

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 508**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2008.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2014** **PCT/CA2014/050326**
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14153674**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2014** **E 14773061 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 2978848**

54 Título: **Producción de partículas similares al virus de la gripe en plantas**

30 Prioridad:

28.03.2013 US 201361806227 P
10.01.2014 US 201461925852 P
27.03.2014 US 201461971274 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 803 508 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 similares al virus de la gripe en plantas

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a la producción de partículas similares a virus en plantas.

10 Antecedentes de la invención

La gripe es causada por un virus de ARN de la familia de los ortomixovíridos. Hay tres tipos de estos virus y causan tres tipos diferentes de gripe: tipo A, B y C. Los virus de la gripe tipo A infectan a mamíferos (seres humanos, cerdos, hurones, caballos) y aves. Esto es muy importante para la humanidad, ya que este es el tipo de virus que ha causado pandemias en todo el mundo. El virus de la gripe tipo B (también conocido simplemente como gripe B) infecta solo a los seres humanos. Ocasionalmente causa brotes locales de gripe. Los virus de la gripe C también infectan solo a los seres humanos. Infectan a la mayoría de las personas cuando son jóvenes y rara vez causan enfermedades graves.

La vacunación proporciona protección contra la enfermedad causada por un agente similar al inducir a un sujeto a levantar una defensa antes de la infección. Convencionalmente, esto se ha logrado mediante el uso de formas vivas atenuadas o inactivadas completas de los agentes infecciosos como inmunógenos. Para evitar el peligro de usar el virus completo (como los virus muertos o atenuados) como vacuna, se han buscado proteínas virales recombinantes, por ejemplo, subunidades, para usar como vacunas. Tanto las vacunas de péptidos como de subunidades están sujetas a una serie de posibles limitaciones. Las vacunas de subunidades pueden exhibir una inmunogenicidad deficiente, debido al plegamiento incorrecto o una presentación de antígeno deficiente. Un problema importante es la dificultad de asegurar que la conformación de las proteínas modificadas genéticamente imita la de los antígenos en su entorno natural. Se deben usar adyuvantes adecuados y, en el caso de péptidos, proteínas transportadoras, para estimular la respuesta inmunitaria. Además, estas vacunas provocan principalmente respuestas humorales y, por lo tanto, pueden no provocar una inmunidad efectiva. Las vacunas de subunidades a menudo son ineficaces para enfermedades en las que se puede demostrar que el virus completo inactivado proporciona protección.

Las partículas similares a virus (VLP) son posibles candidatos para su inclusión en composiciones inmunogénicas. Las VLP se parecen mucho a los viriones maduros, pero no contienen material genómico viral. Por lo tanto, las VLP son de naturaleza no replicativa, lo que las hace seguras para la administración como vacuna. Además, las VLP pueden modificarse genéticamente para expresar glicoproteínas virales en la superficie de la VLP, que es su configuración fisiológica más nativa. Además, dado que las VLP se parecen a viriones intactos y son estructuras particuladas multivalentes, las VLP pueden ser más efectivas para inducir anticuerpos neutralizantes contra la glucoproteína que los antígenos solubles de proteínas de la envoltura.

Las VLP se han producido en plantas (documentos WO2009/009876; WO 2009/076778; WO 2010/003225; WO 2010/003235; WO 2011/03522; WO 2010/148511), y en sistemas de insectos y mamíferos (Noad, R. y Roy, P., 2003, Trends Microbiol 11: 438-44; Neumann y otros, 2000, J. Virol., 74, 547-551). Latham y Galarza (2001, J. Virol., 75, 6154-6165) informaron la formación de VLP de la gripe en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que coexpresan genes de hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), M1 y M2. Este estudio demostró que las proteínas del virión de la gripe se autoensamblan tras la coexpresión en células eucariotas y que la proteína de la matriz M1 era necesaria para la producción de VLP. Gomez-Puertas y otros, (1999, J. Gen. Virol., 80, 1635-1645) mostraron que la sobreexpresión de M2 bloqueó completamente la transmisión de ARN de CAT a los cultivos MDCK.

La glucoproteína de pico hemaglutinina (HA) de los virus de la gripe es de gran importancia para la captación de partículas virales por la célula huésped. Es responsable de su unión a los receptores celulares que contienen ácido siálico, y está involucrada en la penetración del virus a través de la fusión de la envoltura del virus con las membranas celulares. La actividad de fusión y, en consecuencia, la infectividad del virus dependen de la escisión de la molécula precursora de HA, HA0, en las cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, HA1 y HA2. La escisión de un consiguiente cambio conformacional dependiente del pH da como resultado la exposición y la reubicación de un péptido hidrófobo altamente conservado en el extremo amino del polipéptido transmembrana HA2, que media la fusión de la membrana.

HA se sintetiza como una proteína precursora HA0, que se somete a procesamiento proteolítico en dos subunidades (HA1 y HA2) unidas por un puente disulfuro. Se cree que dos características estructurales están involucradas en la escisión de HA: en las HA de escisión restringida, el enlazador generalmente consiste en una única arginina, mientras que las HA escindibles en una amplia gama de diferentes tipos de células tienen una inserción de una serie de múltiples residuos básicos en esta posición con el motivo principal de reconocimiento enzimático Arg-X-Lys/Arg-Arg, en donde X es un aminoácido no básico. Las HA con un sitio de escisión básico múltiple se escinden en la ruta de transporte exocítica antes de que lleguen al sitio de gemación en la superficie celular, en contraste con las HA con un enlazador monobásico que se activan en las partículas de virus en el espacio extracelular o, como se muestra para la cepa WSN, en la etapa de entrada del virus. Un segundo determinante de la escisión de HA parece ser una cadena lateral de carbohidratos que está presente en las proximidades del sitio de escisión e interfiere con la accesibilidad de la proteasa. La pérdida de este carbohidrato dio como resultado una mayor capacidad de escisión de HA y patogenicidad

viral.

Las cepas de virus de la gripe aviar apatogénicas y de mamíferos causan infecciones localizadas anatómicamente como resultado de la variedad restringida de células que secretan una proteasa que puede escindir el precursor HA0 extracelularmente (Chen J, y otros, 1998, Cell. Vol. 95: 409-417). Las proteasas responsables de la escisión de HA0 en las infecciones por gripe en seres humanos, son secretadas por células del tracto respiratorio, o por coinfección de bacterias o micoplasma, o pueden producirse en respuestas inflamatorias a las infecciones. Un candidato de proteasa importante es la tripsina Clara, que es producida por las células Clara del epitelio bronquiolar y tiene una distribución tisular limitada (tracto respiratorio superior). La proteasa es específica para la secuencia monobásica Q/E-X-R encontrada en el sitio de escisión de H1, H2, H3 y H6. Las HA de las cepas H9 y B muestran un sitio de escisión monobásico ligeramente diferente con una secuencia SSR y KER respectivamente. No se ha identificado ninguna proteasa para la mayoría de los virus de la gripe que causan infección entérica y respiratoria en las aves acuáticas. La mayoría de las líneas celulares no admiten la replicación de múltiples ciclos a menos que se agregue proteasa exógena (generalmente tripsina).

Sin embargo, en cepas de aves altamente patógenas, la HA0 es escindida por una familia de proteasas intracelulares más distribuidas, lo que resulta en infecciones sistémicas de gripe. Esta diferencia en patogenicidad se correlaciona con diferencias estructurales en el sitio de escisión de HA0. Las cepas patógenas tienen insertos de aminoácidos polibásicos dentro o al lado del sitio monobásico. La escisión en este caso ocurre intracelularmente y las proteasas involucradas han sido identificadas como furina y otras enzimas similares a la subtilisina, encontradas en el Golgi e involucradas en el procesamiento postraduccional de precursores de hormonas y factores de crecimiento. La secuencia de reconocimiento de furina R-X-R/K-R es un aminoácido de inserción frecuente en los sitios de escisión de HA0 de H5 y H7. La amplia distribución tisular de la enzima, y la eficiencia de la escisión intracelular, contribuyen a la infección sistémica virulenta y de amplia dispersión causada por estos virus.

El sitio de escisión de HA es un objetivo para la atenuación del virus, ya que la escisión de activación del precursor HA0 en los fragmentos HA1 y HA2 por las proteasas del huésped es una etapa en el ciclo de replicación de todas las cepas de virus de la gripe A y B. Solo la HA escindida puede experimentar un cambio conformacional en el medio ácido del endosoma después de la endocitosis mediada por el receptor para exponer el extremo N hidrofóbico del fragmento HA2 para mediar la fusión entre las membranas endosómicas y de los viriones.

Horimoto T, y otros (2006, Vaccine, Vol 24: 3669-3676) describe la abolición del sitio de escisión polibásico de H5 (RERRRKKR↓G) en H5. Los mutantes seleccionados se sometieron al estudio de inmunogenicidad en ratones, incluido un mutante con una delección de los 4 primeros aminoácidos cargados (RERR) y una modificación para inactivar el sitio de escisión polibásico (RKKR con TETR). La abolición del sitio de escisión no afectó las propiedades inmunogénicas del mutante H5. También se ha informado la abolición del sitio polibásico (GERRRKKR↓G reemplazado por RETR) para producir el virus de referencia de la gripe NIBSC 05/240 NIBSC mutante NIBG-23. Hoffman y otros (2002, Vaccine, Vol 20: 3165-3170) reemplazaron el sitio de escisión polibásico de una HA de H5 con el sitio monobásico de H6 para aumentar la expresión en los huevos. Los primeros 4 residuos se eliminaron y los cuatro últimos aminoácidos del sitio polibásico se reemplazaron por IETR (reemplazo de RERRRKKR↓G con IETR↓G). Este H5 mutante mostró un alto nivel de expresión, proteólisis potencial y cambio conformacional a pH bajo necesario para la replicación viral y la producción en la célula huésped, no se informaron datos de inmunogenicidad. Estos estudios muestran que la modificación del sitio de escisión puede emplearse para disminuir la virulencia de la partícula viral (en los casos en que se replican los virus verdaderos), permitiendo que el virus se replique sin matar el huevo huésped. Sin tales mutaciones, los virus matan al huevo antes de alcanzar títulos altos.

El documento WO2013043067 de Sirko y otros, describe una vacuna de ADN para pollos que contiene el ADNc que codifica una proteína de hemaglutinina (HA) de H5 modificada en donde se elimina el sitio de escisión proteolítica entre subunidades de HA. Sirko y otros, plantean que esto proporciona una mayor seguridad de las vacunas y la expresión de un "superantígeno" en forma de un polipéptido largo no procesado. Además, Sirko y otros, afirman que la región codificante de la HA se modifica de tal manera que la producción de proteínas en las células de las aves alcanza el máximo rendimiento. La modificación principal es la optimización de codones para pollo y la eliminación de la región sensible a la proteólisis de HA.

El documento WO 2013/044390 describe un método para producir una partícula similar a virus (VLP) en una planta con hemaglutinina modificada (HA) en donde la proteína HA modificada comprende un bucle proteolítico modificado. La HA modificada se expresa en presencia de la región reguladora HT del virus del mosaico del caupí (CPMV) y el elemento de amplificación de geminivirus del virus del mosaico enano amarillo del frijol (BeYDV).

El documento US 2008/0069821 de Yang y otros, describe variantes de polipéptidos y polinucleótidos de HA de la gripe para su uso en la producción de virus de la gripe como vacunas. Los virus de la gripe reagrupados se obtienen mediante la introducción de un subconjunto de vectores correspondientes a segmentos genómicos de un virus de la gripe maestro, en combinación con segmentos complementarios derivados de las variantes de HA de la gripe. Típicamente, las cepas maestras se seleccionan en base a las propiedades convenientes de interés para la administración de la vacuna. Por ejemplo, para la producción de vacunas, p. ej., para la producción de una vacuna viva atenuada, la cepa maestra del virus donante puede seleccionarse en cuanto a un fenotipo atenuado, adaptación

al frío y/o sensibilidad a la temperatura.

Resumen de la invención

5 Esta invención se refiere a la producción de partículas similares a virus y proteínas HA modificadas en plantas.

Un objeto de la invención es proporcionar una producción mejorada de partículas similares a virus y proteínas HA en plantas.

10 En este documento se describe un ácido nucleico que comprende un potenciador de la expresión activo en una planta y unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una hemaglutinina (HA) modificada de la gripe tipo B que comprende una eliminación completa del bucle proteolítico.

15 Además, en este documento se describe un método para producir partículas similares a virus de la gripe (VLP) en una planta, que comprende:

- a) proporcionar una planta, o una parte de una planta, que comprende un ácido nucleico que comprende un potenciador de la expresión activo en una planta y unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una hemaglutinina (HA) modificada de la gripe que comprende un bucle proteolítico modificado, e
- 20 b) incubar la planta o parte de la planta en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, produciendo así las VLP

25 El método descrito anteriormente puede comprender además las etapas de

- c) cosechar la planta, y
- d) purificar las VLP, en donde las VLP varían en tamaño de 80 a 300 nm.

30 El potenciador de la expresión es CPMVX, CPMVX+ o CPMV-HT+. Además, el ácido nucleotídico no comprende un elemento de amplificación de geminivirus. Por lo tanto, el ácido nucleotídico no comprende una región intergénica larga del virus del mosaico enano amarillo del frijol (BeYDV LIR), y una región intergénica corta de BeYDV (BeYDV SIR). La HA modificada puede comprender un péptido señal nativo o no nativo. Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la HA modificada puede comprender una secuencia de nucleótidos quimérica que codifica, en serie, un ectodominio de HA modificada que comprende un bucle proteolítico completamente eliminado, un dominio transmembrana de la gripe y una cola citoplasmática, en donde el ectodominio de HA modificada es de una primera cepa de gripe y el dominio transmembrana y la cola citoplasmática son de una segunda cepa de gripe.

40 En el presente documento se describe, además, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una hemaglutinina (HA) de la gripe, la secuencia de nucleótidos está unida operativamente con una región reguladora que es activa en una planta, en donde la HA comprende una secuencia de bucle proteolítico completamente eliminada. Se proporciona, además, una planta que comprende el ácido nucleico.

45 Este sumario de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

Breve descripción de los dibujos

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

50 La Figura 1 muestra los componentes utilizados para preparar A-2X35S/CPMV-HT/H5 Indonesia/NOS (Construcción número 489). La Figura 1A muestra el cebador IF-H5A-I-05.s1+3c (SEQ ID NO: 2). La Figura 1B muestra el cebador IF-H5dTm.r (SEQ ID NO: 3). La Figura 1C muestra una representación esquemática de la construcción 1191. La figura 1D muestra la construcción 1191 (SEQ ID NO: 4). La Figura 1E muestra el casete de expresión número 489 (SEQ ID NO: 5). La Figura 1F muestra la secuencia de aminoácidos de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) (SEQ ID NO: 6). La Figura 1G muestra una secuencia de nucleótidos que codifica H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) (SEQ ID NO: 42).

60 La Figura 2 muestra los componentes utilizados para preparar B-2X35S/CPMV HT/M2 New Caledonia/NOS (Construcción número 1261). La Figura 2A muestra el cebador IF-S1-M1+M2ANC.c (SEQ ID NO: 7). La Figura 2B muestra el cebador IF-S1-4-M2ANC.r (SEQ ID NO: 8). La Figura 2C muestra la secuencia de nucleótidos para el gen de M2 sintetizado (correspondiente a los nt 1-26 unidos a 715-982 del número de acceso al Genbank DQ508860) (SEQ ID NO: 9). La Figura 2D muestra el casete de expresión número 1261 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. M2 de la gripe A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) está subrayado. (SEQ ID NO: 10). La Figura 2E muestra la secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) (SEQ ID NO: 11).

La Figura 3 muestra los componentes utilizados para preparar C-2X35S/CPMV-HT/M2 Puerto Rico/NOS (Construcción número 859). La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos del gen de M2 sintetizado (correspondiente a los nt 26-51 unidos a los nt 740-1007 del número de acceso al Genbank EF467824) (SEQ ID NO: 12). La figura 3B muestra el casete de expresión número 859 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. M2 de la Gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) está subrayado. (SEQ ID NO: 13). La Figura 3C muestra la secuencia de aminoácidos de M2 de la Gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (SEQ ID NO: 14).

La Figura 4 muestra los componentes utilizados para preparar G-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV+Replicasa (Construcción número 1008). La Figura 4A muestra una representación esquemática de la construcción 1194. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación. La Figura 4B muestra la construcción 1194 desde el límite izquierdo al derecho de ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV+Replicasa con casete de expresión de inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina (SEQ ID NO: 31). La Figura 4C muestra el casete de expresión número 1008 desde LIR izquierda de BeYDV a LIR derecha de BeYDV. PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 está subrayado. (SEQ ID NO: 32).

La Figura 5 muestra los componentes utilizados para preparar I-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane con bucle proteolítico eliminado/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV+Replicasa (Construcción número 1059). La Figura 5A muestra el cebador 1039+1059.r (SEQ ID NO: 38). La Figura 5B muestra el cebador 1039+1059.c (SEQ ID NO: 39). La Figura 5C muestra el casete de expresión número 1059 desde LIR izquierda de BeYDV a LIR derecha de BeYDV. El PDISP/HA de la Gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado está subrayado (SEQ ID NO: 40). La Figura 5D muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la Gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 41). La Figura 5E muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA de la Gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 43).

La Figura 6 muestra los componentes utilizados para preparar B-2X35S/CPMV-HT/HA B Wisconsin/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa (Construcción número 1462). La Figura 6A muestra el cebador IF-HAB110.S1+3c (SEQ ID NO: 49). La Figura 6B muestra el cebador IF-HAB110.s1-4r (SEQ ID NO: 50). La Figura 6C muestra la secuencia de nucleótidos de HA B Wisconsin sintetizada (número de acceso al Genbank JN993010) (SEQ ID NO: 51). La figura 6D muestra una representación esquemática de la construcción 193. La Figura 6E muestra la construcción 193 desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa con casete de expresión de inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina (SEQ ID NO: 52). La Figura 6F muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1462 desde el promotor 2X35S hasta el terminador NOS. HA de la Gripe B/Wisconsin/1/2010 está subrayada (SEQ ID NO: 53). La Figura 6G muestra la secuencia de aminoácidos de HA de la Gripe B/Wisconsin/1/2010 (SEQ ID NO: 54). La Figura 6H muestra una representación esquemática de la construcción 1462.

La Figura 7 muestra los componentes utilizados para preparar C-2X35S/CPMV-HT/HA B Wisconsin con bucle proteolítico eliminado/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa (Construcción número 1467). La Figura 7A muestra el cebador HAB110(PrL-).r (SEQ ID NO: 55). La Figura 7B muestra el cebador HAB110(PrL-).c (SEQ ID NO: 56). La Figura 7C muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1467 desde el promotor 2X35S hasta el terminador NOS. La HA de la Gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado está subrayada (SEQ ID NO: 57). La Figura 7D muestra la secuencia de aminoácidos de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 58). La Figura 7E muestra una representación esquemática de la construcción 1467.

La Figura 8 muestra los componentes utilizados para preparar A-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane con bucle proteolítico eliminado/NOS (Construcción número 1039). La Figura 8A muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1039 desde el promotor 2X35S hasta el terminador NOS. La HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado está subrayada (SEQ ID NO: 15). La Figura 8B muestra una representación esquemática de la construcción 1039.

La Figura 9 muestra el mapa plasmídico de la construcción número 1008. La construcción número 1008 dirige la expresión de HA natural de la cepa de la gripe B/Brisbane/60/2008. Esta construcción comprende elementos derivados de BeYDV para la amplificación de ADN.

La Figura 10 muestra el mapa plasmídico de la construcción número 1059. La construcción número 1059 dirige la expresión de una HA mutante de la cepa de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado. Esta construcción comprende elementos derivados de BeYDV para la amplificación de ADN.

La Figura 11 muestra el mapa plasmídico de la construcción número 1261. La construcción número 1261 dirige la expresión del M2 natural de la cepa de la gripe A/New Caledonia/20/99 (H1N1).

La Figura 12 muestra el mapa plasmídico de la construcción número 859. La construcción número 859 dirige la expresión del M2 natural de la cepa de la gripe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).

La Figura 13A muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína HA en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. "1008": expresión de HA natural de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); "1008+1261": coexpresión de HA natural de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 de A/New Caledonia/20/99; "1059": expresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); "1059+1261": coexpresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 a partir de A/New Caledonia/20/99. Se analizaron plantas de tres infiltraciones separadas (A, B y C). Las relaciones indican la proporción de cultivos de *Agrobacterium* utilizados en experimentos de coexpresión. La Figura 13B muestra una comparación de la capacidad de hemaglutinación de extractos proteicos crudos de plantas productoras de HA.

La Figura 14 muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína HA en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. "1059": expresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); "1059+1261": coexpresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 de A/New Caledonia/20/99. "1059+859": coexpresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 de A/Puerto Rico/8/34. Se analizaron plantas de tres infiltraciones separadas (A, B y C). Las relaciones indican la proporción de cultivos de *Agrobacterium* utilizados en experimentos de coexpresión.

La Figura 15 muestra la alineación de secuencias de aminoácidos de la región que rodea el enlazador de las HA de varias cepas de gripe: H1 New Cal (SEQ ID NO: 22); H1 Brisbane (SEQ ID NO: 23); H1 Sol Islands (SEQ ID NO: 24); H2A Singapore (SEQ ID NO: 25); H3A Brisbane (SEQ ID NO: 26); H3A WCN (SEQ ID NO: 27); H5 Anhui (SEQ ID NO: 28); H5 Indo (SEQ ID NO: 29); H5 Vietnam (SEQ ID NO: 30); H6 Teal HK (SEQ ID NO: 33); H7 Eq Prague (SEQ ID NO: 34); H9A HK (SEQ ID NO: 35); B Florida (SEQ ID NO: 36); B Malaysia (SEQ ID NO: 37). El sitio de escisión del precursor HA0 se indica mediante una flecha.

La Figura 16A muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína HA en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. HA de B/Wisconsin/1/2010 se coexpresa con M2 de A/New Caledonia/20/99. Se cargaron diez microgramos de extracto de proteína por carril. "C+": control positivo, virus B/Wisconsin/1/2010 semipurificado del Instituto Nacional de Normas y Control Biológicos, Reino Unido; "1462": expresión de HA natural de B/Wisconsin/1/2010 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); "1467": expresión de la HA mutante de B/Wisconsin/1/2010 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); "1462+1261": coexpresión de HA natural de B/Wisconsin/1/2010 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2; "1467+1261": coexpresión de la HA mutante de B/Wisconsin/1/2010 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2. Las relaciones indican la densidad óptica para cada cultivo de *Agrobacterium* utilizado en experimentos de expresión y coexpresión. La Figura 16B muestra una comparación de la capacidad de hemaglutinación de extractos proteicos crudos de plantas transformadas con AGL1/1462, AGL1/1467, AGL1/1462+AGL1/1261 y AGL1/1467+AGL1/1261.

Las Figuras 17A y 17B muestran un análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína HA en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. "1008": expresión de HA natural de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); "1008+1261": coexpresión de HA natural de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 de A/New Caledonia/20/99; "1039": expresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en ausencia de elementos de amplificación (BeYDV). "1039+1261": coexpresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en ausencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 de A/New Caledonia/20/99. HA de A/Brisbane/59/2007 (H1N1). "1059": expresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV); "1059+1261": coexpresión de HA mutante de B/Brisbane/60/2008 en presencia de elementos de amplificación (BeYDV) con M2 de A/New Caledonia/20/99.

La Figura 18A muestra la representación esquemática de la escisión del HA0 por la proteasa similar a Clara y/o similar a Furina en HA1 y HA2. La Figura 18B muestra la alineación de secuencias de HA de varias cepas de gripe: H1 New Cal (SEQ ID NO: 22); H1 Brisbane (SEQ ID NO: 23); H1 Sol Islands (SEQ ID NO: 24); H2A Singapore (SEQ ID NO: 25); H3A Brisbane (SEQ ID NO: 26); H3A WCN (SEQ ID NO: 27); H5 Anhui (SEQ ID NO: 28); H5 Indo (SEQ ID NO: 29); H5 Vietnam (SEQ ID NO: 30); H6 Teal HK (SEQ ID NO: 33); H7 Eq Prague (SEQ ID NO: 34); H9A HK (SEQ ID NO: 35); B Florida (SEQ ID NO: 36); B Malaysia (SEQ ID NO: 37). La Figura 18C muestra la eliminación de parte del sitio de escisión en cepas H5, A/Anhui/1/2005 (H5N1) SEQ ID NO: 69, A/Indonesia/5/2005 (H5N1) SEQ ID NO: 70, A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) SEQ ID NO: 71, y cepas de tipo B, B/Florida/4/2006 SEQ ID NO: 72, y B/Malaysia/2506/2004 SEQ ID NO: 73.

La Figura 19 muestra la mutación del sitio de escisión en H5/Indo. Secuencia nativa (SEQ ID NO: 44); sitio de escisión modificado de H5/Indo que comprende TETR (SEQ ID NO: 45); sitio de escisión modificado de H5/Indo que comprende TETQ (SEQ ID NO: 46).

La Figura 20 muestra los títulos encontrados en las biomásas iniciales después de la extracción enzimática de diferentes HA de H5/Indo modificadas que comprenden mutaciones dentro del bucle proteolítico. Control de H5/Indo (construcción 489); bucle proteolítico de H5/Indo reemplazado con un enlazador GG (construcción 928); bucle proteolítico de H5/Indo reemplazado con un enlazador TETR (construcción 676); bucle proteolítico de H5/Indo reemplazado con un enlazador TETQ (construcción 766).

La Figura 21 muestra varios enfoques para modificar el bucle proteolítico de HA tipo B. La Figura 21A muestra la secuencia de aminoácidos de B/Brisbane/60/2008 nativa (SEQ ID NO: 16). La parte subrayada es el bucle proteolítico y el dominio HA2. La Figura 21B muestra la secuencia de aminoácidos de B/Brisbane/60/2008 con el bucle proteolítico modificado (SEQ ID NO: 17), en donde 19 residuos de aminoácidos que comprenden la secuencia AKLLKERGFFGAIGFLEG se han reemplazado con un enlazador GG (cursiva). La Figura 21 C muestra la secuencia de aminoácidos de B/Brisbane/60/2008 (SEQ ID NO: 18), en donde 9 aminoácidos que comprenden la secuencia PPAKLLKER se han reemplazado por un enlazador –GSSSGSSSG– (cursiva). La Figura 21 D muestra la secuencia de aminoácidos de H3 A/Perth/16/2009 nativa (SEQ ID NO: 19). La Figura 21 E muestra la secuencia de aminoácidos de H3 A/Perth/16/2009 (SEQ ID NO: 20) con 12 restos de aminoácidos que comprenden la secuencia RNVPEKQTRGIF reemplazada por un enlazador GS (cursiva). La Figura 21 F muestra la secuencia de aminoácidos de H3 A/Perth/16/2009 (SEQ ID NO: 21) con 9 restos de aminoácidos que comprenden la secuencia RNVPEKQTR reemplazada por un enlazador GSSSGSSSGS (cursiva).

La Figura 22 muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína HA en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. HA de H5/Indo. Panel superior lista de componentes cargados en cada carril; panel inferior Western blot. C: H5 recombinante Indonesia/5/05 S-STD-0002; anticuerpo primario: Anti-HA A/Indonesia/05/2005 CBER # S-BIO-0003 1/50 000; transferencia. Carriles 1 y 2: control de H5/Indo (construcción 489); carriles 3 y 4 bucle proteolítico de H5/Indo reemplazado con un enlazador GG (construcción 928); carriles 5 y 6 bucle proteolítico de H5/Indo reemplazado con un enlazador TETR (construcción 676); carriles 7 y 8 bucle proteolítico de H5/Indo reemplazado con un enlazador TETQ (construcción 766); carril 9 marcador de peso molecular; carril 10 control de H5.

La Figura 23 muestra los componentes utilizados para preparar B-2X35S/CPMV-HT/H5 de A/Indonesia/5/2005 con mutación TETR del sitio de escisión (Construcción número 676). La Figura 23A muestra la secuencia del cebador MutCleavage-H5(Indo).r (SEQ ID NO: 74). La Figura 23B muestra la secuencia del cebador MutCleavage-H5(Indo).c (SEQ ID NO: 75). La Figura 23C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 76) para el casete de expresión 676 desde el promotor 2X35S hasta el terminador NOS. El mutante TETR del sitio de escisión de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) está subrayado. La Figura 23D muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 77) de un mutante TETR del sitio de escisión de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1). La Figura 23E muestra una representación esquemática de la construcción número 676.

La Figura 24 muestra los componentes utilizados para preparar B-2X35S/CPMV-HT/H5 de A/Indonesia/5/2005 con mutación TETQ del sitio de escisión (Construcción número 766). La Figura 24A muestra la secuencia del cebador H5I505_TETQ.r (SEQ ID NO: 78). La Figura 24B muestra la secuencia del cebador H5I505_TETQ.c (SEQ ID NO: 79). La Figura 24C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 80) para el casete de expresión 766 desde el promotor 2X35S hasta el terminador NOS. El mutante TETQ del sitio de escisión de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) está subrayado. La Figura 24D muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 81) de un mutante TETQ del sitio de escisión de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1). La Figura 24E muestra una representación esquemática de la construcción número 766.

La Figura 25 muestra los componentes utilizados para preparar B-2X35S/CPMV-HT/H5 de A/Indonesia/5/2005 con bucle proteolítico eliminado (Construcción número 928). La Figura 25A muestra la secuencia del cebador H5I505(PrL-).r (SEQ ID NO: 82). La Figura 25B muestra la secuencia del cebador H5I505(PrL-).c (SEQ ID NO: 83). La Figura 25C muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 84) para el casete de expresión 928 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) el bucle proteolítico eliminado está subrayado. La Figura 25D muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 85) de un mutante de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) que comprende un bucle proteolítico eliminado. La Figura 25E muestra una representación esquemática de la construcción número 928.

La Figura 26A muestra un esquema general de un ejemplo de varias secuencias potenciadoras, CPMVX y CPMVX+ (que comprende CPMVX y un fragmento de relleno, que en este ejemplo no limitante, comprende un sitio de clonación múltiple y una secuencia Kozak de plantas), como se describe en el presente documento. CPMCX y CPMVX+ se muestran cada uno unidos operativamente a la región reguladora en plantas en sus extremos 5' y en sus extremos 3', en serie, una secuencia de nucleótidos de interés (que incluye un sitio de inicio ATG y un sitio de PARADA), una 3'UTR, y una secuencia terminadora. Un ejemplo de construcción CPMVX como se describe en este documento, es CPMV160. Un ejemplo de construcción CPMVX+ como se describe en este documento, es CPMV160+. La Figura 26B muestra los títulos relativos de hemaglutinación (HMG) en extractos proteicos crudos de proteínas HA modificadas producidas en plantas que comprenden construcciones de expresión CPMV-HT y construcciones de expresión basadas en CPMV160+. Se muestran datos para la expresión de HA B Brisbane/60/08 con bucle proteolítico eliminado y con un péptido señal de PDI (Construcción número 1039, 5'UTR: CMPV HT; y construcción número 1937, 5'UTR: CMPV160+; ver el Ejemplo 5.7), B Brisbane/60/08+H1Tm, con bucle proteolítico eliminado, con dominio transmembrana y cola citoplasmática reemplazados por los de H1, B Massachusetts/2/2012 2012 con bucle proteolítico eliminado y con un péptido señal de PDI (construcción número 2072, 5'UTR: CMPV HT; y construcción número 2050, 5'UTR: CMPV160+; ver el Ejemplo 5.14), B Massachusetts/2/2012+H1Tm con bucle proteolítico eliminado, con dominio transmembrana y cola citoplasmática reemplazados por los de H1 A/California/07/2009 y con

un péptido señal de PDI (construcción número 2074, 5'UTR: CMPV HT; y construcción número 2060, 5'UTR: CMPV160+; ver el Ejemplo 5.15), B Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado y con el péptido señal nativo (construcción número 1445, 5'UTR: CMPV HT; y construcción número 1975, 5'UTR: CMPV160+; ver el Ejemplo 5.16), y B Wisconsin/1/2010+H1Tm con bucle proteolítico eliminado, con dominio transmembrana y cola citoplasmática reemplazados por los de H1 A/California/07/2009 y con el péptido señal nativo (construcción número 1454, 5'UTR: CMPV HT; y construcción número 1893, 5'UTR: CMPV160+; ver el Ejemplo 5.18).

La Figura 27A muestra un esquema general de la secuencia potenciadora de CPMV HT y CPMV HT+ fusionado a una secuencia de nucleótidos de interés. No todos los elementos mostrados en esta figura pueden ser necesarios dentro de la secuencia potenciadora. Se pueden incluir elementos adicionales en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos de interés (no mostrada) que incluyen una secuencia que codifica una región no traducida (UTR) 3' de comovirus, una 3'UTR de plastocianina, o una combinación de la 3'UTR de comovirus y la 3'UTR de plastocianina. La Figura 27B muestra el título relativo de hemaglutinación (HMG) en extractos proteicos crudos de proteínas producidas en plantas que comprenden construcciones de expresión de CPMV-HT, y construcciones de expresión basadas en CPMV HT+, unidas operativamente con una secuencia de nucleótidos de interés. Se muestran datos para la expresión de HA B Brisbane/60/08 con bucle proteolítico eliminado y con un péptido señal de PDI (Construcción número 1039: CPMV HT; ver el Ejemplo 5.7 y construcción número 1829: CPMV HT+; ver el ejemplo 5.12), B Brisbane/60/08 + H1TM con bucle proteolítico eliminado, con dominio transmembrana y cola citoplasmática reemplazados por los de H1 A/California/07/2009, y con un péptido señal de PDI (construcción número 1067: CPMV HT; ver el Ejemplo 5.14 y construcción número 1875: CPMV HT+; ver el ejemplo 5.19), B Massachusetts/2/2012 con bucle proteolítico eliminado y con un péptido señal de PDI (Construcción número 2072: CPMV HT; ver el ejemplo 5.15 y la construcción número 2052: CPMV HT+; ver el ejemplo 5.20), B Massachusetts/2/2012+H1Tm con bucle proteolítico eliminado, con dominio transmembrana y cola citoplasmática reemplazados por los de H1 A/California/07/2009 y con un péptido señal de PDI (construcción número 2074: CPMV HT; ver el Ejemplo 5.16 y construcción número 2062: CPMV HT+; ver el Ejemplo 5.21), B Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado y con el péptido señal nativo (construcción número 1445: CPMV HT; ver el Ejemplo 5.17 y construcción número 1839: CPMV HT+; ver el Ejemplo 5.22), y B Wisconsin/1/2010+H1Tm con bucle proteolítico eliminado, con dominio transmembrana y cola citoplasmática reemplazados por los de H1 A/California/07/2009 y con el péptido señal nativo (construcción número 1454: CPMV HT; ver el ejemplo 5.18 y la construcción número 1860: CPMV HT+; ver el ejemplo 5.23).

La Figura 28A muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína H3 Perth en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. Carril 1: (2019+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de H3 Perth-16-09 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-HT+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 2: (2139+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de H3 Perth-16-09 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV 160+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 3 (2039+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de H3 Perth-16-09 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV HT+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 4: (2159+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de H3 Perth-16-09 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV 160+) con M2 de A/New Caledonia/20/99.

La Figura 28B muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína B Malaysia en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. Carril 2: (2013+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de B Malaysia 2506-04 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-160+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 2: (2014+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de B Malaysia 2506-04 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV 160+) con M2 de A/New Caledonia/20/99.

La Figura 28C muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína H9 Hong Kong en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. Carril 1: (1610+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de H9 Hong Kong -1037-99 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-HT) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 2: (1630+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de H9 Hong Kong -1037-99 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-HT+) y elemento de amplificación BEYDV con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 3: (2244+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de H9 Hong Kong -1037-99 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-HT+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 4: (2226+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de H9 Hong Kong -1037-99 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV 160+) con M2 de A/New Caledonia/20/99. Carril 6: (2246+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de H9 Hong Kong -1037-99 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-160+) y elemento de amplificación de BeYDV con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 7: (2225+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de H9 Hong Kong -1037-99 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-HT+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 8: (2245+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de H9 Hong Kong -1037-99 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV HT+) y elemento de amplificación de BeYDV con M2 de A/New Caledonia/20/99. Carril 9: (2227+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de H9 Hong Kong -1037-99 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV 160+) con M2 de A/New Caledonia/20/99. Carril 10: (2247+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de H9 Hong Kong -1037-99 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV 160+) y elemento de amplificación de BeYDV con M2 de A/New Caledonia/20/99.

La Figura 28D muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína B Massachusetts en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. Carril 1: (2070+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de B

Massachusetts -2-12 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-HT) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 2: (2080+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de B Massachusetts -2-12 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-HT+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 3: (2090+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de B Massachusetts -2-12 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-160+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 4: (2072+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de B Massachusetts -2-12 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV HT) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 5: (2052+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de B Massachusetts -2-12 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV HT+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 6: (2050+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de B Massachusetts -2-12 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV 160+) con M2 de A/New Caledonia/20/99.

La Figura 28E muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína H2 Sin en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. Carril 1: (2220+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de H2 Singapore -1-57 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-HT+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 2: (2222+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de H2 Singapore -1-57 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV 160+) con M2 de A/New Caledonia/20/99. Carril 3: (2221+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de H2 Singapore -1-57 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-HT+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 4: (2223+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de H2 Singapore -1-57 en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV 160+) con M2 de A/New Caledonia/20/99.

La Figura 28F muestra un análisis de transferencia Western de la expresión de la proteína B/Florida en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. Carril 1: (1004+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de B/Florida en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-HT) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 2: (1003+1261) coexpresión de HA nativa (natural) de B/Florida en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV HT) y elemento de amplificación de BeYDV con M2 de A/New Caledonia/20/99. Carril 3: (2102+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de B/Florida en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV-HT+) con M2 de A/New Caledonia/20/99; Carril 4: (2104+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de B/Florida en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV HT+) y elemento de amplificación de BeYDV con M2 de A/New Caledonia/20/99. Carril 5: (2106+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de B/Florida+H1 California TMCT en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV HT+) con M2 de A/New Caledonia/20/99. Carril 6: (2108+1261) coexpresión de HA mutante (modificada) de B/Florida+H1 California TMCT en presencia de un potenciador de la expresión (CPMV HT+) y elemento de amplificación de BeYDV con M2 de A/New Caledonia/20/99.

La Figura 29A muestra el título relativo de HA modificada de diversas cepas de la gripe que se expresaron en presencia del elemento potenciador de CPMV HT, CPMV HT+ o CPMV 160+. La actividad se compara con la proteína HA nativa expresada con el mismo elemento potenciador. H3 A Perth/16/09 (H3 Per1609), H3 Victoria/361/11 (H3 Vic26111), B Brisbane 60/2008 (HB Bris60008), B Malaysia 2506/04 (HB Mal 250604) y B Massachusetts 2/12 (Ma212) se coexpresaron con la proteína M2 de la gripe.

La Figura 30A muestra el cebador IF-S2+S4-B Bris.c (SEQ ID NO: 86). La Figura 30B muestra el cebador IF-S1a4-B Bris.r (SEQ ID NO: 87). La Figura 30C muestra la secuencia de nucleótidos del gen de HA B Brisbane sintetizado (correspondiente a los nt 34-1791 del número de acceso al Genbank FJ766840) (SEQ ID NO: 88). La Figura 30D muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 1029 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 está subrayado. (SEQ ID NO: 89). La Figura 30E muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 (SEQ ID NO: 90). La Figura 30F muestra una representación esquemática de la construcción 1029. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

La Figura 31 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 1039 y 1829 (2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Brisbane (PrL-) NOS y 2X35S/CPMV HT+ PDISP/HA B Brisbane (PrL-) NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 5.12). La construcción número 1039 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (PDISP/HA B Brisbane (PrL-)). La construcción número 1829 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno que comprende una proteína M incompleta, un sitio de clonación múltiple y una secuencia Kozak de plantas y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV HT+. PDISP: péptido señal de proteína disulfuro isomerasa; NOS: terminador de nopalina sintasa; PrL-: bucle proteolítico eliminado. La Figura 31A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-) (SEQ ID NO: 91). La Figura 31B muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-); SEQ ID NO: 92). La Figura 31C muestra una representación esquemática de la construcción número 1829 (2X35S/CPMV HT+).

La Figura 32 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 1039 y 1937 (2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Brisbane (PrL-) NOS y 2X35S/CPMV160+ PDISP/HA B Brisbane (PrL-) NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 5.7). La construcción número 1039 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (PDISP/HA B Brisbane (PrL-)). La construcción número 1937 incluye una 5'UTR de CPMV

que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno (sitio de clonación múltiple) y una secuencia kozak de plantas (esta construcción no comprende una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV160+ (CPMVX+, donde X=160). PDISP: péptido señal de proteína disulfuro isomerasa; NOS: terminador de nopalina sintasa; PrL-: bucle proteolítico eliminado. La Figura 32A muestra una representación esquemática de la construcción número 1937 (2X35S/CPMV160+; una construcción basada en CPMVX+, donde X=160).

La Figura 33 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 1067 y 1977 (2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT NOS y 2X35S/CPMV160+ PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 5.14). La construcción número 1067 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT). La construcción número 1977 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno (sitio de clonación múltiple) y una secuencia kozak de plantas (esta construcción no comprende una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV160+ (CPMVX+, donde X=160). PDISP: péptido señal de proteína disulfuro isomerasa; NOS: terminador de nopalina sintasa; PrL-: bucle proteolítico eliminado; TMCT: cola citoplasmática del dominio transmembrana. La Figura 33A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT (SEQ ID NO: 95). La Figura 33B muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT (SEQ ID NO: 96). La Figura 33C muestra una representación esquemática de la construcción número 1067 (2X35S/CPMV HT; construcción de referencia). La Figura 33D muestra una representación esquemática de la construcción número 1977 (2X35S/CPMV160+; una construcción basada en CPMVX+, donde X=160).

La Figura 34 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2072 y 2050 (2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) NOS y 2X35S/CPMV160+ PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 5.15). La construcción número 2072 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)). La construcción número 2050 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno (sitio de clonación múltiple) y una secuencia kozak de plantas (esta construcción no comprende una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV160+ (CPMVX+, donde X=160). PDISP: péptido señal de proteína disulfuro isomerasa; NOS: terminador de nopalina sintasa; PrL-: bucle proteolítico eliminado. La Figura 34A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) (SEQ ID NO: 97). La Figura 34B muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) (SEQ ID NO: 98). La Figura 34C muestra una representación esquemática de la construcción número 2072 (2X35S/CPMV HT; construcción de referencia). La Figura 34D muestra una representación esquemática de la construcción número 2050 (2X35S/CPMV160+; una construcción basada en CPMVX+, donde X=160).

La Figura 35 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2074 y 2060 (2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT NOS y 2X35S/CPMV160+ PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 5.16). La construcción número 2074 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT). La construcción número 2060 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno (sitio de clonación múltiple) y una secuencia kozak de plantas (esta construcción no comprende una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV160+ (CPMVX+, donde X=160). PDISP: péptido señal de proteína disulfuro isomerasa; NOS: terminador de nopalina sintasa; PrL-: bucle proteolítico eliminado; TMCT: cola citoplasmática del dominio transmembrana. La Figura 35A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT (SEQ ID NO: 99). La Figura 35B muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT (SEQ ID NO: 100). La Figura 35C muestra una representación esquemática de la construcción número 2074 (2X35S/CPMV HT; construcción de referencia). La Figura 35D muestra una representación esquemática de la construcción número 2060 (2X35S/CPMV160+; una construcción basada en CPMVX+, donde X=160).

La Figura 36 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 1445, 1820 y 1975 (2X35S/CPMV HT HA B Wisconsin (PrL-) NOS, 2X35S/CPMV160+ HA B Wisconsin (PrL-) NOS y 2X35S/CPMV160 HA B Wisconsin (PrL-) NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 15.17). La construcción número 1445 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (HA B Wisconsin (PrL-)). La construcción número 1820 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno (sitio de clonación múltiple) y una secuencia kozak de plantas (esta construcción no comprende una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV160+ (CPMVX+, donde X=160). La construcción

número 1975 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, y no incluye un fragmento de relleno (sitio de clonación múltiple) o una secuencia kozak de plantas (esta construcción tampoco comprende una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y es un ejemplo de una construcción basada en "CPMV160" (CPMVX). PrL-: bucle proteolítico eliminado; NOS: terminador de nopalina sintasa. La Figura 36A muestra la secuencia de nucleótidos de HA B Wisconsin (PrL-) (SEQ ID NO: 101). La Figura 36B muestra la secuencia de aminoácidos de HA B Wisconsin (PrL-) (SEQ ID NO: 102). La Figura 36C muestra una representación esquemática de la construcción número 1445 (2X35S/CPMV HT; construcción de referencia). La Figura 36D muestra una representación esquemática de la construcción número 1820 (2X35S/CPMV160+; una construcción basada en CPMVX+). La Figura 36E muestra una representación esquemática de la construcción número 1975 (2X35S/CPMV160; una construcción basada en CPMVX, donde X=160).

La Figura 37 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 1454 y 1893 (2X35S/CPMV HT HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT NOS y 2X35S/CPMV160+ HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 5.18). La construcción número 1454 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT). La construcción número 1893 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno (sitio de clonación múltiple) y una secuencia kozak de plantas (esta construcción no comprende una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV160+ (CPMVX+, donde X=160). NOS: terminador de nopalina sintasa; PrL-: bucle proteolítico eliminado; TMCT: cola citoplasmática del dominio transmembrana. La Figura 37A muestra la secuencia de nucleótidos de HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT (SEQ ID NO: 103). La Figura 37B muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT (SEQ ID NO: 104). La Figura 37C muestra una representación esquemática de la construcción número 1454 (2X35S/CPMV HT; construcción de referencia). La Figura 37D muestra una representación esquemática de la construcción número 1893 (2X35S/CPMV160+; una construcción basada en CPMVX+, donde X=160).

La Figura 38 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 1067 y 1875 (2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT NOS y 2X35S/CPMV HT+ PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 5.19). La construcción número 1067 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT). La construcción número 1875 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno que comprende una proteína M incompleta, un sitio de clonación múltiple y una secuencia Kozak de plantas y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV HT+. PDISP: péptido señal de proteína disulfuro isomerasa; NOS: terminador de nopalina sintasa; PrL-: bucle proteolítico eliminado; TMCT: cola citoplasmática del dominio transmembrana. La Figura 38A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT (SEQ ID NO: 105). La Figura 38B muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT (SEQ ID NO: 106). La Figura 38C muestra una representación esquemática de la construcción número 1875 (2X35S/CPMV160+).

La Figura 39 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2072 y 2052 (2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) NOS y 2X35S/CPMV HT+ PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 5.20). La construcción número 2072 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)). La construcción número 2052 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno que comprende una proteína M incompleta, un sitio de clonación múltiple y una secuencia kozak de plantas y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV HT+. PDISP: péptido señal de proteína disulfuro isomerasa; NOS: terminador de nopalina sintasa; PrL-: bucle proteolítico eliminado. La Figura 39A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) (SEQ ID NO: 107). La Figura 39B muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) (SEQ ID NO: 108). La Figura 39C muestra una representación esquemática de la construcción número 2052 (2X35S/CPMV HT+).

La Figura 40 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2074 y 2062 (2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT NOS y 2X35S/CPMV HT+ PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 5.21). La construcción número 2074 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT). La construcción número 2062 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno que comprende una proteína M incompleta, un sitio de clonación múltiple y una secuencia kozak de plantas y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV HT+. PDISP: péptido señal de proteína disulfuro isomerasa; NOS: terminador de nopalina sintasa; PrL-: bucle proteolítico eliminado; TMCT: cola citoplasmática del dominio transmembrana. La Figura 40A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1

California TMCT (SEQ ID NO: 109). La Figura 40B muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT (SEQ ID NO: 110). La Figura 40C muestra una representación esquemática de la construcción número 2062 (2X35S/CPMV HT+).

La Figura 41 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 1445 y 1839 (2X35S/CPMV HT HA B Wisconsin (PrL-) NOS, y 2X35S/CPMV HT+ HA B Wisconsin (PrL-) NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 5.22). La construcción número 1445 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (HA B Wisconsin (PrL-)). La construcción número 1839 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno que comprende una proteína M incompleta, un sitio de clonación múltiple y una secuencia Kozak de plantas y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV HT+. PrL-: bucle proteolítico eliminado; NOS: terminador de nopalina sintasa. La Figura 41A muestra la secuencia de nucleótidos de HA B Wisconsin (PrL-) (SEQ ID NO: 111). La Figura 41B muestra la secuencia de aminoácidos de HA B Wisconsin (PrL-) (SEQ ID NO: 112). La Figura 41C muestra una representación esquemática de la construcción número 1839 (2X35S/CPMV HT+).

La Figura 42 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 1454 y 1860 (2X35S/CPMV HT HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT NOS y 2X35S/CPMV HT+ HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT NOS, respectivamente; ver el Ejemplo 5.23). La construcción número 1454 incorpora una secuencia de CPMV-HT de la técnica anterior (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT). La construcción número 1860 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno que comprende una proteína M incompleta, un sitio de clonación múltiple y una secuencia Kozak de plantas y es un ejemplo de una construcción basada en HT+ de CPMV. NOS: terminador de nopalina sintasa; PrL-: bucle proteolítico eliminado; TMCT: cola citoplasmática del dominio transmembrana. La Figura 42A muestra la secuencia de nucleótidos de HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT (SEQ ID NO: 113). La Figura 42B muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT (SEQ ID NO: 114). La Figura 42C muestra una representación esquemática de la construcción número 1893 (2X35S/CPMV HT+).

La Figura 43 muestra los componentes de secuencia usados para preparar la construcción número 489 (2X35S/CPMV HT H5 Indonesia NOS, ver el Ejemplo 5.24). La construcción número 489 incorpora una secuencia de CPMV-HT (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y no comprende una secuencia kozak heteróloga entre la 5'UTR y la secuencia de nucleótidos de interés (PDISP/H1 California). La Figura 43A muestra la secuencia de nucleótidos de H5 Indonesia nativa (SEQ ID NO: 115). La Figura 43B muestra la secuencia de aminoácidos de H5 Indonesia nativa (SEQ ID NO: 116). La Figura 43C muestra una representación esquemática de la construcción número 489 (2X35S/CPMV HT; construcción de referencia).

La Figura 44 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar la construcción número 1800 (A-2X35S CPMV160+ PDISP H3Victoria NOS; ver el ejemplo 5.25). La construcción número 1800 incluye una 5'UTR de CPMV que comprende 160 nucleótidos, un fragmento de relleno (sitio de clonación múltiple) y una secuencia kozak de plantas (esta construcción no comprende una secuencia que codifica una proteína M incompleta) y es un ejemplo de una construcción basada en CPMV160+ (CPMVX+, donde X=160). PDISP: péptido señal de proteína disulfuro isomerasa. NOS: terminador de nopalina sintasa. La Figura 44A muestra la secuencia del cebador IF**(SacII)-PDI.s1+4c (SEQ ID NO: 117). La Figura 44B muestra la secuencia del cebador IF-H3V36111.s1-4r (SEQ ID NO: 118). La Figura 44C muestra la secuencia de PDISP/H3 Victoria (SEQ ID NO: 119). La Figura 44D muestra una representación esquemática de la construcción 2171 (se indican los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización de plásmidos). La Figura 44E muestra la construcción 2171 desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t (subrayados), 2X35S/CPMV160+/NOS con casete de expresión de inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina, una cola citoplasmática transmembrana de H1 California y la 3'UTR de CPMV (SEQ ID NO: 120). La Figura 44F muestra el casete de expresión número 1800 desde el promotor 2X35S hasta el terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Victoria está subrayada; la 5'UTR se muestra en negrita; la secuencia kozak de plantas está subrayada doble; un fragmento de relleno (sitio de clonación múltiple) de 16 pares de bases se ubica entre la 5'UTR y la secuencia Kozak de plantas (SEQ ID NO: 121). La Figura 44G muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 Victoria (SEQ ID NO: 122). La Figura 44H muestra una representación esquemática de la construcción número 1800 (una construcción basada en CPMVX+, donde X=160).

La Figura 45 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar la construcción número 1819 (2X35S CPMV-HT+ PDISP H3Victoria NOS). La construcción número 1819 incorpora una secuencia de CPMV-HT+ (5'UTR de CMPV con codón de inicio mutado en la posición 161 fusionado a un fragmento de relleno que codifica una proteína M incompleta, un sitio de clonación múltiple, y comprende una secuencia kozak de plantas entre el sitio de clonación múltiple y la secuencia de nucleótidos de interés (PDISP/H3 Victoria)). PDISP: péptido señal de proteína disulfuro isomerasa. NOS: terminador de nopalina sintasa. La Figura 45A muestra la secuencia del cebador IF(SacII)-Kozac_PDI.c (SEQ ID NO: 123). La Figura 45B muestra la secuencia del cebador IF-H3V36111.s1-4r (SEQ ID NO: 124). La Figura 45C muestra una representación esquemática de la construcción 2181. La Figura 45D muestra la secuencia para la construcción 2181 (bordes de ADN-t de izquierda a derecha, subrayados; 2X35S/CPMV-HT+/NOS).

con casete de expresión de inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina; SEQ ID NO: 126). La Figura 45E muestra el casete de expresión número 1819 desde el promotor 2X35S hasta el terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Victoria está subrayada (SEQ ID NO: 127). La Figura 45F muestra una representación esquemática de la construcción 1819.

La Figura 46A muestra la actividad de hemaglutinación relativa de HA nativa de H7 Hangzhou y HA modificada de H7 Hangzhou, con bucle proteolítico eliminado cuando se coexpresa con M2. La HA nativa y modificada de H7 Hangzhou (construcciones # 2142 y 2152, ver los ejemplos 5.33 y 5.34) se expresaron en presencia de M2 (construcción # 1261, ver el ejemplo 5.1) y se purificaron a partir de plantas. La Figura 46B muestra el rendimiento de proteína HA nativa de H7 Hangzhou (construcción # 2142) y HA modificada de H7 Hangzhou, con bucle proteolítico eliminado (construcción # 2152). La Figura 46C muestra un análisis de SDS-PAGE, donde el carril 2 muestra HA modificada de H7 Hangzhou purificada con bucle proteolítico eliminado (construcción núm. 2152) y el carril 3 muestra la HA nativa de H7 Hangzhou purificada (construcción núm. 2142). Para cada carril, se cargaron 2 µg de proteína total en el gel. La pureza de los perfiles de proteínas es similar para ambas construcciones.

La Figura 47A muestra la resistencia a la tripsina entre la proteína HA nativa y la HA modificada con el bucle proteolítico reemplazado con un enlazador GG (prl-), la HA modificada con el bucle proteolítico reemplazado con un enlazador TETQ (TETQ) y la HA modificada con el bucle proteolítico reemplazado con un enlazador TETR (TETR). Las construcciones de VLP de HA nativa (# 489), PRL- (# 928), TETQ (# 766) y TETR (# 676) de H5 Indonesia fueron purificadas. Para cada lote, se volvieron a suspender dos muestras de VLP de HA en tampón (Na/KPO₄ 100 mM, NaCl 150 mM, TWEEN 80 al 0,01 %) a pH 7,4 a una concentración objetivo de 150 µg/ml. Se añadió tripsina en una proporción de proteína 1:100 a una muestra resuspendida. Las muestras se incubaron durante 30, 60 y 120 minutos a temperatura ambiente. 30 µl del extracto no digerido (control) y 30 µl de los extractos digeridos se cargaron en gel SDS-PAGE, que se tiñó con azul de Coomassie. La Figura 47B muestra la inmunogenicidad (título de HI) de VLP de H5 nativa y sus contrapartes mutantes (prl-, TETQ y TETR) en ratones después de dos dosis. Las barras representan la comparación de títulos de HI relativos (%) de cada VLP de los mutantes H5 con la VLP de H5 nativa.

La Figura 48 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar la construcción número 2220 (2X35S/CPMV HT+/PDISP/H2 Singapore/NOS, ver el Ejemplo 5.27). La Figura 48A muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF**-H2S157.s1-6r (SEQ ID NO: 127). La Figura 48B muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/H2 Singapore (SEQ ID NO: 128). La Figura 48C muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 2220 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H2 Singapore está subrayada. La Figura 48D muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H2 Singapore. La Figura 48E muestra una representación esquemática de la construcción número 2220.

La Figura 49 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar la construcción número 2221 (2X35S/CPMV HT+/PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado/NOS, ver el Ejemplo 5.28). La Figura 49A muestra la secuencia de nucleótidos del cebador H2S157(Prl-).r (SEQ ID NO: 131). La Figura 49B muestra la secuencia de nucleótidos del cebador H2S157(Prl-).c (SEQ ID NO: 132). La Figura 49C muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 2221 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H2 Singapore está subrayada (SEQ ID NO: 133). La Figura 49D muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 134). La Figura 49E muestra una representación esquemática de la construcción número 2221.

La Figura 50 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2222 (2X35S/CPMV 160+/PDISP/H2 Singapore) y 2223 (2X35S/CPMV 160+/PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado/NOS), ver el Ejemplo 5.29). La Figura 50A muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 2222 desde el promotor 2X35S hasta el terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H2 Singapore está subrayada (SEQ ID NO: 135). La Figura 50B muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 2223 desde el promotor 2X35S hasta el terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado está subrayada (SEQ ID NO: 136). La Figura 50C es una representación esquemática de la construcción número 2222. La Figura 50D es una representación esquemática de la construcción número 2223.

La Figura 51 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar la construcción número 2219 (2X35S/CPMV HT+ PDISP/H3 Perth) y 2139 (2X35S/CPMV 160+/PDISP/H3 Perth), ver el Ejemplo 5.30). La Figura 51A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Perth (SEQ ID NO: 137). La Figura 51B muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF**-H3P1609.S1-6r (SEQ ID NO: 138). La Figura 51C muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 Perth (SEQ ID NO: 139). La Figura 51D muestra una representación esquemática de la construcción número 2219. La Figura 51E muestra una representación esquemática de la construcción número 2139.

La Figura 52 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2039 (2X35S/CPMV HT+ PDISP/H3 Perth con bucle proteolítico eliminado) y 2159 (2X35S/CPMV 160+ PDISP/H3 Perth con bucle proteolítico eliminado) ver el Ejemplo 5.31). La Figura 52A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Perth con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 140). La Figura 52B muestra la secuencia de nucleótidos del cebador H3P1609(Prl-)#2.r (SEQ ID NO: 141). La Figura 52C muestra la secuencia de nucleótidos del cebador H3P1609(Prl-)#2.c (SEQ ID NO: 142). La Figura 52D muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 Perth con

bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 143). La Figura 52E muestra una representación esquemática de la construcción número 2039. La Figura 52F muestra una representación esquemática de la construcción número 2159.

La Figura 53 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2230 (2X35S/CPMV HT+ PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado) y 2250 (2X35S/CPMV 160+ PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado) ver el Ejemplo 5.32). La Figura 53A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 144). La Figura 53B muestra la secuencia de nucleótidos del cebador H3V36111(PrL-).r (SEQ ID NO: 145). La Figura 53C muestra la secuencia de nucleótidos del cebador H3V36111(PrL-).c (SEQ ID NO: 146). La Figura 53D muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 147). La Figura 53E muestra una representación esquemática de la construcción número 2230. La Figura 53F muestra una representación esquemática de la construcción número 2250.

La Figura 54 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar la construcción número 2142 (2X35S/CPMV HT+/PDISP/H7 Hangzhou/NOS), ver el Ejemplo 5.33). La Figura 54A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/H7 Hangzhou (SEQ ID NO: 148). La Figura 54B muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF*-H7H113.s1-6r (SEQ ID NO: 149). La Figura 54C muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H7 Hangzhou (SEQ ID NO: 150). La Figura 53D muestra una representación esquemática de la construcción número 2142.

La Figura 55 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar la construcción número 2152 (2X35S/CPMV HT+/PDISP/H7 Hangzhou con bucle proteolítico eliminado/NOS), ver el Ejemplo 5.34). La Figura 55A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/H7 Hangzhou con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 151). La Figura 55B muestra la secuencia de nucleótidos del cebador H7H113(PrL-).r (SEQ ID NO: 152). La Figura 55C muestra la secuencia de nucleótidos del cebador H7H113(PrL-).c (SEQ ID NO: 153). La Figura 55D muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H7 Hangzhou con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 154). La Figura 53E muestra una representación esquemática de la construcción número 2152.

La Figura 56 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2224 (2X35S/CPMV HT+ PDISP/H9 Hong Kong) y 2226 (2X35S/CPMV 160+ PDISP/H9 Hong Kong), ver el Ejemplo 5.35). La Figura 56A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/H9 Hong Kong (SEQ ID NO: 155). La Figura 56B muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF*-H9HK107399.S1-6r (SEQ ID NO: 156). La Figura 56C muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H9 Hong Kong (SEQ ID NO: 157). La Figura 56D muestra una representación esquemática de la construcción número 2224. La Figura 56E muestra una representación esquemática de la construcción número 2226.

La Figura 57 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2225 (2X35S/CPMV HT+ PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado) y 2227 (2X35S/CPMV 160+ PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado) ver el Ejemplo 5.36. La Figura 57A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 158). La Figura 57B muestra la secuencia de nucleótidos del cebador H9HK107399(PrL-).r (SEQ ID NO: 159). La Figura 57C muestra la secuencia de nucleótidos del cebador H9HK107399(PrL-).c (SEQ ID NO: 160). La Figura 57D muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 161). La Figura 57E muestra una representación esquemática de la construcción número 2225. La Figura 57F muestra una representación esquemática de la construcción número 2227.

La Figura 58 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar la construcción número 2013 (2X35S/CPMV 160 +/PDISP/HA B Malaysia/NOS), ver el Ejemplo 5.37. La Figura 58A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Malaysia (SEQ ID NO: 162). La Figura 58B muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF*-HBM250604.S1-6r (SEQ ID NO: 163). La Figura 58C muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Malaysia (SEQ ID NO: 164). La Figura 58D muestra una representación esquemática de la construcción número 2013.

La Figura 59 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar la construcción número 2014 (2X35S/CPMV 160+/PDISP/HA B Malaysia con bucle proteolítico eliminado/NOS) ver el Ejemplo 5.38. La Figura 59A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Malaysia con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 165). La Figura 59B muestra la secuencia de nucleótidos del cebador HBM250604(PrL-).r (SEQ ID NO: 166). La Figura 59C muestra la secuencia de nucleótidos del cebador HBM250604(PrL-).c (SEQ ID NO: 167). La Figura 59D muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Malaysia con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 168). La Figura 59E muestra una representación esquemática de la construcción número 2014.

La Figura 60 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2070 (2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Massachusetts), 2080 (2X35S/CPMV HT+ PDISP/HA B Massachusetts) y 2090 (2X35S/CPMV 160+ PDISP/HA B Massachusetts) ver el Ejemplo 5.39. La Figura 60A muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachusetts (SEQ ID NO: 169). La Figura 60B muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachusetts (SEQ ID NO: 170). La Figura 60C muestra una representación esquemática de la construcción número 2070. La Figura 60D muestra una representación esquemática de la construcción número 2080.

La Figura 60E muestra una representación esquemática de la construcción número 2090.

La Figura 61 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2102 (2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Florida con bucle proteolítico eliminado) y 2104 (2X35S/CPMV HT+/BeYDV/PDISP/HA B Florida con bucle proteolítico eliminado), ver el Ejemplo 5.40. La Figura 61A muestra la secuencia de nucleótidos del cebador HBF406(PrL-).r (SEQ ID NO: 190). La Figura 61B muestra la secuencia de nucleótidos del cebador HBF406(PrL-).c (SEQ ID NO: 191). La Figura 61C muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF*-HBF406.s1-6r (SEQ ID NO: 192). La Figura 61D muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Florida con bucle proteolítico eliminado. La Figura 61E muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Florida con bucle proteolítico eliminado. La Figura 61F muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 2102. La Figura 61G muestra la representación esquemática de la construcción número 2102. La Figura 61H muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 2104. La Figura 61I muestra la representación esquemática de la construcción número 2104.

La Figura 62 muestra los componentes de secuencia utilizados para preparar las construcciones número 2106 (2X35S/CPMV HT+/PDISP/B Florida+H1 California TMCT con bucle proteolítico eliminado/NOS) y 2108 (2X35S/CPMV HT+/BeYDV/PDISP/B Florida +H1 California TMCT con bucle proteolítico eliminado/NOS) ver el Ejemplo 5.41. La Figura 62A muestra la secuencia de nucleótidos del cebador IF-H1cTMCT.S1-4r (SEQ ID NO: 197). La Figura 62B muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Florida+H1Cal TMCT con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 198). La Figura 62C muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Florida+H1Cal TMCT con bucle proteolítico eliminado. La Figura 62D muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 2106. La Figura 62E muestra la representación esquemática de la construcción número 2106. La Figura 62F muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión número 2108. La Figura 62G muestra la representación esquemática de la construcción número 2108.

Descripción detallada

La siguiente descripción es de una modalidad preferida.

La presente invención se refiere a partículas similares a virus (VLP) y a métodos de producción en plantas.

La presente invención proporciona, en parte, un método para producir una partícula similar a virus (VLP) en una planta. El método implica introducir un ácido nucleico en la planta. El ácido nucleico comprende una región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una hemaglutinina (HA) de la gripe tipo B. La HA comprende un bucle proteolítico completamente eliminado. La planta se incuba en condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, produciendo así la VLP. Si se desea, se puede cosechar la planta y purificar la VLP.

La VLP se puede usar para preparar una composición que comprende una dosis eficaz de la VLP para inducir una respuesta inmunitaria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En este documento se proporciona, además, una hemaglutinina modificada, en la que el bucle proteolítico está completamente eliminado.

La presente invención proporciona, además, materia vegetal que comprende la VLP producida mediante la expresión de los ácidos nucleicos descritos anteriormente. La materia vegetal puede usarse para inducir inmunidad contra una infección por virus de la gripe en un sujeto. La materia vegetal también se puede mezclar como un complemento alimenticio.

La VLP descrita también puede producirse al proporcionar una planta que comprende un ácido nucleico como se definió anteriormente, e incubar la planta o parte de la planta en condiciones que permitan la expresión del ácido nucleico, produciendo así la VLP. La VLP puede comprender uno o más de un lípido derivado de una planta. La VLP se puede usar para preparar una composición que comprende una dosis eficaz de la VLP para inducir una respuesta inmunitaria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención proporciona, además, materia vegetal que comprende la VLP producida mediante la expresión del ácido nucleico. La materia vegetal puede usarse para inducir inmunidad contra una infección por virus de la gripe en un sujeto. La materia vegetal también se puede mezclar como un complemento alimenticio.

La VLP descrita comprende hemaglutinina (HA) de la gripe modificada. La HA modificada se deriva de la HA de tipo B como se describe en los documentos WO 2009/009876; WO 2009/076778; WO 2010/003225; WO 2010/003235; WO 2011/03522.

Proteína HA

El término "hemaglutinina" o "HA", como se usa en el presente documento, se refiere a una glucoproteína que se encuentra en el exterior de las partículas virales de la gripe. La HA es una glicoproteína de membrana de tipo I

homotrimérica, que generalmente comprende un péptido señal, un dominio HA1 y un dominio HA2 que comprende un sitio de anclaje que abarca la membrana en el extremo C-terminal y una cola citoplasmática pequeña. Las secuencias de nucleótidos que codifican HA son bien conocidas y están disponibles; consulte, por ejemplo, la base de BioDefence Public Health (virus de la gripe; consulte la URL: biohealthbase.org) o el Centro Nacional de Información Biotecnológica (consulte la URL: ncbi.nlm.nih.gov).

El monómero de HA puede subdividirse en tres dominios funcionales: un dominio de tallo o un grupo de dominios de tallo (SDC), un dominio de cabeza globular o un grupo de dominios de cabeza (HDC) y un grupo de dominio transmembrana (TDC). El SDC y el HDC pueden denominarse colectivamente "ectodominio". Una publicación de Ha y otros, 2002 (EMBO J. 21: 865-875) ilustra la orientación relativa de los diferentes subdominios de SDC y HDC en varios subtipos de gripe, sobre la base de las estructuras cristalográficas por rayos X.

La proteína HA se sintetiza como una proteína precursora (HAO) de aproximadamente 75 kDa, que se ensambla en la superficie en una proteína trimérica alargada. La escisión de la proteína precursora en un sitio de escisión conservado para la activación produce 2 cadenas polipeptídicas, HA1 y HA2 (que comprende la región transmembrana), unidas por un enlace disulfuro. La Figura 15 proporciona ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos de la región enlazadora para varias HA.

El término "homotrímero" u "homotrimérico" indica que un oligómero está formado por tres moléculas de proteína HA. Sin desear estar limitados por la teoría, la proteína HA se sintetiza como proteína precursora monomérica (HAO) de aproximadamente 75 kDa, que se ensambla en la superficie en una proteína trimérica alargada. Antes de que se produzca la trimerización, la proteína precursora se escinde en un sitio de escisión conservado para la activación (también denominado péptido de fusión) en 2 cadenas polipeptídicas, HA1 y HA2 (que comprende la región transmembrana), unidas por un enlace disulfuro. El segmento HA1 puede tener 328 aminoácidos de longitud, y el segmento HA2 puede tener 221 aminoácidos de longitud. Aunque esta escisión puede ser importante para la infectividad del virus, puede no ser esencial para la trimerización de la proteína o para la inmunogenicidad. La inserción de HA dentro de la membrana del retículo endoplásmico (ER) de la célula huésped, la escisión del péptido señal y la glucosilación de la proteína son eventos co-traduccionales. El plegamiento correcto de HA requiere la glucosilación de la proteína y la formación de 5-6 enlaces disulfuro intracatenarios. El trímero de HA se ensambla dentro del complejo cis y trans-Golgi, y el dominio transmembrana desempeña un papel en el proceso de trimerización. Las estructuras cristalinas de las proteínas HA tratadas con bromelina, que carecen del dominio transmembrana, han mostrado una estructura altamente conservada entre las cepas de gripe. También se ha establecido que la HA experimenta cambios conformacionales importantes durante el proceso de infección, lo que requiere que el precursor HAO se escinda en las 2 cadenas polipeptídicas HA1 y HA2. La proteína HA puede procesarse (es decir, comprender los dominios HA1 y HA2), o puede no procesarse (es decir, comprender el dominio HAO). La proteína precursora no procesada de HA se sintetiza como una proteína precursora (HAO) de aproximadamente 75 kDa, que se ensambla en la superficie en una proteína trimérica alargada. La proteína precursora se escinde en un sitio de escisión conservado (también conocido como bucle proteolítico) en 2 cadenas polipeptídicas, HA1 y HA2 (que comprende la región transmembrana), unidas por un enlace disulfuro.

La proteína HA como se describe en el presente documento es una proteína HA modificada (también denominada "HA mutante") en la que el bucle proteolítico está completamente eliminado.

HA modificada/sitio de escisión

Después de la escisión de HAO, HA se vuelve sensible al pH, experimentando un cambio conformacional irreversible en el pH del endosoma (<pH 6,0). La conformación del precursor HAO es estable a pH bajo, pero la forma escindida HA1-HA2 es metaestable (Bullough PA y otros, 1994, Nature. Vol. 371: 37-43). El umbral de pH que induce un cambio conformacional en diferentes HA es aproximadamente pH 5,8-5,9 para las cepas B, mientras que es más ácido, pH 5,1 a 5,8, para HA tipo A (Beyer WEP y otros, 1986, Archives Virol, vol 90: 173). Después de la escisión, el terminal amino de HA2 es una secuencia no polar de 23 aminoácidos que luego se convierte en un dominio transmembrana que atraviesa la membrana de la célula huésped (llamado péptido de fusión; Figura 15). El sitio de escisión de una HA está ubicado en un bucle que sobresale en la superficie de la HA, y a este sitio pueden acceder las proteasas.

Para optimizar la producción de vacuna en los huevos y mantener un virus activo pero atenuado, se ha estudiado la modificación del sitio de escisión polibásico de H5 (RERRRKKR↓G) (Horimoto T, y otros, 2006, Vaccine, Vol 24: 3669-3676). Los mutantes de interés contenían una delección de los 4 primeros aminoácidos cargados (RERR) y un reemplazo de los aminoácidos RKKR con TETR que inactivan el sitio de escisión polibásico, pero mantienen la posibilidad de procesar HAO a HA1-HA2 a través del residuo de Arginina del motivo TETR (ver la Figura 19). NIBSC emplea una estrategia similar para producir virus atenuados para abolir el sitio polibásico que permite producir con altos rendimientos la cepa H5N1 A/Turquía/Turquía/1/2005 sin matar los huevos. La secuencia del sitio polibásico (GERRRKKR↓G) se reemplaza por RETR en su mutante (virus de referencia de la gripe NIBSC 05/240 NIBSC NIBG-23). El sitio de escisión polibásico de una HA de H5 también ha sido reemplazado por el sitio monobásico de H6 para la expresión en huevos. En este ejemplo, los primeros 4 residuos y los cuatro últimos aminoácidos del sitio polibásico se reemplazan por IETR (reemplazo de RERRRKKR↓G con IETR↓G; Hoffman E, y otros, 2002, Vaccine, Vol 20: 3165-3170). En cada uno de los ejemplos proporcionados anteriormente, la modificación se realizó para atenuar el virus

mientras se mantenía la producción de HA dentro de los huevos. Es decir, la escisión del precursor HA0 no se inactivó totalmente para permitir que la HA0 se procese a HA1-HA2 y se someta a un cambio conformacional por pH, permitiendo así la replicación del virus en la célula huésped.

5 Como se usa en el presente documento, el término "hemaglutinina modificada" o "HA modificada", "hemaglutinina mutada" o "HA mutada" se refiere a una HA en la que la HA tiene una modificación o mutación que da como resultado la delección del bucle proteolítico.

10 Se ha determinado la estructura cristalina de HA0 de A/Hong Kong/68 (Chen, J., 1998. Cell 95: 409-417). Los residuos que están expuestos al disolvente generalmente se consideran parte del sitio de escisión que forma un bucle de superficie extendido y altamente expuesto. Se puede determinar una secuencia consenso en esta región elegida, por ejemplo, pero sin limitarse a:

15 Consenso de A/H3/HA0: NVPEKQTR/GIFGAIAGFIE (SEQ ID NO: 66)

Consenso de A/H1/HA0: NIPSIQSR/GLFGAIAGFIE (SEQ ID NO: 67)

20 Consenso de H5 aviar QRESRRKKR/GLFGAIAGFIEG (SEQ ID NO: 1)

Consenso de B/HA0: PAKLLKER/GFFGAIAGFLE (SEQ ID NO: 68)

25 Donde la escisión entre HA1 y HA2 se indica con "/" (ver Bianchi y otros, 2005, Journal of Virology, 79: 7380-7388), y también las Figuras 15 y 18A.

La proteína HA es una hemaglutinina de la gripe tipo B con una región de bucle proteolítico completamente eliminada. Sin desear limitarse a la teoría, la modificación del bucle proteolítico puede garantizar que la molécula de HA se mantenga como un precursor HA0. Así, esto produce una VLP más homogénea y uniforme que comprende proteínas HA0.

30 Por "bucle proteolítico" o "sitio de escisión" se entiende la secuencia consenso del sitio proteolítico que está implicada en la escisión del precursor HA0. "Consenso" o "secuencia consenso", como se usa en el presente documento, significa una secuencia (secuencia de aminoácidos o de nucleótidos) que comprende la variabilidad de secuencia de las secuencias relacionadas sobre la base del análisis de alineamiento de secuencias múltiples, por ejemplo, subtipos de una secuencia particular de HA0 de la gripe. La secuencia consenso del sitio de escisión de HA0 de la gripe puede incluir secuencias de aminoácidos consenso de hemaglutinina de la gripe A, que incluyen, por ejemplo, secuencias de aminoácidos de hemaglutinina consenso de H1, consenso de H3, consenso de H5 o consenso de la gripe B, por ejemplo, pero sin limitarse a, B Florida y B Malaysia. Los ejemplos no limitantes de secuencias de la región del bucle proteolítico se muestran en las Figuras 15 y 18B (y ver Bianchi y otros, 2005, Journal of Virology, 79: 7380-7388).

40 Por "bucle proteolítico modificado" se entiende que el bucle proteolítico se eliminó por completo.

45 Al estabilizar la proteína HA mediante la eliminación del bucle proteolítico, se pueden lograr mayores rendimientos de producto o proteína al expresar la HA modificada en una planta, en comparación con una HA nativa expresada en una planta en las mismas condiciones. Además, al eliminar el bucle proteolítico, se reduce la variabilidad de la expresión de la HA modificada expresada y se aumenta la uniformidad de la HA modificada producida, en comparación con una HA nativa expresada en una planta en las mismas condiciones.

50 Por lo tanto, se describe un método para aumentar el rendimiento del producto de una proteína HA en una planta. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que al eliminar el bucle proteolítico en una proteína HA, se proporciona mejor estabilidad frente a la degradación proteolítica en la planta, estabilización durante el paso de la HA en el proceso de secreción por el aparato de Golgi y durante el proceso de purificación.

55 Además, se describe un método para aumentar la calidad del producto de una proteína HA expresada en una planta. Por calidad del producto, se entiende, por ejemplo, un aumento del rendimiento del producto de una HA expresada en una planta, la estabilidad del producto, por ejemplo, una mayor estabilidad de la HA expresada en una planta, la uniformidad del producto, por ejemplo, la producción de un producto homogéneo por ejemplo HA0 o una combinación de estos.

60 Por un aumento en el rendimiento del producto o de la proteína, se entiende un aumento en el rendimiento relativo de la proteína de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 100 %, o cualquier cantidad entre ellos según se determine utilizando técnicas estándar en la técnica, por ejemplo, de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 70 % o cualquier valor entre ellos, por ejemplo, aproximadamente 20, 22, 24, 25, 26, 28, 30, 32, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 58, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 %, o cualquier cantidad entre ellos, en comparación con el rendimiento de producto o proteína de la misma proteína HA que no tiene su bucle proteolítico eliminado.

Como se muestra en las Figuras 13A y 14, la HA de B/Brisbane/60/2008 se expresa pobremente en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas (véase el carril 1008). Sin embargo, la expresión de HA tipo B que se ha modificado para eliminar el bucle proteolítico (véase el carril 1059, Figura 13A, Figura 14) dio como resultado una expresión aumentada. Además, la coexpresión de HA-tipo B con M2 de A/New Caledonia/20/99, da como resultado un aumento en la expresión de HA (véanse los carriles "1008+1261" y 1059+1261"). La coexpresión de HA tipo B que comprende una delección en el bucle proteolítico, con un M2 de A/Puerto Rico/8/34 también dio como resultado una expresión aumentada (1059+859; Figura 14).

Como se muestra adicionalmente en la Figura 46B, el rendimiento de la proteína HA de H7 A/Hangzhou/1/13 expresada en *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrada aumenta en la HA que se ha modificado para eliminar o modificar el bucle proteolítico. La coexpresión de HA H7 A/Hangzhou/1/13 nativa (natural) con M2 de A/New Caledonia/20/99 conduce a un rendimiento de proteína relativo del 100 %, mientras que la coexpresión de HA H7 A/Hangzhou/1/13 que comprende una delección en el bucle proteolítico, con M2 de A/New Caledonia/20/99, conduce a un rendimiento relativo de proteína del 182 % (Figura 46B). Sin embargo, el aumento del rendimiento relativo de proteína HA que comprende una delección en el bucle proteolítico no depende de M2. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 29A, H7 A/Hangzhou/1/13 que comprende una delección en el bucle proteolítico mostró una mayor expresión (según se mide por el título relativo de HA) en comparación con H7 A/Hangzhou/1/13 nativa.

Se evaluaron varias estrategias para inactivar la escisión de HA0 para las cepas A y B. La secuencia consenso reconocida por las proteasas está encerrada en un bucle extendido, expuesto al disolvente y cerrado a la parte distal de la membrana a la proteína. En la cepa B, este bucle contiene 2 motivos de secuencia reconocidos por las proteasas y los primeros aminoácidos del N-terminal del dominio HA2. Un enfoque de mutación puntual (para los ejemplos, véase la Tabla 2, más abajo) para inactivar la escisión del precursor HA0 dio como resultado la producción de HA0, sin un aumento de la acumulación de la VLP de la cepa B. La eliminación de los motivos de secuencia que comprenden los 2 motivos de escisión de proteasa (7 aminoácidos) abolió la acumulación de HA B. Eliminar todo el bucle de 18 aminoácidos de la proteína HA de la cepa B e insertar un enlazador para conservar las características estructurales (cadenas beta) de la estructura proteica fue eficaz (ver más abajo; Figuras 13A, 14, 16A, 17B). La eliminación o el reemplazo del bucle proteolítico en la proteína HA de las cepas A también fue eficaz (ver las Figuras 20, 22).

Las delecciones e inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen delecciones de aminoácidos e inserciones de aminoácidos. Un ejemplo de una delección en la gripe B es la eliminación de 17 aminoácidos (AKLLKERGFFGAIAGFLE) desde la posición 340 a la 357 de la proteína HA madura, por ejemplo, como se muestra en la Figura 18C para la gripe B Florida y B Malaysia. Esta delección puede ser reemplazada por un enlazador apropiado para unir las cadenas polipeptídicas para una expresión adecuada, por ejemplo, mediante el uso de la secuencia "GG", como se muestra en la Figura 21B (SEQ ID NO: 17; B/Brisbane/60/2008 modificada; el reemplazo de AKLLKERGFFGAIAGFLEG con GG; por ejemplo, Construcción 1059, Figuras 5D, 10; Construcción 1039, Figura 8B o Construcción 1467; Figura 7D, 7E). Un reemplazo alternativo comprende reemplazar "PPAKLLKER" con "GSSSGSSSG", como se muestra en la Figura 21C (SEQ ID NO: 18). Además, la secuencia "RESRRKKR" puede reemplazarse por "TETR" o "TETQ", como se muestra en la Figura 19 para la gripe H5/Indonesia.

Otras mutaciones de aminoácidos para HA de la cepa A incluyen sustituciones, inserciones y delecciones de aminoácidos, por ejemplo, pero sin limitarse a, una delección en la región del bucle proteolítico de H5 Anhui de la secuencia de aminoácidos "RERRRKRGLFGAIAGFIE", una delección de la secuencia de aminoácidos de la región del bucle proteolítico de H5 Indo que comprende "RESRRKKRGLFGAIAGFIE" o una delección de la secuencia de aminoácidos de la región del bucle proteolítico de H5 Vietnam "RERRRKKRGLFGAIAGFIE". Para H3, la secuencia "RNVPEKQTRGIF" puede eliminarse y reemplazarse por una secuencia enlazadora apropiada, por ejemplo, pero sin limitarse a "GS" como se muestra en la Figura 21E (SEQ ID NO: 20). Alternativamente, la secuencia "RNVPEKQTR" en H3 puede reemplazarse por "GSSSGSSSG" como se muestra en la Figura 21F (SEQ ID NO: 21; H3 A/Perth/16/2009 modificada).

Las mutaciones de aminoácidos para HA de la cepa B y/o las cepas A pueden incluir delecciones de aminoácidos. Por ejemplo, para reducir o abolir la escisión del bucle proteolítico o el sitio de escisión por una proteasa, uno o más aminoácidos son eliminados o removidos dentro de la secuencia del bucle proteolítico o del sitio de escisión. Los ejemplos no limitantes de delecciones incluyen la eliminación de los aminoácidos 323 a 341 de la proteína HA H5 nativa, por ejemplo H5 Anhui (RERRRKRGLFGAIAGFIE), H5 Indo (RESRRKKRGLFGAIAGFIE) o H5 Vietnam (RERRRKKRGLFGAIAGFIE), como se muestra en la Figura 18C. Para H3, la secuencia "RNVPEKQTRGIF" puede reemplazarse por "GS" (Figura 21E; SEQ ID NO: 20), o la secuencia H3 "RNVPEKQTR" puede reemplazarse por "GSSSGSSSG" (Figura 21F; SEQ ID NO: 21). Para las cepas B, la secuencia "AKLLKERGFFGAIAGFLE" se puede eliminar y/o reemplazar por la secuencia "GG", como se muestra en la Figura 21B (SEQ ID NO: 17), la secuencia "AKLLKERGFFGAIAGFLEG" se puede reemplazar por "GG", o la secuencia "PPAKLLKER" reemplazada por "GSSSGSSSG" (Figura 21C; SEQ ID NO: 18).

Las mutaciones de aminoácidos se pueden generar mediante el uso de métodos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir mutagénesis dirigida al sitio, PCR, síntesis de genes y similares. Se contempla que los métodos para alterar el grupo de la cadena lateral de un aminoácido por métodos distintos a la

ingeniería genética, como la modificación química, también pueden ser útiles.

El análisis de la secuencia de las HA H1, H3 y B revela que H1 posee un sitio proteolítico monobásico (monobásico tipo Clara: Q/EXR) que precede directamente al péptido de fusión, mientras que las HA H3 y B tienen 2 sitios proteolíticos, uno que es reconocido por proteasas tipo Clara (como se encuentran en H1), y otro sitio reconocido por tripsina y proteasas similares a quimotripsina (P-E/A-K). La secuencia consenso para la escisión de estas HA se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencia consenso del sitio proteolítico para la escisión de HA₀ precursora. Las secuencias reconocidas por las triptasas Clara o por tripsina/quimotripsina están en cursiva y en negrita, respectivamente. Varias cepas de HA comprenden sitios de escisión polibásicos de tipo furina (RKKR; texto sin formato, subrayado).

H1	NIPSIQSR↓GLF	SEQ ID NO: 47
H3	NVPEKQTR↓GIF	SEQ ID NO: 48
H5	TGLRNSPQRESRRKKR↓GLF	SEQ ID NO: 60
B	PAKLLKER↓GFF	SEQ ID NO: 59

Para evitar una posible escisión proteolítica del precursor HA₀ de la HA, solo es necesario modificar un sitio proteolítico de la secuencia de H1, mientras que, en el caso de H3 y B, puede ser necesario modificar dos sitios monobásicos.

Por ejemplo, un primer sitio de escisión de HA₀ de B/Florida y B/Brisbane, por ejemplo, puede eliminarse reemplazando la Lys 341 (numeración de la proteína madura) con una Ile (ver la Tabla 2). El segundo sitio monobásico puede ser eliminado reemplazando tres aminoácidos antes del péptido de fusión, KER (344-346), con NIQ. Las secuencias de varios bucles proteolíticos modificados de HA se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2: Ilustración de ejemplos de mutaciones para destruir la escisión del precursor HA₀. El sitio monobásico está en cursiva (reconocimiento tipo Clara) y en negrita (sin subrayar; tipo tripsina/quimotripsina). La mutación se muestra en negrita y subrayada. La flecha representa el sitio de escisión para la conversión de HA₀ en HA1-HA2.

Cepa	Secuencia natural	Abolición del sitio de escisión del precursor
H5/Indo	TGLRNSPQ RESRRKKR ↓GLF SEQ ID NO: 60	TGLRNSPQ TETR GLF SEQ ID NO: 61 TGLRNSPQ TETQ GLF SEQ ID NO: 62
H1/Brisbane	NIPSIQSR↓GLF SEQ ID NO: 47	NIPSIQ SQ GLF SEQ ID NO: 63
H3/Brisbane	NVPEKQTR↓GIF SEQ ID NO: 48	NVPE QTQ GIF SEQ ID NO: 64
B/Florida, B/Brisbane	PAKLLKER↓GFF SEQ ID NO: 59	PA LLNIQ GFF SEQ ID NO: 65

En otros ejemplos, las secuencias que comprenden el bucle proteolítico en HA₀ pueden reemplazarse o eliminarse. Por ejemplo, en la Figura 21E se proporciona una variante de H3 que contiene una eliminación de la secuencia RNVPEKQT en el extremo C terminal de HA1 además de la eliminación de los aminoácidos en extremo N terminal GIFGIA de HA2. HA1-HA2 acortadas pueden unirse entre sí por un enlazador GS.

En otro ejemplo, el bucle contiene el sitio de escisión proteolítica, por ejemplo en H3, puede haber sido reemplazado por un enlazador flexible, y la parte de HA2 puede dejarse intacta. Un enlazador (GSS)₃ puede diseñarse para acomodar la HA1 acortada a HA2. (ver la Figura 21F).

En otro ejemplo, la HA de la gripe B puede contener una eliminación de la secuencia ALKLLKER en el extremo C terminal de HA1 además de la eliminación de los aminoácidos en el extremo N terminal GFFGAIAGFLEG de HA2. HA1-HA2 acortadas pueden unirse entre sí por un enlazador GG (véase, por ejemplo, la Figura 21B; Construcción 1008). La expresión de esta construcción se muestra en las Figuras 13A y B.

En otro ejemplo, HA de la gripe B, el bucle que contiene el sitio proteolítico puede haber sido reemplazado por un enlazador flexible, y la parte de HA2 se dejó intacta. Se puede diseñar un enlazador GSSS más largo para acomodar la HA1 acortada a HA2. (ver, por ejemplo, la Figura 21 C).

- Como se muestra en las Figuras 13A y 14, la HA de B/Brisbane/60/2008 se expresa pobremente en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas (véase el carril 1008). Sin embargo, la expresión de HA tipo B que se ha modificado para eliminar el bucle proteolítico (véase el carril 1059, Figura 13A, Figura 14) dio como resultado una expresión aumentada.
- Además, la coexpresión de HA-tipo B con M2 de A/New Caledonia/20/99, da como resultado un aumento en la expresión de HA (véanse los carriles "1008+1261" y 1059+1261"). La coexpresión de HA tipo B que comprende una delección en el bucle proteolítico, con un M2 de A/Puerto Rico/8/34 también dio como resultado una expresión aumentada (1059+859; Figura 14).
- De manera similar, la eliminación del bucle proteolítico en H5/Indo y el reemplazo con una secuencia "GG" (Construcción 928; ver la Figura 46D), "TETR" (Construcción 676; también ver las Figuras 19, 24D) o "TETQ" (Construcción 766; también ver las Figuras 19, 25D) resultó en niveles de expresión que coincidieron o aumentaron con relación al nivel de expresión observado con H5/Indo nativa (Construcción 489; ver las Figuras 20 y 23).
- Como se muestra en la Figura 13B, al eliminar el bucle proteolítico de HA0 (secuencia que se muestra en la Figura 21B), la proteína HA0 resultante exhibe una mayor actividad como se muestra por una mayor capacidad de hemaglutinación, en comparación con una proteína HA en la que no se ha eliminado su bucle proteolítico.
- Por un aumento en la actividad, se entiende un aumento en la capacidad de hemaglutinación de aproximadamente 2 % a aproximadamente 100 %, o cualquier cantidad entre ellas según se determine mediante el uso de técnicas estándar en la técnica, por ejemplo, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 % o cualquier valor entre ellos, por ejemplo, aproximadamente 2, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 28, 30, 32, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 58, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 %, o cualquier cantidad entre estos, en comparación con la actividad de la misma proteína HA que no tiene su bucle proteolítico eliminado.
- La presente invención incluye, además, secuencias de nucleótidos que codifican una HA modificada de HA de tipo B, o cualquier secuencia de nucleótidos que hibridan con HA de tipo B en condiciones rigurosas, o una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con un complemento de HA de tipo B, en donde la secuencia de nucleótidos codifica una proteína hemaglutinina que cuando se expresa forma una VLP y que la VLP induce la producción de un anticuerpo. Por ejemplo, la expresión de la secuencia de nucleótidos dentro de una célula vegetal forma una VLP, y la VLP puede usarse para producir un anticuerpo que es capaz de unirse a HA, incluida HA madura de B. La VLP, cuando se administra a un sujeto, induce una respuesta inmunitaria. Preferentemente, la VLP induce la producción de un anticuerpo y la VLP, cuando se administra a un sujeto, induce una respuesta inmunitaria.
- Por ejemplo, la expresión de la secuencia de nucleótidos dentro de una célula vegetal forma una VLP, y la VLP puede usarse para producir un anticuerpo que sea capaz de unirse a una proteína viral como, por ejemplo, HA, que incluye HA1 o HA2 de una o más HA de la gripe tipo B. La VLP, cuando se administra a un sujeto, induce una respuesta inmunitaria.
- La hibridación en condiciones rigurosas de hibridación es conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y otros, Eds. 1995 y suplementos; Maniatis y otros, En Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982; Sambrook y Russell, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra edición 2001). Un ejemplo de tales condiciones de hibridación rigurosas puede ser aproximadamente 16-20 horas de hibridación en SSC 4 X a 65 °C, seguido de lavado en SSC 0,1 X a 65 °C durante una hora, o 2 lavados en SSC 0,1 X a 65 °C cada uno durante 20 o 30 minutos. Alternativamente, una condición de hibridación rigurosa ilustrativa podría ser durante la noche (16-20 horas) en formamida al 50 %, SSC 4 X a 42 °C, seguido de lavado en SSC 0,1 X a 65 °C durante una hora, o 2 lavados en SSC 0,1 X a 65 °C cada uno durante 20 o 30 minutos, o durante la noche (16-20 horas), o hibridación en tampón de fosfato acuoso Church (SDS al 7 %; tampón NaPO₄ 0,5 M pH 7,2; EDTA 10 mM) a 65 °C, con 2 lavados a 50 °C en SSC 0,1 X, SDS al 0,1 % durante 20 o 30 minutos cada uno, o 2 lavados a 65 °C en SSC 2 X, SDS al 0,1 % durante 20 o 30 minutos cada uno.
- Además, la presente invención incluye secuencias de aminoácidos que se caracterizan por tener aproximadamente 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 % o cualquier cantidad entre ellas, de identidad de secuencia o similitud de secuencia, con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 98, 108, 110, 168, 194 y 199, en donde la secuencia de aminoácidos codifica una proteína HA modificada que cuando se expresa forma una VLP, y que la VLP induce la producción de un anticuerpo que es capaz de unirse a HA, incluida HA no procesada (HAO) o no procesada en la que el bucle proteolítico se ha eliminado o modificado. La VLP, cuando se administra a un sujeto, induce una respuesta inmunitaria.
- La identidad de secuencia o la similitud de secuencia se pueden determinar mediante el uso de un programa de comparación de secuencias de nucleótidos, como el proporcionado dentro de DNASIS (por ejemplo, que usa, pero sin limitarse a, los siguientes parámetros: penalización por HUECO 5, # de diagonales superiores 5, penalización por HUECO fijo 10, k-tupla 2, hueco flotante 10 y tamaño de ventana 5). Sin embargo, otros métodos de alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos 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 mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP,

BESTFIT, FASTA y BLAST), o mediante alineación manual e inspección visual. En la Figura 24 se puede encontrar un ejemplo de alineación de secuencias de HA de diferentes cepas de gripe.

Por ejemplo, pero sin limitarse a, las secuencias de nucleótidos que codifican:

- una HA de tipo B con un bucle proteolítico modificado como se define en las SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 168.

Elementos de amplificación y elementos potenciadores/Elementos reguladores

Como se usa en la presente descripción, la frase "elementos de amplificación" se refiere a un segmento de ácido nucleico que comprende al menos una parte de una o más regiones intergénicas largas (LIR) de un genoma de geminivirus. Como se usa en la presente descripción, "región intergénica larga" se refiere a una región de una región intergénica larga que contiene un sitio de unión a rep capaz de mediar la escisión y replicación por una proteína Rep de geminivirus. En algunos aspectos, el segmento de ácido nucleico que comprende una o más LIR, puede comprender además una región intergénica corta (SIR) de un genoma de geminivirus. Como se usa en la presente descripción, "región intergénica corta" se refiere a la cadena complementaria (la IR corta (SIR) de un Mastrevirus). En la presente descripción puede usarse cualquier elemento de amplificación derivado de geminivirus adecuado. Ver, por ejemplo, los documentos WO2000/20557; WO2010/025285; Zhang X. y otros (2005, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 93, 271-279), Huang Z. y otros (2009, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 103, 706-714), Huang Z. y otros (2009, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 106, 9-17)). Si se usa más de una LIR en la construcción, por ejemplo, dos LIR, entonces el promotor, las regiones CMPV-HT y la secuencia de ácido nucleico de interés y el terminador están flanqueados por cada una de las dos LIR.

Como se describe en el presente documento, la administración conjunta del vector derivado del virus del mosaico enano amarillo del frijol (BeYDV) y un vector suministrador de Rep/RepA, mediante agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana* da como resultado una amplificación eficiente del replicón y una robusta producción de proteína. El análisis de transferencia Western de extractos de proteínas de plantas transformadas con construcciones de genes que conducen la expresión de la HA modificada de la gripe B (de B/Brisbane/60/2008) con o sin el bucle proteolítico eliminado (ver la Figura 17A para las construcciones) y en presencia o ausencia del elemento de amplificación de BeYDV (construcción núm. 1059 y 1039) mostró que en ausencia de BeYDV no se pudo detectar acumulación de la HA de la gripe B (Figura 17B), cuando el elemento regulador era CPMV-HT.

Como se muestra en las Figuras 17B, la expresión de HA de B/Brisbane/60/2008 con el bucle proteolítico eliminado en ausencia de BeYDV no conduce a una expresión detectable por análisis de Western Blot (véase el carril 1039 en la Figura 17B). Sin embargo, la expresión de HA tipo B con bucle proteolítico eliminado en presencia del elemento de amplificación de BeYDV, da como resultado una expresión aumentada (véase el carril 1059). De manera similar, en ausencia de BeYDV, la coexpresión de HA mutante tipo B que comprende una delección en el bucle proteolítico, con M2 de A/New Caledonia/20/99, no da como resultado una expresión de HA detectable (ver los carriles "1039+ 1261" en la Figura 17B). La coexpresión de HA mutante tipo B que comprende una delección en el bucle proteolítico en presencia de BeYDV, con un M2 de A/New Caledonia/20/99, por otro lado, dio como resultado una expresión aumentada (véase el carril "1059+1261"; Figura 17B).

Sin embargo, no se requiere la presencia de BeYDV cuando hay un elemento potenciador en el sistema de expresión y cuando el elemento potenciador no es CPMV-HT. Como se muestra, por ejemplo, en la Figura 29A, la expresión de HA de varias cepas B bajo el control de un elemento potenciador, como por ejemplo CPMV 160, CPMV160+ o CPMV HT+, conduce a la producción de proteínas HA que muestran un aumento del título de hemaglutinación (HMG) en ausencia de BeYDV.

Por lo tanto, la proteína HA mutante (modificada) se expresa en ausencia de un elemento de amplificación, como un elemento de amplificación basado en geminivirus, por ejemplo, BeYDV, pero en presencia de un elemento potenciador, como por ejemplo CPMV 160, CPMV160+ o CPMV HT+.

El mutante (HA modificada) se expresa en presencia de un elemento potenciador, como por ejemplo CPMV 160, CPMV160+ o CPMV HT+, pero en ausencia o presencia de un elemento de amplificación, como por ejemplo BeYDV. Como se muestra en las Figuras 28B, 28C y 28F la HA mutante (modificada) puede expresarse en presencia de un elemento potenciador, con o sin la presencia de un elemento de amplificación. Por lo tanto, la presente invención también se dirige a la expresión de una HA mutante (modificada) en presencia de un elemento potenciador y opcionalmente un elemento de amplificación.

Las construcciones de HA que comprenden un elemento potenciador (ya sea CPMV HT+ o CPMV 160+) y un bucle proteolítico reemplazado con un enlazador GG (bucle proteolítico eliminado) exhiben una mayor expresión en comparación con las construcciones de HA modificados o de tipo silvestre que comprenden CPMV HT (Figura 28A, H3 Per; Figura 28B, B Malaysia; Figura 28C, H9 HK; Figura 29D, B Mass; Figura 28E, H2 Sin).

La Figura 29A presenta un resumen de los datos para el título de hemaglutinación de proteínas HA modificadas

producidas en plantas que comprenden elementos potenciadores basados en CPMV HT, CPMV HT+, CPMV 160 o CPMV160+, unidos operativamente con una secuencia de nucleótidos que codifica una HA modificada con bucle proteolítico eliminado (enlazador GG) o una HA nativa. En la mayoría de los casos, la expresión (determinada como título de hemaglutinación) fue mayor para la construcción basada en CPMV HT+, CPMV 160 o CPMV160+ que

demuestra niveles de expresión importantes.

Los elementos potenciadores pueden usarse para lograr un alto nivel de expresión transitoria de proteínas HA mutantes (modificadas) con bucles proteolíticos modificados. Los elementos potenciadores pueden basarse en virus de plantas de ARN, que incluyen los comovirus, tales como el *virus del mosaico del caupí* (CPMV; ver, por ejemplo, los documentos WO2007/135480; WO2009/087391; US 2010/0287670, Sainsbury F. y otros, 2008, Plant Physiology; 148: 121-1218; Sainsbury F. y otros, 2008, Plant Biotechnology Journal; 6: 82-92; Sainsbury F. y otros, 2009, Plant Biotechnology Journal; 7: 682-693; Sainsbury F. y otros, 2009, Methods in Molecular Biology, Recombinant Proteins From Plants, vol. 483: 25-39).

CPMV 160 (CPMVX) y CPMV 160+ (CPMVX+)

En una modalidad, los elementos potenciadores son "CPMVX" (también denominado "CPMV 160") y/o "CPMVX+" (también denominado "CPMV 160+") como se describe en el documento US 61/925,852.

El potenciador de la expresión "CPMVX" comprende una región no traducida (UTR) 5' de comovirus como el virus del mosaico del caupí (CPMV). La 5'UTR de los nucleótidos 1-160 de la secuencia de ARN -2 del CPMV (SEQ ID NO: 93), comienza en el sitio de inicio de la transcripción hasta el primer codón de inicio en marco (en la posición 161), que sirve como el sitio de inicio para la producción de la más larga de dos proteínas carboxi coterminales codificadas por un segmento de genoma de comovirus natural. Además, un "tercer" sitio de iniciación en (o correspondiente a) la posición 115 en la secuencia genómica de ARN-2 del CPMV también puede estar mutado, eliminado o alterado de otra manera. Se ha demostrado que la eliminación de AUG 115 además de la eliminación de AUG 161 mejora la expresión cuando se combina con una proteína M incompleta (Sainsbury y Lomonosoff, 2008, Plant Physiology; 148: 1212-1218; documento WO 2009/087391).

CPMVX comprende X nucleótidos de la SEQ ID NO: 93, donde X=160, 155, 150 o 114 de la SEQ ID NO: 93, o una secuencia que comprende entre 80 % a 100 % de similitud de secuencia con CPMVX, donde X=160, 155, 150 o 114 de la SEQ ID NO: 93. Este potenciador de la expresión generalmente se denomina CPMVX (ver la Figura 26A).

El potenciador de la expresión CPMVX, donde X=160, consiste en los nucleótidos 1-160 de la SEQ ID NO: 93:

```

1   tattaaaatc ttaatagggt ttgataaaag cgaacgtggg gaaacccgaa ccaaaccctc
61  ttctaaactc tctctcatct ctcttaaage aaacttctct cttgtctttc ttgcgtgagc
121 gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca (SEQ ID NO:93)

```

La secuencia potenciadora CPMVX se puede fusionar adicionalmente a una secuencia de relleno, en donde el CPMVX comprende X nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, donde X=160, 155, 150 o 114 de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia que comprende entre 80 a 100 % de similitud de secuencia con CPMVX, donde X=160, 155, 150 o 114 de la SEQ ID NO: 93, y la secuencia de relleno comprende de 1-100 nucleótidos fusionados al extremo 3' de la secuencia de CPMVX. Por ejemplo, la secuencia de relleno puede comprender aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nucleótidos, o cualquier número de nucleótidos entre ellos.

Si la secuencia CPMVX comprende un fragmento de relleno, entonces este potenciador de la expresión puede denominarse CPMVX+ (consulte la Figura 26A), donde X=160, 155, 150, 114 de la SEQ ID NO: 1, también puede denominarse CPMVX que comprende una secuencia de relleno, o puede denominarse CPMV160+; CPMV155+; CPMV150+; CPMV114+, cuando X=160, 155, 150 o 114, respectivamente. Las construcciones que comprenden CPMVX que no comprende una secuencia de relleno pueden denominarse CPMVX+, donde X=160, 155, 150, 114 de la SEQ ID NO: 93, y donde la secuencia de relleno tiene 0 nucleótidos de longitud.

La secuencia de relleno puede modificarse por truncamiento, delección o reemplazo de la secuencia nativa de 5'UTR de CPMV que se encuentra 3' al nucleótido 160. La secuencia de relleno modificada puede eliminarse, reemplazarse, truncarse o acortarse en comparación con la secuencia de relleno inicial o no modificada (es decir, nativa) asociada con la 5'UTR (como se describe en Sainsbury F., y Lomonosoff G.P., 2008, Plant Physiol. 148: págs. 1212-1218). La secuencia de relleno puede comprender uno o más sitios de restricción (polienlazador, sitio de clonación múltiple, uno o más sitios de clonación), una o más secuencias Kozak de plantas, una o más secuencias enlazadoras, uno o más sitios de recombinación, o una combinación de estos. Por ejemplo, que no debe considerarse limitante, una secuencia de relleno puede comprender en serie, un sitio de clonación múltiple de una longitud deseada, fusionado a una secuencia kozak de plantas. La secuencia de relleno no comprende una secuencia de nucleótidos de la secuencia

5'UTR nativa que se coloca 3' al nucleótido 160 de la 5'UTR nativa de CPMV, por ejemplo los nucleótidos 161 al 512 como se muestra en la Figura 1 de Sainsbury F. y Lomonosoff G.P. (2008, Plant Physiol. 148: págs. 1212-1218), o los nucleótidos 161-509 de la SEQ ID NO: 4. Es decir, la proteína M incompleta presente en la secuencia de CPMV HT de la técnica anterior (Figura 1; de Sainsbury F. y Lomonosoff G.P., 2008) se elimina de la 5'UTR en la presente invención.

Las secuencias consenso Kozak en plantas son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Rangan y otros, Mol. Biotechnol., 2008, julio 39(3), págs. 207-213). Tanto las secuencias Kozak sintéticas como las naturales pueden usarse en el potenciador de la expresión o pueden fusionarse con la secuencia de nucleótidos de interés como se describe en el presente documento.

La secuencia kozak de plantas puede ser cualquier secuencia kozak conocida de plantas (véase, por ejemplo, L. Rangan y otros, Mol. Biotechnol.2008), incluidas, entre otras, las siguientes secuencias consenso en plantas:

caA(A/C)a	(SEQ ID NO: 174; reino vegetal)
aaA(A/C)a	(SEQ ID NO: 175; dicotiledóneas)
aa(A/G)(A/C)a	(SEQ ID NO: 176; arabidopsis)

La secuencia kozak de plantas también se puede seleccionar del grupo de:

AGAAA	(SEQ ID NO: 177)
AGACA	(SEQ ID NO: 178)
AGGAA	(SEQ ID NO: 179)
AAAAA	(SEQ ID NO: 180)
AAACA	(SEQ ID NO: 181)
AAGCA	(SEQ ID NO: 182)
AAGAA	(SEQ ID NO: 183)
AAAGAA	(SEQ ID NO: 184)
AAAGAA	(SEQ ID NO: 185)

(A/-)A(A/G) (A/G) (A/C)A. (SEQ ID NO: 186; secuencia consenso)

El potenciador de la expresión CPMVX, o CPMVX+, puede unirse operativamente en el extremo 5' de la secuencia potenciadora con una región reguladora que es activa en una planta, y unirse operativamente a una secuencia de nucleótidos de interés en el extremo 3' del potenciador de la expresión (Figura 26A), para conducir la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés dentro de una planta huésped.

CPMV HT+, CPMV HT+[WT115], CPMV HT+ [511]

En otra modalidad, los elementos potenciadores son "CPMV HT+" como se describe en el documento US 61/971,274. El potenciador de la expresión "CPMV HT+" (ver la Figura 27A) comprende una región no traducida (UTR) 5' de comovirus y una secuencia de relleno modificada, alargada o truncada.

Se proporciona, además, un sistema de expresión en plantas que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que comprende una región reguladora, unida operativamente con uno o más de un potenciador de la expresión como se describe en el presente documento (por ejemplo, CPMV HT+, CPMV HT+ [WT115], CPMV HT+ [511]) y una secuencia de nucleótidos que codifica una HA modificada. Se describe, además, un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora (región reguladora), un potenciador de la expresión (por ejemplo, CPMV HT+ o CPMV HT+[WT115]) que comprende una 5'UTR de comovirus y una secuencia de relleno con una secuencia kozak de plantas fusionada a una o más secuencias de ácido nucleico que codifican una HA modificada. El ácido nucleico puede comprender además una secuencia que comprende una región no traducida (UTR) 3' de comovirus, por ejemplo, una 3'UTR de plastocianina, u otra 3'UTR activa en una planta, y una secuencia terminadora, por ejemplo un terminador NOS, operativamente unido al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica una HA modificada (referida como nucleótido de interés en la Figura 27A), de modo que la secuencia de nucleótidos que codifica la HA modificada se inserta hacia el extremo 3' de la región no traducida (UTR) 3' de comovirus, 3'UTR de plastocianina, u otra secuencia 3'UTR.

La SEQ ID NO: 173 comprende un potenciador de la expresión "CPMV HT" como se conoce en la técnica anterior (por ejemplo, la Figura 1 de Sainsbury y Lomonosoff 2008, Plant Physiol. 148: págs. 1212-1218). CPMV HT incluye la secuencia 5'UTR de los nucleótidos 1-160 de SEQ ID NO: 173 con nucleótidos modificados en la posición 115 (cgt), y una proteína M incompleta con un nucleótido modificado en la posición 162 (acg), y carece de una secuencia kozak de plantas (5'UTR: nucleótidos 1-160; proteína M incompleta subrayada, nucleótidos 161-509). La SEQ ID NO: 173 incluye, además, un sitio de clonación múltiple (cursiva, nucleótidos 510-528) que no está presente en la secuencia de CPMV HT de la técnica anterior:

1 tatta~~aa~~a~~at~~c tta~~at~~ag~~gt~~t ttgata~~aa~~a~~ag~~ cgaacgtggg gaaacccgaa ccaa~~ac~~cttc
5 61 ttctaa~~act~~c tctctcatct ctcttaa~~agc~~ aaacttctct cttgtctttc ttgcgtgagc
121 gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt tcaactgaagc
10 181 gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgccggcgcca ttaaataacg tgtacttgct
241 ctattcttgt cgggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct gttcagcccc
15 301 atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct acttctgctt
361 gacgaggtat tggtgcctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt tctataagaa
20 421 atctagtatt ttctttgaaa cagagtttct ccgtgggttt cgaacttgga gaaagattgt
481 taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt cgggccc SEQ ID NO: 173

El CPMV HT+ con una secuencia consenso de Kozak de plantas se proporciona en la SEQ ID NO: 187 (nucleótido 1-160, 5'UTR, incluido ATG modificado en las posiciones 115 (GTG) en minúscula, negrita y cursiva; fragmento de relleno que comprende: una proteína M incompleta subrayada, nucleótidos 161 - 509, con nucleótido modificado en 162 (ACG); un sitio de clonación múltiple, cursiva, nucleótidos 510-528; y una secuencia kozak consenso de plantas, mayúsculas y negrita, nucleótidos 529-534).

1 tatta~~aa~~a~~at~~c tta~~at~~ag~~gt~~t ttgata~~aa~~a~~ag~~ cgaacgtggg gaaacccgaa ccaa~~ac~~cttc
35 61 ttctaa~~act~~c tctctcatct ctcttaa~~agc~~ aaacttctct cttgtctttc ttgc~~gt~~gagc
121 gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt tcaactgaagc
40 181 gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgccggcgcca ttaaataacg tgtacttgct
241 ctattcttgt cgggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct gttcagcccc
45 301 atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct acttctgctt
361 gacgaggtat tggtgcctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt tctataagaa
50 421 atctagtatt ttctttgaaa cagagtttct ccgtgggttt cgaacttgga gaaagattgt
55 481 taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt *tcgggccc*aa *taccgcgg* (A/-)A (A/G)

(A/G) (A/C)A

(SEQ ID NO:187)

La SEQ ID NO: 188 ("CPMV HT+ 511") comprende un segmento de la secuencia nativa del genoma de ARN 2 de CPMV de los nucleótidos 1-154. La secuencia 5'UTR de los nucleótidos 1-511 de la SEQ ID NO: 188 comprende secuencias "atg" modificadas en las posiciones 115 ("g" en lugar de "a"; cursiva en negrita) y 162 ("c" en lugar de "t"; cursiva en negrita), y una proteína M incompleta (subrayada) de los nucleótidos 161-511. CPMV HT+ 511 comprende una secuencia consenso kozak de la proteína M nativa (nucleótidos 508-511; negrita):

1 tatttaaaatc ttaatagggt ttgataaaaag cgaacgtggg gaaacccgaa ccaaacccttc
61 ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct cttgtctttc ttgc**gt**gagc
5 121 gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca **acg**ttttctt tcaactgaagc
181 gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg tgtacttgtc
10 241 ctattcttgt cgggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggtgct gttcagcccc
301 atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct acttctgctt
15 361 gacgaggtat tgttgctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt tctataagaa
421 atctagtatt ttctttgaaa cagagtttct ccgtggtttt cgaacttgga gaaagattgt
20 481 taagcttctg tatattctgc ccaaatt**tga** **a**... SEQ ID NO: 188

Otro ejemplo de una secuencia potenciadora de CPMV HT+ es proporcionado por la secuencia de SEQ ID NO: 189 (CPMV HT+[WT115]). Los casetes o vectores de expresión que comprenden CPMV HT+ y que incluyen una región reguladora de plantas en asociación operativa con la secuencia potenciadora de la expresión de la SEQ ID NO: 189, y el sitio de inicio de la transcripción (ATG) en el extremo 3' fusionado a una secuencia de nucleótidos que codifica una HA modificada son también parte de la presente invención.

SEQ ID NO: 189 (CPMV HT+[WT115]) nucleótidos 1-160, 5'UTR, con un ATG en la posición 115-117, minúscula en negrita; fragmento de relleno que comprende: una proteína M incompleta subrayada, nucleótidos 161 - 509; con un ATG modificado en la posición 161-153 minúscula en negrita y subrayado, un sitio de clonación múltiple, cursiva, nucleótidos 510-528; y una secuencia kozak de plantas, mayúsculas y negrita, nucleótidos 529-534).

1 tatttaaaatc ttaatagggt ttgataaaaag cgaacgtggg gaaacccgaa ccaaacccttc
61 ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct cttgtctttc ttgc**atg**gagc
40 121 gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca **acg**ttttctt tcaactgaagc
181 gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg tgtacttgtc
45 241 ctattcttgt cgggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggtgct gttcagcccc
301 atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct acttctgctt
50 361 gacgaggtat tgttgctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt tctataagaa
421 atctagtatt ttctttgaaa cagagtttct ccgtggtttt cgaacttgga gaaagattgt
481 taagcttctg tatattctgc ccaaattt**gt** **t**cgggcccaa **taccg**cg**gAG** **AAAA**

(SEQ ID NO: 189)

La secuencia kozak de plantas de SEQ ID NO: 189 puede ser cualquier secuencia kozak de plantas, que incluye pero no se limita a una de las secuencias de SEQ ID NO: 174-186.

Péptido señal

Un péptido señal (SP) puede ser nativo de la HA modificada o HA modificada quimérica, o un péptido señal puede ser heterólogo con respecto a la secuencia primaria de la HA modificada que se expresa. La HA modificada puede comprender un péptido señal de un primer tipo, subtipo o cepa de la gripe con el equilibrio de la HA de uno o más de un tipo, subtipo o cepa de la gripe diferente. Por ejemplo, el péptido señal nativo de HA subtipos de H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9 o gripe tipo B se puede usar para expresar la HA modificada en un sistema vegetal. En algunas modalidades de la invención, el SP puede ser de la gripe tipo B, H1, H3 o H5; o del subtipo H1/Bri, H1/NC, H5/Indo, H3/Bri o B/Flo.

Además, la HA modificada o la HA modificada quimérica puede comprender un péptido señal nativo o no nativo; el péptido señal no nativo puede ser de origen vegetal u obtenerse de un polipéptido animal o bacteriano. El péptido señal nativo puede corresponder al de la HA o a HA modificada que se expresa, además, el péptido señal puede ser de una proteína estructural o hemaglutinina de un virus distinto de la gripe. Ejemplos no limitantes de un péptido señal que se puede usar es el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDI SP; nucleótidos 32-103 del número de acceso Z11499 también ver los documentos WO 2009/076778; WO 2010/148511, o WO 2010/003235), o el péptido señal de patatina (Pata SP; nucleótidos localizados 1738 - 1806 del número de acceso de GenBank A08215). La secuencia de nucleótidos de Pata SP para este número de acceso es:

ATGGCAACTACTAAAACCTTTTAAATTTTATTTTATGATATTAGCAACTACTAGTTCAACATGTGCT
(SEQ ID NO: 171)

la secuencia de aminoácidos del péptido señal de patatina A es:

MATTKTFLILFFMILATTSSTCA (SEQ ID NO: 172)

Por lo tanto, la presente invención proporciona una HA modificada o HA modificada quimérica que comprende un péptido señal nativo o no nativo, y ácidos nucleicos que codifican tales proteínas de HA modificadas quiméricas.

Coexpresión con proteína de canal

La HA mutante (modificada) puede producirse en una planta coexpresando un primer ácido nucleico que codifica la HA modificada con un segundo ácido nucleico que codifica una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones. Los ácidos nucleicos primero y segundo pueden introducirse en la planta en el mismo paso, o pueden introducirse en la planta secuencialmente. Los ácidos nucleicos primero y segundo pueden introducirse en la planta de manera transitoria, o de manera estable. Además, una planta que expresa un primer ácido nucleico que codifica la HA modificada puede transformarse con una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones (segundo ácido nucleico), de modo que tanto el primer como el segundo ácido nucleico se coexpresan en la planta. Alternativamente, una planta que expresa una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, (segundo ácido nucleico) puede transformarse con un primer ácido nucleico que codifica la HA modificada de modo que tanto el primer como el segundo ácido nucleico se coexpresan en la planta. Además, una primera planta que expresa el primer ácido nucleico que codifica una HA modificada, puede cruzarse con una segunda planta que expresa el segundo ácido nucleico que codifica la proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, para producir una planta de prole que coexpresa los ácidos nucleicos primero y segundo que codifican la HA modificada y la proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a, una proteína de canal de protones, respectivamente.

Sin desear limitarse a la teoría, el pH de un compartimento celular que comprende HA modificada, incluido el aparato de Golgi, puede ser importante para el plegamiento, la estabilidad y/o la proteólisis de HA. Las proteínas de canal de protones, como por ejemplo la proteína M2 y BM2 de la gripe, pueden regular el pH en los compartimentos celulares. Por ejemplo, M2 regula la potenciación de la fusión de membranas al amortiguar los compartimentos intracelulares tanto en las etapas tardías como tempranas de la replicación viral de la gripe.

Al coexpresar una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, junto con una HA modificada, el pH dentro del aparato de Golgi puede aumentar y dar como resultado un aumento de la estabilidad, reducción de la degradación o una combinación de estos, y aumentar los niveles de expresión y el rendimiento de HA modificada y/o VLP.

Al coexpresar una HA modificada junto con una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones, en una planta, se observa un mayor rendimiento de HA y/o VLP, en comparación con una planta que expresó la modificación sin coexpresión de la proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a, una proteína de canal de protones (véanse las Figuras 13A y 14). Como se muestra, por ejemplo, en la Figura 13A, la coexpresión de M2 con la HA modificada de la gripe B aumentó el nivel de acumulación de HA (Figura 13A, 1059 frente a 1059+1261).

Además, la eficacia de M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 para aumentar la acumulación de la HA modificada de la gripe B y H3 se comparó con la de M2 de la gripe A/New Caledonia/20/1999. Para la HA modificada de la gripe B, la comparación se realizó mediante análisis de transferencia Western de extractos de proteínas de plantas transformadas con las construcciones 1059, 1059+1261 y 1059+859. Los resultados obtenidos demostraron que la coexpresión de

M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (codificada por la construcción núm. 859) fue tan eficiente como la coexpresión de M2 de la gripe A/New Caledonia/20/1999 (codificada por la construcción núm. 1261) para aumentar la acumulación de la HA modificada de la gripe B (Figura 14).

Como se usa en el presente documento, los términos "M2", "proteína M2", "secuencia de M2" y "dominio de M2" se refieren a toda o una parte de una secuencia de la proteína M2 aislada, basada o presente en cualquier cepa o aislado del virus de la gripe producidos de forma natural o artificial. Por lo tanto, el término M2 y similares incluyen variantes de la secuencia de M2 de origen natural producidas por mutación durante el ciclo de vida del virus o producidas en respuesta a una presión selectiva (por ejemplo, terapia farmacológica, expansión del tropismo o infectividad de la célula huésped, etc.), así como secuencias de M2 producidas de forma recombinante o sintética. Ejemplos no limitativos de secuencias que pueden usarse con la presente invención incluyen M2 de A/Puerto Rico/8/1934 y M2 de A/New Caledonia/20/1999.

Respuesta inmunitaria

Una "respuesta inmunitaria" generalmente se refiere a una respuesta del sistema inmunitario adaptativo. El sistema inmunitario adaptativo generalmente comprende una respuesta humoral y una respuesta mediada por células. La respuesta humoral es el aspecto de la inmunidad mediada por anticuerpos secretados, producidos en las células del linaje de linfocitos B (célula B). Los anticuerpos secretados se unen a los antígenos en las superficies de los microbios invasores (como virus o bacterias), lo que los marca para su destrucción. La inmunidad humoral se usa generalmente para referirse a la producción de anticuerpos y los procesos que la acompañan, así como a las funciones efectoras de los anticuerpos, incluida la activación de células Th2 y la producción de citocinas, la generación de células de memoria, la promoción de la fagocitosis por opsonina, la eliminación de patógenos y similares. Los términos "modular" o "modulación" o similares se refieren a un aumento o disminución en una respuesta o parámetro particular, según lo determinado por cualquiera de varios ensayos generalmente conocidos o usados, algunos de los cuales se ejemplifican en este documento.

Una respuesta mediada por células es una respuesta inmunitaria que no involucra anticuerpos, sino que implica la activación de macrófagos, células asesinas naturales (NK), linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y la liberación de varias citocinas en respuesta a un antígeno. La inmunidad mediada por células se usa generalmente para referirse a alguna activación de células Th, activación de células Tc y respuestas mediadas por células T. La inmunidad celular es de particular importancia para responder a las infecciones virales.

Por ejemplo, la inducción de linfocitos T positivos para CD8 específicos de antígeno se puede medir mediante el uso de un ensayo ELISPOT; La estimulación de linfocitos T CD4 positivos se puede medir mediante el uso de un ensayo de proliferación. Los títulos de anticuerpos contra la gripe pueden cuantificarse mediante el uso de un ensayo ELISA; los isotipos de anticuerpos específicos de un antígeno o con reactividad cruzada también se pueden medir con el uso de anticuerpos anti-isotipo (por ejemplo, anti-IgG, IgA, IgE o IgM). Los métodos y técnicas para realizar tales ensayos son bien conocidos en la técnica.

Los títulos de HAI con reactividad cruzada también se pueden usar para demostrar la eficacia de una respuesta inmunitaria a otras cepas de virus relacionadas con el subtipo de vacuna. Por ejemplo, el suero de un sujeto inmunizado con una composición vacunal de una primera cepa (por ejemplo, VLP de A/Indonesia 5/05) puede usarse en un ensayo de HAI con una segunda cepa de virus completo o partículas virales (por ejemplo, A/Vietnam/1194/2004), y el título de HAI determinado.

La presencia o los niveles de citocinas también pueden cuantificarse. Por ejemplo, una respuesta de células T auxiliares (Th1/Th2) se caracterizará por la medición de las células secretoras de IFN- γ e IL-4 mediante ELISA (por ejemplo, kits de BD Biosciences OptEIA). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o los esplenocitos obtenidos de un sujeto pueden cultivarse y analizarse el sobrenadante. Los linfocitos T también se pueden cuantificar mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), mediante el uso de etiquetas fluorescentes específicas de marcadores y métodos como se conocen en la técnica.

También se puede realizar un ensayo de microneutralización para caracterizar una respuesta inmunitaria en un sujeto, véanse, por ejemplo, los métodos de Rowe y otros, 1973. Los títulos de neutralización del virus se pueden obtener de varias maneras, que incluyen: 1) enumeración de las placas de lisis (ensayo de placa) después de la fijación/coloración con cristal violeta; 2) observación microscópica de la lisis celular en cultivo; 3) ELISA y detección espectrofotométrica de la proteína del virus NP (correlacionada con la infección viral de las células huésped).

Los términos "partícula similar a virus" (VLP), o "partículas similares a virus" o "VLP" se refieren a estructuras que se autoensamblan y comprenden proteínas virales, por ejemplo, una proteína HA de la gripe o proteína HA modificada, por ejemplo, una proteína HA0, en donde el bucle proteolítico ha sido modificado. Generalmente las VLP 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. En algunos ejemplos, las VLP pueden comprender una sola especie de proteína o más de una especie de proteína. Para las VLP que comprenden más de una especie de proteína, la especie de proteína puede ser de la misma especie de virus, o puede comprender una

proteína de una especie, género, subfamilia o familia de virus diferentes (según lo designado por la nomenclatura de ICTV). En otros ejemplos, una o más de las especies de proteínas que comprenden una VLP pueden modificarse a partir de la secuencia natural, como por ejemplo una HA modificada como se describe en el presente documento. Las VLP se pueden producir en células huésped adecuadas, incluidas las células huésped de plantas e insectos. Tras la extracción de la célula huésped y tras el aislamiento y posterior purificación en condiciones adecuadas, las VLP pueden purificarse como estructuras intactas.

Además, se pueden producir VLP que comprenden una combinación de subtipos de HA. Por ejemplo, las VLP pueden comprender una o más de una HA o una o más de una HA modificada del subtipo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, HA del subtipo B o una combinación de estos. La selección de la combinación de HA o HA modificadas puede determinarse por el uso previsto de la vacuna preparada a partir de la VLP. Por ejemplo, una vacuna para usar en la inoculación de aves puede comprender cualquier combinación de subtipos de HA o subtipos de HA modificadas, mientras que las VLP útiles para inocular humanos pueden comprender uno o más de los subtipos o subtipos modificados de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, HA de subtipo B. Sin embargo, se pueden preparar otras combinaciones de subtipos de HA o subtipos de HA modificadas según el uso de la VLP. Para producir VLP que comprenden combinaciones de subtipos de HA o subtipos de HA modificadas, el subtipo de HA deseada o el subtipo de HA modificada se pueden coexpresar dentro de la misma célula, por ejemplo, una célula vegetal.

Las VLP producidas a partir de proteínas derivadas de la gripe, de acuerdo con la presente invención, no comprenden proteína M1. Se sabe que la proteína M1 se une al ARN (Wakefield y Brownlee, 1989), que es un contaminante de la preparación de VLP. La presencia de ARN no se desea cuando se obtiene la aprobación reglamentaria para el producto de VLP, por lo tanto, una preparación de VLP que carece de ARN puede ser ventajosa.

Las VLP producidas como se describe en el presente documento típicamente no comprenden neuraminidasa (NA). Sin embargo, NA puede coexpresarse con HA si se desean VLP que comprenden HA y NA.

La invención incluye, además, pero sin limitarse a, VLP derivadas de virus que obtienen una envoltura lipídica de la membrana plasmática de la célula en la que se expresan las proteínas de VLP. Por ejemplo, si la VLP se expresa en un sistema basado en plantas, la VLP puede obtener una envoltura lipídica de la membrana plasmática de la célula.

En general, el término "lípidos" se refiere a moléculas solubles en grasa (lipofílicas) que se producen naturalmente. El término también se usa más específicamente para referirse a los ácidos grasos y sus derivados (incluidos los tri, di y monoglicéridos y fosfolípidos), así como otros metabolitos o esteroides que contienen esteroides solubles en grasa. Los fosfolípidos son un componente principal de todas las membranas biológicas, junto con los glucolípidos, esteroides y proteínas. Los ejemplos de fosfolípidos incluyen fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y similares. Los ejemplos de esteroides incluyen zoosteroides (por ejemplo, colesterol) y fitoesteroides. Se han identificado más de 200 fitoesteroides en varias especies de plantas, donde los más comunes son campesterol, estigmasterol, ergosterol, brasicasterol, delta-7-estigmasterol, delta-7-avenasterol, daunosterol, sitosterol, 24-metilcolesterol, colesterol o beta-sitosterol. Como entenderá un experto en la materia, la composición lipídica de la membrana plasmática de una célula puede variar con las condiciones de cultivo o crecimiento de la célula u organismo del que se obtiene la célula.

Las membranas celulares generalmente comprenden bicapas lipídicas, así como proteínas para diversas funciones. Se pueden encontrar concentraciones localizadas de lípidos particulares en la bicapa lipídica, denominadas "balsas lipídicas". Sin desear limitarse a la teoría, las balsas lipídicas pueden tener un papel importante en la endo y exocitosis, la entrada o salida de virus u otros agentes infecciosos, la transducción de señales intercelulares, la interacción con otros componentes estructurales de la célula u organismo, como matrices intracelulares y extracelulares.

En las plantas, las VLP de la gripe brotan de la membrana plasmática, por lo tanto, la composición lipídica de las VLP refleja su origen. Las VLP producidas de acuerdo con la presente invención comprenden HA de uno o más de un tipo o subtipo de gripe, en complejo con lípidos derivados de plantas. Los lípidos de las plantas pueden estimular células inmunitarias específicas y mejorar la respuesta inmunitaria inducida. Las membranas vegetales están constituidas por lípidos, fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), y también contienen glucosfingolípidos, saponinas y fitoesteroides. Además, las balsas lipídicas también se encuentran en las membranas plasmáticas de las plantas; estos microdominios están enriquecidos en esfingolípidos y esteroides. En las plantas, se sabe que existe una variedad de fitoesteroides, que incluyen estigmasterol, sitosterol, 24-metilcolesterol y colesterol (Mongrand y otros, 2004).

La PC y la PE, así como los glucosfingolípidos pueden unirse a las moléculas CD1 expresadas por las células inmunitarias de los mamíferos, como las células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas y los macrófagos y otras células, incluidos los linfocitos B y T en el timo y el hígado (Tsuji M. 2006). Las moléculas CD1 son estructuralmente similares a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y su función es presentar antígenos de glucolípidos a las células NKT (células T asesinas naturales). Tras la activación, las células NKT activan las células de la inmunidad innata, como las células NK y las células dendríticas, y también activan las células de la inmunidad adaptativa, como las células T y las células B productoras de anticuerpos.

Se puede encontrar una variedad de fitoesteroides en una membrana plasmática; el complemento específico puede variar según la especie, las condiciones de crecimiento, los recursos nutrientes o el estado del patógeno, por nombrar algunos factores. En general, el beta-sitosterol es el fitoesterol más abundante.

Los fitoesteroides presentes en una VLP de la gripe en complejo con una bicapa lipídica, como una envoltura derivada de la membrana plasmática, pueden proporcionar una composición vacunal ventajosa. Sin desear limitarse a la teoría, las VLP de origen vegetal en complejo con una bicapa lipídica, como una envoltura derivada de la membrana plasmática, pueden inducir una reacción inmunitaria más fuerte que las VLP producidas en otros sistemas de expresión, y puede ser similar a la reacción inmunitaria inducida por vacunas con virus enteros vivos o atenuados.

La VLP como se describe en el presente documento puede estar en complejo con una bicapa lipídica derivada de plantas. En algunas modalidades, la bicapa lipídica derivada de plantas puede comprender la envoltura de la VLP. Los lípidos derivados de la planta pueden comprender componentes lipídicos de la membrana plasmática de la planta donde se produce la VLP, que incluyen, entre otros, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), glucosfingolípidos, fitoesteroides o una combinación de estos. Un lípido derivado de plantas se puede denominar alternativamente como un "lípido vegetal". Los ejemplos de fitoesteroides son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, estigmasterol, sitosterol, 24-metilcolesterol y colesterol; véase, por ejemplo, Mongrand y otros, 2004.

Se puede evaluar la estructura y el tamaño de las VLP mediante, por ejemplo, un ensayo de hemaglutinación, microscopía electrónica o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Para la cromatografía de exclusión por tamaño, las proteínas solubles totales se pueden extraer del tejido vegetal al homogeneizar (Polytron) una muestra de material vegetal congelado triturado en tampón de extracción, y el material insoluble se elimina por centrifugación. También puede usarse la precipitación con PEG. La proteína soluble se cuantifica y el extracto pasa a través de una matriz de exclusión por tamaño, por ejemplo, pero sin limitarse a Sephacryl™. Después de la cromatografía, las fracciones pueden analizarse adicionalmente por inmunotransferencia para determinar el complemento proteico de la fracción.

Sin desear limitarse a la teoría, la capacidad de HA para unirse a RBC de diferentes animales está dirigida por la afinidad de HA por los ácidos siálicos $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ y la presencia de estos ácidos siálicos en la superficie de RBC. La HA equina y aviar de los virus de la gripe aglutina los eritrocitos de todas las especies, incluidos pavos, pollos, patos, cobayas, seres humanos, ovejas, caballos y vacas; mientras que las HA humanas se unirán a los eritrocitos de pavo, pollos, patos, cobayas, seres humanos y ovejas (ver también Ito T. y otros, 1997, Virology, vol 227, p493-499; y Medeiros R y otros, 2001, Virology, vol 289 p.74-85).

El plegamiento correcto de la proteína viral expresada puede ser importante para la estabilidad de la proteína, la formación de multímeros, la formación de VLP, la función de la proteína viral y el reconocimiento de la proteína viral por un anticuerpo, entre otras características. El plegamiento y la acumulación de una proteína pueden estar influenciados por uno o más factores, que incluyen, entre otros, la secuencia de la proteína, la abundancia relativa de la proteína, el grado de amontonamiento 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 chaperonas, o similares.

Las proteínas de choque térmico (Hsp) o las proteínas de estrés son ejemplos de proteínas chaperonas, que pueden participar en varios procesos celulares que incluyen síntesis de proteínas, tráfico intracelular, prevención de plegamientos erróneos, prevención de la agregación de proteínas, ensamblaje y desensamblaje de complejos proteicos, plegamiento de proteínas y desagregación de proteínas. Los ejemplos de tales proteínas chaperonas incluyen, pero no se limitan a, Hsp60, Hsp65, Hsp 70, Hsp90, Hsp100, Hsp20-30, Hsp10, Hsp100-200, Hsp100, Hsp90, Lon, TF55, FKBP, ciclofilinas, ClpP, GrpE, ubiquitina, calnexina y proteínas 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); patente de Estados Unidos núm. 5,232,833). Como se describe en este documento, las proteínas chaperonas, por ejemplo, pero sin limitarse a Hsp40 y Hsp70, pueden usarse para asegurar el plegamiento de una proteína viral.

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

Los ejemplos de Hsp40 incluyen DnaJ de procariotas como *E. coli* y micobacterias y HsJ1, HDJ1 y Hsp40 de eucariotas, como alfalfa (Frugis y otros, 1999. Plant Molecular Biology 40: 397-408). Un ejemplo particular de una Hsp40 es MsJ1 de *M. sativa* (ref. del Genbank: AJ000995.1). Hsp40 desempeña un papel como chaperona molecular

en el plegamiento de proteínas, la termotolerancia y la replicación del ADN, entre otras actividades celulares.

Entre las Hsp, Hsp70 y su co-chaperona, Hsp40, están involucradas en la estabilización de los polipéptidos en traducción y recién sintetizados antes de que se complete la síntesis. Sin desear estar limitados por la teoría, Hsp40 se une a los parches hidrófobos de polipéptidos desplegados (nacientes o recién transferidos), lo que facilita 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 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 viral en las hojas agroinfiltradas pueden conducir a la acumulación de proteína viral en el citosol, y la coexpresión de una o más de una proteína chaperona como Hsp70, Hsp40 o Hsp70 y Hsp40 puede reducir el nivel de interacción con otros parches hidrófobos, y aumentan el número de proteínas que exhiben características estructurales terciarias y cuaternarias que permiten la formación de partículas similares a virus.

Por lo tanto, la presente invención proporciona, además, un método para producir VLP de proteína viral en una planta, en donde un primer ácido nucleico que codifica una proteína viral se coexpresa con un segundo ácido nucleico que codifica una proteína de canal, por ejemplo, pero sin limitarse a una proteína de canal de protones y un tercer ácido nucleico que codifica una chaperona. Los ácidos nucleicos primero, segundo y tercero pueden introducirse en la planta en el mismo paso, o pueden introducirse en la planta secuencialmente.

La VLP producida dentro de una planta puede inducir una proteína viral que comprende N-glucanos específicos de la planta. Por lo tanto, esta invención proporciona, además, una VLP que comprende proteína viral que tiene N-glucanos específicos de la planta.

Además, se conoce la modificación de N-glucano en las plantas (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2008/151440; WO 2010/006452; o US 60/944,344) y se puede producir proteína viral que tiene N-glucanos modificados. Se puede obtener proteína viral que comprende un patrón de glicosilación modificado, por ejemplo, N-glucanos con reducción de fucosilación, xilosilación, o ambas, fucosilación y xilosilación, o se puede obtener proteína viral que tiene un patrón de glicosilación modificado, en donde la proteína carece de fucosilación, xilosilación, o ambos, y comprende una galactosilación aumentada. Además, la modulación de modificaciones postraduccionales, por ejemplo, la adición de galactosa terminal puede dar como resultado una reducción de la fucosilación y la xilosilación de la proteína viral expresada en comparación con una planta natural que expresa una proteína viral.

Por ejemplo, que no debe considerarse limitante, la síntesis de la proteína viral que tiene un patrón de glicosilación modificado se puede lograr coexpresando la proteína de interés junto con una secuencia de nucleótidos que codifica beta-1.4galactosiltransferasa (GalT), por ejemplo, pero sin limitarse a GalT de mamífero o GalT humana, sin embargo, también se puede utilizar GalT de otras fuentes. El dominio catalítico de GalT también puede fusionarse con un dominio CTS (es decir, la cola citoplasmática, dominio transmembrana, región del tallo) de N-acetilglucosaminil transferasa (GNT1), para producir una enzima híbrida GNT1-GalT, y la enzima híbrida puede coexpresarse con la proteína viral. La proteína viral también se puede coexpresar junto con una secuencia de nucleótidos que codifica N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III), por ejemplo, pero sin limitarse a GnT-III de mamífero o GnT-III humana, también pueden 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 incluye, además, VLP que comprenden una o más proteínas virales que tienen N-glucanos modificados.

Los ejemplos no limitantes de secuencias que pueden usarse con la presente invención para producir HA modificadas también incluyen las descritas en los documentos WO 2009/009876; WO 2009/076778; WO 2010/003225; WO 2010/148511; WO 2010/003235; WO 2010/006452), por ejemplo, pero sin limitarse a:

la proteína H1 codificada por la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, cepa de A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/ Solomon Islands 3/2006 (H1N1), /PuertoRico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1);

la proteína H2 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Singapore/1/57 (H2N2);

la proteína H3 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Victoria/361/2011 (H3N2) o A/Perth/16/2009 (H3N2);

la proteína H5 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Indonesia/5/2005 (H5N1), A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)

la proteína H6 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Teal/HongKong/W312/97 (H6N1);

la proteína H7 codificada por la molécula de ácido nucleico también puede ser de la cepa A/ Hangzhou/1/13 (H7N9), A/Equine/Prague/56 (H7N7);

la proteína H9 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Hong Kong/1073/99 (H9N2);

la proteína HA del subtipo B codificada por el ácido nucleico puede ser de la cepa B/Florida/4/2006, B/Massachusetts/2/12, B/Malaysia/2506/2004, B/Wisconsin/1/2010 o B/Brisbane/60/2008.

Tabla 3: Ejemplos de construcciones que se han preparado como se describe en este documento:

Constr. #	Potenciador de la expresión	Ampl. Elemento	Descripción	Ejemplo
1261	CPMV-HT		A/New Caledonia/20/1999 (H1N1)	Ejemplo 5.1
859	CPMV-HT		A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	Ejemplo 5.2
1008	CPMV-HT	BeYDV	B/Brisbane/60/2008	Ejemplo 5.3
1059	CPMV-HT	BeYDV	B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.4
1462	CPMV-HT	BeYDV	B/Wisconsin/1/2010	Ejemplo 5.5
1467	CPMV-HT	BeYDV	B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.6
1039	CPMV-HT		B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.7
1029	CPMV-HT		B/Brisbane/60/2008	Ejemplo 5.11
1829	CPMV-HT+		B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.12
1937	CPMV-160+		B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.13
1067	CPMV-HT		B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado +H1 California TMCT	Ejemplo 5.14
1977	CPMV-160+		B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado +H1 California TMCT	Ejemplo 5.14
1875	CPMV-HT+		B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado +H1 California TMCT	Ejemplo 5.19
676	CPMV-HT		H5 A/Indonesia, 5/2005 con sitio de escisión TETR	Ejemplo 5.8
766	CPMV-HT		H5 A/Indonesia/5/2005 con sitio de escisión TETQ	Ejemplo 5.9
928	CPMV-HT		H5 A/Indonesia/5/2005 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.10
489	CPMV-HT		H5 A/Indonesia/5/2005 (nativa)	Ejemplo 5.24
2220	CPMV-HT+		H2 A/Singapore/1/57 (nativa)	Ejemplo 5.27
2221	CPMV-HT+		H2 A/Singapore/1/57 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.28
2222	CPMV-160+		H2 A/Singapore/1/57 (nativa)	Ejemplo 5.29
2223	CPMV-160+		H2 A/Singapore/1/57 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.29
2019	CPMV-HT+		H3 A/Perth/16/09 (nativa)	Ejemplo 5.30
2039	CPMV-HT+		H3 A/Perth/16/09 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.31
2139	CPMV-160+		H3 A, Perth/16/09 (nativa)	Ejemplo 5.30
2159	CPMV-160+		H3 A/Perth/16/09 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.31

1819	CPMV-HT+		H3 A/Victoria/361/11 (nativa)	Ejemplo 5.26
2230	CPMV-HT+		H3 A/Victoria/361/11 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.32
1800	CPMV-160+		H3 A/Victoria/361/11 (nativa)	Ejemplo 5.25
2250	CPMV-160+		H3 A/Victoria/361/11 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.32
2142	CPMV-HT+		H7 A/Hangzhou/1/13 (nativa)	Ejemplo 5.33
2152	CPMV-HT+		H7 A/Hangzhou/1/13 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.34
2224	CPMV-HT+		H9 A/Hong Kong/1073/99 (nativa)	Ejemplo 5.35
2225	CPMV-HT+		H9 A/Hong Kong/1073/99 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.36
2226	CPMV-160+		H9 A/Hong Kong/1073/99 (nativa)	Ejemplo 5.35
2227	CPMV-160+		H9 A/Hong Kong/1073/99 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.36
2013	CPMV-160+		B/Malaysia/2506/04 (nativa)	Ejemplo 5.37
2014	CPMV-160+		B/Malaysia/2506/04 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.38
2070	CPMV-HT		B/Massachusetts/2/12 (nativa)	Ejemplo 5.39
2072	CPMV-HT		B/Massachusetts/2/12 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.15
2080	CPMV-HT+		B/Massachusetts/2/12 (nativa)	Ejemplo 5.39
2052	CPMV-HT+		B/Massachusetts/2/12 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.20
2090	CPMV-160+		B/Massachusetts/2/12 (nativa)	Ejemplo 5.39
2050	CPMV-160+		B/Massachusetts/2/12 con bucle proteolítico eliminado	Ejemplo 5.15
2074	CPMV-HT		HA B/Massachusetts/2/12 (PrL-) + H1 California TMCT	Ejemplo 5.16
2060	CPMV-160+		HA B/Massachusetts/2/12 (PrL-) + H1 California TMCT	Ejemplo 5.16
2062	CPMV-HT+		HA B/Massachusetts/2/12 (PrL-) + H1 California TMCT	Ejemplo 5.21
1445	CPMV HT		B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado (PrL-)	Ejemplo 5.17
1839	CPMV-HT+		B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado (PrL-)	Ejemplo 5.22
1820	CPMV160+		B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado (PrL-)	Ejemplo 5.17
1975	CPMV160		B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado (PrL-)	Ejemplo 5.17
1454	CPMV-HT		HA B Wisconsin con bucle proteolítico eliminado (PrL-)+H1 California TMCT	Ejemplo 5.18
1893	CPMV-160+		HA B Wisconsin con bucle proteolítico eliminado (PrL-) + H1 California TMCT	Ejemplo 5.18
1860	CPMV-HT+		HA B Wisconsin con bucle proteolítico eliminado (PrL-)+H1 California TMCT	Ejemplo 5.23
2102	CPMV-HT+		B Florida con bucle proteolítico eliminado (PrL-)	Ejemplo 5.40
2104	CPMV-HT+	BeYDV	B Florida con bucle proteolítico eliminado (PrL-)	Ejemplo 5.40
2016	CPMV-HT+		B Florida +H1 California TMCT con bucle proteolítico eliminado (PrL-)	Ejemplo 5.41
2108	CPMV-HT+	BeYDV	B Florida +H1 California TMCT con bucle proteolítico eliminado (PrL-)	Ejemplo 5.41

Tabla: 4: Descripción de secuencias

SEQ ID NO:	Descripción	Figura	SEQ ID NO:	Descripción	Figura
1	Secuencia consenso de bucle proteolítico de H5 aviar		102	Secuencia de aminoácidos de HA B36B Wisconsin (PrL-).	

5	2	IF-H5A-I-05.si+3c	1A	103	Secuencia de nucleótidos de HA B37A Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT	
	3	IF-H5dTm.r	1B	104	Secuencia de aminoácidos de HA B37B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMC.	
	4	Construcción 1191	ID	105	Secuencia de nucleótidos de38A PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT.	
	5	Casete 489	1E	106	Secuencia de aminoácidos de38B PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT.	
	6	Secuencia de aminoácidos de H5A/ Indonesia/5/2005 (H5N1)	1F	107	Secuencia de nucleótidos de39A PDISP/HA B Massachussetts (PrL-).	
15	7	IF-S 1-M1+M2ANC.c	2A	108	Secuencia de aminoácidos de39B PDISP/HA B Massachussetts (PrL-).	
20	8	IF-S 1-4-M2ANC.r	2B	109	Secuencia de nucleótidos de40A PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)+H1 California TMCT.	
	9	M2 sintético (nt 1-26 unidos a 715-982 de DQ508860)	2C	110	Secuencia de aminoácidos de40B PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)+H1 California TMCT.	
	10	Casete 1261	2D	111	Secuencia de nucleótidos de HA B41A Wisconsin (PrL-).	
	11	M2 de la gripe A/New Caledonia/20/1999 (H1N1)	2E	112	Secuencia de aminoácidos de HA B41B Wisconsin (PrL-).	
	12	M2 sintético (nt 26-51 unidos a los nt 740-1007 de EF467824)	3A	113	Secuencia de nucleótidos de HA B42A Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT	
30	13	Casete 859	3B	114	Secuencia de aminoácidos de HA B42B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMC.	
35	14	Secuencia de aminoácidos de M2 de gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	3C	115	Secuencia de nucleótidos de H543A Indonesia nativa.	
	15	Casete 1039	8A	116	Secuencia de aminoácidos de H543B Indonesia nativa	
	16	Secuencia de aminoácidos de21A B/Brisbane/ 60/2008	117	IF**(SacII)-PDI.s1+4c	44A	
	17	Secuencia de aminoácidos de21B bucle proteolítico delta de HA tipo B (con enlazador GG)	118	IF-H3V36111.sl-4r	44B	
	18	Secuencia de aminoácidos que reemplaza el sitio de escisión de B HA con enlazador	21C	119	Secuencia de nucleótidos de44C PDISP/H3 Victoria.	
45	19	Secuencia de aminoácidos de H321D A/Perth/ 16/2009	120	Construcción 2171	44E	
50	20	Secuencia de aminoácidos de21E bucle proteolítico delta de H3 (con enlazador GS)	121	Construcción 1800	44F	
	21	Secuencia de aminoácidos que reemplaza el sitio de escisión de H3 con enlazador	21F	122	Secuencia de aminoácidos de44G PDISP/H3 Victoria	
	22	Región enlazadora de H1 New Cal	15	123	IF(SacII)-Kozac PDI.c	45A
	23	Región enlazadora de H115 Brisbane	124	IF-H3V36111.s1-4r	45B	
	24	Región enlazadora de H1 Sol15 Islands	125	Construcción 2181	45D	
55	25	Región enlazadora de H2A15 Singapore	126	Construcción 1819	45E	
60	26	Región enlazadora de H3A15 Brisbane	127	IF**-H2S157.s1-6r	48A	
	27	Región enlazadora de H3A WCN15	128	Secuencia de nucleótidos de48B PDISP/H2 Singapore.		
	28	Región enlazadora de H5 Anhui15	129	Casete de expresión número 2220	48C	
	29	Región enlazadora de H5 Indo15	130	Secuencia de aminoácidos de48D PDISP/H2 Singapore		
	65					

5	30	Región enlazadora de H5 Vietnam	15	131	H2S157(PrL-).r	49A
	31	Construcción 1194	4B	132	H2S157(PrL-).c	49B
	32	Casete 1008	4C	133	Casete de expresión número 2221	49C
	33	Región enlazadora de H6 Teal HK	15	134	Secuencia de aminoácidos de PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado	49D
	34	Región enlazadora de H7 Eq Prague	15	135	Casete de expresión número 2222	50A
10	35	Región enlazadora de H9A HK	15	136	Casete de expresión número 2223	50B
	36	Región enlazadora de B Florida	15	137	Secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Perth	51A
15	37	B Malaysia	15	138	IF**-H3P1609.S1-6r	51B
	38	1039+1059.r	5A	139	Secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 Perth	51C
	39	1039+1059.c	5B	140	Secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Perth con bucle proteolítico eliminado	52A
20	40	Casete 1059	5C	141	H3P1609(PrL-)#2.r	52B
	41	Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA gripe B/Brisbane/60/2008 (bucle proteolítico eliminado)	5D	142	H3P1609(PrL-)#2.c	52C
	42	Secuencia natural de nucleótidos de H5 A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	1G	143	Secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 Perth con bucle proteolítico eliminado	52D
25	43	secuencia de nucleótidos de PDISP/HA gripe B/Brisbane/60/2008 (bucle proteolítico eliminado)	5E	144	Secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado	53A
	44	escisión de H5/Indo	19	145	H3V36111(PrL-).r	53B
30	45	sitio de escisión modificado de H5/Indo (TETR)	19	146	H3V36111(PrL-).c	53C
	46	sitio de escisión modificado de H5/Indo (TETQ)	19	147	Secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado	53D
	47	Sitio de escisión H1	Tabla 1	148	Secuencia de nucleótidos de PDISP/H7 Hangzhou	54A
40	48	Sitio de escisión de H3	Tabla 1	149	IF*-H7H113.s1-6r	54B
	49	IF-HAB110.S1+3c	6A	150	Secuencia de aminoácidos de PDISP/H7 Hangzhou	54C
	50	IF-HAB110.s1-4r	6B	151	Secuencia de nucleótidos de PDISP/H7 Hangzhou con bucle proteolítico eliminado	55A
45	51	HA B Wisconsin sintética	6C	152	H7H113(PrL-).r	55B
	52	Construcción 193	6E	153	H7H113(PrL-).c	55C
	53	Casete 1462	6F	154	Secuencia de aminoácidos de PDISP/H7 Hangzhou con bucle proteolítico eliminado	55D
50	54	Secuencia de aminoácidos de HA gripe B/Wisconsin/1/2010	6G	155	Secuencia de nucleótidos de PDISP/H9 Hong Kong	56A
	55	HAB110(PrL-).r	7A	156	IF**-H9HK107399.S1-6r	56B
	56	HAB110(PrL-).c	7B	157	Secuencia de aminoácidos de PDISP/H9 Hong Kong	56C
55	57	Casete 1467	7C	158	Secuencia de nucleótidos de PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado	57A
	58	Secuencia de aminoácidos de HA gripe B/Wisconsin/1/2010 (PL eliminado)	7D	159	H9HK107399(PrL-).r	57B
	59	sitio de escisión B	Tabla 1	160	H9HK107399(PrL-).c	57C
60	60	sitio de escisión natural de H5/Indo	Tabla 2	161	Secuencia de aminoácidos de PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado	57D
	61					

5	61	Sitio de escisión modificado de H5/Indo	Tabla 2	162	Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Malaysia	58A
	62	Sitio de escisión modificado de H5/Indo	Tabla 2	163	IF**-HBM250604.S1-6r	58B
	63	Sitio de escisión modificado de H1/Brisbane	Tabla 2	164	Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Malaysia	58C
	64	sitio de escisión modificado de H3/Brisbane	Tabla 2	165	Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Malaysia con bucle proteolítico eliminado	59A
	65	Sitio de escisión modificado de B/Florida, B/Brisbane	Tabla 2	166	HBM250604(PrL-).r	59B
10	66	A/H3/HA0 consenso		167	HBM250604(PrL-).c	59C
	67	A/H1/HA0 consenso		168	Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Malaysia con bucle proteolítico eliminado	59D
	68	B/HA0 consenso		169	Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachusetts	60A
15	69	Deleción de bucle proteolítico de H5 Anhui	18C	170	Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachusetts	60B
	70	Deleción de bucle proteolítico de H5 Indo	18C	171	secuencia de nucleótidos de PatA SP	
	71	Deleción de bucle proteolítico de H5 Vietnam	18C	172	secuencia de aminoácidos del péptido señal de patatina A	
20	72	Deleción del bucle proteolítico de B Florida	18C	173	Secuencia de CPMV HT	
	73	Deleción del bucle proteolítico de B Malaysia	18C	174	Secuencia kozak consenso de plantas-reino vegetal	
	74	MutCleavage-H5(Indo).r	23A	175	Secuencia kozak consenso en plantas-dicotiledóneas	
25	75	MutCleavage-H5(Indo).c	23B	176	Secuencia kozak consenso de plantas-arabidopsis	
	76	Casete 676	23C	177	Secuencia kozak consenso de plantas	
	77	Secuencia de aminoácidos de mutante TETR del sitio de escisión de gripe A/ Indonesia/5/2005 (H5N1).	23D	178	Secuencia kozak consenso de plantas	
30	78	H5I505_TETQ.r	24A	179	Secuencia kozak consenso de plantas	
	79	H5I505_TETQ.c	24B	180	Secuencia kozak consenso de plantas	
	80	Casete 766	25C	181	Secuencia kozak consenso de plantas	
35	81	Secuencia de aminoácidos de mutante TETQ del sitio de escisión de gripe A/ Indonesia/5/2005 (H5N1).	25D	182	Secuencia kozak consenso de plantas	
	82	H5I505(PrL-).r	26A	183	Secuencia kozak consenso de plantas	
	83	H5I505(PrL-).c	26B	184	Secuencia kozak consenso de plantas	
40	84	Casete 928	26C	185	Secuencia kozak consenso de plantas	
	85	Secuencia de aminoácidos de gripe A/ Indonesia/5/2005 (H5N1) con bucle proteolítico eliminado.	26D	186	Secuencia Kozak consenso	
	86	IF-S2+S4-B Bris.c	30A	187	Secuencia de nucleótidos de CPMV HT+	
45	87	IF-S1a4-B Bris.r	30B	188	Secuencia de nucleótidos de CPMV HT+ 511	
	88	Gen sintetizado de HA B Brisbane	30C	189	Secuencia de nucleótidos de CPMV HT+ [WT115]	
	89	Construcción 1029	30D	190	HBF406(PrL-).r	61A
50	90	Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008	30E	191	HBF406(PrL-).c	61B
	91	Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-).	31A	192	IF*-HBF406.s1-6r	61C
	92	Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-)	31B	193	Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Florida con bucle proteolítico eliminado	61D

93	Secuencia de nucleótidos de CPMVX/CPMVX+		194	Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Florida con bucle proteolítico eliminado	61E
94	secuencia de aminoácidos consenso del dominio transmembrana		195	Casete de expresión número 2102	61F
95	Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT.	33A	196	Casete de expresión número 2104	61H
96	Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT.	33B	197	IF-H1cTMCT.S1-4r	62A
97	Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)	34A	198	Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Florida+H1Cal TMCT con bucle proteolítico eliminado	62B
98	Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)	34B	199	Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Florida+H1Cal TMCT con bucle proteolítico eliminado	62C
99	Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)+H1 California TMCT.	35A	200	Casete de expresión número 2106	62D
100	Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)+H1 California TMCT.	35B	201	Casete de expresión número 2108	62F
101	Secuencia de nucleótidos de HA B Wisconsin (PrL-).	36A			

Ejemplos

Ejemplo 1

Transfección de *Agrobacterium*

La cepa de *Agrobacterium* AGL1 se transfectó por electroporación con las construcciones de ADN con el uso de los métodos descritos por D'Aoust y otros 2008 (Plant Biotechnology Journal 6:930-940). Las *Agrobacterias* transfectadas se cultivaron en medio YEB suplementado con ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 10 mM, acetosiringona 20 µM, kanamicina 50 µg/ml y carbenicilina 25 µg/ml pH 5,6 a una DO₆₀₀ entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes de su uso y se resuspendieron en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM pH 5,6).

Preparación de biomasa vegetal, inóculo y agroinfiltración

Los términos "biomasa" y "materia vegetal" tal como se usan en el presente documento pretenden reflejar cualquier material derivado de una planta. La biomasa o materia vegetal puede comprender una planta completa, tejido, células o cualquier fracción de estos. Además, la biomasa o materia vegetal puede comprender componentes vegetales intracelulares, componentes vegetales extracelulares, extractos líquidos o sólidos de plantas, o una combinación de estos. Además, la biomasa o materia vegetal puede comprender plantas, células vegetales, tejidos, un extracto líquido, o una combinación de estos, de hojas, tallos, frutos, raíces de las plantas o una combinación de estos. Una parte de una planta puede comprender materia vegetal o biomasa.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron a partir de semillas en bandejas llenas con un sustrato de turba comercial. Se permitió que las plantas crecieran en el invernadero con un fotoperiodo de 16/8 y un régimen de temperaturas de 25 °C de día/20 °C de noche. Tres semanas después de la siembra, se escogieron plántulas individuales, se trasplantaron en macetas y se dejaron crecer en el invernadero durante tres semanas adicionales en las mismas condiciones ambientales.

Las *agrobacterias* transfectadas con cada construcción se cultivaron en un medio YEB suplementado con ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 10 mM, acetosiringona 20 µM, kanamicina 50 µg/ml y carbenicilina 25 µg/ml, pH 5,6 hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes de su uso y se resuspendieron en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM, pH 5,6) y se almacenaron durante la noche a 4 °C. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron en 2,5 volúmenes de cultivo y se permitió que se calentaran antes de su uso. Las plantas completas de *N. benthamiana* se colocaron al revés en la suspensión bacteriana en un tanque de acero inoxidable hermético a vacío de 20-40 Torr durante 2 min. Las plantas se devolvieron al invernadero durante un período de incubación de 2-6 días hasta la cosecha.

Cosecha de hojas y extracción de proteínas totales

Después de la incubación, la parte aérea de las plantas se cosechó, se congeló a -80 °C y se trituró en pedazos. Las proteínas solubles totales se extrajeron mediante homogeneización (Polytron) de cada muestra de material vegetal congelado triturado en 3 volúmenes de Tris 50 mM frío pH 8,0, NaCl 0,5 M, Triton X-100 al 0,1 % y fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM. Después de la homogeneización, las suspensiones se centrifugaron a 10 000 g durante 10 minutos a 4 °C y estos extractos crudos clarificados (sobrenadante) se guardaron para su análisis.

Análisis de proteínas e inmunotransferencia

El contenido de proteína total de los extractos crudos clarificados se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizando albúmina de suero bovino como patrón de referencia. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron por electrotransferencia a membranas de difluoruro de polivinileno (PVDF) (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN) para la inmunodetección. Antes de la inmunotransferencia, las membranas se bloquearon con leche descremada 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 con una primera incubación con un anticuerpo primario (la Tabla 4 presenta los anticuerpos y las condiciones utilizadas para la detección de cada HA), en 2 µg/ml en leche descremada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los anticuerpos secundarios utilizados para la detección de quimioluminiscencia fueron como se indica en la Tabla 4, diluidos como se indica en leche descremada al 2 % en TBS-Tween 20 al 0,1 %. Los complejos inmunorreactivos se detectaron por quimioluminiscencia utilizando luminol como sustrato (Roche Diagnostics Corporation). La conjugación con la enzima peroxidasa de rábano picante y el anticuerpo IgG humano se llevó a cabo mediante el uso del kit de conjugación de peroxidasa activada EZ-Link Plus® (Pierce, Rockford, IL).

Tabla 4: Condiciones de electroforesis, anticuerpos y diluciones para inmunotransferencia de proteínas expresadas.

Subtipo de HA	Cepa de gripe	Condición de electroforesis	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
B	B/Brisbane/60/2008	No reductora	TGA, AS397	1:20 000	Anti-oveja producido en conejo (JIR 313-035-045)	1:10 000
B	B/Wisconsin/1/2010	No reductora	NIBSC 07/356	1:2000	Anti-oveja producido en conejo (JIR 313-035-045)	1:10 000
B	B/Malaysia/2506/2004	No reductora	NIBSC 07/184	1:2000	Anti-oveja producido en conejo (JIR 313-035-045)	1:10 000
H3	A/Perth/16/2009 (H3N2)	No reductora	TGA, AS400	1:20 000	Anti-oveja producido en conejo (JIR 313-035-045)	1:10 000
H3	A/Victoria/361/2011	No reductora	TGA, AS400	1:20 000	Anti-oveja producido en conejo (JIR 313-035-045)	1:10 000
H1	A/California/07/2009 (H1N1)	Reductora	Sino, 11055-MMO1	1 µg/ml	Anti-ratón producido en cabra (JIR 115-035-146)	1: 7500
H5	A/Indonesia/05/2005 (H5N1)	Reductora	CBER, S-7858	1:4000	Anti-oveja producido en conejo (JIR 313-035-045)	1:10 000

JIR: Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Estados Unidos;

CBER: Center for Biologics Evaluation and Research, Rockville, MD, Estados Unidos.

Sino: Sino Biological inc., Beijing, China.

TGA: Therapeutic Goods Administration, Australia.

NIBSC: National Institute for Biological Standards and Control, Reino Unido

Ensayo de hemaglutinación

El ensayo de hemaglutinación se basó en un método descrito por Nayak y Reichl (2004). Brevemente, se prepararon diluciones dobles en serie de las muestras de prueba (100 µl) en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo en V que contenían 100 µl de PBS, dejando 100 µl de muestra diluida por pocillo. Se añadieron cien microlitros de una suspensión de glóbulos rojos de pavo al 0,25 % (Bio Link Inc., Syracuse, NY) a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. El recíproco de la dilución más alta que muestra hemaglutinación completa se registró como actividad de HA. Paralelamente, un patrón de HA recombinante (A/Vietnam/1203/2004 H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT) se diluyó en PBS y se utilizó como control en cada placa.

Extracción de VLP por digestión de la pared celular

Se recogió tejido foliar de las plantas de *Nicotiana benthamiana* y se cortó en pedazos de ~ 1 cm². Los pedazos de hojas se empaparon en manitol 500 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT). La solución de manitol se retiró y se cambió con la mezcla de enzimas (mezcla de celulasas de *Trichoderma viride* (Onozuka R-10; 3 % v/v) y una mezcla de pectinasas de *Rhizopus* sp. (MACEROZYME™; 0,75 % v/v; ambos de Yakult Pharmaceuticals) en solución protoplástica (manitol 500 mM, CaCl₂ 10 mM y MES/KOH 5 mM (pH 5,6)). La proporción utilizada fue de 20 g de pedazos de hoja por 100 ml de solución. Esta preparación se extendió uniformemente en un recipiente poco profundo (~11 x 18 cm) y se incubó durante 16 horas en un agitador rotatorio a 40 rpm y 26 °C.

Alternativamente, la extracción de VLP se puede realizar de la siguiente manera: las plantas se agroinfiltraron con AGL1/# 489, 928, 676 y 766. Se recogió tejido foliar de las plantas de *N. benthamiana* el día 7 después de la infiltración y se cortó en pedazos de ~ 1 cm². Se añadieron pectinasa 162L (Biocatalysts), Multifect CX CG y Multifect CX B (Genencor) a un tampón de manitol 200 mM, citrato 75 mM, bisulfito de sodio al 0,04 %, pH 6,0; tampón de digestión. Las biomásas se digirieron por duplicado durante la noche a temperatura ambiente en un agitador orbital..

Después de la extracción asistida por enzimas, los restos de hojas se eliminaron por filtración (filtro de nailon de malla de 250 o 400 µm). El extracto filtrado grueso se centrifugó a 5000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante se sometió a la detección de la expresión de HA (actividad de hemaglutinación (ver la Figura 20) y transferencia Western (ver la Figura 22).

Ejemplo 2:

Efecto del bucle proteolítico modificado sobre la acumulación de HA

Como se muestra en la Figura 13A, la expresión de B/Brisbane nativa (Construcción núm.: 1008) fue menor que la expresión de B/Brisbane que comprende un bucle proteolítico modificado (Construcción núm.: 1059). También se observó una mayor actividad de hemaglutinación con B/Brisbane que comprende un bucle proteolítico modificado (Construcción núm.: 1059) en comparación con la HA B/Brisbane nativa (Construcción núm.: 1008; Figura 13B).

Se observaron resultados similares en el nivel de acumulación de B/Wisconsin que comprende un bucle proteolítico modificado (Construcción núm.: 1467), que es mayor que el observado para la HA B/Wisconsin nativa (Construcción núm.: 1462; Figura 16A). También se observó una mayor actividad de hemaglutinación con B/Wisconsin que comprende un bucle proteolítico modificado (Construcción núm.: 1467) en comparación con la HA B/Wisconsin nativa (Construcción núm.: 1462; Figura 16B) que indica una mayor acumulación de la proteína mutante.

La expresión de H5/Indo que comprende un bucle proteolítico modificado también se observó con modificaciones que incluyen un bucle proteolítico que comprende un enlazador GG (Construcción núm.: 928; SEQ ID NO: 85), un enlazador TETR (Construcción núm.: 676; SEQ ID NO: 77), o un enlazador TETQ (Construcción núm.: 766; SEQ ID NO: 8; Figura 22).

Efecto de la coexpresión de M2 de la gripe sobre el nivel de acumulación de HA

Se evaluó el impacto de la coexpresión de M2 sobre el nivel de acumulación de una HA modificada de la gripe B. La Construcción núm. 1059 codifica una HA de la gripe B en la cual el bucle proteolítico se reemplaza por un enlazador de 2 aminoácidos (GG en lugar de los aa 341-359). Los resultados del análisis de transferencia Western presentados en la figura 13A muestran que la eliminación del bucle proteolítico dio como resultado un aumento en el nivel de acumulación de HA de la gripe B (compárese 1008 con 1059) y que la coexpresión de M2 con la HA modificada de la gripe B también aumentó el nivel de acumulación de HA (Figura 13A, 1059 vs 1059+1261). Un análisis de la actividad de hemaglutinación en extractos proteicos crudos de plantas transformadas con HA de la gripe B con o sin modificación y con o sin coexpresión de M2 confirmó el efecto positivo de la coexpresión de M2 sobre el nivel de acumulación de la HA de la gripe B nativa (Figura 13B, 1008 vs 1008+1261) y la HA modificada de la gripe B (Figura 13B, 1059 vs 1059+1261).

La coexpresión de M2 con HA de tipo A que comprende un bucle proteolítico modificado también dio como resultado la expresión de HA. Por ejemplo, la coexpresión de H3 modificada, con el bucle proteolítico reemplazado con un enlazador GS o un enlazador (GSS)₃ (ver la Figura 21E, 21F), junto con M2 también puede dar lugar a la acumulación de HA en una planta.

La eficacia de M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 para aumentar la acumulación de la HA modificada de la gripe B y H3 se comparó con la de M2 de la gripe A/New Caledonia/20/1999. Para la HA modificada de la gripe B, la comparación se realizó mediante análisis de transferencia Western de extractos de proteínas de plantas transformadas con las construcciones 1059, 1059+1261 y 1059+859. Los resultados obtenidos demostraron que la coexpresión de M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (codificada por la construcción núm. 859) fue tan eficiente como la coexpresión de M2 de la gripe A/New Caledonia/20/1999 (codificada por la construcción núm. 1261) para aumentar la acumulación de la HA modificada de la gripe B (Figura 14).

Efecto de la coexpresión de M2 de gripe sobre el nivel de acumulación de diferentes cepas de HA B

El análisis de transferencia Western de extractos de proteínas de plantas transformadas con construcciones génicas que dirigen la expresión de HA de la gripe B (de B/Wisconsin/1/2010) (construcciones núms. 1462) en presencia o ausencia de construcciones para la expresión de M2 (construcción núm. 1261) mostró que la coexpresión de M2 da como resultado una mayor acumulación de la HA de la gripe B (Figura 16A).

También se evaluó el impacto de la coexpresión de M2 sobre el nivel de acumulación de una HA modificada de la gripe B. La Construcción núm. 1467 codifica una HA de la gripe B en la que el bucle proteolítico se reemplaza por un enlazador de 2 aminoácidos (GG en lugar de aa 341-359). Los resultados del análisis de transferencia Western presentados en las figuras 16A muestran que la eliminación del bucle proteolítico dio como resultado un aumento del nivel de acumulación de HA de la gripe B (compárese 1462 con 1467) y que la coexpresión de M2 con la HA modificada de la gripe B también aumentó el nivel de acumulación de HA (Figura 16A, 1467 vs 1467+1261). Un análisis de la actividad de hemaglutinación en extractos proteicos crudos de plantas transformadas con HA de la gripe B con o sin modificación y con o sin coexpresión de M2 confirmó el efecto positivo de la coexpresión de M2 en el nivel de acumulación de la HA nativa de la gripe B (Figura 16B, 1462 vs 1462+1261) y la HA modificada de la gripe B (Figura 16B, 1467 vs 1467+ 1261).

Efecto del elemento de amplificación de BeYDV y el bucle proteolítico modificado sobre la acumulación de HA

El análisis de transferencia Western de extractos de proteínas de plantas transformadas con construcciones de genes que conducen la expresión de la HA modificada de la gripe B (de B/Brisbane/60/2008) con o sin el bucle proteolítico eliminado (ver la Figura 17A para las construcciones) y en presencia o ausencia del elemento de amplificación de BeYDV (construcción núm. 1059 y 1039) mostró que en ausencia de BeYDV no se pudo detectar acumulación de la HA de la gripe B (Figura 17B), cuando el elemento regulador era CPMV-HT.

Efecto del bucle proteolítico modificado sobre el título relativo de HA y la hemaglutinación

Con referencia a la Figura 29A, se muestra una comparación de la actividad de las proteínas HA modificadas producidas en plantas que comprenden elementos potenciadores basados en CPMV HT, CPMV HT+, CPMV 160 o CPMV160+, unidos operativamente con una secuencia de nucleótidos que codifica una HA modificada con bucle proteolítico eliminado (reemplazado con un enlazador GG) o una HA nativa. En la mayoría de los casos, la expresión (determinada como título o actividad de hemaglutinación) fue mayor para la construcción basada en CPMV HT+, CPMV 160 o CPMV160+ que demuestra niveles de expresión significativos.

Tabla 5a: Título relativo de HA (HA natural = 1) (ver la Figura 29A)

Descripción (n=)	Fct = 1					
	de tipo silvestre			PrL-		
	GM	MD	n =	GM	MD	n =
H2 Sin157 (HT+) (n = 2)	1,0	0,4	2	1,2	0,1	2
H2 Sin157 (160+) (n = 2)	1,0	0,3	2	1,9	0,9	2
H3 Per1609 (HT+) (n = 4)	1,0	0,0	4	4,9	4,2	4
H3 Per1609 (160+) (n = 4)	1,0	0,3	4	6,1	3,6	4
H3 Vic36111 (HT+) (n = 6)	1,0	0,3	6	0,9	0,3	6
H3 Vic36111 (160+) (n = 6)	1,0	0,3	6	1,2	0,4	6
H5 Indo505 (HT) (n = 3)	1,0	0,1	3	1,2	0,3	3
H7 Han113 (HT+) (n = 5)	1,0	0,2	5	1,0	0,1	5
H9 HK107399 (HT+) (n = 2)	1,0	0,4	2	1,2	0,2	2
H9 HK107399 (160+) (n = 2)	1,0	0,2	2	0,7	0,1	2
HB Bri6008 (HT) (n = 1)	1,0	0,6	1	0,6	0,1	1
HB Mal250604 (160+) (n = 2)	1,0	0,3	2	8,4	2,4	2
HB Mas212 (HT) (n = 3)	1,0	0,1	3	1,4	1,3	3
HB Mas212 (HT+) (n = 3)	1,0	0,6	3	6,7	3,5	3
HB Mas212 (160+) (n = 2)	1,0	0,8	2	11,5	4,2	2

Ejemplo 3

Aumento del rendimiento de VLP de HA de H7 Hangzhou cuando se elimina el bucle proteolítico (PrL-) en comparación con la construcción nativa.

Las plantas de *N. benthamiana* se infiltraron con AGL1/# 2142+1261 y # 2152+1261 y las hojas se cosecharon después

de un período de incubación de siete días. Se recogió tejido foliar y se cortó en pedazos de ~ 1 cm². Se agregaron pectinasa 162L y pectinasa 444L (Biocatalysts), Multifect CX CG y Multifect CX B (Genencor) en un tampón de manitol 200 mM, citrato 125 mM, bisulfito de sodio al 0,04 % pH 6,0. La biomasa se digirió durante la noche a temperatura ambiente en un agitador orbital.

Después de la digestión, la fracción apoplástica se filtró a través de un filtro de nailon de 400 µm para eliminar el tejido vegetal grueso no digerido (<5 % de la biomasa de partida). El extracto filtrado se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 minutos a 5000xg para eliminar protoplastos y contaminantes intracelulares (proteínas, ADN, membranas, vesículas, pigmentos, etc.). A continuación, el sobrenadante se filtró a profundidad (para su clarificación) utilizando un filtro de fibra de vidrio de 1,2 µm (Sartopore GF plus/Sartorius Stedim) y un filtro de 0,45/0,2 µm (Sartopore 2/Sartorius Stedim), antes de someterse a cromatografía.

La fracción apoplástica clarificada se cargó sobre una columna de intercambio catiónico (Poros HS Applied Biosystems) equilibrada con un tampón de equilibrio/elución (NaPO₄ 50 mM, NaCl 100 mM, Tween 80 al 0,005 %, pH 6,0). Una vez que la radiación UV volvió a cero, el extracto se eluyó por etapas con el tampón de equilibrio/elución que contenía concentraciones crecientes de NaCl (500 mM). Las VLP purificadas se concentraron mediante TFF, se diafiltraron contra el tampón de formulación (PO₄ 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 80 al 0,01 % a pH 7,4) y se pasaron a través de un filtro de 0,22 µm.

El ensayo de hemaglutinación para H7 se realizó sobre la base de un método descrito por Nayak y Reichl (2004). Brevemente, se prepararon diluciones dobles sucesivas de las muestras de prueba (100 µl) en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo en V que contenían 100 µl de PBS, dejando 100 µl de muestra diluida por pocillo. Se añadieron cien microlitros de una suspensión de glóbulos rojos de pavo al 0,25 % (Bio Link Inc., Syracuse, NY) a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. El recíproco de la dilución más alta que mostró hemaglutinación completa se registró como actividad de hemaglutinación.

El contenido de proteína total de los extractos crudos clarificados se determinó utilizando albúmina de suero bovino como patrón de referencia. Los rendimientos relativos se obtuvieron comparando la construcción PrL- con la construcción nativa utilizada como control. La separación por SDS-PAGE, con tampón de carga de muestra desnaturante (Tris 0,1 M, pH 6,8, bromofenol azul al 0,05 %, glicerol al 12,5 %, SDS al 4 % y beta-mercaptoetanol al 5 %), se realizó en condiciones reductoras y se utilizó el azul brillante de Coomassie R-250 para la tinción de proteínas.

La Figura 46A muestra que la actividad de hemaglutinación en extractos de plantas es mayor para la construcción de H7 Hangzhou donde se elimina el bucle proteolítico (#2152 + #1261, ver el Ejemplo 5.34) en comparación con la construcción nativa (# 2142 + # 1261, ver el Ejemplo 5.33).

La Figura 46B muestra que el rendimiento relativo de proteína total en VLP purificada es mayor para la construcción de H7 Hangzhou donde se elimina el bucle proteolítico (#2152 + #1261) en comparación con la construcción nativa (# 2142 + # 1261). Este ejemplo demuestra una buena correlación entre la mejora en la VLP acumulada en las plantas frente a los rendimientos finales al realizar el proceso completo.

La Figura 46C muestra un análisis de SDS-PAGE, donde el carril 2 muestra la construcción de H7 Hangzhou purificada con bucle proteolítico eliminado y el carril 3 muestra la construcción de H7 Hangzhou nativa purificada. Para cada carril, se cargaron 2 µg de proteína total en el gel. La pureza de los perfiles de proteínas es similar para ambas construcciones y superior al 90 %.

Ejemplo 4.1.

La resistencia a la tripsina de las VLP de mutantes H5 Indonesia donde se modifica o elimina el bucle proteolítico es mayor que la H5 Indonesia nativa.

Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con AGL1/#489, # 928, # 766 y # 676 como se describe en el Ejemplo 1 (arriba). Las hojas fueron recolectadas de las plantas 7 días después de la infiltración, cortadas en pedazos de ~ cm². Se añadieron pectinasa 162L (Biocatalysts), Multifect CX CG y Multifect CX B (Genencor) en un tampón de manitol 200 mM, citrato 75 mM, bisulfito de sodio al 0,04 %, pH 6,0. La biomasa se digirió durante la noche a temperatura ambiente en un agitador orbital. Los extractos digeridos se sometieron a filtración gruesa, centrifugación, clarificación y purificación como se describe en el Ejemplo 3 (H7 Hangzhou).

Para cada uno de los extractos de VLP de HA de H5 Indonesia nativa (# 489), PRL- (# 928), TETQ (# 766) y TETR (# 676), se resuspendieron dos muestras de VLP de HA en tampón (Na/KPO₄ 100 mM, NaCl 150 mM, TWEEN 80 al 0,01 %) a pH 7,4. Se añadió tripsina en una proporción con la proteína de 1:100. Se tomaron muestras después de 30, 60 y 120 minutos de incubación a temperatura ambiente, luego se llevaron a ebullición en tampón de carga de muestra para detener la reacción. Los extractos no digeridos (control) y los extractos digeridos con tripsina se analizaron por gel SDS-PAGE como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 47A muestra un análisis de SDS-PAGE de las muestras digeridas con tripsina, donde los carriles 2 a 5 muestran VLP de H5 Indonesia nativa (# 489), los carriles 6 al 9 muestran VLP de H5 Indonesia PrL- (# 928), los carriles 10 a 13 muestran VLP de H5 Indonesia TETQ (# 766) y los carriles 14 a 17 muestran VLP de H5 Indonesia TETR (# 676) en diferentes puntos de tiempo en la digestión (0, 30, 60 y 120 minutos). La VLP de H5 Indonesia nativa, con una banda correspondiente al monómero HA0 que es detectable a aproximadamente 75 kDa en el extracto no digerido en el carril 2, se procesó rápidamente en bandas de HA1 y HA2 mediante la adición de tripsina, detectables a aproximadamente 50 y 25 kDa respectivamente durante la digestión con tripsina en los carriles 3 a 5. Tanto las VLP de H5 Indonesia PrL- como TETQ, estabilizadas por la eliminación o modificación del sitio proteolítico, mostraron resistencia a la tripsina ya que la banda HA0 no se escindió en las bandas HA1 y HA2. Las VLP de H5 Indonesia TETR se estabilizaron parcialmente mediante la modificación del sitio proteolítico y los monómeros de HA0 se escindieron en HA1 y HA2 más lentamente que en las VLP de H5 Indonesia nativas.

Estos datos demuestran la protección exitosa de la proteína HA0 en su sitio proteolítico dentro de HA1-HA2, ya sea eliminando el bucle proteolítico (prl-) o reemplazando el bucle proteolítico con un enfoque de secuencia enlazadora (TETQ).

Ejemplo 4.2. La inmunogenicidad de las VLP de H5 Indonesia nativa es similar a sus contrapartes mutantes (PrL-, TETQ y TETR) en ratones.

Los extractos de VLP de H5 Indonesia nativa, PrL-, TETR y TETQ se purificaron como se describe en el Ejemplo 4.1 (anterior).

La Figura 47B muestra la inmunogenicidad (título de HI) de VLP de H5 nativa y sus contrapartes mutantes (prl-, TETQ y TETR) en ratones después de dos dosis. Los ratones BALB/c (n = 8/grupo) se inyectaron dos veces por vía intramuscular, con 21 días de diferencia, con una dosis de 10 µg de vacunas de VLP de H5 basadas en plantas (nativa, prl-, TETQ o TETR) en función de su contenido de HA. El análisis de títulos de HI se realizó a partir de sueros de cada animal, 42 dpv (21 días después de la 2da dosis) y se usó VLP de H5 A/Indonesia/5/2005 (H5N1) como antígeno. Las barras representan la comparación relativa (%) de los títulos de HI de cada VLP de mutantes H5 con la VLP de H5 nativa (calculado con el log2 del título de HI GMT e IC del 95 %). Las diferencias estadísticas entre los grupos para cada dosis se compararon mediante el uso de un ANOVA de una vía seguido de un análisis post-hoc de Tukey en los datos transformados por Log2 (suponiendo una distribución normal de estos). * p <0,05 se consideró significativo. No se observaron diferencias entre los grupos para cada dosis.

Ejemplo 5.1: B-2X35S/CPMV-HT/M2 New Caledonia/NOS (Construcción núm. 1261)

Una secuencia que codifica M2 de la gripe A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter mediante el uso del siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contiene la secuencia codificante de M2 completa se amplificó mediante el uso de los cebadores IF-S1-M1+M2ANC.c (Figura 2A, SEQ ID NO: 7) e IF-S1-4-M2ANC.r (Figura 2B, SEQ ID NO: 8) mediante el uso del gen de M2 sintetizado (correspondiente a los nt 1-26 unidos a los nt 715-982 del número de acceso de GenBank DQ508860; Figura 2C, SEQ ID NO: 9) como molde. El producto de PCR se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS con el uso del sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 1191 (Figura 1C) se digirió con las enzimas 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 coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura ID (SEQ ID NO: 4). La construcción resultante recibió el número 1261 (Figura 2D, SEQ ID NO: 10). La secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) se presenta en la Figura 2E (SEQ ID NO: 11). Una representación del plásmido 1261 se presenta en la Figura 11.

Ejemplo 5.2: C-2X35S/CPMV-HT/M2 Puerto Rico/NOS (Construcción núm. 859)

Una secuencia que codifica M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter mediante el uso del siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contiene la secuencia codificante de M2 completa se amplificó mediante el uso de los cebadores IF-S1-M1+M2ANC.c (Figura 2A, SEQ ID NO: 7) e IF-S1-4-M2ANC.r (Figura 2B, SEQ ID NO: 8), utilizando el gen de M2 sintetizado (correspondiente a los nt 26-51 unidos a los nt 740-1007 del número de acceso al Genbank EF467824) (Figura 3A, SEQ ID NO: 12) como molde. El producto de PCR se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS con el uso del sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 1191 (Figura 1C) se digirió con las enzimas 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 coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. El vector es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde el

límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura ID (SEQ ID NO: 4). A la construcción resultante se le asignó el número 859 (Figura 3B, SEQ ID NO: 13). La secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) se presenta en la Figura 3C (SEQ ID NO: 14). Una representación del plásmido 859 se presenta en la Figura 17.

Ejemplo 5.3: G-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV+Replicasa (Construcción número 1008)

La preparación de la construcción 1008 se describe en el documento US 61/541,780. Brevemente, una secuencia que codifica HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 se clonó en 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS que comprende el sistema de amplificación de BeYDV+replicasa en un plásmido que contiene un casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter mediante el uso de un método basado en PCR que utiliza el gen de HA B Brisbane sintetizado (correspondiente a los nt 34-1791 del número de acceso al Genbank FJ766840). El producto de PCR se clonó en marco con el péptido señal de PDI de alfalfa en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV. La construcción 1194 (véanse las Figuras 4A, 4B) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para una reacción de ensamblaje para producir la construcción número 1008 (Figura 4C, Figura 9; SEQ ID NO: 32).

La construcción número 1194 (Figura 4A) es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en marco con un péptido señal de PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT en el sistema de amplificación de BeYDV. También incorpora una construcción génica para la coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCambia.

Ejemplo 5.4: 1-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane con bucle proteolítico eliminado en el sistema de amplificación de BeYDV+Replicasa (Construcción número 1059)

La preparación de la construcción 1059 se describe en el documento US 61/541,780. Brevemente, se clonó una secuencia que codifica HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado en 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS que comprende el sistema de amplificación de BeYDV+replicasa en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter mediante el uso del método de ligadura basado en PCR (Darveau y otros, 1995, Methods in Neuroscience 26: 77-85). En una primera ronda de PCR, se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante de HA B Brisbane del nt 46 al nt 1065 mediante el uso del gen de HA B Brisbane sintetizado (correspondiente a los nt 34-1791 del número de acceso al Genbank FJ766840) como molde. Un segundo fragmento, que contenía la secuencia codificante de HA B Brisbane del nt 1123 al nt 1758, se amplificó mediante el uso del gen de HA B Brisbane sintetizado (correspondiente a los nt 34-1791 del número de acceso al Genbank FJ766840) como molde. Los productos de PCR de ambas amplificaciones se mezclaron y se usaron como molde para una segunda ronda de amplificación. El fragmento resultante (que codifica HA B/Brisbane/60/2008 Δa.a. 356-374 con un enlazador GG entre fragmentos; ver la Figura 21B) se clonó en marco con el péptido señal de PDI de alfalfa en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprende el sistema de amplificación de BeYDV para producir la construcción 1194 (Figuras 4A, 4B) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado fue utilizado para una reacción de ensamblaje. La construcción resultante recibió el número 1059 (Figura 5C; SEQ ID NO: 40).

La secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado se presenta en la Figura 5D (SEQ ID NO: 41).

Ejemplo 5.5: B-2X35S/CPMV-HT/HA B Wisconsin/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa (Construcción número 1462)

La preparación de la construcción 1462 se describe en el documento US 61/541,780. Brevemente, una secuencia que codifica HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 se clonó en 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprende el sistema de amplificación de BeYDV(m)+replicasa en un plásmido que contiene un casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter mediante el uso de un método basado en PCR. Se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante de HA B Wisconsin completa mediante el uso del gen de HA B Wisconsin sintetizado (número de acceso al Genbank JN993010) como molde. El producto de PCR se clonó en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m). La construcción 193 (Figura 6D) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para una reacción de ensamblaje.

La construcción número 193 (Figura 6D, 6E) 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 de BeYDV(m). También incorpora una construcción génica para la coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCambia y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura 6E (SEQ ID NO: 52). La construcción resultante recibió el número 1462 (Figura 6F, SEQ ID NO: 53). La secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 se presenta en la Figura 6G (SEQ ID NO: 54). Una representación del plásmido 1462 se presenta

en la Figura 6H.

Ejemplo 5.6: C-2X35S/CPMV-HT/HA B Wisconsin con bucle proteolítico eliminado en sistema de amplificación de BeYDV(m)+replicasa (Construcción número 1467)

La preparación de la construcción 1467 se describe en el documento US 61/541,780. Brevemente, una secuencia que codifica HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado se clonó en 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprende el sistema de amplificación de BeYDV(m)+replicasa en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando un método de ligadura basado en PCR (Darveau y otros 1995, Methods in Neuroscience 26: 77-85). En una primera ronda de PCR, un fragmento que contiene la secuencia codificante de HA B Wisconsin del nt 1 al nt 1062 se amplificó mediante el uso de los cebadores IF-HAB110.S1+3c (Figura 6A, SEQ ID NO: 49) y HAB110(PrL-).r (Figura 7A, SEQ ID NO: 55), mediante el uso del gen de HA B Wisconsin sintetizado (número de acceso al Genbank JN993010) (Figura 6C, SEQ ID NO: 51) como molde. Un segundo fragmento, que contiene la secuencia codificante de HA B Wisconsin del nt 1120 al nt 1755, se amplificó mediante el uso de los cebadores HAB110(PrL-).c (Figura 7B, SEQ ID NO: 56) e IF-HAB110.s1-4r (Figura 6B, SEQ ID NO: 50), con el uso del gen de HA B Wisconsin sintetizado (número de acceso al Genbank JN993010) (Figura 6C, SEQ ID NO: 51) como molde. Los productos de PCR de ambas amplificaciones se mezclaron y usaron como molde para una segunda ronda de amplificación con el uso de IF-HAB110.S1+3c (Figura 6A, SEQ ID NO: 49) e IF-HAB110.s1-4r (Figura 6B, SEQ ID NO: 50) como cebadores. El fragmento resultante (que codifica HA B/Wisconsin/1/2010 Δa.a. 340-358 con un enlazador GG entre fragmentos) se clonó en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS que comprende el sistema de amplificación de BeYDV(m) con el uso del sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 193 (Figura 6D) se dirigió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje "In-Fusion".

La construcción número 193 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT hacia un sistema de amplificación de BeYDV(m). También incorpora una construcción génica para la coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura 6E (SEQ ID NO: 52). La construcción resultante recibió el número 1467 (Figura 7C, SEQ ID NO: 57). La secuencia de aminoácidos de HA de la Gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado se presenta en la Figura 7D (SEQ ID NO: 58). Una representación del plásmido 1467 se presenta en la Figura 7E.

Ejemplo 5.7: A-2X35S/CPMV-HT/PDISP-HA B Brisbane con bucle proteolítico eliminado (Construcción número 1039)

La preparación de la construcción 1192 se describe en el documento US 61/541,780. Brevemente, una secuencia que codifica HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado se clonó en 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método de ligadura basado en PCR (Darveau y otros, 1995, Methods in Neuroscience 26: 77-85). En una primera ronda de PCR, se amplificó un fragmento que contenía la secuencia codificante de HA B Brisbane del nt 46 al nt 1065 mediante el uso del gen de HA B Brisbane sintetizado (correspondiente a los nt 34-1791 del número de acceso al Genbank FJ766840) como molde. Un segundo fragmento, que contenía la secuencia codificante de HA B Brisbane del nt 1123 al nt 1758, se amplificó mediante el uso del gen de HA B Brisbane sintetizado (correspondiente a los nt 34-1791 del número de acceso al Genbank FJ766840) como molde. Los productos de PCR de ambas amplificaciones se mezclaron y se usaron como molde para una segunda ronda de amplificación. El fragmento resultante (que codifica HA B/Brisbane/60/2008 Δa.a. 356-374 con un enlazador GG entre fragmentos) se clonó en marco con el péptido señal de PDI de alfalfa en el casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS. La construcción 1192 se dirigió con las enzimas 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 destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en marco con un péptido señal de PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora una construcción génica para la coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA. La construcción resultante recibió el número 1039 (Figura 8B). La secuencia de aminoácidos de PDISP-HA B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado se presenta en la Figura 5D (SEQ ID NO: 41). Una representación del plásmido 1039 se presenta en la Figura 8A (SEQ ID NO: 15).

Ejemplo 5.8: A-2X35S/CPMV-HT/H5 de A/Indonesia/5/2005 con mutación TETR del sitio de escisión (Construcción número 676)

Una secuencia que codifica H5 de A/Indonesia/5/2005 con mutación TETR del sitio de escisión se clonó en 2X35S/CPMV-HT/ NOS en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter mediante el uso del siguiente método de ligadura basado en PCR (Darveau y otros, 1995, Methods in Neuroscience 26: 77-85). En una primera ronda de PCR, se amplificó un fragmento que contenía H5 de la secuencia codificante de A/Indonesia/5/2005 del nt 1 al nt 1015 mediante el uso de los cebadores IF-H5A-I-05.s1+3c (Figura 1A, SEQ ID NO: 2) y MutCleavage-H5(Indo).r (Figura 23A, SEQ ID NO: 74), utilizando H5 sintetizada de A/Indonesia/5/2005 (Figura 1G, SEQ ID NO: 42)

como molde. Un segundo fragmento, que contenía H5 de la secuencia codificante de A/Indonesia/5/2005 del nt 1038 al nt 1707, se amplificó utilizando los cebadores MutCleavage-H5(Indo).c (Figura 23B, SEQ ID NO.: 75) e IF-H5dTm.r (Figura 1B, SEQ ID NO: 3), utilizando H5 sintetizada de A/Indonesia/5/2005 (Figura 1G, SEQ ID NO: 42) como molde. Los productos de PCR de ambas amplificaciones se mezclaron y usaron como molde para una segunda ronda de amplificación mediante el uso de IF-H5A-I-05.s1+3c (Figura 1A, SEQ ID NO: 2) e IF-H5dTm.r (Figura 1B, SEQ ID NO: 3) como cebadores. El fragmento resultante (que codifica H5 de A/Indonesia/5/2005 Δa.a. 339-346 con un enlazador TETR entre fragmentos) se clonó en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS con el uso del sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 1191 (Figura ID) se dirigió con las enzimas 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 marco en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora una construcción génica para la coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura ID (SEQ ID NO: 4). A la construcción resultante se le asignó el número 676 (Figura 23C, SEQ ID NO: 76). La secuencia de aminoácidos de H5 del mutante TETR del sitio de escisión de A/Indonesia/5/2005 se presenta en la Figura 23D (SEQ ID NO: 77). Una representación esquemática del plásmido 676 se presenta en la Figura 23E.

Ejemplo 5.9: B-2X35S/CPMV-HT/H5 de A/Indonesia/5/2005 con mutación TETQ en el sitio de escisión (Construcción número 766)

Una secuencia que codifica H5 de A/Indonesia/5/2005 con mutación TETQ del sitio de escisión se clonó en 2X35S/CPMV-HT/ NOS en un plásmido que contiene el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter mediante el uso del siguiente método de ligadura basado en PCR (Darveau y otros., 1995, Methods in Neuroscience 26: 77-85). En una primera ronda de PCR, se amplificó un fragmento que contenía H5 de la secuencia codificante de A/Indonesia/5/2005 del nt 1 al nt 1015 mediante el uso de los cebadores IF-H5A-I-05.s1+3c (Figura 1A, SEQ ID NO: 2) y H5I505_TETQ.r (Figura 24A, SEQ ID NO: 78), utilizando H5 sintetizada de A/Indonesia/5/2005 (Figura 1G, SEQ ID NO: 42) como molde. Un segundo fragmento, que contenía H5 de la secuencia codificante de A/Indonesia/5/2005 del nt 1038 al nt 1707, se amplificó utilizando los cebadores H5I505_TETQ.c (Figura 24B, SEQ ID NO: 79) e IF-H5dTm.r (Figura 1B, SEQ ID NO: 3), utilizando H5 sintetizada de A/Indonesia/5/2005 (Figura 1G, SEQ ID NO: 42) como molde. Los productos de PCR de ambas amplificaciones se mezclaron y usaron como molde para una segunda ronda de amplificación mediante el uso de IF-H5A-I-05.s1+3c (Figura 1A, SEQ ID NO: 2) e IF-H5dTm.r (Figura 1B, SEQ ID NO: 3) como cebadores. El fragmento resultante (que codifica H5 de A/Indonesia/5/2005 Δa.a. 339-346 con un enlazador TETQ entre fragmentos) se clonó en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS utilizando el sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 1191 (Figura ID) se dirigió con las enzimas 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 marco en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora una construcción génica para la coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura ID (SEQ ID NO: 4). A la construcción resultante se le asignó el número 766 (Figura 24C, SEQ ID NO: 80). La secuencia de aminoácidos de H5 del mutante TETQ del sitio de escisión de A/Indonesia/5/2005 se presenta en la Figura 24D (SEQ ID NO: 81). Una representación esquemática del plásmido 766 se presenta en la Figura 24E.

Ejemplo 5.10: C-2X35S/CPMV-HT/H5 de A/Indonesia/5/2005 con bucle proteolítico eliminado (Construcción número 928)

Una secuencia que codifica H5 de A/Indonesia/5/2005 con bucle proteolítico eliminado se clonó en 2X35S/CPMV-HT/ NOS en un plásmido que contenía el casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter utilizando el siguiente método de ligadura basado en PCR presentado por Darveau y otros (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, se amplificó un fragmento que contenía H5 de la secuencia codificante de A/Indonesia/5/2005 del nt 1 al nt 1011 mediante el uso de los cebadores IF-H5A-I-05.s1+3c (Figura 1A, SEQ ID NO: 2) y H5I505(PrL-).r (Figura 25A, SEQ ID NO: 82), utilizando H5 sintetizada de A/Indonesia/5/2005 (Figura 1G, SEQ ID NO: 42) como molde. Un segundo fragmento, que contenía H5 de la secuencia codificante de A/Indonesia/5/2005 del nt 1075 al nt 1707, se amplificó utilizando los cebadores H5I505(PrL-).c (Figura 25B, SEQ ID NO: 83) e IF-H5dTm.r (Figura 1B, SEQ ID NO: 3), utilizando H5 sintetizada de A/Indonesia/5/2005 (Figura 1G, SEQ ID NO: 42) como molde. Los productos de PCR de ambas amplificaciones se mezclaron y usaron como molde para una segunda ronda de amplificación mediante el uso de IF-H5A-I-05.s1+3c (Figura 1A, SEQ ID NO: 2) e IF-H5dTm.r (Figura 1B, SEQ ID NO: 3) como cebadores. El fragmento resultante (que codifica H5 de A/Indonesia/5/2005 Δa.a. 338-358 con un enlazador GG entre fragmentos) se clonó en un casete de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS con el uso del sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 1191 (Figura ID) se dirigió con las enzimas 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 marco en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora una construcción génica para la coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura ID (SEQ ID NO: 4). A la construcción resultante se le asignó el número 928 (Figura 25C, SEQ ID NO: 84). La secuencia de aminoácidos

de H5 de A/Indonesia/5/2005 con bucle proteolítico eliminado se presenta en la Figura 25D (SEQ ID NO: 85). Una representación del plásmido 928 se presenta en la Figura 25E.

Ejemplo 5.11 - F-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane/NOS (Construcción número 1029)

Una secuencia que codifica HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 se clonó en un sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en un plásmido que contenía un casete de expresión Plasto_pro/P19/Plasto_ter mediante el uso del siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de HA B Brisbane sin su péptido señal de tipo silvestre se amplificó con el uso de los cebadores IF-S2+S4-B Bris.c (Figura 30A, SEQ ID NO: 86) e IF-S1a4-B Bris.r (Figura 30B, SEQ ID NO: 87), con el uso del gen de HA B Brisbane sintetizado (correspondiente a los nt 34-1791 del número de acceso al Genbank FJ766840) (Figura 30C, SEQ ID NO: 88) como molde. El producto de PCR se clonó en marco con el péptido señal de PDI de alfalfa en un sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT/NOS con el uso del sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción 1192 se digirió con las enzimas 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 destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en marco con un péptido señal de PDI de alfalfa en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora una construcción génica para la coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde los límites izquierdo al derecho del ADN-t. La construcción resultante recibió el número 1029 (Figura 30D, SEQ ID NO: 89). La secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 se presenta en la Figura 30E (SEQ ID NO: 90). Una representación del plásmido 1029 se presenta en la Figura 30F.

Ejemplo 5.12 - 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1039) y HT+ (construcción núm. 1829) para PDISP/HA B Brisbane (PrL-)

Una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado (PrL-) en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Brisbane (PrL-; Figura 31A, SEQ ID NO: 91) se clonó en HT original y HT+ modificado mediante el uso del mismo método basado en PCR descrito en los Ejemplos 5.7 y 5.11, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/HA B Brisbane (PrL-). La secuencia de aminoácidos de HA B Brisbane (PrL-) madura fusionada con PDISP se presenta en la Figura 31B (SEQ ID NO: 92). Las representaciones de los plásmidos 1039 y 1829 se presentan en las Figuras 8B y 31D.

Ejemplo 5.13 - 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1039) y 2X35S/CPMV160+ (construcción núm. 1937) para PDISP/HA B Brisbane (PrL-)

Una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado (PrL-) (consulte la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 61/806,227 presentada el 28 de marzo de 2013 para obtener información adicional sobre: regiones eliminadas del bucle proteolítico en secuencias de HA) en el que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Brisbane (PrL-)) (Figura 32A, SEQ ID NO: 93) se clonó en CPMV-HT original y CPMV160+ mediante el uso del mismo Método basado en PCR como se describe en el Ejemplo 5.7 y en el Ejemplo 5.11, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/HA B Brisbane (PrL-). La secuencia de aminoácidos de HA B Brisbane (PrL-) madura fusionada con PDISP se presenta en la Figura 31B (SEQ ID NO: 92). Las representaciones de los plásmidos 1039 y 1937 se presentan en la Figura 8B y la Figura 32C.

Ejemplo 15.14 - 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1067) y 2X35S/CPMV160+ (construcción núm. 1977) para PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT

Una secuencia codificante de hemaglutinina quimérica correspondiente al ectodominio de HA de la gripe B/Brisbane/60/08 con bucle proteolítico eliminado (PrL-) (consulte la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 61/806,227 presentada el 28 de marzo de 2013, para obtener información adicional sobre: regiones eliminadas de bucle proteolítico en secuencias de HA) fusionada con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática (TMCT) de H1 de la gripe A/California/7/2009 y con el péptido señal de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT) (Figura 33A, SEQ ID NO: 95) se clonó en CPMV-HT original y CPMV160+ mediante el uso del mismo método basado en PCR como se describe en los Ejemplos 5.7 y 5.11, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT. La secuencia de aminoácidos de HA madura de B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT fusionada con PDISP se presenta en la Figura 33B (SEQ ID NO: 96). Las representaciones de los plásmidos 1067 y 1977 se presentan en la Figura 33C y la Figura 33D.

Ejemplo 5.15 - 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 2072) y 2X35S/CPMV160+ (construcción núm. 2050) para PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)

Una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Massachussetts/2/2012 con bucle proteolítico eliminado (PrL-) (consulte la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 61/806,227 presentada el 28 de marzo de 2013 para

obtener información adicional sobre: regiones eliminadas de bucle proteolítico en secuencias de HA) en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)) (Figura 34A, SEQ ID NO: 97) se clonó en CPMV-HT original y CPMV160+ mediante el uso del mismo método basado en PCR como se describe en los Ejemplos 5.7 y 5.11, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/HA B Massachusetts (PrL-). La secuencia de aminoácidos de HA madura de B Massachusetts (PrL-) fusionada con PDISP se presenta en la Figura 34B (SEQ ID NO: 98). Las representaciones de los plásmidos 2072 y 2050 se presentan en la Figura 34C y la Figura 34D.

Ejemplo 5.16 - 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 2074) y 2X35S/CPMV160+ (construcción núm. 2060) para PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT

Una secuencia codificante de hemaglutinina quimérica correspondiente al ectodominio de HA de la gripe B/Massachusetts/2/2012 con bucle proteolítico eliminado (PrL-) (consulte la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 61/806,227 presentada el 28 de marzo de 2013 para obtener información adicional sobre: regiones eliminadas de bucle proteolítico en secuencias de HA) fusionada con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática (TMCT) de H1 de la gripe A/California/7/2009 y con el péptido señal de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT) (Figura 35A, SEQ ID NO: 99) se clonó en CPMV-HT original y CPMV160+ utilizando el mismo método basado en PCR que se describe en los Ejemplos 5.7 y 5.11, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT. La secuencia de aminoácidos de la HA madura de B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT fusionada con PDISP se presenta en la Figura 35B (SEQ ID NO: 100). Las representaciones de los plásmidos 2074 y 2060 se presentan en las Figuras 35C y 35D.

Ejemplo 5.17 - 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1445), 2X35S/CPMVHT+ (construcción núm. 1820) y CPMV160+ (construcción núm. 1975) para HA B Wisconsin (PrL-)

Una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado (PrL-) (consulte la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 61/806,227 presentada el 28 de marzo de 2013 para obtener información adicional sobre: regiones eliminadas de bucle proteolítico en secuencias de HA) con su péptido señal nativo (HA B Wisconsin (PrL-)) (Figura 36AA, SEQ ID NO: 101) se clonó en CPMV-HT original, CPMVHT+ y CPMV160 mediante el uso del mismo método basado en PCR que se describe en los Ejemplos 5.7 y 5.11, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para HA B Wisconsin (PrL-). La secuencia de aminoácidos de HA B Wisconsin (PrL-) con su péptido señal nativo se presenta en la Figura 36B (SEQ ID NO: 102). Las representaciones de los plásmidos 1445, 1820 y 1975 se presentan en las Figuras 36C, 36D y 36E, respectivamente.

Ejemplo 5.18 - 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1454) y 2X35S/CPMV160+ (construcción núm. 1893) para HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT

Una secuencia codificante de hemaglutinina quimérica correspondiente al ectodominio de HA de la Gripe B/ Wisconsin /2/2012 con bucle proteolítico eliminado (PrL-) (consulte la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 61/806,227 presentada el 28 de marzo de 2013 para obtener información adicional sobre: regiones eliminadas de bucle proteolítico en secuencias de HA) fusionada con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática (TMCT) de H1 de la gripe A/California/7/2009 con el péptido señal nativo de HA B Wisconsin (HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT) (Figura 37A, SEQ ID NO: 103) se clonó en CPMV-HT original y CPMV160+ mediante el uso del mismo método basado en PCR como se describe en los Ejemplos 5.7 y 5.11, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT. La secuencia de aminoácidos de HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT se presenta en la Figura 37 (SEQ ID NO: 104). Las representaciones de los plásmidos 1454 y 1893 se presentan en las Figuras 37C y 37D.

Ejemplo 5.19: 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1067) y HT+ (construcción núm. 1875) para PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT

Una secuencia codificante de hemaglutinina quimérica correspondiente al ectodominio de HA de la gripe B/Brisbane/60/08 con bucle proteolítico eliminado (PrL-) fusionada con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática (TMCT) de H1 de la gripe A/California/7/2009 y con el péptido señal de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT) (Figura 38A, SEQ ID NO: 105) se clonó en HT original y HT+ modificando utilizando el mismo método basado en PCR como se describe en el Ejemplo 5.26, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT. La secuencia de aminoácidos de HA madura de B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT fusionado con PDISP se presenta en la Figura 38B (SEQ ID NO: 106). Las representaciones de los plásmidos 1067 y 1875 se presentan en las Figuras 33C y 39C.

Ejemplo 5.20: 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 2072) y HT+ (construcción núm. 2052) para PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)

Una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Massachusetts/2/2012 con bucle proteolítico eliminado

(PrL-) en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)) (Figura 39A, SEQ ID NO: 107) se clonó en HT original y HT+ modificado mediante el uso del mismo método basado en PCR como se describe en el Ejemplo 5.26, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/HA B Massachussetts (PrL-). La secuencia de aminoácidos de la HA madura de B Massachussetts (PrL-) fusionada con PDISP se presenta en la Figura 39B (SEQ ID NO: 108). Las representaciones de los plásmidos 2072 y 2052 se presentan en la Figura 34C y la Figura 39C.

Ejemplo 5.21: 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 2074) y HT+ (construcción núm. 2062) para PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)+H1 California TMCT

Una secuencia codificante de hemaglutinina quimérica correspondiente al ectodominio de HA de la gripe B/Massachussetts/2/2012 con bucle proteolítico eliminado (PrL-) fusionada con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática (TMCT) de H1 de la gripe A/California/7/2009 y con el péptido señal de proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)+H1 California TMCT) (Figura 40A, SEQ ID NO: 109) se clonó en HT original y HT+ modificado mediante el uso del mismo método basado en PCR como se describe en el Ejemplo 5.26, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)+H1 California TMCT. La secuencia de aminoácidos de la HA madura de B Massachussetts (PrL-)+H1 California TMCT fusionada con PDISP se presenta en la Figura 40B (SEQ ID NO: 110). Las representaciones de los plásmidos 2074 y 2062 se presentan en la Figura 35C y la Figura 40C.

Ejemplo 5.22: 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1445) y HT+ (construcción núm. 1839) para HA B Wisconsin (PrL-)

Una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado (PrL-) con su péptido señal nativo (HA B Wisconsin (PrL-)) (Figura 41A, SEQ ID NO: 111) se clonó en HT original y HT+ modificado mediante el uso del mismo método basado en PCR que se describe en el Ejemplo 5.26, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para HA B Wisconsin (PrL-). La secuencia de aminoácidos de HA B Wisconsin (PrL-) con su péptido señal nativo se presenta en la Figura 41B (SEQ ID NO: 112). Las representaciones de los plásmidos 1445 y 1839 se presentan en las Figuras 36C y 41C.

Ejemplo 5.23: 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1454) y HT+ (construcción núm. 1860) para HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT

Una secuencia codificante de hemaglutinina quimérica correspondiente al ectodominio de HA de la gripe B/ Wisconsin /2/2012 con bucle proteolítico eliminado (PrL-) fusionada con el dominio transmembrana y la cola citoplasmática (TMCT) de H1 de la gripe A/California/7/2009 con el péptido señal nativo de HA B Wisconsin (HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT) (Figura 42A, SEQ ID NO: 113) se clonó en HT original y HT+ modificado con el uso del mismo método basado en PCR como se describe en el Ejemplo 5.26 pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT. La secuencia de aminoácidos de HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT se presenta en la Figura 42B (SEQ ID NO: 114). Las representaciones del plásmido 1454 y 1860 se presentan en las Figuras 37C y 42C.

Ejemplo 5.24 - 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 489), 2X35S/CPMV160+ (construcción núm. 1880) y 2X35S/CPMV160 (construcción núm. 1885) para H5 Indonesia

Una secuencia codificante correspondiente a H5 nativa de la gripe A/Indonesia/5/2005 (Figura 43A, SEQ ID NO: 115) se clonó en CPMV-HT original, CPMV160+ y CPMV160 con el uso del mismo método basado en PCR como se describe en el Ejemplo 5.25 pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para H5 Indonesia. La secuencia de aminoácidos de H5 nativa de la gripe A/Indonesia/5/2005 se presenta en la Figura 43B (SEQ ID NO: 116). Una representación del plásmido 489 se presenta en la Figura 43C.

Ejemplo 5.25 - 2X35S/CPMV160+/PDISP/H3 Victoria/NOS (Construcción número 1800)

Una secuencia que codifica H3 de la gripe A/Victoria/361/2011 en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/H3 Victoria) se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV160+/NOS (CPMV160+) con el uso del siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de PDISP/H3 Victoria se amplificó utilizando los cebadores IF**(SacII)-PDI.s1+4c (Figura 44A, SEQ ID NO: 117) e IF-H3V36111.s1-4r (Figura 44B, SEQ ID NO: 118), con el uso de la secuencia de PDISP/H3 Victoria (Figura 44C, SEQ ID NO: 119) como molde. El producto de PCR se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV160+/NOS con el uso del sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción número 2171 (Figura 44D) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje "In-Fusion". La construcción número 2171 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV160+. También incorpora una construcción génica para la coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura 44E (SEQ ID NO: 120). La construcción

resultante recibió el número 1800 (Figura 44F, SEQ ID NO: 121). La secuencia de aminoácidos de la H3 madura de la gripe A/Victoria/361/2011 fusionada con PDISP se presenta en la Figura 44G (SEQ ID NO: 122). Una representación del plásmido 1800 se presenta en la Figura 44H.

5 Ejemplo 5.26: 2X35S/CPMV-HT+/PDISP/H3 Victoria/NOS (Construcción número 1819)

Una secuencia que codifica H3 de la gripe A/Victoria/361/2011 en la que el péptido señal nativo se ha reemplazado con el de la proteína disulfuro isomerasa de la alfalfa (PDISP/H3 Victoria) se clonó en el casete de expresión 2X35S-CPMV-HT+/NOS con el uso del siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de PDISP/H3 Victoria se amplificó utilizando los cebadores IF(SacII)-Kozac_PDI.c (Figura 45A, SEQ ID NO: 123) e IF-H3V36111.s1-4r (Figura 45B, SEQ ID NO: 124), mediante el uso de la secuencia de PDISP/H3 Victoria (Figura 44C, SEQ ID NO: 119) como molde. El producto de PCR se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT+/NOS con el uso del sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción número 2181 (Figura 45D) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje "In-Fusion". La construcción número 2181 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 coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura 45E (SEQ ID NO: 125). La construcción resultante recibió el número 1819 (Figura 45E, SEQ ID NO: 126). La secuencia de aminoácidos de la H3 madura de la gripe A/Victoria/361/2011 fusionada con PDISP se presenta en la Figura 44G (SEQ ID NO: 122). Una representación del plásmido 1819 se presenta en la Figura 45F.

Ejemplo 5.27 2X35S/CPMV HT+/PDISP/H2 Singapore/NOS (Construcción número 2220)

Una secuencia que codifica H2 de la gripe A/Singapore/1/1957 en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/H2 Singapore) se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV HT+/NOS mediante el uso del siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de PDISP/H2 Singapore se amplificó mediante el uso de los cebadores IF(SacII)-Kozac_PDI.c (descrito para la construcción 1819 en el Ejemplo 5.26) e IF**-H2S157.s1-6r (Figura 48A, SEQ ID NO: 127), utilizando la secuencia de PDISP/H2 Singapore (Figura 48B, SEQ ID NO: 128) como molde. El producto de PCR se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV-HT+/NOS con el uso del sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción número 2181 (descrita para la construcción 1819 en el Ejemplo 5.26) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje "In-Fusion". La construcción número 2181 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 coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura 45D. La construcción resultante recibió el número 2220 (Figura 48C, SEQ ID NO: 129). La secuencia de aminoácidos de la H2 madura de la gripe A/Singapore/1/1957 fusionada con PDISP se presenta en la Figura 48D (SEQ ID NO: 130). Una representación del plásmido 2220 se presenta en la Figura 48E.

Ejemplo 5.28 2X35S/CPMV HT+/PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado/NOS (Construcción número 2221)

Una secuencia que codifica H2 de la gripe A/Singapore/1/1957 con bucle proteolítico eliminado en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado) se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CPMV HT+/NOS mediante el uso del siguiente método de ligadura basado en PCR presentado por Darveau y otros (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). En una primera ronda de PCR, un fragmento que contenía H2 de la secuencia codificante de la Gripe A/Singapore/1/1957 del nt 1 al nt 1032 se amplificó con los cebadores IF(SacII)-Kozac_PDI.c (descrito para la construcción 1819 en el Ejemplo 5.26) y H2S157(PrI-).r (Figura 49A, SEQ ID NO: 131), con el uso de la secuencia de PDISP/H2 Singapore (Figura 48B, SEQ ID NO: 128) como molde. Un segundo fragmento, que contenía H2 de la secuencia codificante de la Gripe A/Singapore/1/1957 del nt 1084 al nt 1716, se amplificó con los cebadores H2S157(PrI-).c (Figura 49B, SEQ ID NO: 132) e IF**-H2S157.s1-6r (Figura 48A, SEQ ID NO: 127) con el uso de la secuencia de PDISP/H2 Singapore (Figura 48B, SEQ ID NO: 128) como molde. Los productos de PCR de ambas amplificaciones se mezclaron y usaron como molde para una segunda ronda de amplificación mediante el uso de IF(SacII)-Kozac_PDI.c (descrito para la construcción 1819 en el Ejemplo 5.26) e IF**-H2S157.s1-6r (Figura 48A, SEQ ID NO: 127) como cebadores. El producto de PCR (que comprende la secuencia codificante de PDISP/H2 Singapore con los aa 321 a 337 reemplazados por un enlazador GG) se clonó en un sistema de expresión 2X35S/CPMV HT+/NOS con el uso del sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción número 2181 (descrita para la construcción 1819 en el Ejemplo 5.26) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje "In-Fusion". La construcción número 2181 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 coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura 45D (descrita para la construcción 1819, en el

ejemplo 5.26). La construcción resultante recibió el número 2221 (Figura 49C, SEQ ID NO: 133). La secuencia de aminoácidos de la H2 madura de la gripe A/Singapore/1/1957 con bucle proteolítico eliminado, fusionada con PDISP se presenta en la Figura 49D (SEQ ID NO: 134). Una representación del plásmido 2221 se presenta en la Figura 49E.

- 5 Ejemplo 5.29 PDISP/H2 Singapore (Construcción número 2222) y PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado (Construcción número 2223) en el sistema de expresión 2X35S/CPMV 160+/NOS

Las secuencias que codifican H2 de la gripe A/Singapore/1/1957 con o sin bucle proteolítico en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/H2 Singapore y PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado) fueron clonadas en el sistema de expresión 2X35S/CPMV 160 +/NOS mediante el mismo método basado en PCR que la construcción 2220 y 2221, respectivamente, pero con el uso del cebador directo modificado IF**(SacII)-PDI.s1+4c (descrito para la construcción 1800 en el Ejemplo 5.25) para la amplificación y un plásmido aceptor diferente. Los productos de PCR resultantes se clonaron en el sistema de expresión 2X35S/CPMV 160 +/NOS con el uso del sistema de clonación "In-Fusion" (Clontech, Mountain View, CA). La construcción número 2171 (descrita para la construcción 1800 en el Ejemplo 5.25) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje "In-Fusion". La construcción número 2171 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV 160+. También incorpora una construcción génica para la coexpresión del supresor de silenciamiento de TBSV P19 bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCambia y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en (descrito para la construcción 1800 en el Ejemplo 5.25). Las construcciones resultantes recibieron el número 2222 para PDISP/H2 Singapore (Figura 50A, SEQ ID NO: 135) y 2223 para PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado (Figura 50B, SEQ ID NO: 136). Las representaciones de los plásmidos 2222 y 2223 se presentan en las figuras 50C y 50D, respectivamente.

25 Ejemplo 5.30 2X35S/CPMV HT+ (construcción núm. 2019) y 160+ (construcción núm. 2139) para PDISP/H3 Perth

Una secuencia codificante correspondiente a H3 de la gripe A/Perth/16/2009 en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/H3 Perth) (Figura 51A, SEQ ID NO: 137) se clonó en CPMV HT+ modificado y 160+ utilizando el mismo enfoque basado en "In Fusion" que la construcción 2220 y 2222, respectivamente, pero con cebador de PCR modificado específicamente diseñado para PDISP/H3 Perth (Figura 51B, SEQ ID NO: 138). La secuencia de aminoácidos de la H3 madura de la gripe A/Perth/16/2009 fusionada con PDISP se presenta en la Figura 51C (SEQ ID NO: 139). Las representaciones de los plásmidos 2019 y 2139 se presentan en la Figura 51D y la Figura 51E.

35 Ejemplo 5.31 2X35S/CPMV HT+ (construcción núm. 2039) y 160+ (construcción núm. 2159) para PDISP/H3 Perth con bucle proteolítico eliminado

Una secuencia codificante correspondiente a H3 de la gripe A/Perth/16/2009 con bucle proteolítico eliminado en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/H3 Perth con bucle proteolítico eliminado) (Figura 52, SEQ ID NO: 140) se clonó en CPMV HT+ modificado y 160+ utilizando el mismo enfoque basado en "In Fusion" que la construcción 2221 y 2223, respectivamente, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/H3 Perth con bucle proteolítico eliminado (Figura 51B (SEQ ID NO: 138), 52B (SEQ ID NO: 141) y 53C (SEQ ID NO: 142). La secuencia de aminoácidos de la H3 madura de la gripe A/Perth/16/2009 con bucle proteolítico eliminado, fusionada con PDISP se presenta en la Figura 52D (SEQ ID NO: 143). Las representaciones de los plásmidos 2039 y 2159 se presentan en la Figura 52E y la Figura 52F.

50 Ejemplo 5.32 2X35S/CPMV HT+ (construcción núm. 2230) y 160+ (construcción núm. 2250) para PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado

Una secuencia codificante correspondiente a H3 de la gripe A/Victoria/361/2011 con bucle proteolítico eliminado en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado) (Figura 53, SEQ ID NO: 144) se clonó en CPMV HT+ modificado y 160+ con el uso del mismo enfoque basado en "In Fusion" que la construcción 2221 y 2223 (ver Ejemplos 5.28 y 5.29), respectivamente, pero con cebador de PCR modificado específicamente diseñado para PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado (Figuras 53B (SEQ ID NO: 145) y 53C (SEQ ID NO: 146). La secuencia de aminoácidos de la H3 madura de la gripe A/Victoria/361/2011 con bucle proteolítico eliminado, fusionada con PDISP se presenta en la Figura 53D (SEQ ID NO: 147). Las representaciones de los plásmidos 2230 y 2250 se presentan en la Figura 53E y la Figura 53F.

60 Ejemplo 5.33 2X35S/CPMV HT+/PDISP/H7 Hangzhou/NOS (Construcción núm. 2142)

Una secuencia codificante correspondiente a H7 de la gripe A/Hangzhou/1/2013 en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/H7 Hangzhou) (Figura 54A, SEQ ID NO: 148) se clonó en CPMV HT+ modificado utilizando el mismo enfoque basado en "In Fusion" que la construcción 2220 pero con cebador de PCR modificado diseñado específicamente para PDISP/H7 Hangzhou (Figura 54B, SEQ ID NO: 149).

149). La secuencia de aminoácidos de la H7 madura de la gripe A/Hangzhou/1/2013 fusionada con PDISP se presenta en la Figura 54C (SEQ ID NO: 150). La representación del plásmido 2142 se presenta en la Figura 54E.

Ejemplo 5.34 2X35S/CPMV HT+/PDISP/H7 Hangzhou con bucle proteolítico eliminado/NOS (Construcción núm. 2152)

Una secuencia codificante correspondiente a H7 de la gripe A/Hangzhou/1/2013 con bucle proteolítico eliminado en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/ H7 Hangzhou con bucle proteolítico eliminado) (Figura 55A, SEQ ID NO: 151) se clonó en CPMV HT+ modificado con el uso del mismo enfoque basado en "In Fusion" que la construcción 2221 pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/ H7 Hangzhou con bucle proteolítico eliminado (Figura 54B (SEQ ID NO: 149), Figura 55B (SEQ ID NO: 152) y Figura 55C (SEQ ID NO: 153)). La secuencia de aminoácidos de la H7 madura de la gripe A/Hangzhou/1/2013 con bucle proteolítico eliminado, fusionada con PDISP se presenta en la Figura 55D (SEQ ID NO: 154). La representación del plásmido 2152 se presenta en la Figura 55E.

Ejemplo 5.35 2X35S/CPMV HT+ (construcción núm. 2224) y 160+ (construcción núm. 2226) para PDISP/H9 Hong Kong

Una secuencia codificante correspondiente a H9 de la gripe A/Hong Kong/1073/1999 en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/H9 Hong Kong) (Figura 56A, SEQ ID NO: 155) fue clonada en CPMV HT+ modificado y 160+ utilizando el mismo enfoque basado en "In Fusion" que la construcción 2220 y 2222, respectivamente, pero con cebador de PCR modificado específicamente diseñado para PDISP/H9 Hong Kong (Figura 56B, SEQ ID NO: 156). La secuencia de aminoácidos de la H9 madura de la gripe A/Hong Kong/1073/1999 fusionada con PDISP se presenta en la Figura 56C (SEQ ID NO: 157). Las representaciones de los plásmidos 2224 y 2226 se presentan en las Figuras 56D y Figura 56E.

Ejemplo 5.36 2X35S/CPMV HT+ (construcción núm. 2225) y 160+ (construcción núm. 2227) para PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado

Una secuencia codificante correspondiente a H9 de la gripe A/Hong Kong/1073/1999 con bucle proteolítico eliminado en donde el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado) (Figura 57A, SEQ ID NO: 158) se clonó en CPMV HT+ modificado y 160+ utilizando el mismo enfoque basado en "In Fusion" que la construcción 2221 y 2223, respectivamente, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado (Figura 56B (SEQ ID NO: 156), Figura 57B (SEQ ID NO: 159) y Figura 57C (SEQ ID NO: 160)). La secuencia de aminoácidos de H9 madura de la gripe A/Hong Kong/1073/1999 con el bucle proteolítico eliminado fusionado con PDISP se presenta en la Figura 57D (SEQ ID NO: 161). Las representaciones de los plásmidos 2225 y 2227 se presentan en la Figura 57E y la Figura 57F.

Ejemplo 5.37 2X35S/CPMV 160+/PDISP/HA B Malaysia/NOS (Construcción núm. 2013)

Una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Malaysia/2506/2004 en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Malaysia) (Figura 58A, SEQ ID NO: 162) se clonó en CPMV 160+ modificado con el uso del mismo enfoque basado en "In Fusion" que la construcción 2222 pero con cebador de PCR modificado específicamente diseñado para PDISP/HA B Malaysia (Figura 58B, SEQ ID NO: 163). La secuencia de aminoácidos de HA madura de la gripe B/Malaysia/2506/2004 fusionada con PDISP se presenta en la Figura 58C (SEQ ID NO: 164). La representación del plásmido 2013 se presenta en la Figura 58D.

Ejemplo 5.38 2X35S/CPMV 160+/PDISP/HA B Malaysia con bucle proteolítico eliminado/NOS (Construcción núm. 2014)

Una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Malaysia/2506/2004 con bucle proteolítico eliminado en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Malaysia con bucle proteolítico eliminado) (Figura 59A, SEQ ID NO: 165) se clonó en CPMV 160+ modificado utilizando el mismo enfoque basado en In Fusion que la construcción 2223 pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/HA B Malaysia con bucle proteolítico eliminado (Figura 58B (SEQ ID NO: 163), Figura 59B (SEQ ID NO: 166), Figura 59C (SEQ ID NO: 167)). La secuencia de aminoácidos de HA madura de la gripe B/Malaysia/2506/2004 con bucle proteolítico eliminado, fusionada con PDISP se presenta en la Figura 59D (SEQ ID NO: 168). La representación del plásmido 2014 se presenta en la Figura 59E.

Ejemplo 5.39 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 2070), HT+ (construcción núm. 2080) y 160+ (-Mprot) (construcción núm. 2090) para PDISP/HA B Massachusetts

Una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Massachusetts/2/2012 en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Massachusetts) (Figura 60A, SEQ ID NO: 169) se clonó en HT original, HT+ modificado y 160+ con el uso del mismo enfoque basado en "In Fusion" que la construcción 2072, 2220 y 2222, respectivamente, pero con cebadores de PCR modificados diseñados

específicamente para PDISP/HA B Massachusetts. La secuencia de aminoácidos de HA madura de la gripe B/Massachusetts/2/2012 fusionada con PDISP se presenta en la Figura 60B (SEQ ID NO: 170). Las representaciones de los plásmidos 2070, 2080 y 2090 se presentan en la Figura 60C, Figura 60D y Figura 60E.

- 5 Ejemplo 5.40 2X35S/CPMV HT+ (construcción núm. 2102), HT+ con BeYDV (construcción núm. 2104) para PDISP/HA B Florida con bucle proteolítico eliminado

Una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Florida con bucle proteolítico eliminado y en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Florida) (Figura 61D, SEQ ID NO: 193) se clonó en HT+ modificado, el mismo enfoque basado en "In Fusion" como se describió anteriormente, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/HA B/Florida (ver la Fig. 61A (SEQ ID NO: 190), la Fig. 61B (SEQ ID NO: 191) y la Fig. 61C (SEQ ID NO: 192). La secuencia de nucleótidos del casete de expresión resultante 2102 se proporciona en la Fig. 61F (SEQ ID NO: 195). De manera similar, una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Florida con bucle proteolítico eliminado y en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa se clonó en HT+ modificado junto con el elemento de amplificación de BeYDV. La secuencia de nucleótidos del casete de expresión resultante 2104 se proporciona en la Fig. 61F (SEQ ID NO: 196). La secuencia de aminoácidos de HA madura de la gripe B/Florida con bucle proteolítico eliminado fusionada con PDISP se presenta en la Figura 61E (SEQ ID NO: 194). Las representaciones de los plásmidos 2102 y 2104 se presentan en las Figuras 61G y 61I.

- 20 Ejemplo 5.41 2X35S/CPMV HT+ (construcción núm. 2106), HT+ con BeYDV (construcción núm. 2108) para PDISP/HA B Florida+H1 California TMCT con bucle proteolítico eliminado

Una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Florida + H1 California TMCT con el bucle proteolítico eliminado y en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa (PDISP/HA B Florida + H1 California TMCT) (Figura 62B, SEQ ID NO: 198) se clonó en HT+ modificado, el mismo enfoque basado en "In Fusion" como se describió anteriormente, pero con cebadores de PCR modificados diseñados específicamente para PDISP/HA B/Florida + H1 California TMCT (ver la Figura 61A (SEQ ID NO: 197). La secuencia de nucleótidos del casete de expresión resultante 2106 se proporciona en la Fig. 62D (SEQ ID NO: 200). De forma similar, una secuencia codificante correspondiente a HA de la gripe B/Florida + H1 California TMCT con el bucle proteolítico eliminado y en la que el péptido señal nativo ha sido reemplazado por el de la proteína disulfuro isomerasa de alfalfa se clonó en HT+ modificado junto con el elemento de amplificación de BeYDV. La secuencia de nucleótidos del casete de expresión resultante 2108 se proporciona en la Fig. 62F (SEQ ID NO: 201). La secuencia de aminoácidos de HA madura de la gripe B/Florida + H1 California TMCT con bucle proteolítico eliminado fusionada con PDISP se presenta en la Figura 62C (SEQ ID NO: 199). Las representaciones de los plásmidos 2106 y 2108 se presentan en la Figura 62E y 62G.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que comprende una región reguladora activa en una planta y un potenciador de la expresión activo en una planta, la región reguladora y el potenciador de la expresión unidos operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una hemaglutinina (HA) de la gripe tipo B modificada que comprende un bucle proteolítico completamente eliminado, y el potenciador de la expresión se selecciona del grupo que consiste en el CPMVX del comovirus virus del mosaico del caupí (CPMV), CPMVX+, CPMV-HT+, CPMV HT+[WT115] y CPMV HT+ [511], en donde el ácido nucleico no comprende una región intergénica larga del virus del mosaico enano amarillo del frijol (BeYDV LIR) y una región intergénica corta de BeYDV (BeYDV SIR), y en donde:

CPMVX comprende X nucleótidos de la SEQ ID NO: 93, donde X=160, 155, 150, o 114 de la SEQ ID NO: 93, o una secuencia que comprende entre 80 % a 100 % de similitud de secuencia con CPMVX, donde X=160, 155, 150 o 114 de la SEQ ID NO: 93, CPMVX+ comprende X nucleótidos de la SEQ ID NO: 93, donde X=160, 155, 150, o 114 de la SEQ ID NO: 93, o una secuencia que comprende entre 80 y 100 % de similitud de secuencia con CPMVX, donde X=160, 155, 150 o 114 de la SEQ ID NO: 93, y una secuencia de relleno comprende de 1-100 nucleótidos fusionados al extremo 3' de la secuencia de CPMVX, CPMV-HT+ comprende una región no traducida (UTR) 5' de comovirus y una secuencia de relleno modificada, alargada o truncada, CPMV HT+[WT115] comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 189, y CPMV HT+ [511] comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 188.
2. El ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 1, en donde la HA modificada se mantiene como un precursor HAO o en donde el bucle proteolítico se reemplaza completamente con una secuencia enlazadora.
3. El ácido nucleico de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína hemaglutinina (HA) de la gripe tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 98, 100, 108, 110, 168, 194 y 199.
4. El ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la HA modificada comprende un péptido señal nativo o no nativo.
5. El ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la HA modificada comprende una secuencia de nucleótidos quimérica que codifica, en serie, un ectodominio de HA modificada que comprende un bucle proteolítico completamente eliminado, un dominio transmembrana de la gripe y una cola citoplasmática, en donde el ectodominio de la HA modificada es de una primera cepa de gripe y el dominio transmembrana y la cola citoplasmática son de una segunda cepa de gripe.
6. Un método para producir partículas similares al virus (VLP) de la gripe en una planta que comprende,
 - a) introducir un ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en la planta o parte de la planta; o proporcionar una planta, o una parte de una planta, que comprende el ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5; e
 - b) incubar la planta o parte de la planta en condiciones que permitan la expresión de los ácidos nucleicos, produciendo así las VLP.
7. El método de conformidad con la reivindicación 6, que comprende además las etapas de
 - c) cosechar la planta, y
 - d) purificar las VLP, en donde las VLP varían en tamaño de 80 a 300 nm.
8. El método de conformidad con la reivindicación 6 o 7, en donde la etapa a) comprende además introducir un segundo ácido nucleico en la planta o parte de la planta, el segundo ácido nucleico comprende una segunda región reguladora activa en la planta y unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de canal de protones, por ejemplo M2 o BM2.
9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en donde en la etapa de introducción (etapa a), el ácido nucleico se introduce en la planta de manera transitoria, o el ácido nucleico se introduce en la planta para que sea estable.
10. Una planta que comprende el ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

Figura 1: A-2X35S/CPMV-HT/H5 Indonesia/NOS (Construcción número 489)

Figura 1A

IF-H5A-I-05.s1+3c SEQ ID NO: 2

AAATTTGTCGGGCCCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGC

Figura 1B

IF-H5dTm.r SEQ ID NO: 3

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTAAATGCAAATTCTGCATTGTAACGATCCAT

Figura 1C

Representación esquemática de la construcción 1191. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

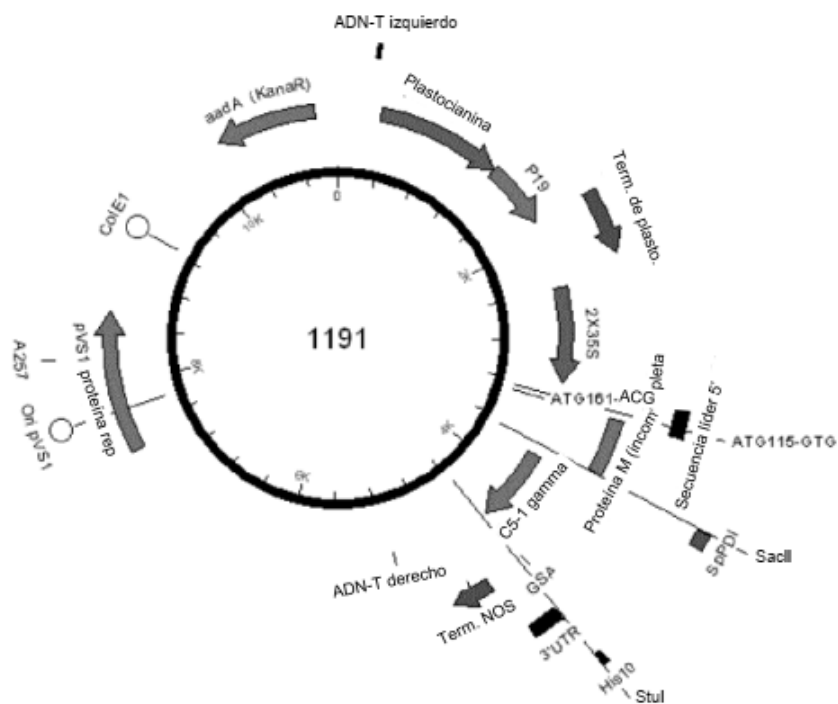


Figura 1D

Construcción 1191 desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS con casete de expresión del inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina (SEQ ID NO: 4)

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACG
TTTTTAATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTC
AAAAACCATAAAAGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTTGAACAAAAATATTCACCTA
CTACTGTTATAAATCATTATTTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAG
TGATATTTTGCACAACATTTTGTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTGTTCTCTCTTTTCATTG
GTCAAAAACAATAGAGAGAGAGAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGA
GAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGC
TACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTA
GAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAATTAAGTTGAGTCA
TTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAA
TTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCCATAGAGTC
AGTTAACTCATTTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAA
AAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTA
GGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCAC
GCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAA
ACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATT
CCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGA
ACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAACAAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCA
GGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAGTCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTAC
ATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTGGTTTCAAGGAAAGCTGGGGTTTCGG
GAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCACTGCACAGAGTCCCT
GGATCTTGGACGGGAGATTTCGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTTCGGTTTCGACAGATCG
GATGTACCTATAGTATTCGGTTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCGCGAACTCT
TCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCCAATCGAA
GTGGAAAGTAAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGT
AAGTTAAATGCTTCTTCGTCTCTTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGT
AGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAAGTGGTGAATG
TAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACATGAAG
ACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACATAAATTGAACATCTTTTGCCACAACCTT
ATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGT
TATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACCTACTAATTTTATATCATCCCTTTGA
TAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTGTCGTTTCCCGCCTTC
AGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGGAAT
TACTAGCGCGTGTGACAAGCTTGCATGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTAC
TCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGG
TAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGT
GGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGAT
GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAG
ACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACT
TGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAA
CAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGA
AGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGT

TGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGA
 AAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAA
 GGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCA
 TTTGGAGAGGTATTAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAA
 ACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGA
 GCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGA
 AATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTC
 TTGTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTGAGCCCCATACATTACT
 TGTTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTT
 GCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTGA
 AACAGAGTTTTTCCCGTGGTTTTTCGAACCTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCC
 AAATTTGTGGGCCCCGCGGATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTT
 GTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCTGCAGGCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTC
 TATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCA
 AGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCA
 CACCTTCCCAGCTGTCTGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCCTCC
 AGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGCCCAGCAGCACCAGGTGG
 ACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCAATATGTACAGTCCCAGAAGTATC
 ATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTC
 ACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATG
 ATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTC
 AGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGCGATCGCTCACCATC
 ACCATCACCATCACCATCACCATTAAAGGCCATTTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGG
 TGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTA
 ATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATT
 TTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGT
 TCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCA
 TATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTAT
 GAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATA
 TAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTC
 TCAAGCTTGGCGCGCCACGTGACTAGTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
 AAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAT
 AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGA
 GCAGCTTGAGCTTGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAACTATCAGTGTTTGACAG
 GATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 1E

Casete de expresión número 489 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. La H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) está subrayada. SEQ ID NO: 5

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAG
 ACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTG
 CCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCAT
 CATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGAC
 CCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGA
 TTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTC
 TCAGAAGACCAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGAT
 TCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAA
 ATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAA
 GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGC
 AAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA
 AGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGTTT
 TGATAAAAGCGAACGTGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTT
 AAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCG
 GCACCAAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGC
 GCGGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTCTTGTCTGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTT
 GCTGGAGGCTGCTGTTTACGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTTCGGCGGGTGC
 AATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGA
 TTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTCGAACCTGG
 AGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGGCCCATGGAGAAAATAGTGC
 TTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTAAAGTGTATCAGATTGCAATTGGTTACCATGCAAACAA
 TTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATA
 CTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAG
 ATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGA
 ATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAAC
 GACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAAATCATCC
 CAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCAGCATGTCCATACCTGGG
 AAGTCCCTCCTTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATA
 AAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGGAATTCACCATCCTA
 ATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAACCCAACCACTATATTTCCATTGGGACATC
 AACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAGTGGA
 AGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAA
 ATTTCAATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAG
 TGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAATGGGGGCGATAAACTCTAGT
 ATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACA
 GATTAGTCCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAGAGAGG
 ACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTAT
 GGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGG
 CAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGC
 CGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGAC
 GGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAACCTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAATC
 TAGACTTTCATGACTCAAATGTTAAGAACCCTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAA

TGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGATAATGAATGTATGGAA
 AGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTATCCGCAGTATTTCAGAAGAAGCAAGATTAAAAAGAGAGG
 AAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACCTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGT
 GCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGA
 TCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCG
 GTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTT
 AATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAT
 TTTATTAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCG
 TTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATC
 ATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTA
 TGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAAT
 ATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 1F

Secuencia de aminoácidos de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) SEQ ID NO: 6

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCDLGDK
 PLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLISRINHFE
 KIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNWVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLLVLW
 GIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIAATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAIN
 FESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNHPLTIGECPK
 YVKSRLVLAATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSYAADK
 ESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWYNAELLVLM
 ENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNALGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSEEA
 RLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCSNGSLQCRICI

Figura 1G Secuencia de nucleótidos que codifica H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) SEQ ID NO: 42)

ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTG
GTTACCATGCAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTAC
ACATGCCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAG
CCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAAT
TCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTA
CCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAG
AAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCAG
CATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAG
TACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGG
GGAATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAACCACCTATA
TTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGT
AAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAGTCTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAATCAAC
TTCGAGAGTAATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACT
CAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGG
GGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAA
TATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCAACAGGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCA
GAAGAAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAAT
GGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAA
GAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGA
AACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAA
CAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAACCTCTGGTTCTCATG
GAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAATGTTAAGAACCTCTACGACAAGGTCCGAC
TACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGA
TAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTATCCGCAGTATTCAGAAGAAGCA
AGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAAATACTGT
CAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATG
GATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA

Figura 2: B-2X35S/CPMV HT/M2 New Caledonia/NOS (Construcción número 1261)

Figura 2A

IF-S1-M1+M2ANC.c (SEQ ID NO:7)

AAATTTGTCGGGCCCATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACG

Figura 2B

IF-S1-4-M2ANC.r (SEQ ID NO: 8)

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTACTCCAGCTCTATGCTGACAAAA

Figura 2C

Gen de M2 sintetizado (correspondiente a los nt 1-26 unidos a 715-982 del número de acceso al Genbank DQ508860) (SEQ ID NO: 9)

ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATT
CAAGTGATCCTCTTGTGTTGTCGCAAGTATAATTGGGATTGTGCACCTGATATTGTGGATTAT
TGATCGCCTTTTTTCCAAAAGCATTATCGTATCTTTAAACACGGTTTAAAAAGAGGGCCTTCT
ACGGAAGGAGTACCAGAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAGAGGAACAGCAGAATGCTGTGGATG
CTGACGATGGTCATTTTGTGAGCATAGAGCTGGAGTAA

Figura 2D

Casete de expresión número 1261 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. M2 de la gripe A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) está subrayado. (SEQ ID NO: 10)

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAG
ACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTG
CCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCAT
CATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC
CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGA
TTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTC
TCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGAT
TCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAA
ATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAA
GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGC
AAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA

AGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGTTT
TGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAACTCTCTCATCTCTCTT
AAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCG
GCACCAGTACAACGTTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTGTGGACACGTAGTGC
GGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTCTGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTT
GCTGGAGGCTGCTGTTTACGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTTCGGCGGGTGC
AATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGA
TTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTCGAACTTG
AGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCCAAATTTGTCGGGCCCATGAGTCTTCTAACCG
AGGTCGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGTGATCCTCTTGT
TGTTGCCGCAAGTATAATTGGGATTGTGCACCTGATATTGTGGATTATTGATCGCCTTTTTTCC
AAAAGCATTTATCGTATCTTTAAACACGGTTTAAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTACCAG
AGTCTATGAGGGAAGAATATCGAGAGGAACAGCAGAATGCTGTGGATGCTGACGATGGTCATTT
TGTCAGCATAGAGCTGGAGTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTG
CATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTT
CTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTAT
TAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAA
ACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATA
ATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGA
TGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGC
GCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 2E

Secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) (SEQ ID NO: 11)

MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDPLVVAASIIIGIVHLILWIIDRLFSKSIYRIFKHGLKRGPS
TEGVPESMREEYREEQQNAVDADDGHFVSIELE

Figura 3: C-2X35S/CPMV-HT/M2 Puerto Rico/NOS (Construcción número 859)

Figura 3A

Gen de M2 sintetizado (correspondiente a los nt 26-51 unidos a los nt 740-1007 del número de acceso al Genbank EF467824) (SEQ ID NO: 12)

ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGGTT
CAAGTGATCCTCTCACTATTGCCGCAAATATCATTGGGATCTTGCACTTGACATTGTGGATTCT
TGATCGTCTTTTTTTCAAATGCATTACCGTCGCTTTAAATACGGACTGAAAGGAGGGCCTTCT
ACGGAAGGAGTGCCAAAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATG
CTGACGATGGTCATTTTGTGTCAGCATAGAGCTGGAGTAA

Figura 3B

Casete de expresión número 859 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. M2 de la Gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) está subrayado. (SEQ ID NO: 13)

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAG
ACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTG
CCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCAT
CATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC
CCCCACCCACGAGGAGCATCGTTGGAAGAAAGAACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGAA
TTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTC
TCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGAT
TCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAA
ATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAA
GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTTGGAAGAAAGAACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGC
AAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA
AGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATAATCTTAATAGGTTT
TGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTT
AAAGCAAATCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCG
GCACCAGTACAACGTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGC
GGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTCTTGTCTGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTT
GCTGGAGGCTGCTGTTGAGCCCATACATTACTTGTACGATCTGCTGACTTTCGGCGGGTGC
AATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGA
TTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTTGAACCTTGG
AGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCCAAATTTGTGCGGGCCATGAGTCTTCTAACCG
AGGTGCGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGGTTCAAGTGATCCTCTCAC
TATTGCCGCAAATATCATTGGGATCTTGCACTTGACATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTTTTC
AAATGCATTTACCGTCGCTTTAAATACGGACTGAAAGGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCAA
AGTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGCTGACGATGGTCATTT
TGTGAGCATAGAGCTGGAGTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTG
CATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTT

CTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTAT
TAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAA
ACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATA
ATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGA
TGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGC
GCGCAAAC TAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 3C

Secuencia de aminoácidos de M2 de la gripe A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (SEQ ID NO: 14)

MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDPLTIAANIIIGILHLTLWILDRLFFKCIYRRFKYGLKGGPS
TEGVPKSMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE

Figura 4: G-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV+Replicasa (Construcción número 1008)

Figura 4A

Representación esquemática de la construcción 1194. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

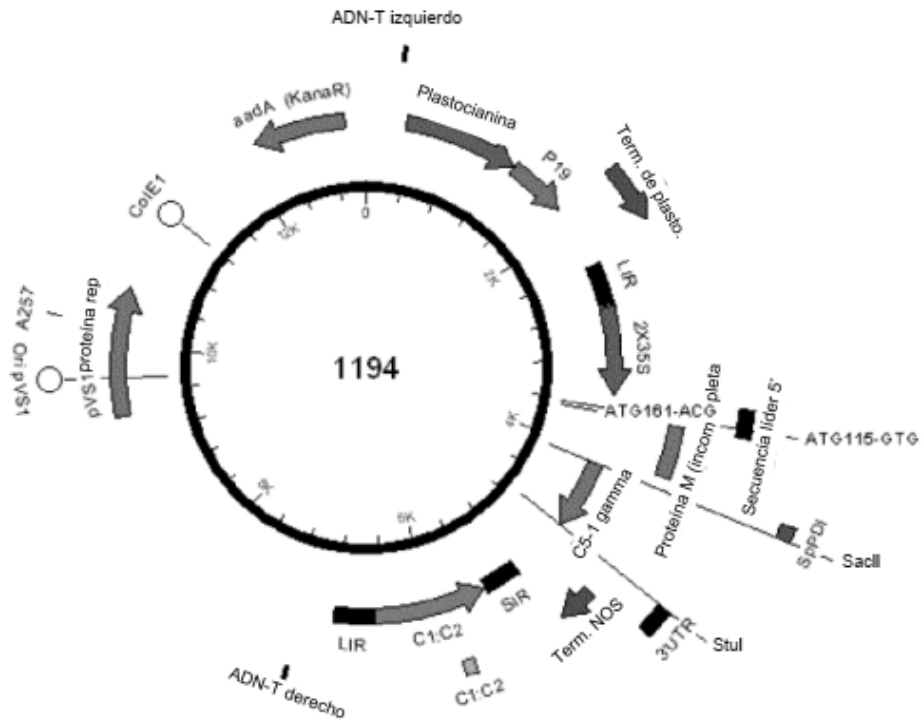


Figura 4B

Construcción 1194 desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/PDISP/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV+Replicasa con casete de expresión de inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina (SEQ ID NO: 31)

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACG
TTTTTAATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTC
AAAAACCATAAAAGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTTGAACAAAATATTCACCTA
CTACTGTTATAAATCATTATTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAG
TGATATTTTGACAACAATTTTGTGCAACATTTGAGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTG
GTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGA
GAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGC

TACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTA
GAGAATTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGATAAATTATTTTAAAATTAAAAGTTGAGTCA
TTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAA
TTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGCCCCATAGAGTC
AGTTAACTCATTTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAA
AAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTA
GGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCAC
GCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAA
ACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATT
CCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGA
ACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAACAAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCA
GGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAGTCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTAC
ATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCCTTGGTTTCAAGGAAAGCTGGGGTTTCGG
GAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCACTGCACAGAGTCCTT
GGATCTTGGACGGGAGATTTCGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTTCGGTTTCGACCAGATCG
GATGTACCTATAGTATTTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTCGCGAACTCT
TCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCCAATCGAA
GTGGAAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTAATCAAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGT
AAGTTAAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGT
AGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAAATG
TAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAG
ACCTGCCGCGTACAATTGCTTATATTTGAACAATAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACCTTT
ATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGT
TATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACCTACTAATTTTATATCATCCCCTTTGA
TAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTGTGCTTTCCCGCCTTC
AGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGGAAT
TACTAGCGCGTGTGACACGCGTGGCGCGCCCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGG
GTTGCCTCAAACCTCTATCTTATAACCGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTT
AAGTAGTTAGTGGAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGGCCAC
GCCGAATTTTAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCA
GATTTAAAGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTTCACTATAAAAGCATATAC
GATGTGATGGTATTTGATAAAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTGCGATACGAATTATTCG
TACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCA
AAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAA
CCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGT
GGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACA
GTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCACACCAC
GTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAA
AATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATAT
CCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAA
GGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCT
GCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTC
CAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACA
ATCCCCTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGTAT
TAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAA
CTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACG
TTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTC

TTTGTGGACACGTAGTGCGGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGT
 CTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTTACGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTG
 CTGACTTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTT
 TCTTCTTCTTCTTGTCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCC
 CGTGGTTTTTCGAACTTGAGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGCGGC
 CCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTTCTTCTCA
 GATCTTTCGCCGCGGCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGAT
 CTGCTGCCCAAACCTAATCCATGGTGACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCC
 AGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTG
 CAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGA
 CCGTCACCTGCAACGTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAG
 GGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCAATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCC
 CCAAAGCCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTACGTGTGTTGTGGTAGACA
 TCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGC
 TCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATC
 ATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATT
 CGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAAT
 TTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCTGCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTA
 ATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGAT
 CGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTA
 TCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATT
 TATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAA
 ATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGA
 GTCTCAAGCTTGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATTCCGAGTGTACTTCAAGTCAGTTGGAAATC
 AATAAAATGATTATTTTATGAATATATTTTCATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTACA
 TAACACACGAAATAAACAACAAAAACACAATCCAAAACAAACACCCCAACAAAATAACACTATA
 TATATCCTCGTATGAGGAGAGGCACGTTTCACTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAGTCTCC
 CCGTCACACATATAGTGGGTGACGCAATTATCTCAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTCAATG
 ATAACATCCAGTCTTTCGTGAGGATTGCAAAGAATTATAGAAGGGATCCCACCTTTTATTTTCTT
 CTTTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAATTGCTTCCACAAT
 GGGACGAACTTGAAGGGGATGTCGTGATGATATTATAGGTGGCGTGTTCATCGTAGTTGGTGA
 AGTCGATGGTCCCGTTCAGTAGTTGTGTGCGCCGAGACTTCTAGCCCAGGTGGTCTTTCCGGT
 ACGAGTTGGTCCGCAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCAGTCTTCCCTCATCCTGGTTA
 GATCGGCCATCCACTCAAGGTGAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGATGTATGAAAGTGTA
 GGCATCGATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCTTCGTGGCAGCGG
 AGATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACGTAAGTCTGCTCAGGTGTGGAGGAAATAATTTGTTGGCTG
 AATATTCCAGCCATTGAAGCTTTGTTGCCCATTCATGAGGGAATTCTTCTTTGATCATGTCAAG
 ATACTCCTCCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCGCCATCGTGCGTCAGATTTGCGAGGA
 GAGACCTTATGATCTCGGAAATCTCCTCTGGTTTTAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAA
 GGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGTGATTTCCTTCAAATCGAAAAAGA
 AGGATCCCTAATAACAAGTTTTTTATCAAGCTGGATAAGAGCATGATAGTGGGTAGTGCCATCT
 TGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTCCAGAGAA
 ACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTGGGGTAGGTAAGGAAAACATATTTAGATTG
 GAGTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCT
 ATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTGTTGTAATTTAAGTAGTTAGTGGA
 AATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCACGCCGAATTTTAATAT
 TACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAA

AGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTACACTATAAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTT
 GATGGAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTACGGCCGGCCACTA
 GTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATC
 GCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCC
 TTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTC
 GTTTCGCGCTTCAGTTTAACTATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAG
 AAAAGAGCGTTTA

Figura 4C

Casete de expresión número 1008 de LIR izquierda de BeYDV a LIR derecha de BeYDV.
 PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 está subrayado (SEQ ID NO: 32)

CTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTTATAACCGGCGT
 GGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTGTTGTAATTTAAGTAGTTAGTGAAAAATGACGTCATTTACT
 TAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGCCACGCCGAATTTTAATATTACCGGCGTGGCCCCA
 CCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAG
 GGTTAAAGGTGTTACACTATAAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATAAAGCGTATATTG
 TATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGTGG
 AGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAAT
 TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGT
 CACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAG
 GAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAG
 GAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAAC
 ATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 GGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGC
 TATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGC
 GATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCAC
 CCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATG
 TGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCT
 ATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAAAACTTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAA
 CGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTCT
 CTCTTGTCTTTCTTTCGCTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAAC
 GTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAAGTGCGGCGCCATTAAAT
 AACGTGTACTTGTCTTATTCTTGTCTGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCT
 GTTCAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGTGACTTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTT
 CTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAG
 AAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTCGAACTTGAGAGAAAGATTGTTA
 AGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCTGGGCCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTTCGGCTT
ATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGAATCTGCACTGGAATA
ACATCGTCAAACCTCACCACATGTCGTCAAACTGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTG
TAATACCACTGACAACAACCCACCAAATCTCATTGCAATCTCAAAGGAACAGAAACCAG
GGGGAACTATGCCCAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTAGCCTTGGGCAGACCAAAA
TGCACGGGGAAAAATACCCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTG
GGTGCTTTCTTATAATGCACGACAGAAACAAAATTAGACAGCTGCCTAACCTTCTCCGAGGATA
CGAACATATCAGGTTATCAACCATAACGTTATCAATGCAGAAAATGCACCAGGAGGACCTAC

AAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACATTACCAATGGAAACGGATTTTTTCGCAACAATGG
 CTTGGGCCGTCCCCAAAAACGACAAAAACAAAACAGCAACAAATCCATTAACAATAGAAGTACC
 ATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAATTACCGTTTGGGGGTTCCTACTCTGACAACGAGACC
 CAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCAGAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGA
 CCACACATTACGTTTCACAGATTGGTGGCTTCCCCAAATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACA
 AAGTGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAATCTGGGAAAACAGGAACAATTACCTAT
 CAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAAG
 GATCCTTGCCCTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAG
 CAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACA
 CCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGCAAACTATTAAAGGAAAGGGGTT
 TCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGG
 ATACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCC
 ATAAACAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGAC
 TAAGCGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTAGAAGTAGATGAGAAAGTGGATGATCT
 CAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAAGTCCGAGTCCTGCTTTCCAATGAAGGAATAATA
 AACAGTGAAGATGAACATCTCTTGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCTCTG
 CTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAG
 AATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACCTTGATTCACTGAATATT
 ACTGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTTTACTACTCAACTG
 CTGCCTCCAGTTTGGCTGTAACACTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGA
 CAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCTATAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTC
 GGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATT
 TAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAA
 TTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATC
 GTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTAT
 CATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTT
 ATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAA
 TATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAG
 TCTCAAGCTTGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATTCCGAGTGTACTTCAAGTCAGTTGGAAATCA
 ATAAAATGATTATTTTATGAATATATTTTATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTACAT
 AACACACGAAATAAACAAAAAACACAATCCAAAACAAACACCCCAACAAAATAACACTATAT
 ATATCCTCGTATGAGGAGAGGCACGTTCAAGTACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAGTCTCCC
 CGTCACACATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTCAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTCATTGA
 TAACATCCAGTCTTCGTCAGGATTGCAAAGAATTATAGAAGGGATCCCACCTTTTATTTTCTTC
 TTTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAATTGCTTCCACAATG
 GGACGAACTTGAAGGGGATGTCGTCGATGATATTATAGGTGGCGTGTTCATCGTAGTTGGTGAA
 GTCGATGGTCCCGTTCCAGTAGTTGTGTCGCCCCGAGACTTCTAGCCCAGGTGGTCTTTCCGGTA
 CGAGTTGGTCCGCAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCAGTCCTTCCCTCATCTGGTTAG
 ATCGGCCATCCACTCAAGGTCAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGATGTATGAAAGTGTAG
 GCATCGATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCTTCGTGGCAGCGGA
 GATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACGTACTGCTCAGGTTGTGGAGGAAATAATTTGTTGGCTGA
 ATATTCCAGCCATTGAAGCTTTGTTGCCCATTCATGAGGGAATCTTCTTTGATCATGTCAAGA
 TACTCCTCCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTTCGCCATCGTGCGTCAGATTTGCGAGGAG
 AGACCTTATGATCTCGGAAATCTCCTCTGGTTTTAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAG
 GACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGTGATTTCTTCAAATCGAAAAAGAA
 GGATCCCTAATACAAGGTTTTTTATCAAGCTGGATAAGAGCATGATAGTGGGTAGTGCCATCTT
 GATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTCCCAGAGAAA

CTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGGTAGGTAAGGAAAACATATTTAGATTGG
AGTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTA
TCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTCTTGGTAATTTAAGTAGTTAGTGAAAA
ATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCAGACAAGGGGGGGCCACGCCGAATTTTAATATT
ACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAA
GTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTG
ATGGAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTAC

Figura 5: I-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane con bucle proteolítico eliminado/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV+Replicasa (Construcción número 1059)

Figura 5A,

1039+1059.r (SEQ ID NO: 38)

CTTCCCATCCTCCACCAGGAGGTCTATATTTGGTTCCATTGGCCAGCTTCAA

Figura 5B

1039+1059.c (SEQ ID NO: 39)

CAAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTGGGCAC

Figura 5C,

Casete de expresión número 1059 de LIR izquierda de BeYDV a LIR derecha de BeYDV. PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado está subrayado. (SEQ ID NO: 40)

CTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTTATAACCGGCGT
GGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTCTTGGTAATTTAAGTAGTTAGTGAAAAATGACGTCATTTACT
TAAAGACGAAGTCTTGCAGACAAGGGGGGGCCACGCCGAATTTTAATATTACCGGCGTGGCCCCA
CCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAAAGTTCCCGCCCACTAG
GGTTAAAGGTGTTACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGATAAAGCGTATATTG
TATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTACAAGCTTCTTAAGCCGGTCAACATGGTGG
AGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAAT
TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGT
CACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAG
GAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAG
GAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAAC

ATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAA
 GGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGC
 TATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGC
 GATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCAC
 CCACGAGGAGCATCGTGGAAGAAAGAACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATG
 TGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTCT
 ATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGTATTTAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAA
 CGTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCT
 CTCTTGTCTTTCTTGTGCGTGAAGCATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAAC
 GTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAAT
 AACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCT
 GTTCAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTT
 CTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGTGCTGATTGGTTCTATAAG
 AAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTA
 AGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGCGGGCCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTT
 ATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGAATCTGCACTGGAATA
 ACATCGTCAAACCTCACCACATGTCGTCAAACTGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTG
 TAATACCACTGACAACAACCCACCAATCTCATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACCAG
 GGGGAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTAGCCTTGGGCAGACCAAAA
 TGCACGGGGAAAATACCTTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTG
 GGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAACCTTCTCCGAGGATA
 CGAACATATCAGGTATCAACCCATAACGTTATCAATGCAGAAAATGCACCAGGAGGACCTTAC
 AAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCTAACATTACCAATGGAAACGGATTTTTCGCAACAATGG
 CTTGGGCGCTCCCAAAAAACGACAAAAACAAAACAGCAACAAATCCATTAAACAATAGAAGTACC
 ATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAATTAACGTTTGGGGGTCCACTCTGACAACGAGACC
 CAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCAGAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGA
 CCACACATTACGTTTACAGATTGGTGGCTTCCCAAATCAAACAGAAAGACGGAGGACTACCACA
 AAGTGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAATCTGGGAAAACAGGAACAATTACCTAT
 CAAAGGGGTATTTTATGCTTCAAAGGTGTGGTGCGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAG
 GATCCTTGCCTTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAG
 CAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACA
 CCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTG
 CAGGTTGGCAGGATACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAG
 CACTCAAGAGGCCATAAACAAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAG
 AATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTAGAACTAGATGAGA
 AAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAACTCGCAGTCTGCTTTCCAA
 TGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAACATCTCTTGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAATG
 CTGGGCCCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAACACAAGTGCAACCAGA
 CCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACCTTTGA
 TTCCTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTT
 TACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGGCTGTAACACTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATA
 TGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGTCTCATCTGTCTATAAAGGCCATATTTTCTTTAGTTTGAA
 TTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTT
 ATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACAC
 AAAAGATTTTAAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTAT
 CGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTC
 TTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATG

CATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCG
 ATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTAC
 TAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGGGGTACCGAGCTCGAATTCCGAGTGTACTTCAAGT
 CAGTTGGAAATCAATAAAATGATTATTTTATGAATATATTTTATTGTGCAAGTAGATAGAAATT
 ACATATGTTACATAACACACGAAATAAACAAAAAACACAATCCAAAACAAACACCCCAACAA
 AATAACACTATATATATCCTCGTATGAGGAGAGGCACGTTTCAAGTACTCGACGATTCCCGAGCA
 AAAAAAGTCTCCCGTCACACATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTCAAAGTAATCCTTCTGTT
 GACTTGTGATTGATAACATCCAGTCTTCGTCAGGATTGCAAAGAATTATAGAAGGGATCCCACC
 TTTTATTTTCTTCTTTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAAT
 TGCTTCCACAATGGGACGAACCTGAAGGGGATGTCGTCGATGATATTATAGGTGGCGTGTTCAT
 CGTAGTTGGTGAAGTCGATGGTCCCGTTCCAGTAGTTGTGTCGCCCCGAGACTTCTAGCCAGGT
 GGTCTTTCCGGTACGAGTTGGTCCGCAGATGTAGAGGCTGGGGTGTCTGACCCAGTCTTCCC
 TCATCCTGGTTAGATCGGCCATCCACTCAAGGTCAGATTGTGCTTGATCGTAGGAGACAGGATG
 TATGAAAGTGTAGGCATCGATGCTTACATGATATAGGTGCGTCTCTCTCCAGTTGTGCAGATCT
 TCGTGGCAGCGGAGATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACGTACTGCTCAGGTTGTGGAGGAAATA
 ATTTGTTGGCTGAATATTCCAGCCATTGAAGCTTTGTTGCCCATTCATGAGGGAATTCTTCTTT
 GATCATGTCAAGATACTCCTCCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCGCCATCGTGCCTCA
 GATTTGCGAGGAGAGACCTTATGATCTCGGAAATCTCCTCTGGTTTTAATATCTCCGTCCTTG
 ATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGTGATTTCTTCAA
 ATCGAAAAAGAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTATCAAGCTGGATAAGAGCATGATAGTGG
 GTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTT
 TCTCCCAGAGAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGGTAGGTAAGGAAAAC
 ATATTTAGATTGGAGTCTGAAGTTCTTGCTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTT
 GCCTCAAACCTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAAGGGCATTTTGGTAATTTAAG
 TAGTTAGTGGAAAATGACGTCATTTACTTAAAGACGAAGTCTTGCGACAAGGGGGGGCCACGCC
 GAATTTTAAATATTACCGGCGTGGCCCCACCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGAT
 TTAAAGTAGAAAAGTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTTCACTATAAAAGCATATACGAT
 GTGATGGTATTTGATGGAGCGTATATTGTATCAGGTATTTCCGTCGGATACGAATTATTCGTAC

Figura 5D

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 41)

MAKNVAIFGLLFSLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSH
 FANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLVALGRPKCTGKIP SARVSI LHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKI
 RQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKT
 ATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFP
 NQTEDGGLPQSGRIVVDYMQVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGSPLPLIGEADCL
 HEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTP LKLANGTKYRPPGGWEGMIAGWHGYTSHGAH
 GVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTISS
 QIELAVLLSNEGIIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTC LDRIAAGTFD
 AGEFSLPTFDSL NITAASLND DGLDNHTILLYYSTAASSLAVTLMIAIFVVMVSRDNVSCSIC
 L

Figura 5E secuencia de nucleótidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado (SEQ ID NO: 43)

```

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGA
TCTTCGCCGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCGTCAAACTCACCACATGTCGTCAAACTGC
TACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGTAAATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTCAT
TTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACCAGGGGGAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAG
ATCTGGACGTAGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGGAAAATACCCTCGGCAAGAGTTTCAAT
ACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTGGGTGCTTTTCTATAATGCACGACAGAACAATAATT
AGACAGCTGCCTAACCTTCTCCGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACCCATAACGTTATCA
ATGCAGAAAATGCACCAGGAGGACCCTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACATTAC
CAATGGAAACGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCCGTCCCAAAAACGACAAAAACAAAACA
GCAACAAATCCATTAACAATAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAATTACCG
TTTGGGGGTTCCACTCTGACAACGAGACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCA
GAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTGGTGGCTTCCCA
AATCAAACAGAAGACGGGAGGACTACCACAAAGTGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAA
AATCTGGGAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAAAGGTGTGGTG
CGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCCTTGCCCTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTC
CACGAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCA
TAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACC
TCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCCCATGGGGCACAT
GGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAACAAGATAACAAAAAATC
TCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACT
CCACAACGAAATACTAGAACTAGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCA
CAAAATAGAACTCGCAGTCCTGCTTTCCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAACATCTCT
TGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATG
CTTTGAAACCAAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGAT
GCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACCTTTGATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACG
ATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGGCTGTAAC
ACTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCCATCTGT
CTATAA

```

Figura 6: B-2X35S/CPMV-HT/HA B Wisconsin/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa (Construcción número 1462)

Figura 6A, SEQ ID NO: 49
IF-HAB110.S1+3c

AAATTTGTCGGGCCCATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAG

Figura 6B, SEQ ID NO: 50
IF-HAB110.s1-4r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTATAGACAGATGGAGCATGAAACGTTGTCTCTG

Figura 6C, SEQ ID NO: 51
HA B Wisconsin sintetizada (número de acceso al Genbank JN993010)

ATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGA
TAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGG
CGTGATACCACTGACAACAACACCAACAAAATCTTATTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACC
AGAGGGAAACTATGCCCCGACTGTCTCAACTGTACAGATCTGGATGTGGCCTTGGGCAGGCCAA
TGTGTGTGGGGACCACACCTTCTGCTAAAGCTTCAATACTCCACGAGGTCAGACCTGTTACATC
CGGGTGCTTTCTTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAGGCAACTACCCAATCTTCTCAGAGGA
TATGAAAATATCAGGTTATCAACCCAAAACGTTATCGATGCAGAAAAAGCACCAGGAGGACCTT
ACAGACTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAAATCGGATTTTTTGCAACAAT
GGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACACTACAAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCA
TACATTTGTACAGAAGGGGAAGACCAAAATTACTGTTTGGGGGTTCATTTCAGATAACAAAACCC
AAATGAAGAGCCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAAGTTACCTCATCTGCTAATGGAGTAAC
CACACATTATGTTTCTCAGATTGGCGACTTCCAGATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAA
AGCGGCAGAAATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTATC
AAAGAGGTGTTTTGTTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCGGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAAGG
GTCATTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGC
AAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCAATATGGGTAAAAACAC
CTTTGAAGCTTGCCAATGGAACCAATATAGACCTCCTGCAAACTATTGAAGGAAAGGGGTTT
CTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTAGAAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGA
TACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGGCAGACCTTAAGAGTACACAAGAAGCTA
TAAATAAGATAACAAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAACCTTCAAAGACT
AAGTGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTC
AGAGCTGACACTATAAGCTCACAAATAGAAGTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAA
ACAGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAACCTAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGC
TGTAACATAGGAAACGGATGCTTCGAAACCAACACAAATGCAACCAGACCTGCTTAGACAGG
ATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACTTTTGATTTCATTGAACATTA
CTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGC
TGCTTCTAGTTTGGCTGTAACATTAATGCTAGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGAC
AACGTTTCATGCTCCATCTGTCTATAA

Figura 6D

Representación esquemática de la construcción 193. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

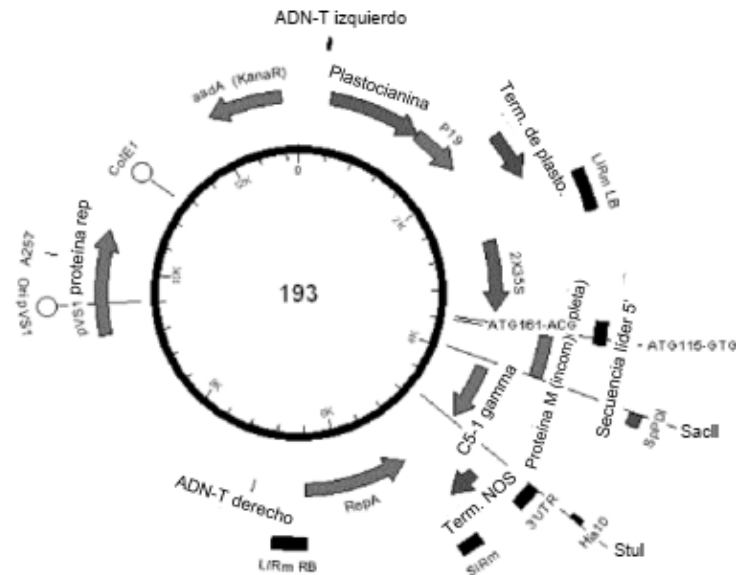


Figura 6E, SEQ ID NO: 52

Construcción 193 desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT/NOS en el sistema de amplificación de BeYDV(m)+Replicasa con casete de expresión de inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAACAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACG
TTTTTAATGTACTGAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTC
AAAAACCATAAAAGTTTAAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTA
CTACTGTTATAAATCATTATTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAAGAGTAG
TGATATTTTGACAACAATTTTGTGCAACATTTGAGAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTG
GTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGA
GAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGC
TACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATT
GAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAGAAAGAAAGAAATAAATTATTTTTAAAAATTAAAGTTGAGTCA
TTTGATTAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAA
TTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCATATATTGCCCCATAGAGTG
AGTTAACTCATTTTTATATTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAA
AAAAAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTA
GGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCAC
GCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAA
ACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATT

CCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGA
 ACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAACAAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCA
 GGAGGTACCACTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAGTCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGCTAC
 ATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCCTTGGTTTCAAGGAAAGCTGGGGTTTCGG
 GAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCACTGCACAGAGTCCTT
 GGATCTTGGACGGGAGATTTCGGTTAACTATGCAGCATCTCGATTTTTTCGGTTTTCGACCAGATCG
 GATGTACCTATAGTATTCGGTTTTCGAGGAGTTAGTATCACCCTTCTGGAGGGTCGCGAACTCT
 TCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAAGTGTACAGCTTGCCCCAATCGAA
 GTGGAAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTAAGTCAAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGT
 AAGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTAAATTTTGTCTTGT
 AGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAAATG
 TAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCCTCCATAACTAACTAGACATGAAG
 ACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACATAAAATTGAACATCTTTTGCCACAACCTTT
 ATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGT
 TATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAATACTAATTTTATATCATCCCCCTTTGA
 TAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCCTAGGAGATTGTCGTTTCCCGCCTTC
 AGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGGAAT
 TACTAGCGCGTGTGAGACGCGTTGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTTA
 TAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAGGGGTATTTTGGTCATTTTAATAGATAGTGGAAAAATGAC
 GTGGAATTTACTTAAAGACGAAGTCTTTGCGACAAGGGGGGGCCACGCCGAATTTAATATTAC
 CGGCGTGGCCCCCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAATT
 TCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTACACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGGT
 CGACAAGCTTGCATGCCGGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCA
 AAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAA
 CCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGT
 GGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACA
 GTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCAC
 GTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAA
 AATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATAT
 CCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAA
 GGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCT
 GCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTT
 CAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACA
 ATCCCCTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGTAT
 TAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAA
 CTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACG
 TTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTC
 TTTGTGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTATTCTTGTGTTGGTTCCTT
 CTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGAGGCTGCTGTTTCAAGGCTATCTGTTTGTGTTGGTTCCTT
 CTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTT
 TCTTCTTCTTCTTGTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTCC
 CGTGGTTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGCGGC
 CCGCGGATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTT
 CTCAGATCTTCGCTGCAGGCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCC
 CTGGATCTGCTGCCCAAACCTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCC
 TGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCT
 GTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCA

GCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAAATTGT
 GCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCCATATGTACAGTCCCAGAAAGTATCATCTGTCTTCATC
 TTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTGTGG
 TAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCA
 CACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCT
 CCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGCGATCGCTCACCATCACCATCACCATCA
 CCATCACCATTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTAT
 GTTTGGTGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAG
 CTCCTGTTTAGCAGGTGCTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAA
 AAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGC
 AATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTT
 GAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTT
 ATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACT
 AGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGC
 GCCATAAAATGATTATTTTATGAATATATTTCAATTGTGCAAGTAGATAGAAATTACATATGTTA
 CATAACACACGAAATAAACAAAAAAGACAATCCAAAAACAAACACCCCCAAAAAATAATCAC
 TTTAGATAAACTCGTATGAGGAGAGGCACGTTCACTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAGT
 CTCCCCGTCACACATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTTAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTC
 ATTGATAACATCCAGTCTTCGTCAGGATTGCAAAGAATTATAGAAGGGATCCCACCTTTATTT
 TCTTCTTTTTTCCATATTTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTGGCAACCTATTAATTGCTTCCA
 CAATGGGACGAACTTGAAGGGGATGTCTGTCGATGATATTATAGGTGGCGTGTTTCATCGTAGTTG
 GTGAAATCGATGGTACCGTTCCAATAGTTGTGTCGTCGAGACTTCTAGCCCAGGTGGTCTTTC
 CGGTACGAGTTGGTCCGCAGATGTAGAGGCTGGGGTGTGCGATTCCATTCTTCCATTGTCTTG
 GTTAAATCGGCCATCCATTCAAGGTCAGATTGAGCTTGTTGGTATGAGACAGGATGTATGTAAG
 TATAAGCGTCTATGCTTACATGGTATAGATGGGTTTCCCTCCAGGAGTGTAGATCTTCGTGGCA
 GCGAAGATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACATACGGTTCAAGTTGTGGAGGGAATAATTTGTTG
 GCTGAATATTCCAGCCATTGAAGTTTTGTTGCCATTTCATGAGGGAATTCCTTCTTGATCATGT
 CAAGATATTCTCCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCTCCATCGTGCCTCAGATTTGCG
 AGGAGAGACCTTATGATCTCGGAAATCTCCTCTGGTTTTAATATCTCCGTCTTTGATATGTAA
 TCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGATATTAGGGTGATTTCCCTTCAAAATCGAAAA
 AAGAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTATCAAGCTGGAGAAGAGCATGATAGTGGGTAGTGCC
 ATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACACCAAGGAAGAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTCCAG
 AGAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGATAGGTAAGGAAAACATATTTAG
 ATTGGAGTCTGAAGTTCTTACTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAA
 CTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAGGGGATTTTGGTCATTTTAATAGATAGT
 GGAAAATGACGTGGAATTTACTTAAAGACGAAGTCTTTGCGACAAGGGGGGGGCCACGCCGAAT
 TTAATATTACCGGCGTGCCCCCCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAA
 GTAGAAAATTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTTCACTATAAAAGCATATACGATGTGAT
 GGTATTTGACTAGTGGCACTGGCCGTGCTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTA
 CCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCG
 CACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTG
 GATCAGATTGTGCTTTCCCGCCTTCAGTTTAAACTATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGG
TAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 6F, SEQ ID NO: 53

Casete de expresión número 1462 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 está subrayada.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAG
 ACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTG
 CCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCAT
 CATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGAC
 CCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGGA
 TTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTC
 TCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGAT
 TCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAA
 ATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAA
 GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGC
 AAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA
 AGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTT
 TGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTT
 AAAGCAAACCTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCG
 GCACCAGTACAACGTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGC
 GGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTCTTGTCTGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTT
 GCTGGAGGCTGCTGTTACGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGC
 AATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGTGCTGA
 TTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTCCCCTGGTGGTTCGAACCTGG
 AGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCTGGGCCCATGAAGGCAATAATTG
 TACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACCTGGGATAACATCTTCAAACCTC
 ACCTCATGTGGTCAAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGCGTGATACCACTGACA
 ACAACACCAACAAAATCTTATTTTGCAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGAAACATATGCC
 CGGACTGTCTCAACTGTACAGATCTGGATGTGGCCTTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGGACCAC
 ACCTTCTGTCTAAAGCTTCAATACTCCACGAGGTGACACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCCTATA
 ATGCACGACAGAACAAAATCAGGCAACTACCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGT
 TATCAACCCAAAACGTTATCGATGCAGAAAAAGCACCAGGAGGACCCTACAGACTTGGAACCTC
 AGGATCTTGCCCTAACGCTACCAAGTAAATCGGATTTTTTGAACAATGGCTTGGGCTGTCCCA
 AAGGACAACACAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATAACATTTGTACAGAAG
 GGGAAGACCAAATTACTGTTTGGGGGTTCCATTGAGATAACAAAACCCAAATGAAGAGCCTCTA
 TGGAGACTCAAATCCTCAAAAAGTTCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACCACACATTATGTTTCT
 CAGATTGGCGACTTCCCAGATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGAAATTGTTG
 TTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTATCAAAGAGGTGTTTTGTT
 GCCTCAAAAGGTGTGGTGCAGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCATTGCCTTTAATT
 GGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAG
 GAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTAAAAACACCTTTGAAGCTTGCCAA
 TGGAACCAAATATAGACCTCCTGCAAACTATTGAAGGAAAGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCT
 GGTTTCTAGAAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCTCACGGAG
 CACATGGAGTGGCAGTGGCGGCAGACCTTAAGAGTACACAAGAAGCTATAAATAAGATAACAAA
 AAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAACCTTCAAAGACTAAGTGGTGGCATGGAT
 GAACTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAA
 GCTCACAAATAGAAGTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAACAGTGAAGACGAGCA
 TCTATTGGCACTTGAGAGAAAATAAGAAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGACATAGGAAAC

GGATGCTTCGAAACCAAACACAAATGCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCT
TTAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACTTTTGATTCATTGAACATTACTGCTGCATCTTTAAA
TGATGATGGATTGGATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTTCTAGTTTGGCT
GTAACATTAATGCTAGCTATTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCA
TCTGTCTATAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGT
TTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCT
CCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAATAAAAAA
AAAAAAGACCGGAATTTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAA
TAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGA
ATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTAT
GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAG
GATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 6G, SEQ ID NO: 54

Secuencia de aminoácidos de HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGVPLTTTPTKSYFANLKGTRT
RGKLCPCDCLNCTDLVALGRPMC VGTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHDKIRQLPNLLRG
YENIRLSTQNVIDAEKAPGGPYRLGTSGSCP NATSKIGFFATMAWAVPKDNYKNATNPLTVEVP
YICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMSLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYVSQIGDFPDQTEDGGLPQ
SGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIKSLPLIGEADCLHEKYGGLNKS
KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHG
YTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
RADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKNQTCCLR
IAAGTFNAGEFSLPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTILLYSTAASSLAVTLM LAIFIVYMVSRD
NVSCSICL*

Figura 6H
Representación esquemática de la construcción número 1462

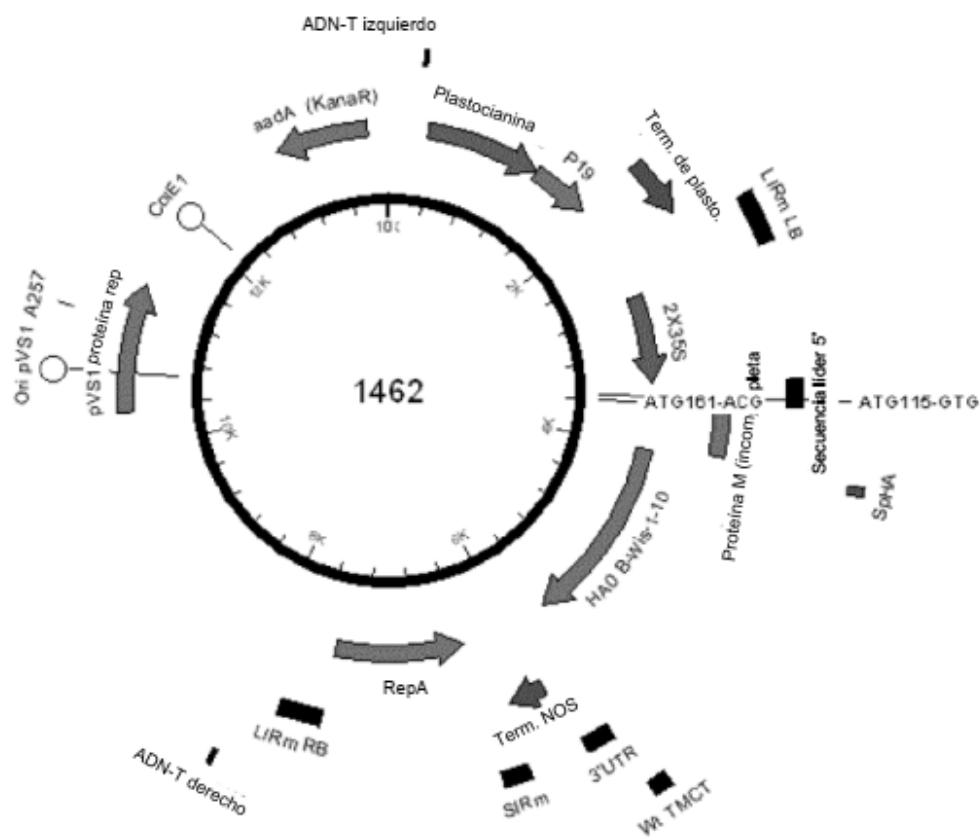


Figura 7: C-2X35S/CPMV-HT/HA B Wisconsin con bucle proteolítico eliminado/NOS en sistema de amplificación de BeYDV(m)+replicasa (Construcción número 1467)

Figura 7A, SEQ ID NO: 55
HAB110(PrL-).r

TCCTTCCCATCCTCCACCAGGAGGTCTATATTTGGTTCCATTGGCAAGCTTCAAAG

Figura 7B, SEQ ID NO: 56
HAB110(PrL-).c

ATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGA

Figura 7C, SEQ ID NO: 57

Casete de expresión número 1467 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. La HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado está subrayada.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAG
ACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTG
CCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCAT
CATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC
CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGA
TTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTC
TCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGAT
TCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAA
ATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAA
GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGC
AAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA
AGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTT
TGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTT
AAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCG
GCACCAAGTACAACGTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTGTGGACACGTAGTGC
GGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTCTTGTCTGCTGGTGTGGTCTTGGGAAAAAGAAAGCTT
GCTGGAGGCTGCTGTTTCAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGC
AATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTGCTGA
TTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCTGTTGTTTTCGAACCTTG
AGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCCATGAAGGCAATAATTG
TACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCTTCAAACCTC
ACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGCGTGATACCACTGACA
ACAACACCAACAAAATCTTATTTTGCAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGGAACTATGCC
CGGACTGTCTCAACTGTACAGATCTGGATGTGGCCTTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGGACCAC
ACCTTCTGCTAAAGCTTCAATACTCCACGAGGTGACACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCTCTATA
ATGCACGACAGAACAAAAATCAGGCAACTACCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAAATATCAGGT
TATCAACCCAAAACGTTATCGATGCAGAAAAAGCACCAGGAGGACCTACAGACTTGGAACCTC
AGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAATCGGATTTTGTGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCA
AAGGACAACCTACAAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAG
GGGAAGACCAAAATTACTGTTTGGGGGTTCATTAGATAACAAAACCCAAATGAAGAGCCTCTA

TGGAGACTCAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACCACACATTATGTTTCT
 CAGATTGGCGACTTCCCAGATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGAATTGTTG
 TTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTATCAAAGAGGTGTTTGT
 GCCTCAAAAGGTGTGGTGCGGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCATTGCCTTTAATT
 GGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAG
 GAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTAAAAACACCTTTGAAGCTTGCCAA
 TGGAACCAAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATAC
 ACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGGCAGACCTTAAGAGTACACAAGAAGCTATAA
 ATAAGATAACAAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAACCTTCAAAGACTAAG
 TGGTGGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGA
 GCTGACACTATAAGCTCACAAATAGAATTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAACA
 GTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAACTAAAGAAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGT
 AGACATAGGAAACGGATGCTTCGAAACCAAACACAAATGCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATA
 GCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACTTTTGATTTCATTGAACATTACTG
 CTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGC
 TTCTAGTTTGGCTGTAACATTAATGCTAGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAAC
 GTTTCATGCTCCATCTGTCTATAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTG
 TGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAAT
 TTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTT
 ATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTC
 AAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATA
 TAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGA
 GATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATA
 GCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 7D, SEQ ID NO: 58

Secuencia de aminoácidos de HA de la gripe B/Wisconsin/1/2010 con bucle proteolítico eliminado

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSYFANLKGTRT
 RGKLCPLDCLNCTDLVALGRPMC VGTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHRTKIRQLPNLLRG
 YENIRLSTQNVIDAEKAPGGPYRLGTSGSCP NATSKIGFFATMAWAVPKDNYKNATNPLTVEVP
 YICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMSLYGDSNPQKFTSSANGVTTHYVSQIGDFPDQTEDGGLPQ
 SGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGGLNKS
 KPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKS
 TQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTISSQIELAVLLSN
 EGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFD
 SLNITAASLNDGLDNHTILLYYSTAASSLAVTLM LAIFIVYMVSRD NVSCSICL*

Figura 7E
Representación esquemática de la construcción número 1467

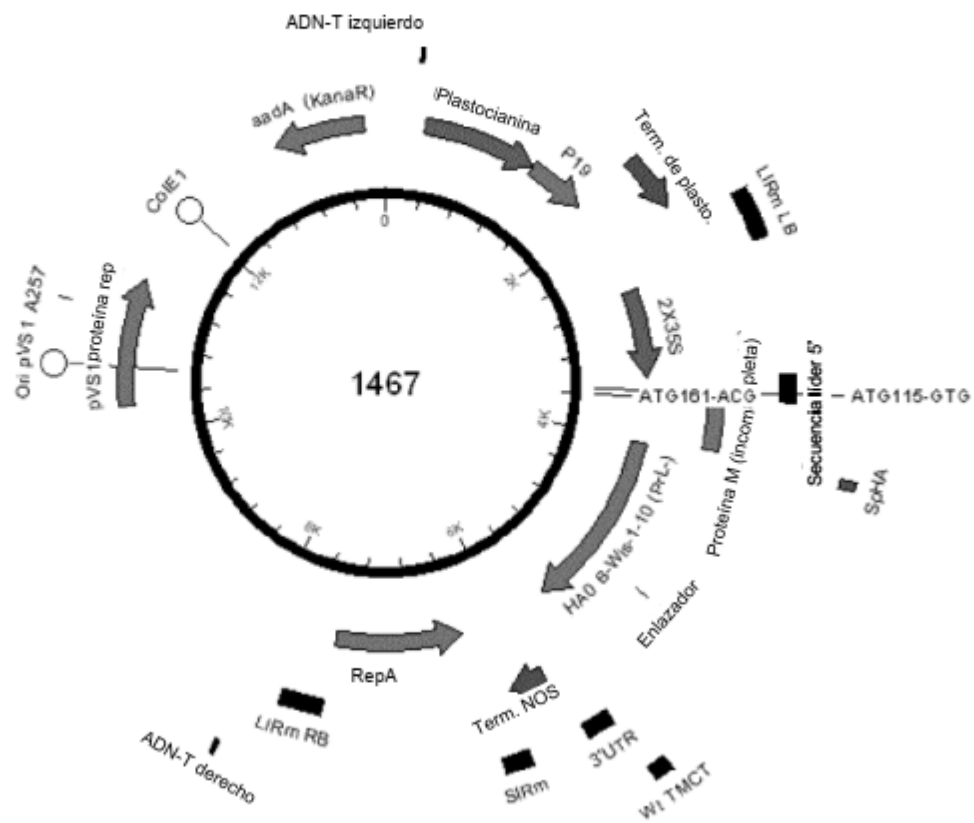


Figura 8: A-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane con bucle proteolítico eliminado/NOS (Construcción número 1039)

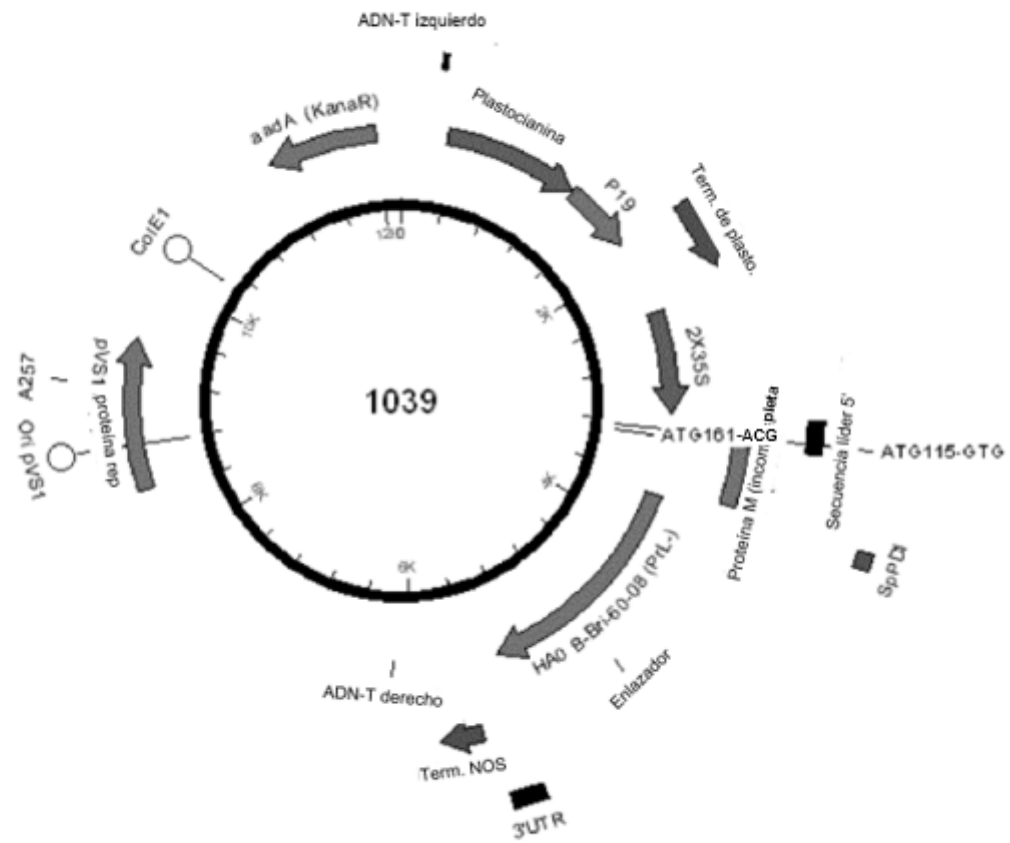
Figura 8A (SEQ ID NO: 15)

Casete de expresión número 1039 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 con bucle proteolítico eliminado está subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAG
 ACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTG
 CCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCAT
 CATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGAC
 CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGA
 TTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTC
 TCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGAT
 TCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCCTACAA
 ATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAA
 GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGC
 AAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCA
 AGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGTTT
 TGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTT
 AAAGCAAACCTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCG
 GCACAGTACAACGTTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGC
 GGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAGAAAGCTT
 GCTGGAGGCTGCTGTTTACGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGC
 AATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTCTGTA
 TTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTGAACCTTG
 AGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGCGGGCCATGGCGAAAAACGTTG
 CGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTTCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGAAT
 CTGCACTGGAATAACATCGTCAAACTCACCACATGTGCTCAAACTGCTACTCAAGGGGAGGTC
 AATGTGACTGGTGTAAATACCACTGACAACAACACCCACCAATCTCATTTTGCAATCTCAAAG
 GAACAGAAACCAGGGGAAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTAGCCTT
 GGGCAGACCAAAATGCACGGGGAAATACCCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGA
 CCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAATAATAGACAGCTGCCTAACC
 TTCTCCGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACCCATAACGTTATCAATGCAGAAAATGCACC
 AGGAGGACCCTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACATTACCAATGGAAACGGATTT
 TTCGCAACAATGGCTTGGGCGTCCCAAAAAACGACAAAAACAAAACAGCAACAATCCATTAA
 CAATAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAATTACCGTTTGGGGGTTCCACTC
 TGACAACGAGACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCAGAAGTTCACCTCATCT
 GCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTACAGATTGGTGGCTTCCCAATCAAACAGAAGACG
 GAGGACTACCACAAAGTGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAATCTGGGAAACAGG
 AACAATTACCTATCAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAAAGGTGTGGTGCAGCAAGTGGCAGGAGC
 AAGGTAATAAAAGGATCCTTGCCTTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTG
 GATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAAT
 ATGGGTGAAAACACCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGG
 GAAGGAATGATTGCAGGTTGGCAGGATACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAG
 CAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAACAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGA

GCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTA
GAACTAGATGAGAAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAACTCGCAG
TCCTGCTTTCCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAACATCTCTTGGCGCTTGAAAGAAA
GCTGAAGAAAATGCTGGGCCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAAACAC
AAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTTTCTC
TCCCCACCTTTGATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCA
TACTATACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGGCTGTAACACTGATGATAGCTATC
TTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCTATAAAGGCCTATTT
TCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGC
TCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCT
TCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCG
ATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAAT
CCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAA
TTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATA
CATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTG
TCATCTATGTTACTAGAT

Figura 8B,
Representación esquemática de la construcción número 1039



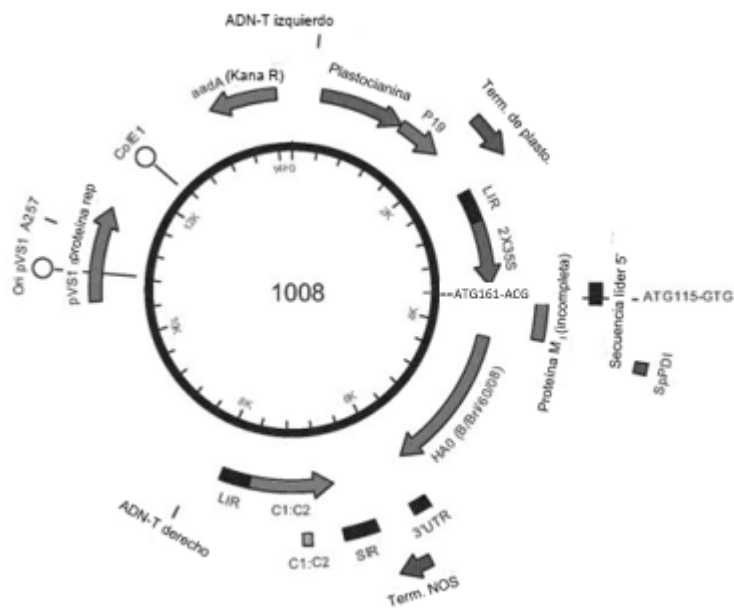


Figura 9

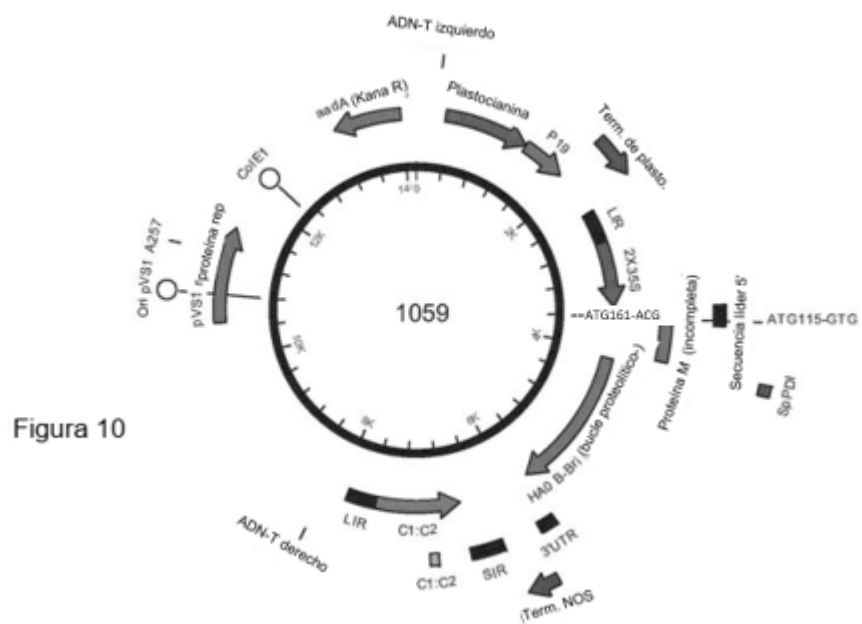


Figura 10

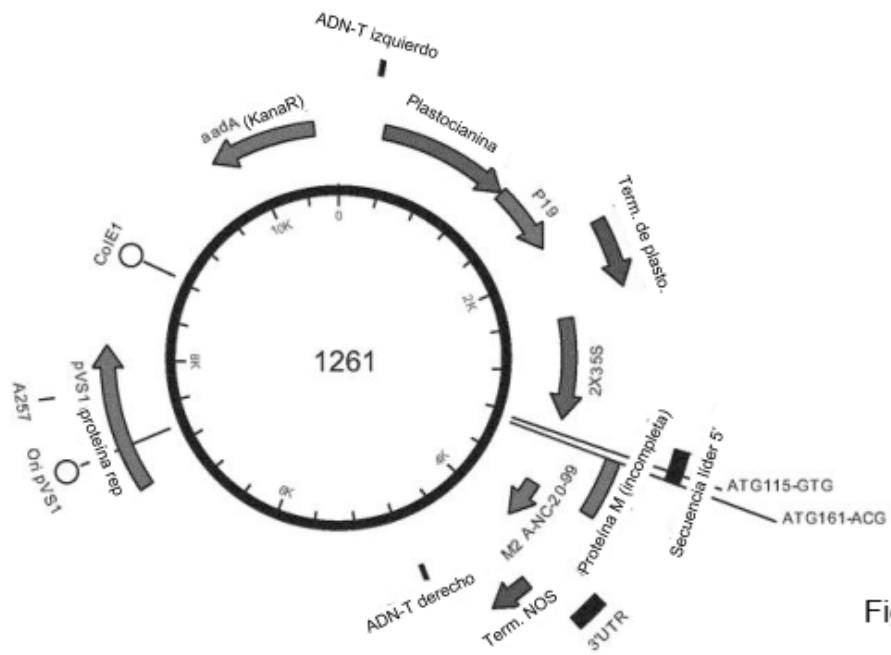


Figura 11

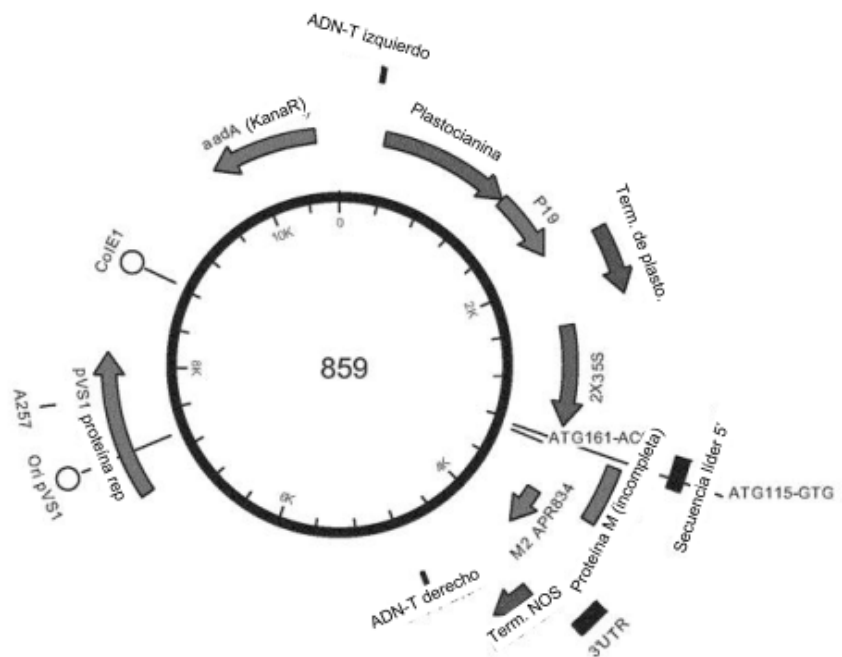


Figura 12

Figura 13A

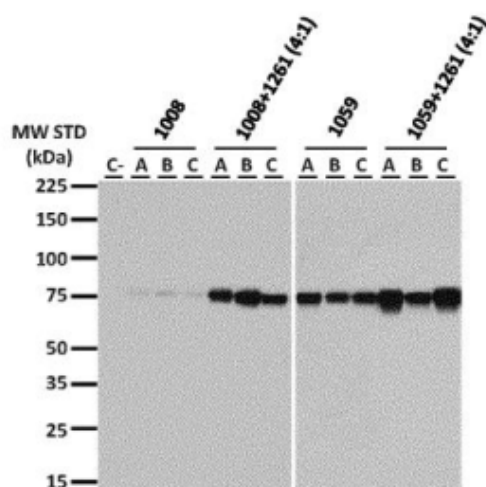


Figura 13B

Construcción número	Capacidad de hemaglutinación (unidades de HA/mg de proteína) ^a
1008	533
1008 + 1261 (4:1)	3200
1059	4267
1059 + 1261 (4:1)	34133

^a Inverso de la menor cantidad de proteína total requerida para una reacción de hemaglutinación positiva en un volumen final de 200 µl.

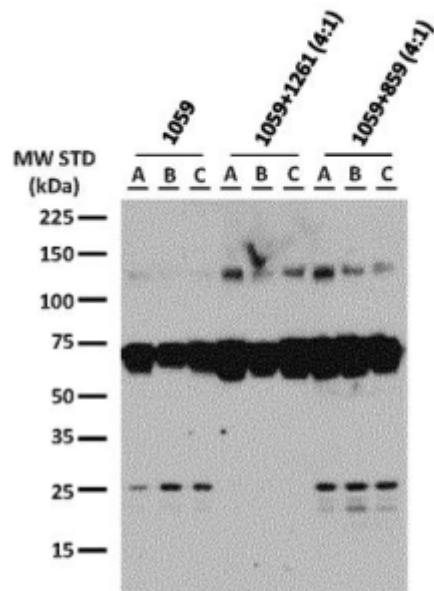


Figura 14

Péptido de fusión

↓

	370	380	390	400
H1 New Cal	- - - - -	- - - - - I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y		
H1 Brisbane	- - - - -	- - - - - I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y		
H1 Sol Islands	- - - - -	- - - - - I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y		
H2A_Singapore	- - - - -	- - - - - V P Q I E S R G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y		
H3A_Bussane	- - - - -	- - - - - V P E K Q T R G I F G A I A G F I E N G W E G M V D G W Y		
H3A_WCN	- - - - -	- - - - - V P E K Q T R G I F G A I A G F I E N G W E G M V D G W Y		
H5 Anhui	- - - - -	- - - - - S P L R E R R R K - R G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y		
H5 Indo	- - - - -	- - - - - S P Q R E S R R K K R G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y		
H5 Vietnam	- - - - -	- - - - - S P Q R E R R R K K R G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y		
H6 Teal_HK	- - - - -	- - - - - V P Q I E T R G L F G A I A G F I E G G W T G M I D G W Y		
H7 Eg_Prague	- V P E A P A H K Q L T H M R K K R G L F G A I A G F I E N G W E G L I D G W Y			
H9A_HK	- - - - -	- - - - - V P A R S S R G L F G A I A G F I E G G W P G L V A G W Y		
B_Florida	L K L A N G T K Y R P P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G G W E G M I A G W H			
B_Malaysia	L K L A N G T K Y R P P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G G W E G M I A G W H			

Figura 15

Figura 16A

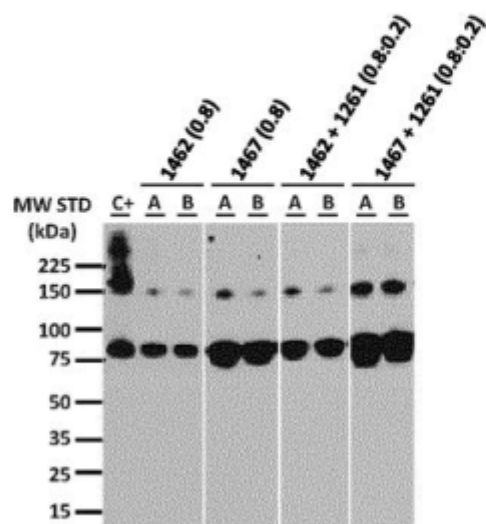


Figura 16B

Construcción número	Capacidad de hemaglutinación (título de HA) ^a
146(0,8)	136 ± 48
146'(0,8)	2660 ± 384
1462 + 126(0,8:0,2)	941 ± 192
1467 + 126(0,8:0,2)	4344 ± 1536

Inverso de la dilución más alta capaz de aglutinar glóbulos rojos.

Figura 17A

Construcción número	Elementos reguladores	BeYDV	Bucle proteolítico	Coexpresión de M2	Capacidad de hemaglutinación (unidad de HA/ml)
1008	CPMV-HT	Si	Presente	No	1216
1008 + 1261	CPMV-HT	Si	Presente	Si	5696
1039	CPMV-HT	No	Eliminado	No	141
1039 + 1261	CPMV-HT	No	Eliminado	Si	2944
1059	CPMV-HT	Si	Eliminado	No	10197
1059 + 1261	CPMV-HT	Si	Eliminado	Si	43008

Figura 17B

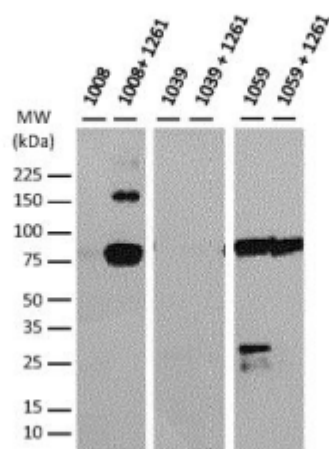


Figura 18A



Figura 18B

	370	380	390	400
H1 New Cal	- - - - -	I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y		
H1 Brisbane	- - - - -	I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y		
H1 Sol Islands	- - - - -	I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y		
H2A_Singapore	- - - - -	V P Q I E S R G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y		
H3A_Brisbane	- - - - -	V P E K Q T R G I F G A I A G F I E N G W E G M V D G W Y		
H3A_WCN	- - - - -	V P E K Q T R G I F G A I A G F I E N G W E G M V D G W Y		
H5 Anhui	- - - - -	S P L R E R R R K - R G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y		
H5 Indo	- - - - -	S P Q R E S R R K K R G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y		
H5 Vietnam	- - - - -	S P Q R E R R R K K R G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y		
H6 Teal_HK	- - - - -	V P Q I E T R G L F G A I A G F I E G G W T G M I D G W Y		
H7 Eo_Prague	- - - - -	V P E A P A H K Q L T H M R K K R G L F G A I A G F I E N G W E G L I D G W Y		
H9 A_HK	- - - - -	V P A R S S R G L F G A I A G F I E G G W P G L V A G W Y		
B_Florida	L K L A N G T K Y R P P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G G W E G M I A G W H			
B_Malaysia	L K L A N G T K Y R P P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G G W E G M I A G W H			

Figura 18C

	370	380	390	400
H1 New Cal	- - - - -	I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y G Y		
H1 Brisbane	- - - - -	I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y G Y		
H1 Sol Islands	- - - - -	I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y G Y		
H2A_Singapore	- - - - -	V P Q I E S R G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y G Y		
H3A_Brisbane	- - - - -	V P E K Q T R G I F G A I A G F I E N G W E G M V D G W Y G F		
H3A_WCN	- - - - -	V P E K Q T R G I F G A I A G F I E N G W E G M V D G W Y G F		
H5 Anhui	- - - - -	S P L	G G W Q G M V D G W Y G Y	
H5 Indo	- - - - -	S P Q	G G W Q G M V D G W Y G Y	
H5 Vietnam	- - - - -	S P Q	G G W Q G M V D G W Y G Y	
H6 Teal_HK	- - - - -	V P Q I E T R G L F G A I A G F I E G G W T G M I D G W Y G Y		
H7 Eo_Prague	- - - - -	V P E A P A H K Q L T H M R K K R G L F G A I A G F I E N G W E G L I D G W Y G Y		
H9 A_HK	- - - - -	V P A R S S R G L F G A I A G F I E G G W P G L V A G W Y G F		
B_Florida	L K L A N G T K Y R P P		G G W E G M I A G W H G Y	
B_Malaysia	L K L A N G T K Y R P P		G G W E G M I A G W H G Y	



Cepa	Secuencia natural	Abolición del sitio de escisión del precursor
H5/Indo	TGLRNSPQ <u>RESRRKKR</u> ↓GLF	TGLRNSPQ <u>TETR</u> ↓GLF TGLRNSPQ <u>TETQ</u> GLF

Figura 20

Títulos de H5 encontrados en biomasa inicial después de la extracción de enzimas para diferentes mutantes

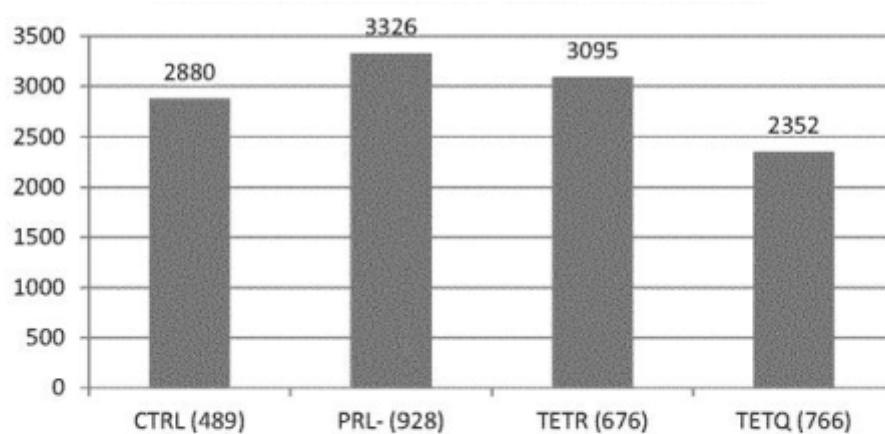


Figura 21: Deleciones/enfoques de reemplazo para HA tipo B

Figura 21 A

Secuencia primaria de B/Brisbane/60/2008 nativa (SEQ ID NO: 16)

DRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTTETRGKLCPCCLNCTDLD
VALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPI MHDR TKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAE
NAPGGPYKIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWG
FHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSG
KTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIG EADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGN
CPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGF FGA IAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAAD
LKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTISSQIELAVL
LSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTC LDRIAAGTFDAGEFSLP
TFDSL NITAASLND DGLDNHTILLYSTAASSLAVTLMIAIFVVMVSRDNVSCSICL

Figura 21 B

Δ bucle proteolítico de HA tipo B (SEQ ID NO: 17)

DRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTTETRGKLCPCCLNCTDLD
VALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPI MHDR TKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAE
NAPGGPYKIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWG
FHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSG
KTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIG EADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGN
CPIWVKTPKLKLANGTKYRPP-GG-
GWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNE
ILELDEKVDDL RADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFET
KHKNQTC LDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSL NITAASLND DGLDNHTILLYSTAASSLAVTLMIA
IFVVMVSRDNVSCSICL

Figura 21 C

Reemplazo del sitio de escisión de HA tipo B por un enlazador (SEQ ID NO: 18)

DRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLD
VALGRPKCTGKI PSARVSILHEVRPVTSGCFPI MHDR TKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAE
NAPGGPYKIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWG
FHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFPNQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSG
KTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGN
CPIWVKTPLKLANGTKYR -GSSSGSSSG-
GFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQ
RLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTISSQIELAVLLSNEGI INSEDEHLLALERK LKKMLGP
SAVEIGNGC FETKH KCNQTC LDR IAAGTFDAGEFSLPTFDSL NITAASLND DGLDNHTILLYS
TAASSLAVTLMIAIFVVMVSRDNVSCSICL

Figura 21 D

Deleciones/enfoques de reemplazo para H3

Secuencia primaria de H3 A/Perth/16/2009 nativa (SEQ ID NO: 19)

QKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGEICDSPHQILDGKNC
TLIDALLGDPQCDGFQNKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNE SFNWT
GVTQNGTSSACIRRSKNSFFSRLNWLTHLNEKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQI
FLYAQASGRITVSTKRSQQT VSPNIGSRPRVRNIPSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRG
YFKIRSGKSSIMRSDAFIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGM
RNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRL
IGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLF
EKTKKQLRENAEDMNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYK
DWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

Figura 21 E

Δ bucle proteolítico H3 (en BeYDV, 1096) (SEQ ID NO: 20)

QKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTIITNDQIEVTNATELVQSSSTGEICDSPHQILDGKNC
 TLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFNWT
 GVTQNGTSSACIRRSKNSFFSRLNWLTHLNFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQI
 FLYAQASGRITVSTKRSQQTVSPNIGSRPRVRNIPSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRG
 YFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGM
 -GS-
GAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIE
KEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFKTKKQLRENAE
DMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISC
FLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

Figura 21 F

Reemplazo del sitio de escisión de H3 por un enlazador (en BeYDV, 1097) (SEQ ID NO: 21)

QKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTIITNDQIEVTNATELVQSSSTGEICDSPHQILDGKNC
 TLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFNWT
 GVTQNGTSSACIRRSKNSFFSRLNWLTHLNFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQI
 FLYAQASGRITVSTKRSQQTVSPNIGSRPRVRNIPSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRG
 YFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGM
 -GSSGSSGSS-
GIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFH
QIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFKTKKQLRE
NAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFA
ISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

Figura 22

Línea #	No de muestra	Descripción	
1	496-59-001A	H5/Indo	CTRL (# 489)
2	496-59-001B	H5/Indo	CTRL (# 489)
3	496-59-002A	H5/Indo	PRL- (# 928)
4	496-59-002B	H5/Indo	PRL- (# 928)
5	496-59-003A	H5/Indo	TETR (# 676)
6	496-59-003B	H5/Indo	TETR (# 676)
7	496-59-004A	H5/Indo	TETQ (# 766)
8	496-59-004B	H5/Indo	TETQ (# 766)
9	MW		
10	C+	H5	25 ng

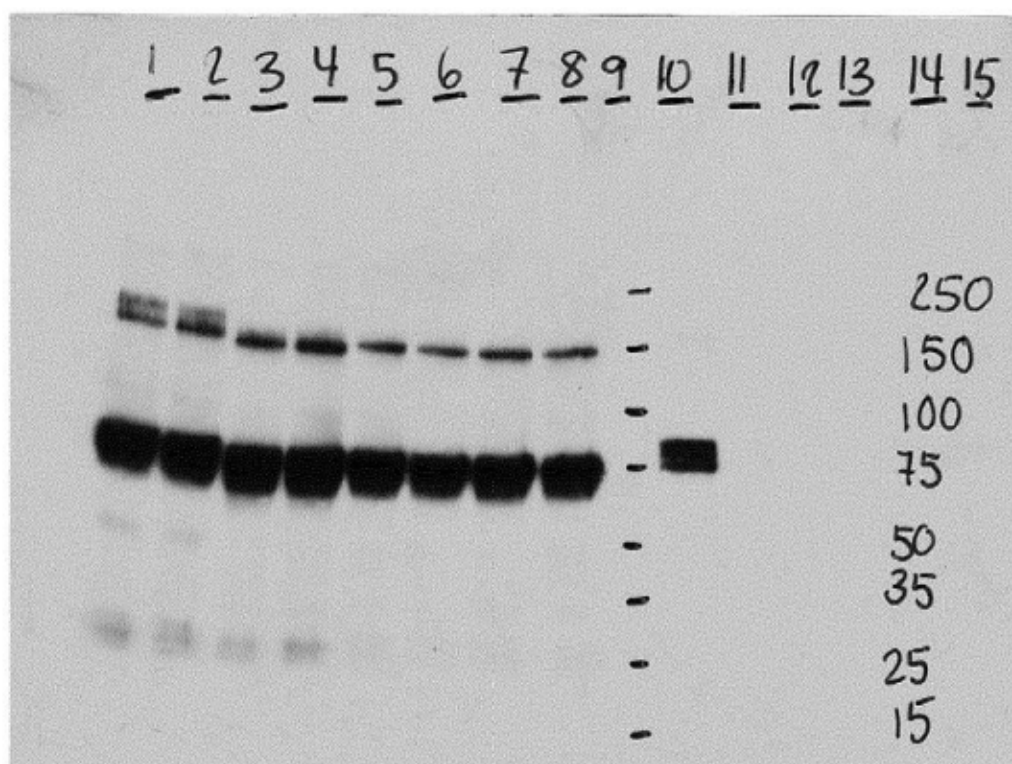


Figura 23: A-2X35S/CPMV-HT/H5 de A/Indonesia/5/2005 con mutación TETR del sitio de escisión (Construcción número 676)

Figura 23A, SEQ ID NO: 74 MutCleavage-H5(Indo).r

TAGTCCTCTTGTCTCTGTTTGAGGGCTATTTCTGAGCCCTGTTGC

Figura 23B, SEQ ID NO: 75 MutCleavage-H5(Indo).c

TAGCCCTCAAACAGAGACAAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGG

Figura 23C, SEQ ID NO: 76

Casete de expresión número 676 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. El mutante TETR del sitio de escisión de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) está subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTC
AGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCG
GATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGC
TCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGA
CAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAGGAAGACGTTT
CAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTT
GTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTT
TCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACT
TTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAA
GGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACC
CACGAGGAGCATCGTGGAAGGAAGACGTTCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATT
GATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGAC
CCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGTATTTAAATCTTAATAGGTT
TTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATC
TCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAG
ATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTT
TGTGGACACGTAGTGC GGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGT
GGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTTCAAGCCCATACATTACTTGTTA
CGATTCTGCTGACTTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTT
GCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTC
TTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTCGAACCTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTA
TATCTGCCCCAAATTTGTGCGGGCCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATAGTCA
GTCTTGTTAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAATTCAACAGAGCAG

GTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAA
 GACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATT
 GTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCG
 GAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAG
 TTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGGAGAAAA
 TTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCA
 GCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAA
 GAACAGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTT
 TGGTACTGTGGGGAATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAA
 AACCCAACCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAA
 AATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAA
 TTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTCAATTGCTCCAGAA
 TATGCATACAAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATA
 TGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCAT
 TCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGA
 TTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAACAGAGACAAGAGGACTATTTGG
 AGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGT
 ACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAG
 GCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTT
 TGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGA
 AGATGGAAGACGGGTTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAACCTCTGGTTCTCATG
 GAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAATGTTAAGAACCTCTACGACAAGGT
 CCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATC
 ACAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTATCCGCAG
 TATTCAGAAGAAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAAT
 AGGAACTTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAA
 TCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATT
 TGCATTTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTA
 TGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTT
 TGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTT
 ATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGAT
 CGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGAT
 GATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCA
 TGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATAC
 GCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATC
 TATGTTACTAGAT

Figura 23D, SEQ ID NO: 77

Secuencia de aminoácidos de mutante TETR del sitio de escisión de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1).

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCD
LDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELK
HLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFERNVWVLIKKNSTYPTIK
KSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIATRSKVN
GQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQ
TPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLRNSPQTETRG LFGA IAGFIEG
GWQGMVDGWYGYHHSNEQGS GYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFN
NLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNA
KELGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSI
YSTVASSLALAIMMAGLSLWMC SNGSLQCRICI

Figura 23E

Representación esquemática de la construcción número 676.

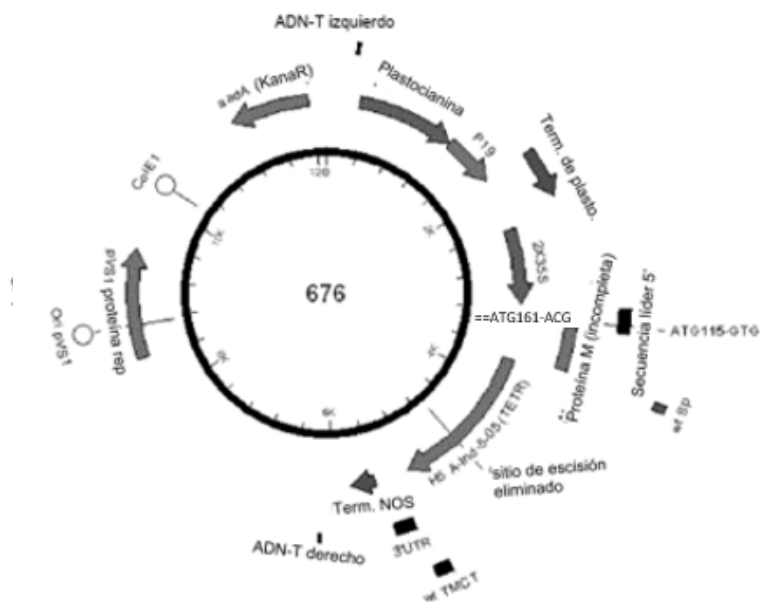


Figura 24: B-2X35S/CPMV-HT/H5 de A/Indonesia/5/2005 con mutación TETQ del sitio de escisión (Construcción número 766)

Figura 24A, SEQ ID NO: 78 H5I505_TETQ.r

TCCAAATAGTCCTTGTGTCTCTGTTGAGGGCTATTTCTGAGCCCTGT

Figura 24B, SEQ ID NO: 79 H5I505_TETQ.C :

AAATAGCCCTCAAACAGAGACACAAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGG

Figura 24C, SEQ ID NO: 80

Casete de expresión número 766 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. El mutante TETQ del sitio de escisión de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) está subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTC
AGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCG
GATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGC
TCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGA
CAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTT
CAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTT
GTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTT
TCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACT
TTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAA
GGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACC
CACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATT
GATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGAC
CCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGTT
TTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATC
TCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAG
ATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTT
TGTGGACACGTAGTGGCGGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTCTGGTGT
GGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTGAGCCCCATACATTACTTGTTA
CGATTCTGCTGACTTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTT
GCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTTC
TTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTCGAACTTGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTA
TATTCTGCCCAAATTTGTCTGGGCCCCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCA
GTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAATTCAACAGAGCAG

TTGTGACACACATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCCAAGACATACCTGGAAAA
GACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATT
GTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCG
GAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAG
TTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAA
TTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCA
GCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAA
GAACAGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTT
TGGTACTGTGGGGAATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAA
AACCCCAACCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAA
AATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAA
TTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTCAATTGCTCCAGAA
TATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATA
TGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCAT
TCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAACAGA
TTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAACAGAGACACAAGGACTATTTGG
AGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGT
ACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAG
GCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTT
TGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGA
AGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAACCTCTGGTTCTCATG
GAAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTTAAGAACCTCTACGACAAGGT
CCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATC
ACAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTATCCGCAG
TATTCAGAAGAAGCAAGATTA AAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAAT
AGGAACTTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCACTGGCAA
TCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATT
TGCATTTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTA
TGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTT
TGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTT
ATTAAAAAAGAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGAT
CGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGAT
GATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCA
TGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCC GCAATTATACATTTAATAC
GCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAAC TAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATC
TATGTTACTAGAT

Figura 24D, SEQ ID NO: 81

Secuencia de aminoácidos de mutante TETQ del sitio de escisión de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1).

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCD
LDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDDEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELK
HLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIK
KSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIATRISKVN
GQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQ
TPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSRLVLTGLRNSPQTETQGLFGAIAGFIEG
GWQGMVDGWYGYHHSNEQSGGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFN
NLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNA
KELGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSI
YSTVASSLALAIMMAGLSLWMCSSNGSLQCRICI

Figura 24E

Representación esquemática de la construcción número 766.

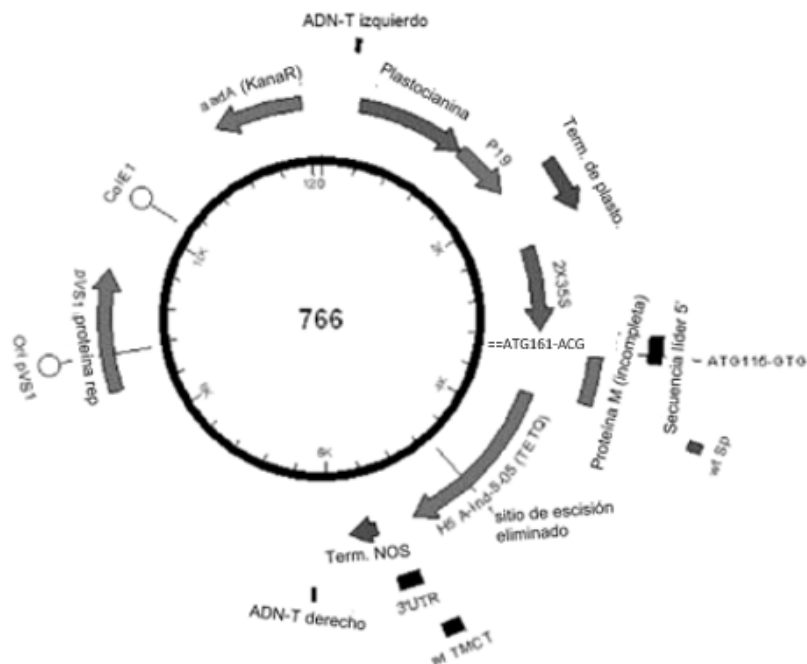


Figura 25: C-2X35S/CPMV-HT/H5 de A/Indonesia/5/2005 con bucle proteolítico eliminado (Construcción número 928)

Figura 25A, SEQ ID NO: 82 H5I505(PrL-).r

CTGCCATCCTCCGCCAGGGCTATTTCTGAGCCCTGTTGCAAGGACTAATC

Figura 25B, SEQ ID NO: 83 H5I505(PrL-).c

GAAATAGCCCTGGCGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTA

Figura 25C, SEQ ID NO: 84

Casete de expresión número 928 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) con bucle proteolítico eliminado está subrayado.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTC
AGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCG
GATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGC
TCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGA
CAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAGAAAGAACGTTT
CAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTT
GTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTT
TCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACT
TTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAA
GGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACC
CACGAGGAGCATCGTGGAAGAAAGAACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATT
GATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGAC
CCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAAAATCTTAATAGGTT
TTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATC
TCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAG
ATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTT
TGTGGACACGTAGTGCGGCCCATTAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGT
GGTCTTGGGAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGTTTCAAGCCCATACATTACTTGTTA
CGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTT
GCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTC
TTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTCAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTA
TATTCTGCCCAAATTTGTCGGGCCCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATAGTCA
GTCTTGTTAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAATTCAACAGAGCAG

GTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAA
 GACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATT
 GTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCG
 GAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAG
 TTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAA
 TTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCA
 GCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAA
 GAACAGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTT
 TGGTACTGTGGGGAATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAA
 AACCCAACCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAA
 AATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAA
 TTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTTATTGCTCCAGAA
 TATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATA
 TGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCAT
 TCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAAATATGTGAAATCAAACAGA
 TTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTGGCGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGA
 TGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAG
 AATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAA
 ATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGA
 GAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAAC
 TTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAATGTTAAGAAC
 CTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTG
 TTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGT
 ACAACTATCCGCAGTATTCAGAAGAAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTA
 AAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTC
 CCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGT
 TACAATGCAGAATTTGCATTTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTC
 GGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATG
 TAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAA
 AAGATTTTAATTTTATTAAGGACGAGGATTTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAAT
 ATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTT
 GCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAAT
 TAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAAT
 TATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCG
 CGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

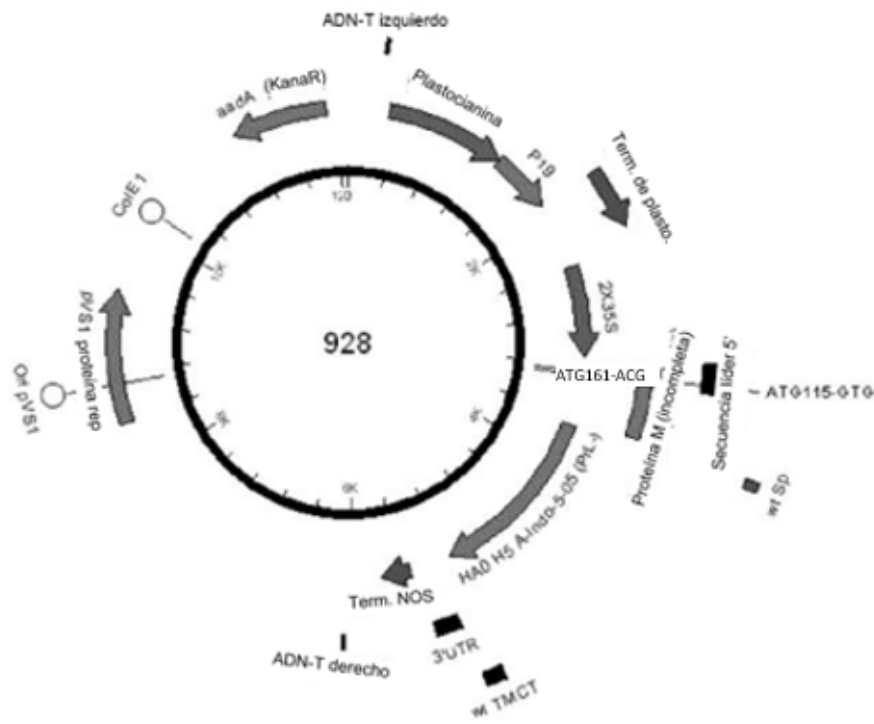
Figura 25D, SEQ ID NO: 85

Secuencia de aminoácidos de H5 de la gripe A/Indonesia/5/2005 (H5N1) con bucle proteolítico eliminado.

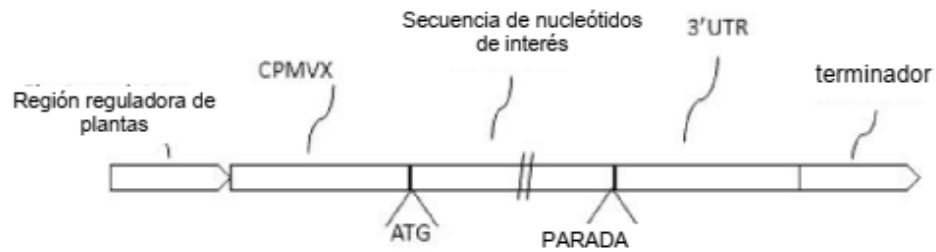
MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLC
LDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPESYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELK
HLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDEASSGVSSACPYLGSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIK
KSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPKIATRISKVN
GQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQ
TPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLRNSPGGGWQGMVDGWYGYHHS
NEQGS GYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKMED
GFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCD
NECMESIRNGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMA
GLSLWMCSNGSLQCRICI

Figura 25E

Representación esquemática de la construcción número 928.



Construcción que comprende CPMV160



Construcción que comprende CPMV160+

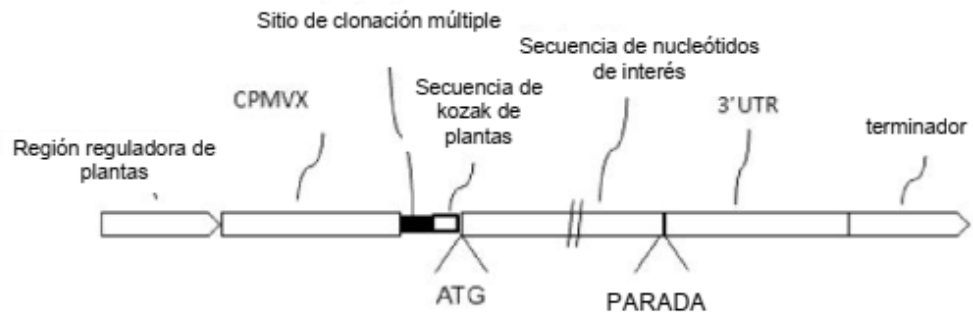


Figura 26A

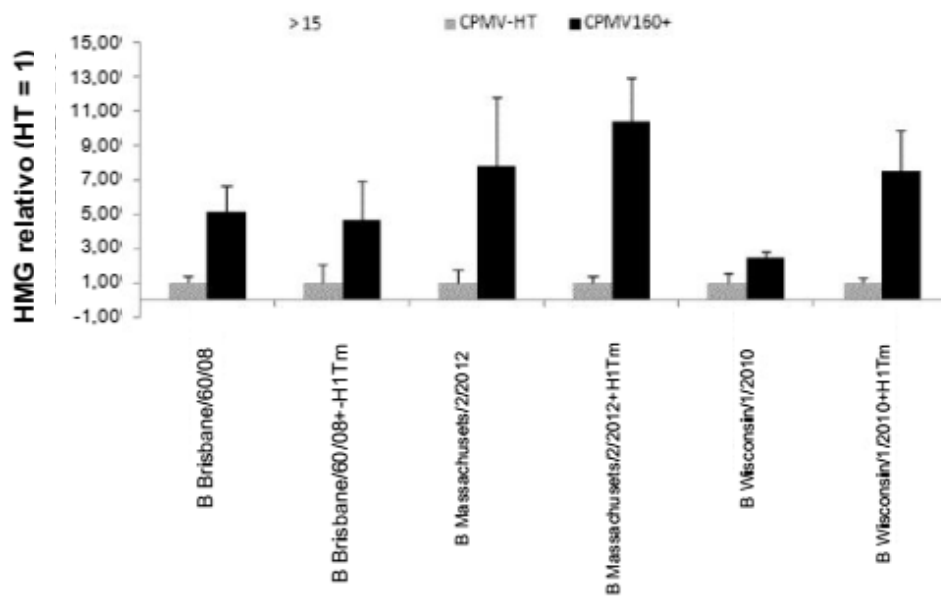


Figura 26B

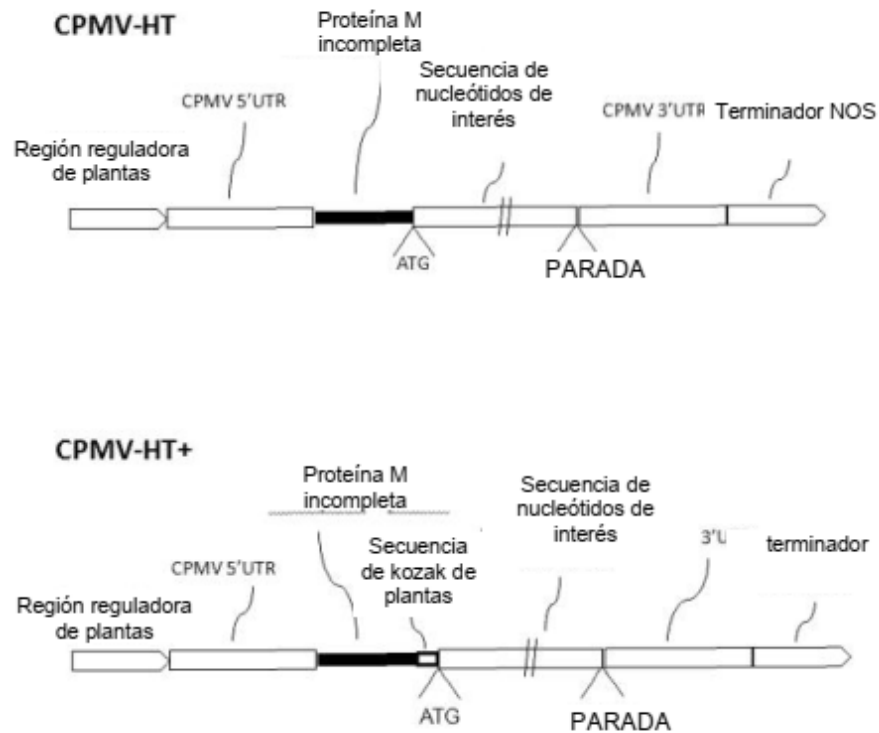


Figura 27A

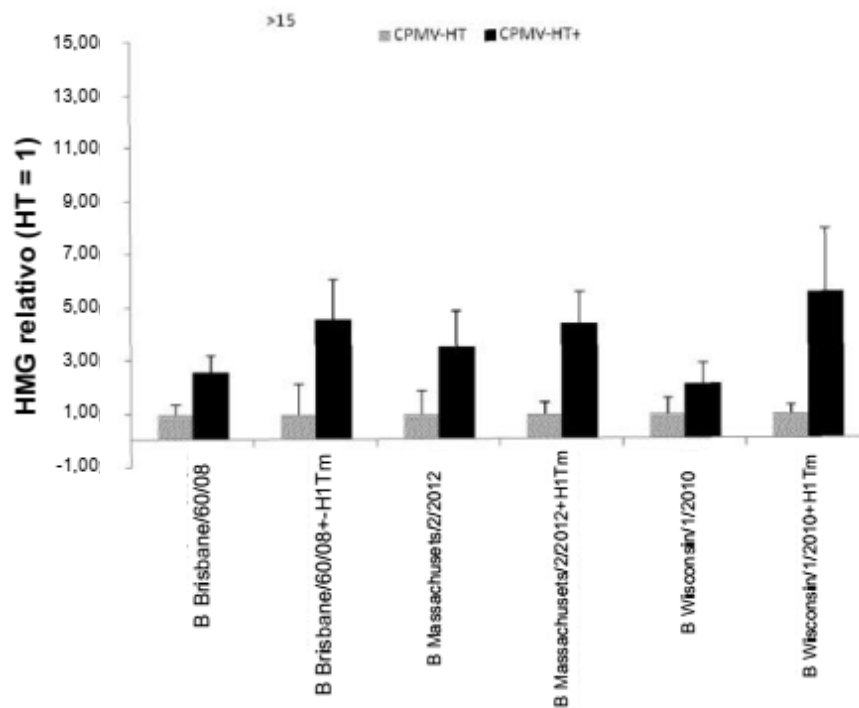


Figura 27B

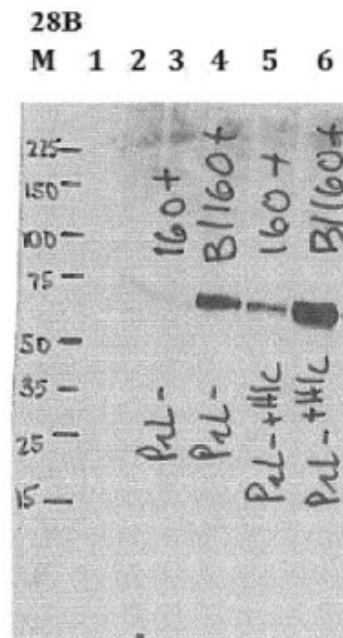
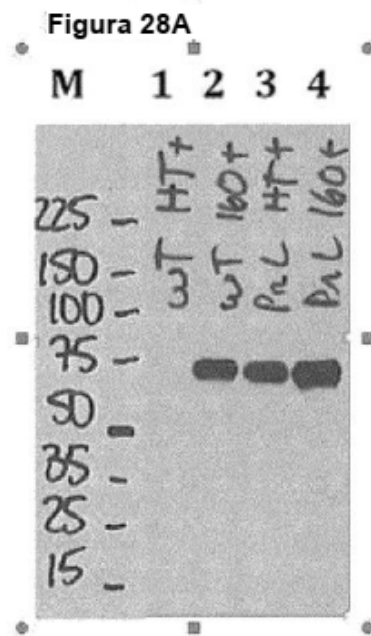


Figura 28C

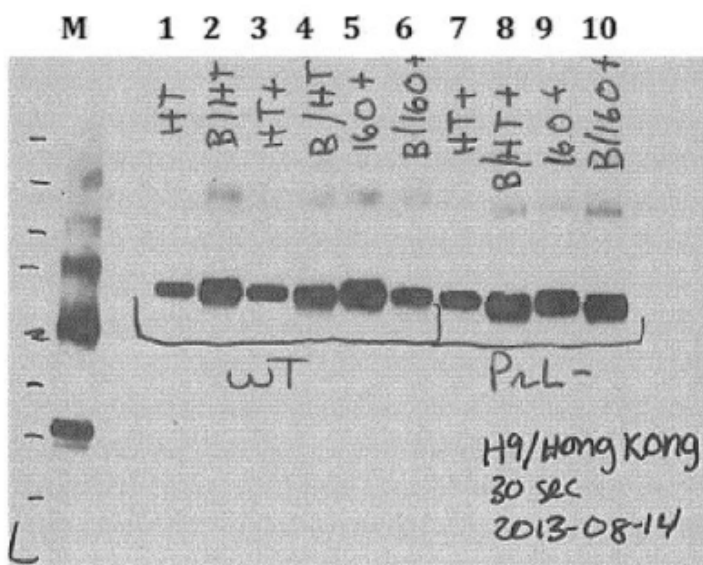


Figura 28D

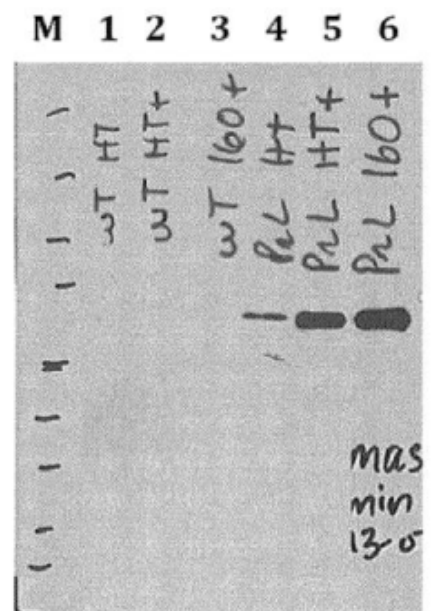
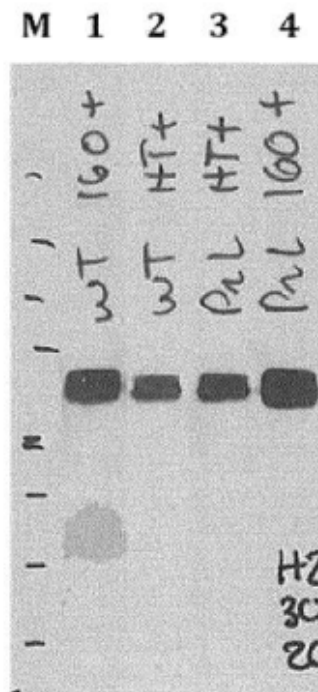


Figura 28E



28F

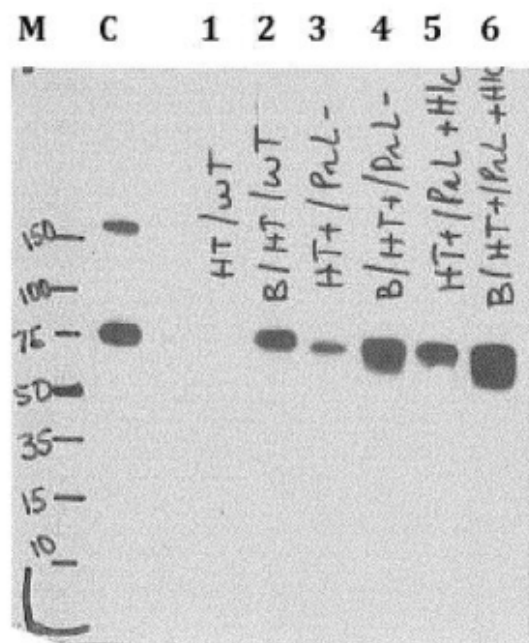
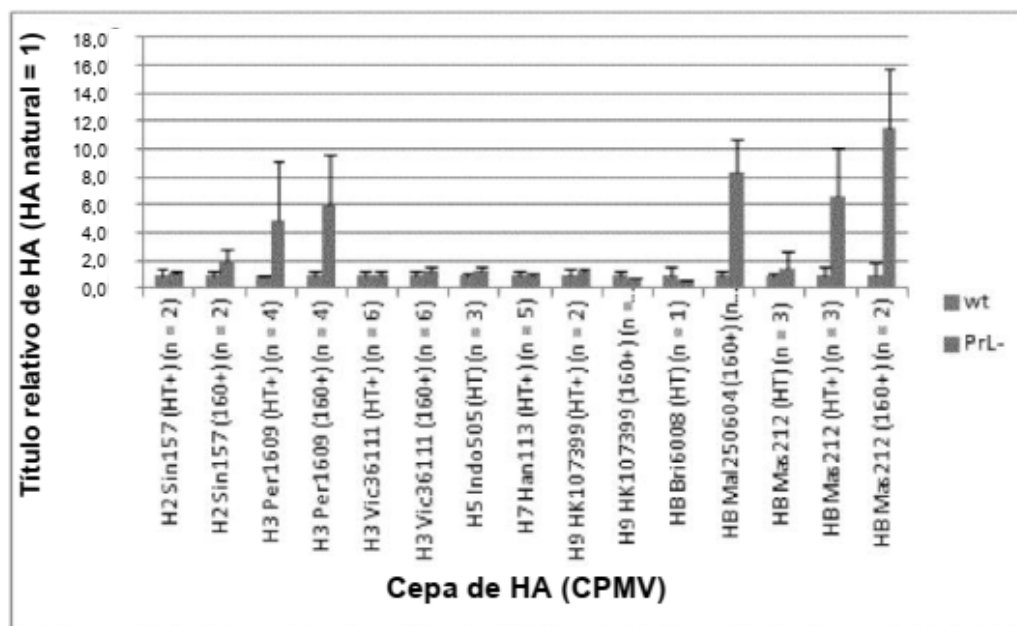


Figura 29A



F-2X35S/CPMV-HT/PDISP/HA B Brisbane/NOS (Construcción número 1029)

Figura 30A

IF-S2+S4-B Bris.c (SEQ ID NO: 86)

TCTCAGATCTTCGCCGATCGAATCTGCACTGGAATAACAT

Figura 30B

IF-S1a4-B Bris.r (SEQ ID NO: 87)

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTATAGACAGATGGAGCAAGAAACA

Figura 30C

Gen sintetizado de HA B Brisbane (correspondiente a los nt 34-1791 del número de acceso al Genbank FJ766840) (SEQ ID NO: 88)

ATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGAA
TAACATCGTCAAACCTCACCACATGTCGTCAAAACTGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGG
TGTAATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTCATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACC
AGGGGGAAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTAGCCTTGGGCAGACCAA
AATGCACGGGGAAAATACCCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATC
TGGGTGCTTTCTTATAATGCACGACAGAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAACCTTCTCCGAGGA
TACGAACATATCAGGTTATCAACCCATAACGTTATCAATGCAGAAAATGCACCAGGAGGACCCT
ACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACATTACCAATGGAACGGATTTTTCGCAACAAT
GGCTTGGGCCGTCCCAAAAACGACAAAAACAAAACAGCAACAAATCCATTAACAATAGAAGTA
CCATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAATTACCGTTTGGGGGTTCCTACTCTGACAACGAGA
CCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCAGAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGT
GACCACACATTACGTTTTCACAGATTGGTGGCTTCCCAAATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCA
CAAAGTGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAATCTGGGAAAAACAGGAACAATTACCT
ATCAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAAAGGTGTGGTGCGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAA
AGGATCCTTGCTTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAAACAAA
AGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAA
CACCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGCAAACTATTAAAGGAAAGGGG
TTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCAC
GGATACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGG
CCATAAACAAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAAATCTTCAAAG
ACTAAGCGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTAGAACTAGATGAGAAAAGTGGATGAT
CTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAACTCGCAGTCCTGCTTTCCAATGAAGGAATAA
TAAACAGTGAAGATGAACATCTCTTGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCTC
TGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGAC
AGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACCTTTGATTCAGTGAATA

TTACTGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTTTACTACTCAAC
TGCTGCCTCCAGTTTGGCTGTAACACTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGA
GACAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCTATAA

Figura 30D

Casete de expresión número 1029 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008 está subrayado. (SEQ ID NO: 89)

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAG
ACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTG
CCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCAT
CATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC
CCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAGAAAGAACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGA
TTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTC
TCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGAT
TCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCCTACAA
ATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAA
GATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAGAAAGAACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGC
AAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCA
AGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTT
TGATAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTT
AAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTCTAGATCGTGCTTCG
GCACAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTGTGGACACGTAGTGC
GGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTATTCTTGTCTGGTGTGGTCTTGGGAAAGAAAGCTT
GCTGGAGGCTGCTGTTTACGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGC
AATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGA
TTGGTCTTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTGAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTCAACTTGG
AGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTCTGGGCCCATGGCGAAAACGTTG
CGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTTCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGAAT
CTGCACTGGAATAACATCGTCAAACCTACCACATGTCTGTCAAAACCTGCTACTCAAGGGGAGGTC
AATGTGACTGGTGTAAATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTCATTTTGCAATCTCAAAG
GAACAGAAACCAGGGGGAAACTATGCCCAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTAGCCTT
GGGACAGACCAAAATGCACGGGGAAATACCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGA
CCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAACC
TTCTCCGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACCCATAACGTTATCAATGCAGAAAATGCACC
AGGAGGACCCTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACATTACCAATGGAAACGGATTT
TTCGCAACAATGGCTTGGGCCGTCCCAAAAACGACAAAACAAAACAGCAACAATCCATTAA
CAATAGAAGTACCATAACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAATTACCGTTTGGGGGTTTCACTC
TGACAACGAGACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCAGAAGTTACCTCATCT
GCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTACAGATTGGTGGCTTCCCAAATCAAACAGAAGACG
GAGGACTACCACAAAGTGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAATCTGGGAAAACAGG
AACAATTACCTATCAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAAAGGTGTGGTGCAGCAAGTGGCAGGAGC
AAGGTAATAAAAGGATCCTTGCTTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTG
GATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAGGCCATAGGAAATTGCCCAAT
ATGGGTGAAAACACCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGCAAACTATTA
AAGGAAAGGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTG

CAGGTTGGCACGGATACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAG
 CACTCAAGAGGCCATAAACAAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAG
 AATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTAGAACTAGATGAGA
 AAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAACTCGCAGTCCTGCTTTCCAA
 TGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAACATCTCTTGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAATG
 CTGGGCCCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAAACACAAGTGCAACCAGA
 CCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACCTTTGA
 TTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTT
 TACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGGCTGTAACACTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATA
 TGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCTATAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAA
 TTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTT
 ATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACAC
 AAAAAGATTTTAATTTTATTAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTAT
 CGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTC
 TTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATG
 CATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCG
 ATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCTATGTTAC
 TAGAT

Figura 30E,

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA de la gripe B/Brisbane/60/2008
 SEQ ID NO: 90

MAKNVAIFGLLFSLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSH
 FANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHRTKI
 RQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKT
 ATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFP
 NQTEDGGLPQSGRIVVDYMQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIGEADCL
 HEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEI
 LELDEKVDDL RADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETK
 HKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSL NITAASLNDGDLNHTILLYYSTAASSLAVTLMIA
 IFVVYMVSRDNVSCSICL

Figura 30F

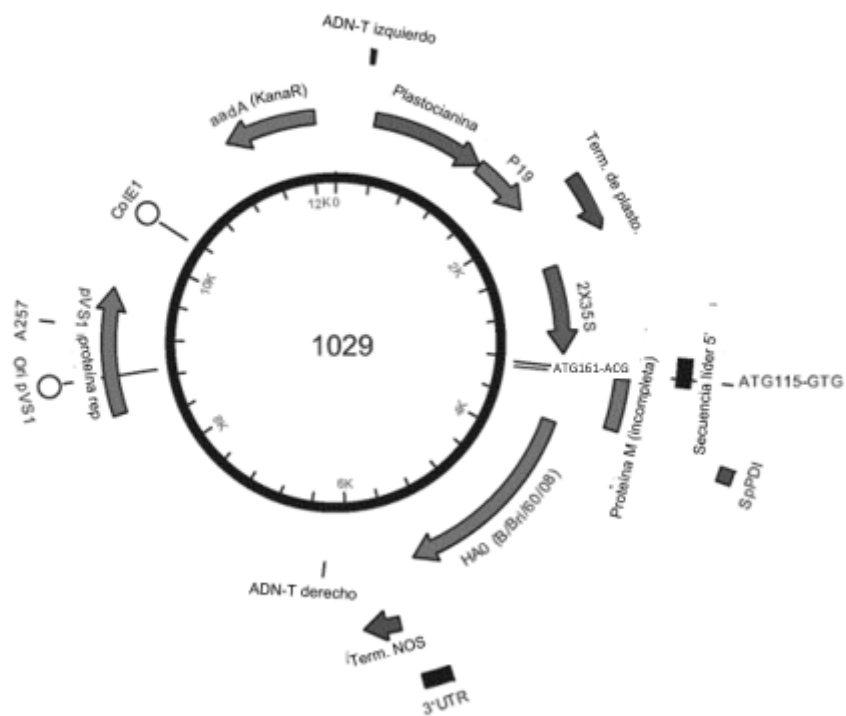


Figura 31

K- 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1039) y HT* (construcción núm. 1829) para PDISP/HA B Brisbane (PrL-)

Figura 31A, SEQ ID NO: 91 Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-).

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGA
TCTTCGCCCATCGAATCTGCACTGGAATAACATCGTCAAACCTCACCACATGTCGTCAAACTGC
TACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGTAATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTCAT
TTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACCAGGGGAAAATATGCCCAAATGCCTCAACTGCACAG
ATCTGGACGTAGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGGAAAATACCCTCGGCAAGAGTTTCAAT
ACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATT
AGACAGCTGCCTAACCTTCTCCGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACCCATAACGTTATCA
ATGCAGAAAATGCACCAGGAGGACCCTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACATTAC
CAATGGAAACGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCCGTCCCAAAAAACGACAAAAACAAAACA
GCAACAAATCCATTAACAATAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAATTACCG
TTTGGGGGTTCCACTCTGACAACGAGACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCA
GAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTGGTGGCTTCCCA
AATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGTGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAA
AATCTGGGAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAAAAGGTGTGGTG
CGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCCTTGCTTTTAATTGGAGAAGCAGATTGCCTC
CACGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCA
TAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACC
TCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCCCATGGGGACAT
GGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAACAAGATAACAAAAAATC
TCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAAC
CCACAACGAAATACTAGAACTAGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCA
CAAATAGAACTCGCAGTCTTGCTTTCCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAACATCTCT
TGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATG
CTTTGAAACCAAACACAAGTGCAACCAGACCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGAT
GCAGGAGAATTTCTCTCCCACTTTGATTCACTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACG
ATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGGCTGTAAC
ACTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCCATCTGT
CTATAA

Figura 31B, SEQ ID NO: 92

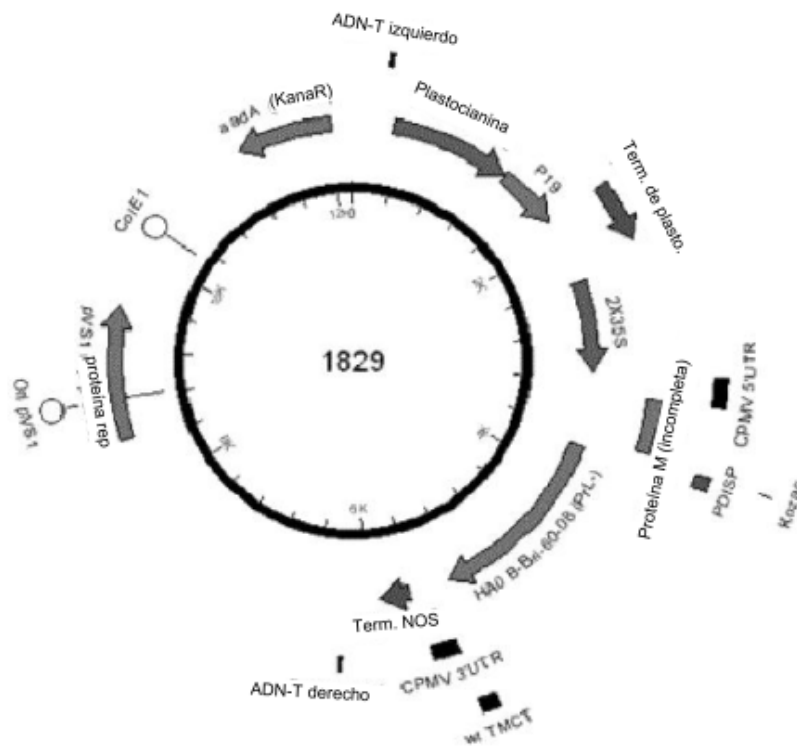
Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-).

MAKNVAIFGLLFSLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGIPLTTPTKSH
FANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLVALGRPKCTGKI PSARVSILHEVRPVTSGCFPIMHDKTI
RQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKT
ATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFP
NQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKGSPLIGEADCL

HEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPGGGWEGMIAGWHGYTSHGAH
GVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTISS
QIELAVLLSNEGINSSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFD
AGEFSLPTFDNLNITAASLNDGDLNHTILLYSTAASSLAVTLMIAIFVVMVSRDNVSCSIC
L*

Figura 31C

Representación esquemática de la construcción número 1829 (2X35S/CPMV HT*)



2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1039) y HT*(-Mprot) (construcción núm. 1937) para PDISP/HA B Brisbane (PrL-)

Figura 32A

Representación esquemática de la construcción número 1937 (2X35S/CPMV HT*(-Mprot))



2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1067) y HT*(-Mprot) (construcción núm. 1977) para PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT

Figura 33A, SEQ ID NO: 95

Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT.

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGA
ATCTGCACTGGAATAACATCGTCAAACTCACCACATGTCGTCAAACTGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTG
GTGTAATACCACTGACAACAACACCCACCAAAATCTCATTTCGAAATCTCAAGGAACAGAAACCGGGGAAAC
TATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTAGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGGGAAATACCTT
CGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAA
AATTAGACAGCTGCCTAACCTTCTCCGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACCCATAACGTTATCAATGCAGAA
AATGCACAGGAGGACCTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACATTACCAATGGAAACGGATTTTCG
CAACAAATGGCTTGGGCCGTCCCAAAAAACGACAAAAACAAAAACGCAACAAATCCATTAAACAATAGAAGTACCA
TACATTGTACAGAAGGAGAAGACCAAAATACCGTTTGGGGGTTCCACTCTGACAACGAGACCCAAATGGCAAAG
CTCTATGGGGACTCAAAGCCCCAGAAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTG
GTGGCTTCCCAATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGTGGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAA
AATCTGGGAAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCCAAAGTGGCA
GGAGCAAGGTAATAAAGGATCCTTGCCCTTAATTGGAGAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAA
ACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTT
TGAAGCTGGCCAATGGAACCAAAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGAT
ACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAAACAAGATA
ACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACCTC
CACAACGAAATACTAGAACTAGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAATAGAACTC
GCAGTCTGCTTTCCAAATGAAGGAATAATAACAGTGAAGATGAACATCTCTTGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAG
AAAATGCTGGGCCCTCTGCTGTAGAGATAGGAATGGATGCTTTGAAACCAACACAAGTGCAACCAGACCTGT
CTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAAATTTCTCTCCCACTTTGATTCACTGAATATTACTGC
TGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTCGCCAGTTCATTGGTAC
TGGTAGTCTCCCTGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAA

Figura 33B, SEQ ID NO: 96

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT.

MAKNVAIFGLLFSLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGIPLTTPTKSHFANLKGTTETRGKLCPKC
LNCTDLVALGRPKCTGKIPSARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAEAPGGPYKIG
TSGSCPNTNNGNFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSA
NGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYVMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIGEDCL
HEKYGGLNKSPPYTGHAHKAIGNCPIWVKTPKLANGTKYRPPGGGWEGMIAHGWYTHGAGHVAADLKTQ
EAINKITKNLSLEVKNLQRLSGAMDELHNEILEDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKK
MLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSLNTAASLNDGLDNYQILAIYSTVASSLVLVVSL
GAISFWMCNSGLQCRICI*

Figura 33C

Representación esquemática de la construcción número 1067 (2X35S/CPMV HT)

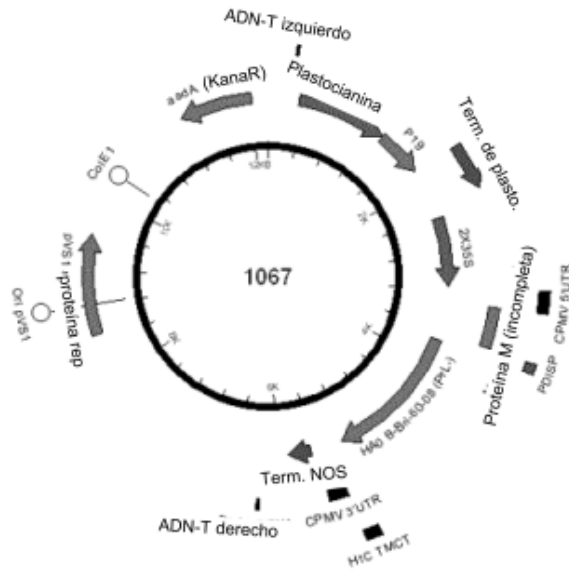
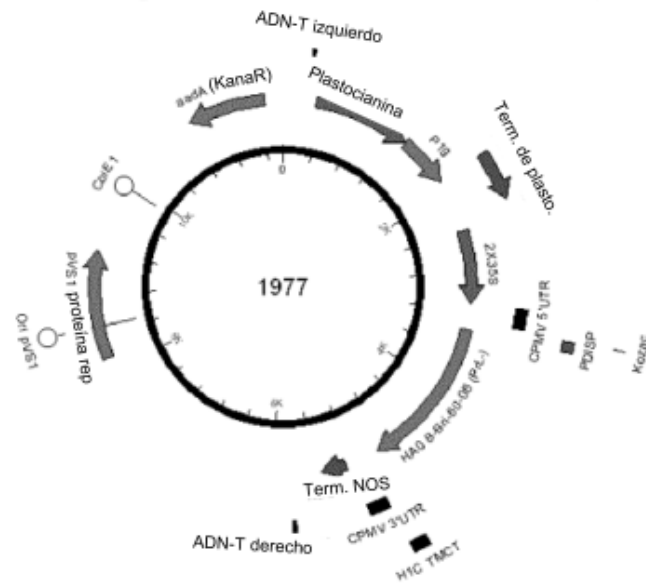


Figura 33D

Representación esquemática de la construcción número 1977 (2X35S/CPMV HT*(-Mprot))



2X35S/CPMV HT (construcción núm. 2072) y HT*(-Mprot) (construcción núm. 2050) para PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)

Figura 34A SEQ ID NO: 97

Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachussetts (PrL-).

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTCTCTTCTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGATCG
AATCTGCACTGGGATAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTG
GTGTGATACCACTAACAACAACACCAACAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAAGACCAGAGGGGAACTA
TGCCAGACTGTCTCAACTGTACAGATCTGGATGTGGCCCTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGAACCTACACCTTCTGC
GAAAGCTTCAATACTTCACGAAGTCAGACCTGTTACATCCGGGTGCTTCCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCA
GGCAACTAGCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAACCCAAAACGTTATCGATGCAGAAAAGGCA
CCAGGAGGACCCTACAGACTTGGAACTCAGGATCTTGCCTAACGCTACCAGTAAAAGCGGATTTTTGCAACAAT
GGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAATGCAACGAACCCATTAACAGTAGAAGTACCATACATTGTGTCAG
AAGGGGAAGACCAATTACTGTTTGGGGGTTCATTTCAGATAACAAAACCCAAATGAAGAACCCTCTATGGAGACTCA
AATCCTCAAAAGTTACCTCATCTGCTAATGGAGTAACACACATTATGTTTCTCAGATTGGCGGCTTCCAGATCA
AACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAAGCGGCAGAATTGTCGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAA
CAATTGTCTATCAAAGAGGTGTTTTGTTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCAGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGG
TCCTTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACAC
AGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATGCCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTTGCCAATGGAAACCAAT
ATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTG
GCAGTTGCTGCAGACCTTAAGAGCACACAAGAAGCTATAACAAGATAACAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCT
AGAAGTAAAGAATCTTCAAAGGCTAAGTGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAG
TGGATGACCTCAGAGCTGACACTATAAGTTCACAAATAGAATTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAAC
AGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAATAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGACATAGGAAA
TGGATGCTTCGAAACCAACACAAATGCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAG
AGTTTTCTCTCCCCACTTTTGATTCAATTGAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACCATACT
ATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTTCTAGTTTGGCTGTAACATTGATGCTAGCTATTTTTATTGTTTATATGGT
CTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTCTATAA

Figura 34B, SEQ ID NO: 98

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachussetts (PrL-).

MAKNVAIFGLLFLLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSYFANLKGTKTRGKL
CPDCLNCTDLVALGRPMCVGTTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLANLLRGYENIRLSTQNVIDAEKA
PGGPYRLGTSGSCP NATSKSGFFATMAWAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICAEGEDQITVWGFHSDNKTQMKNLGYDS
NPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFDPQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPGGGWEGMIAGWHGYTSHGAHV
AVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIIN
SEDEHLLALERKLLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSL NITAASLNDGDLNHT
ILLYYSTAASSLAVTLM LAIFIVYMVRDNDVSCSICL*

Figura 34C

Representación esquemática de la construcción número 2072 (2X35S/CPMV HT)

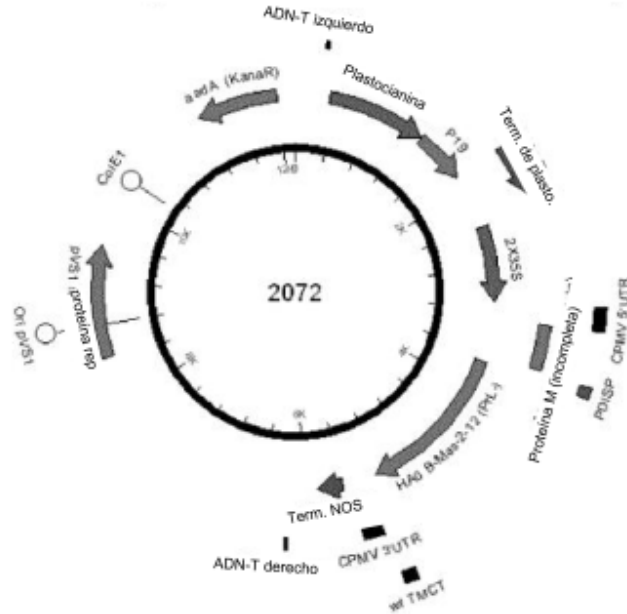
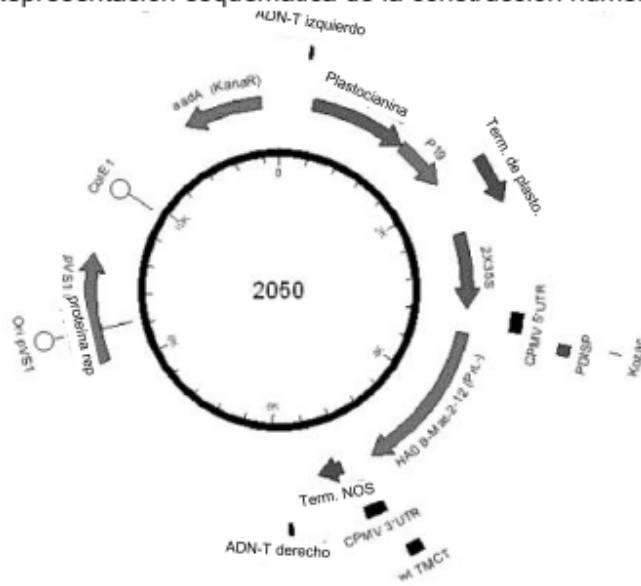


Figura 34D

Representación esquemática de la construcción número 2050 (2X35S/CPMV HT*(-Mprot))



2X35S/CPMV HT (construcción núm. 2074) y HT*(-Mprot) (construcción núm. 2060) para PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)+H1 California TMCT

Figura 35A SEQ ID NO: 99

Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)+H1 California TMCT.

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGATCG
AATCTGCACTGGGATAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTG
GTGTGATACCACTAACAACAACCAACAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAAGACCAGAGGGAACTA
TGCCCGAGCTGTCTCAACTGTACAGATCTGGATGTGGCCCTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGAACACACCTTCTGC
GAAAGCTTCAATACTTCACGAAGTCAGACCTGTTACATCCGGGTGCTTCCCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCA
GGCAACTAGCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAACCCAAAACGTTATCGATGCAGAAAAGGCA
CCAGGAGGACCCTACAGACTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAAAGCGGATTTTTCGCAACAAT
GGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAATGCAACGAACCCATTAAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTGCAG
AAGGGGAAGACCAAAATTACTGTTTGGGGGTTCATTTCAGATAACAAAACCCAAATGAAGAACCTCTATGGAGACTCA
AATCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACCACACATTATGTTTCTCAGATTGGCGGCTTCCCGAGATCA
AACAGAAGACGGGAGGACTACCAAAAGCGGCAGAAATGTCGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAA
CAATTGTCTATCAAAGAGGTGTTTGTTCCTCAAAGGTGTGGTGCAGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGG
TCCTTGCCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACAC
AGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTTGCCAATGGAACCAAT
ATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTG
GCAGTTGCTGCAGACCTTAAGAGCACACAAGAGCTATAACAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCT
AGAAGTAAAGAATCTTCAAAGGCTAAGTGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAG
TGGATGACCTCAGAGCTGACACTATAAGTTCACAAATAGAACTTGCACTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAAC
AGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAATAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGACATAGGAAA
TGGATGCTTCGAAACCAACACAAATGCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAG
AGTTTTCTCTCCCACTTTTGTATTCATTGAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACTACCAG
ATTTTGGCGATCTATTCAACTGTCGCCAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTG
CTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAA

Figura 35B, SEQ ID NO: 100

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)+H1 California TMCT.

MAKNVAIFGLLFSLLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVIPLTTTPTKSYFANLKGTKTRGKL
CPDCLNCTDLVALGRPMCVGTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIMHDRTKIRQLANLLRGYENIRLSTQNVIDAEKA
PGGPYRLGTSGSCPNAATSKSGFFATMAWAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICAEGEDQITVWGFHSDNKTQMKNLGDS
NPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFPDQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKSYPYTGHEHAKAIGNCPIWVKTPKLANGTKYRPPGGWEGMIAGWHGYTSHGAGHV
AVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIIN
SEDEHLLALERKLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQCTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSLNTAASLNDGDLNYQ
ILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

Figura 35C

Representación esquemática de la construcción número 2074 (2X35S/CPMV HT)

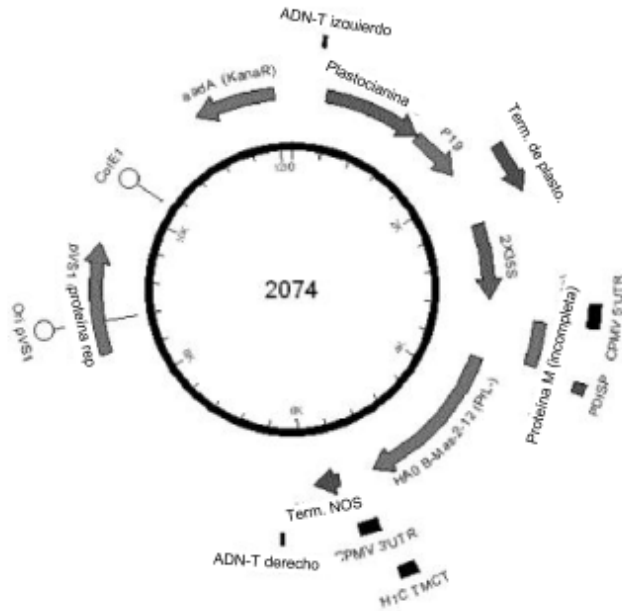
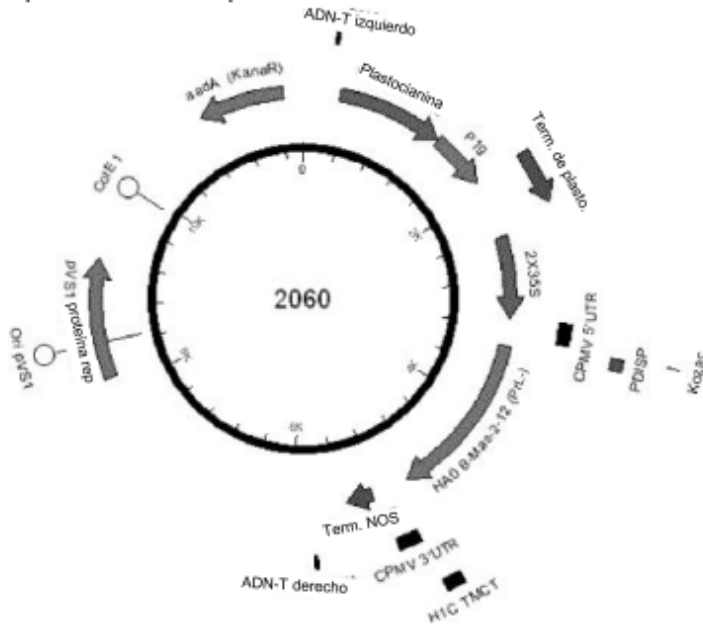


Figura 35D

Representación esquemática de la construcción número 2060 (2X35S/CPMV HT*(-Mprot))



2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1445), HT*(-Mprot) (construcción núm. 1820) y HT(f15'UTR) (construcción núm. 1975) para HA B Wisconsin (PrL-)

Figura 36A, SEQ ID NO: 101

Secuencia de nucleótidos de HA B Wisconsin (PrL-).

```
ATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCTTCAAA
CTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGCGTGATACCACTGACAACAACACCAA
CAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGAACTATGCCCGGACTGTCTCAACTGTACAGAT
CTGGATGTGGCCTTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGGACCACACCTTCTGCTAAAGCTTCAATACTCCACGAGGTGAG
ACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCTTATAATGCACGACAGAACAATAATCAGGCAACTACCCAATCTTCTCAGAGGAT
ATGAAAATATCAGGTTATCAACCCAAAACGTTATCGATGCAGAAAAAGCACCAGGAGGACCTTACAGACTTGGAAAC
TCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAATCGGATTTTTTGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACCTA
CAAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGGGAAGACCAAATTACTGTTTGGG
GGTTCCATTGAGATAACAAAACCCAAATGAAGAGCCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAAAGTTCACCTCATCTGCT
AATGGAGTAACCACACATTATGTTTCTCAGATTGGCGACTTCCCAGATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAG
CGGCAGAAATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAAACAGGAACAATTGCTATCAAAGAGGTGTTTGT
TGCCTCAAAAGGTGTGGTGCGCGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCATTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGAT
TGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAA
TTGCCCAATATGGGTAAAAACACCTTTGAAGCTTGCCAAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAG
GAATGATTGCAGTTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGGCAGACCTTAAGAGTACA
CAAGAAGCTATAAATAAGATAACAAAAAATCTCAATCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAACCTTCAAAGACTAAG
TGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAA
GCTCACAAATAGAAGTTCAGTCTTGCTTTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTT
GAGAGAAAATAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGACATAGGAAACGGATGCTTCGAAACCAAACACAAATG
CAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACTTTTGATTTCAT
TGAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCT
TCTAGTTTGGCTGTAACATTAATGCTAGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCAT
CTGCTCTATAA
```

Figura 36B, SEQ ID NO: 102

Secuencia de aminoácidos de HA B Wisconsin (PrL-).

```
MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSYFANLKGTRTRGKLCPCDCLNCTD
LDVALGRPMCVGTTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEKAPGGPYRLGT
SGSCP NATSKIGFFATMAWAVPKDNYKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMKSLYGDSPNPQKFTSSA
NGVTTHYVSQIGDFPDQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPKGTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIGI EAD
CLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTP LKLANGTKYRPPGGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKST
QEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLAL
ERKLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTC LDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTILLYSTAA
SSLAVTLM LAIFIVYMVSRDNVSCSICL*
```

Figura 36C

Representación esquemática de la construcción número 1445 (2X35S/CPMV HT)



Figura 36D

Representación esquemática de la construcción número 1820 (2X35S/CPMV HT*(-Mprot))

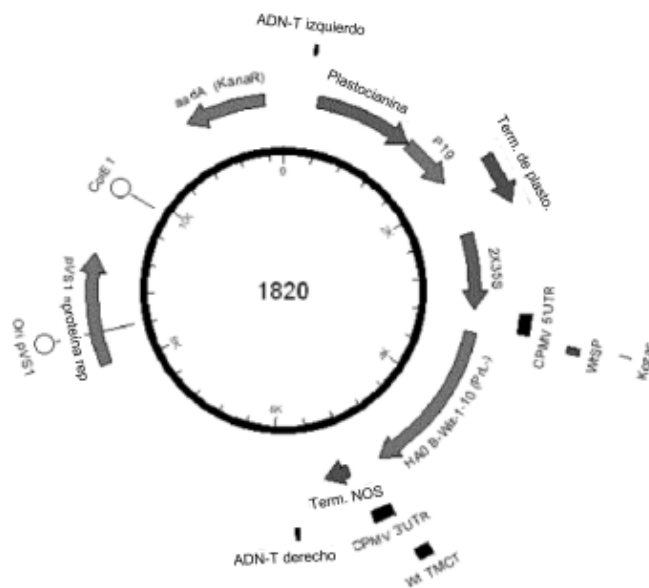
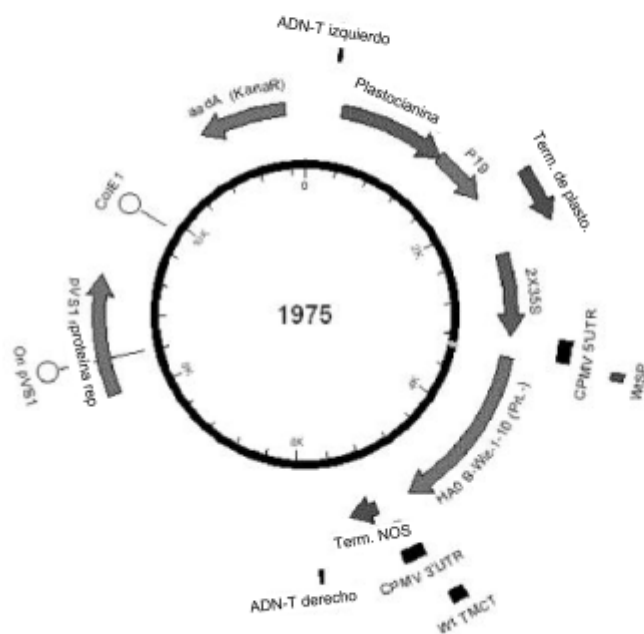


Figura 36E

Representación esquemática de la construcción número 1975 (2X35S/CPMV HT*(fl5'UTR))



2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1454) y HT*(-Mprot) (construcción núm. 1893) para HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT

Figura 37A, SEQ ID NO: 103

Secuencia de nucleótidos de HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT

ATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCTTCAAA
CTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGCGTGATACCACTGACAACAACACCAA
CAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGAACTATGCCCCGACTGTCTCAACTGTACAGAT
CTGGATGTGGCCTTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGGACCACACCTTCTGCTAAAGCTTCAATACTCCACGAGGTCAG
ACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCTTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAGGCAACTACCCAATCTTCTCAGAGGAT
ATGAAAATATCAGGTTATCAACCAAAACGTTATCGATGCAGAAAAAGCACCAGGAGGACCCCTACAGACTTGGAAACC
TCAGGATCTTGGCCTAACGCTACCAGTAAATCGGATTTTTTGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAGGACAACTA
CAAAAATGCAACGAACCCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGGGAAGACCAAAATTAAGTTTGGG
GGTTCATTTCAGATAACAAAACCAAAATGAAGAGCCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCT
AATGGAGTAACACACATTATGTTTCTCAGATTGGCGACTTCCCAGATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAG
CGGCAGAATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTATCAAAGAGGTGTTTGT
TGCCCTCAAAAGGTGTGGTGGCGAGTGGCAGGAGCAAGTAATAAAAGGGTCATTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGAT
TGCCCTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAA
TTGCCCAATATGGGTAAAAACACCTTTGAAGCTTGCCAATGGAACCAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAG
GAATGATTGCAGGTTGGCAGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGGCAGACCTTAAGAGTACA
CAAGAAGCTATAAATAAGATAACAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAACCTTCAAAGACTAAG
TGGTGCCATGGATGAAGTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAA
GCTCACAATAAGAACTTGCACTTCTGCTTTTCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTT
GAGAGAAAACTAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGACATAGGAAACGGATGCTTCGAAACCAACACAAATG
CAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTAAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCACTTTTGGATTAT
TGAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTGCGC
AGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAAT
ATGTATTTAA

Figura 37B, SEQ ID NO: 104

Secuencia de aminoácidos de HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMC.

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSYFANLKGTRTRGKLCPCDCLNCTD
LDVALGRPMCVGTTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHDTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVDAEKAPGGPYRLGT
SGSCPNAATSKIGFFATMAWAVPKDNYKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTOMKSLYGDSPNQKFTSSA
NGVTTHYVSQIGDFPDQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIGLAD
CLHEKYGGLNKSPPYTGEGHAKAIGNCPIWVKTPKLANGTKYRPPGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKST
QEAINKITKNLSLELVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDLADTISSQIELAVLLSNEGIIINSEDEHLLAL
ERKLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSLNTAASLNDGDLNYQILAIYSTVA
SSLVLVVS LGAISFWMCSNGLQCRICI*

Figura 37C

Representación esquemática de la construcción número 1454 (2X35S/CPMV HT)



Figura 37D

Representación esquemática de la construcción número 1893 (2X35S/CPMV HT*(-Mprot))



L- 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1067) y HT* (construcción núm. 1875) para PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT

Figura 38A, SEQ ID NO: 105

Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT.

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGA
ATCTGCACTGGAATAACATCGTCAAACTCACCACATGTGCTCAAACTGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTG
GTGTAATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTCATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACCAGGGGGAAAC
TATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTAGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGGAAAAATACCCCT
CGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAA
AATTAGACAGCTGCCTAACCTTCTCCGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACCCATAACGTTATCAATGCAGAA
AATGCACCAGGAGGACCTTACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACATTACCAATGGAAACGGATTTTTCG
CAACAATGGCTTGGGCCGTCCCAAAAAACGACAAAAACAAAACAGCAACAAATCCATTAACAATAGAAGTACCA
TACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAATTACCGTTTGGGGGTTCCTCTGACAACGAGACCCAAATGGCAAAG
CTCTATGGGGACTCAAAGCCCAGAGTTACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTG
GTGGCTTCCCAATCAAACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAAGTGGTAGAAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAA
AATCTGGGAAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGGGGTATTTTATTGCCTCAAAGGTGTGGTGCGCAAGTGGCA
GGAGCAAGGTAATAAAAGGATCCTTGCTTTAATTGGAGAAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAA
ACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAAACACCCT
TGAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCAGCGAT
ACACATCCCATGGGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAAACAAGATA
ACAAAAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAACTC
CACAAACGAAATACTAGAACTAGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAAGT
GCAGTCTGCTTTTCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAACATCTCTTGGCGCTTGAAAGAAAGCTGAAG
AAAATGCTGGGCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAAACACAAGTGCAACCAGACCTGT
CTCGACAGAAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAAATTTCTCTCCCACTTTGATTCACTGAATATTACTGC
TGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTCGCCAGTTTCATTGGTAC
TGGTAGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAA

Figura 38B, SEQ ID NO: 106

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Brisbane (PrL-)+H1 California TMCT.

MAKNVAIFGLLFSLLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGVPLTTTPKSHFANLKGTTETRGKLCPC
LNCTDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIG
TSGSCPNTNNGFFATMAWAVPKNDKNTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSA
NGVTTHYVSQIGGFPNQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGLPLIGADCL
HEKYGGLNKSPPYTGEGHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPGGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQ
EAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTISSQIELAVLLSNEGIIINSEDEHLLALERKLLK
MLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSL NITAASLNDGLDNYQILAIYSTVASSLVVVS
LAISFWMCSNLSLQCRICI*

Figura 38C

Representación esquemática de la construcción número 1875 (2X35S/CPMV HT*)



M- 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 2072) y HT* (construcción núm. 2052) para PDISP/HA B Massachussetts (PrL-)

Figura 39A, SEQ ID NO: 107

Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachussetts (PrL-).

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGA
ATCTGCACTGGGATAACATCTTCAAACACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTG
GTGTGATACCACTAACAAACACCAACAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAAACAAAGACCAGAGGGAAAC
TATGCCAGACTGTCTCAACTGTACAGATCTGGATGTGGCCCTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGAACTACACCTTC
TGCGAAAGCTTCAATACTTACGAAGTCAGACCTGTTACATCCGGGTGCTTCCCTATAATGCACGACAGAACAAAA
ATCAGGCAACTAGCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAAATATCAGGTTATCAACCCAAAAACGTTATCGATGCAGAA
AAGGCACCAGGAGGACCCTACAGACTTGGAACTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAAAGCGGATTTTTC
GCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAAATGCAACGAACCCATTAAACAGTAGAAGTACCATAC
ATTTGTGCAGAAAGGGGAAGACCAAAATTACTGTTTGGGGGTTCCATTACAGATAACAAAACCCAAATGAAGAACCTC
TATGGAGACTCAAATCCTCAAAGTTACCTCATCTGCTAATGGAGTAACACACATTATGTTTCTCAGATTGGCG
GCTTCCAGATCAAACAGAAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGAAATGTGCTTGATTACATGATGCAAAAAAC
CTGGGAAAAACAGGAACAATTGTCTATCAAAGAGGTGTTTGTGCTCAAAAGGTGTGGTGCAGAGTGGCAGGA
GCAAAAGTAATAAAAGGGTCTTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACA
AAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAATGCAAAAGCCATAGGAAATGCCCAATATGGGTGAAAAACACCTTTGA
AGCTTGCCAAATGGAACCAAAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTGGCACGGATACA
CATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTTGCTGCAGACCTTAAGAGCACACAAGAAGCTATAAACAAAGATAACAA
AAAACTCAACTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAATCTTCAAAGGCTAAGTGGTGCCATGGATGAACCTCCACA
ACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGATGACCTCAGAGCTGACACTATAAGTTACAAAATAGAACTTGCAG
TCTTGCTTTCCAAAGGAATAATAAACAGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAACTAAAGAAAA
TGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGACATAGGAAATGGATGCTTCGAAACCAAAACAAAAATGCAACCAGACCTGCTTAG
ACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAGTTTTCTCTCCCACTTTTGATTCAATTGAACATTACTGCTGCA
TCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTTCTAGTTTGGCTGTAAC
ATTGATGCTAGCTATTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTCTATAA

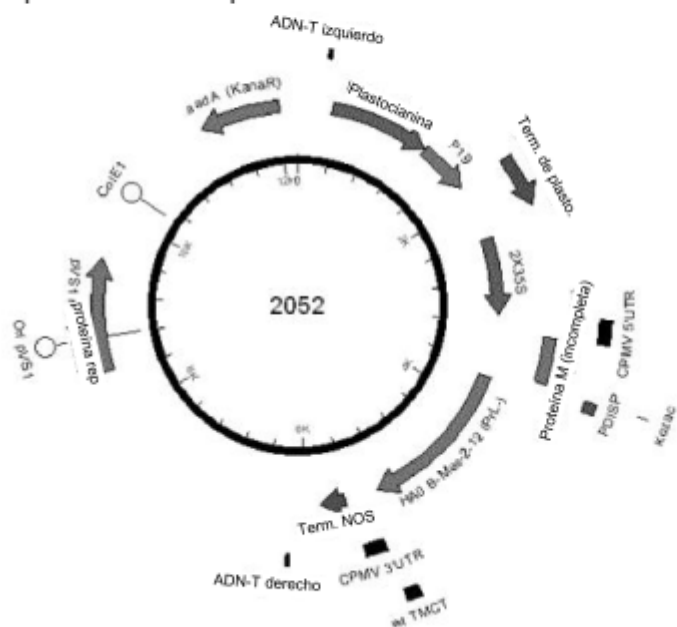
Figura 39B, SEQ ID NO: 108

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachussetts (PrL-).

MAKNVAIFGLLFSLVLPVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGVIPLTTPTKSYFANLKGTKTRGKLCPCD
LNCTDLVDVALGRPMC VGTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLANLLRGYENIRLSTQNVDAEKA PGGPYRL
GTS GSCPNATSKSGFFATMAWAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICAEGEDQITVWGFHSDNKTQMKNLYGDSNPQKFTSS
ANGVTTHYVSQIGGFPDQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIGEAD
CLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPGGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKS
TQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKL
KKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTILLYYSTAASSLAVTL
MLAIFIVYMVSRD NVSCSICL*

Figura 39C

Representación esquemática de la construcción número 2052 (2X35S/CPMV HT*)



N- 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 2074) y HT* (construcción núm. 2062) para PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT

Figura 40A, SEQ ID NO: 109

Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT.

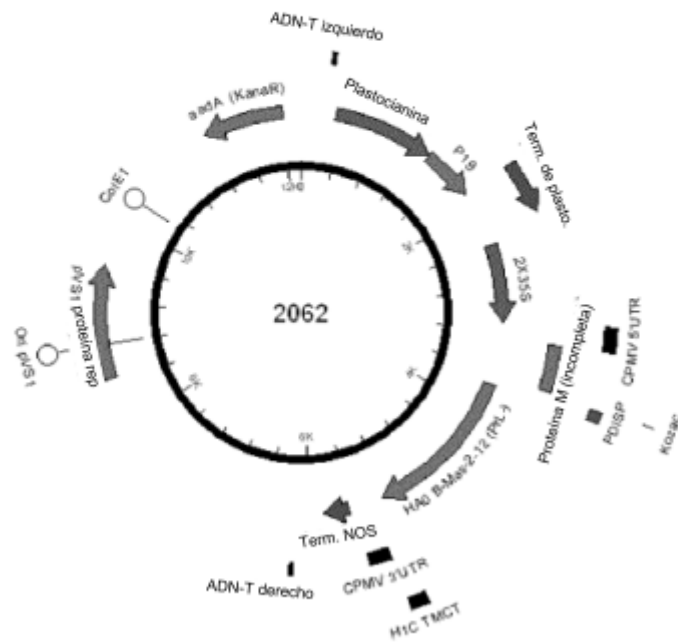
ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGA
ATCTGCACTGGGATAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTG
GTGTGATACCACTAACAAACACCAACAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAAGACCAGAGGGGAAAC
TATGCCCAGACTGTCTCAACTGTACAGATCTGGATGTGGCCCTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGAACACACCTTC
TGCAGAAAGCTTCAATACTTCACGAAGTCAGACCTGTTACATCCGGGTGCTTCCCTATAATGCACGACAGAACAAAA
ATCAGGCAACTAGCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAACCCAAAACGTTATCGATGCAGAA
AAGGCACAGGAGGACCTACAGACTTGGAACTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAAAAGCGGATTTTTC
GCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAATGCAACGAACCCATTAACAGTAGAAGTACCATAC
ATTTGTGCAGAAAGGGGAAGACCAAAATTACTGTTTGGGGGTTCCATTCAGATAACAAAACCCAAATGAAGAACCTC
TATGGAGACTCAAATCCTCAAAAGTTACCTCATCTGCTAATGGAGTAACACACATTATGTTTCTCAGATTGGCG
GCTTCCAGATCAAAACAGAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGAAATTGTCGTTGATTACATGATGCAAAAAAC
CTGGGAAAACAGGAACAATTGCTATCAAAAGAGGTGTTTGTGCTCAAAAAGGTGTGGTGCGCGAGTGGCAGGA
GCAAAGTAATAAAAGGGTCCTTGCCTTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACA
AAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAAACACCTTTGA
AGCTTGCCAATGGAACCAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACA
CATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTTGCTGCAGACCTTAAGAGCACACAAGAAAGCTATAACAAGATAACAA
AAAATCTCAACTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAATCTTCAAAGGCTAAGTGGTGCCATGGATGAACCTCCACA
ACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGACCTCAGAGCTGACACTATAAGTTACAAATAGAACTTGACAG
TCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAACTAAAGAAAA
TGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGACATAGGAAATGGATGCTTCGAAACCAACACAAATGCAACCAGACCTGCTTAG
ACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAGTTTTCTCTCCCACTTTTGATTTCATTGAACATTACTGCTGCA
TCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTGCCAGTTCATTGGTACTGGT
AGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTAA

Figura 40B, SEQ ID NO: 110

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT.

MAKNVAIFGLLFSLVLPVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSYFANLKGTKTRGKLCPCDC
LNCTDLVALGRPMCVGTTTPSAKASILHEVRPVTSKCFPIIMHDRTKIRQLANLLRGYENIRLSTQNVIDAEKAPGGPYRL
GTSGSCPNAATSKSGFFATMAWAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICAEQEDQITVWGFHSDNKTQMKNYLGDSNPQKFTSS
ANGVTTHYVSQIGGFDPQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIKSLPLIGEAD
CLHEKYGGLNKSPPYTGHEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPGGGWEGMAGWHGYTSHGAHGVAAADLKS
TQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILEDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKL
KKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSLNTAASLNDGGLDNYQILAIYSTVASSLVLVV
SLGAISFWMCNSGLQCRICI*

Figura 40C Representación esquemática de la construcción número 2062 (2X35S/CPMV HT*)



O- 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1445), HT* (construcción núm. 1839), HT*(-Mprot) (construcción núm. 1820) y HT(f15'UTR) (construcción núm. 1975) para HA B Wisconsin (PrL-)

Figura 41 A, SEQ ID NO: 111

Secuencia de nucleótidos de HA B Wisconsin (PrL-).

ATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCTTCAA
ACTCACCTCATGTGGTCAAAACAGTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGCGTGATACCACTGACAACAACAC
CAACAAAATCTTATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGAACTATGCCCGGACTGTCTCAACTGTA
CAGATCTGGATGTGGCCTTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGGACCACACCTTCTGCTAAAGCTTCAATACTCCACGA
GGTCAGACCTGTTACATCCGGGTGCTTCTCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAGGCAACTACCCAATCTTCTC
AGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAACCCAAAACGTTATCGATGCAGAAAAAGCACCAGGAGGACCCTACAGA
CTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAAAATCGGATTTTGTCAACAAATGGCTTGGGCTGTCCAA
AGGACAACCTACAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGGGAAGACCAA
ATTACTGTTTGGGGGTTCCATTGAGATAACAAAACCCAAATGAAGAGCCTCTATGGAGACTCAAATCTCTAAAAAGT
TCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACACACATTATGTTTCTCAGATTGGCGACTTCCAGATCAACAGAAAGACGG
AGGACTACCACAAAGCGGCAGAAATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAAACAGGAACAATTGTCTA
TCAAAGAGGTGTTTTGTTGCTCAAAAGGTGTGGTGCGCAGTGGCAGGAGCAAAAGTAATAAAAGGGTCATTGCC
TTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGA
ACATGCAAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTAAAAACACCTTTGAAGCTTGCCAATGGAACCAAAATATAG
ACCTCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGC
AGTGGCGGCAGACCTTAAGAGTACACAAGAAAGCTATAAATAAGATAACAAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCT
AGAAGTAAAGAACCTTCAAAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAATCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAA
AGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCACAAATAGAAGTTCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATA
AACAGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAACTAAAGAAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGACATA
GGAAACGGATGCTTCGAAACCAACACAAATGCAACAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAAT
GCAGGAGAATTTCTCTCCCACTTTTGATTGATTGAACATTACTGCTGCATCTTAAATGATGATGGATTGGATAA
CCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTTCTAGTTTGGCTGTAACATTAATGCTAGCTATTTTATTGTTTA
TATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTCTATAA

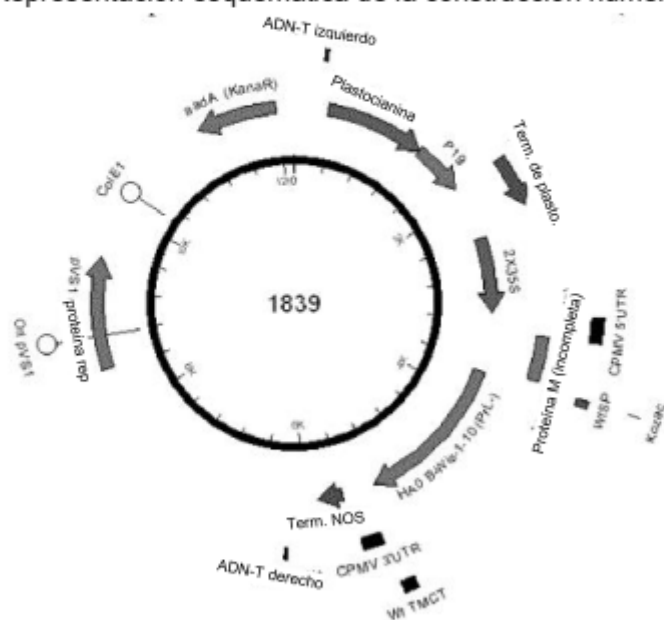
Figura 41B, SEQ ID NO: 112

Secuencia de aminoácidos de HA B Wisconsin (PrL-).

MKAIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSYFANLKGTRTRGKLCPDCLNCTDLDV
ALGRPMC VGTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIHMDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEKAPGGPYRLGTSGSCP
ATSKIGFFATMAWAVPKDNYKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMKSLYGDSNPQKFTSSANGVTTHY
VSQIGDFPDQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQGVLLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGG
LNKSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKANGTKYRPPGGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKIT
KNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILEDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSA
VDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSLNTAASLNDGDLNHTILYYSTAASSLAVTLMIAIFIVY
MVS RDNVSCISL*

Figura 41C

Representación esquemática de la construcción número 1839 (2X35S/CPMV HT*)



P- 2X35S/CPMV HT (construcción núm. 1454) y HT* (construcción núm. 1860) para HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT

Figura 42A, SEQ ID NO: 113

Secuencia de nucleótidos de HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT

ATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAACATCTTCAA
ACTCACCTCATGTGGTCAAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGCGTGATACCACTGACAACAACAC
CAACAAAATCTTATTTTGCAAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGAACTATGCCCAGGACTGTCTCAACTGTA
CAGATCTGGATGTGGCCTTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGGACCACACCTTCTGCTAAAGCTTCAATACTCCACGA
GGTCAGACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAAACAAAAATCAGGCAACTACCCAATCTTCTC
AGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAACCCAAAACGTTATCGATGCAGAAAAAGCACCAGGAGGACCCTACAGA
CTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAAATCGGATTTTTTGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAA
AGGACAACCTACAAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGGGAAGACCAA
ATTACTGTTTGGGGGTTCCATTACAGATAACAAAACCCAAATGAAGAGCCTCTATGGAGACTCAAATCTCAAAAAGT
TCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACACACATTATGTTTCTCAGATTGGCGACTTCCCAGATCAAAACAGAAGACGG
AGGACTACCACAAAGCGGCAGAAATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAAACCTGGGAAAAACAGGAACAATTGTCTA
TCAAAGAGGTGTTTTGTTGCCTCAAAAGGTGTGGTGCGGAGTGGCAGGAGCAAAAGTAATAAAAGGGTCATTGCC
TTTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGA
ACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTAAAAACACCTTTGAAGCTTGCCAATGGAACCAAAATATAG
ACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCAGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGC
AGTGGCGGCAGACCTTAAGAGTACACAAGAAGCTATAAATAAGATAACAAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCT
AGAAGTAAAGAACCTTCAAAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAATCCCAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAA
AGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCACAATAGAACTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATA
AACAGTGAAGACGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAACTAAAGAAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGACATA
GGAAACGGATGCTTCGAAACCAAAACACAAATGCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAAT
GCAGGAGAATTTCTCTCCCACTTTTGATTCAATTGAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAA
CTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTGCGCCAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCT
GGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAA

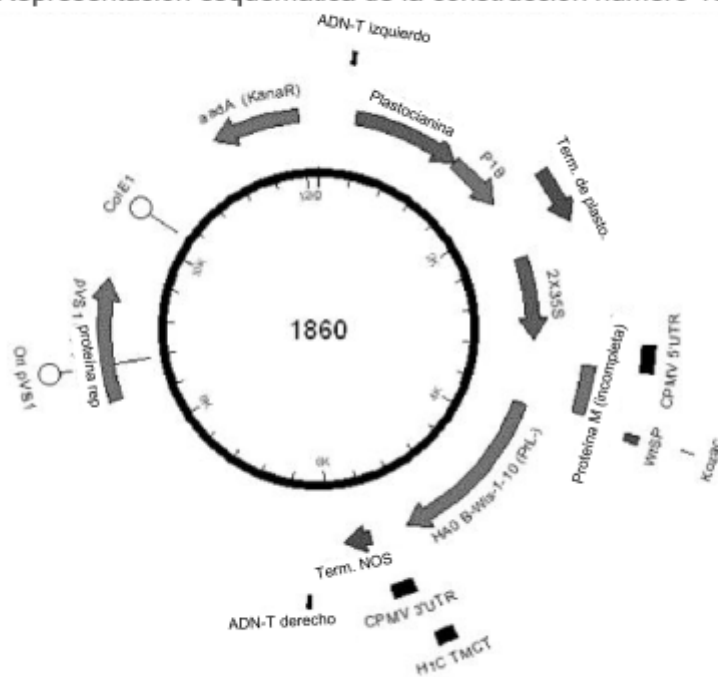
Figura 42B, SEQ ID NO: 114

Secuencia de aminoácidos de HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMC.

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSYFANLKGTRTRGKLCPDCLNCTDLVDV
ALGRPMC VGTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVDAEKAPGGPYRLGTSGSCP
ATSKIGFFATMAWAVPKDNYKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMKSLYGDSNPQKFTSSANGVTTHY
VSQIGDFPDQTEGGGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGG
LNKSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPGGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKIT
KNLNSLSELEVNQLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSA
VDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSLNTAASLNDGDLDNYQILAIYSTVASSLVLVSLGAISFW
MCSNGSLQCRICI*

Figura 42C

Representación esquemática de la construcción número 1860 (2X35S/CPMV HT*)



2X35S/CPMV HT (construcción núm. 489), HT*(-Mprot) (construcción núm. 1880) y HT(5'UTR) (construcción núm. 1885) para H5 Indonesia

Figura 43A

Secuencia de nucleótidos de H5 Indonesia nativa. (SEQ ID NO: 115)

```
ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAA
CAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGA
CACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTC
CTCGGGAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAA
TGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGA
AAATTCAAATCATCCCCAAAAGTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCAGCATGTCCATACCTG
GGAAGTCCCTCCTTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTA
CAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTGGTACTGTGGGGAATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGC
TATATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCATTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAAATAGCTACT
AGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTT
CGAGAGTAATGGAATTTTCAATGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAA
GTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCAC
AACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCAACAGGGCTCAG
AAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTATAGAGGGAGGAT
GGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAA
TCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCAATCATTGACAAAAATGAACACTCAGTTTGAGGC
CGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATG
TCTGGACTTATAATGCCGAACCTCTGGTTCTCATGGAATAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTTAAG
AACCTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCA
CAAATGTGATAATGAATGTATGGAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTATCCGCAGTATTGAGAAGAAGCAAGAT
TAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACCTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTG
GCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAG
AATTTGCATTTAA
```

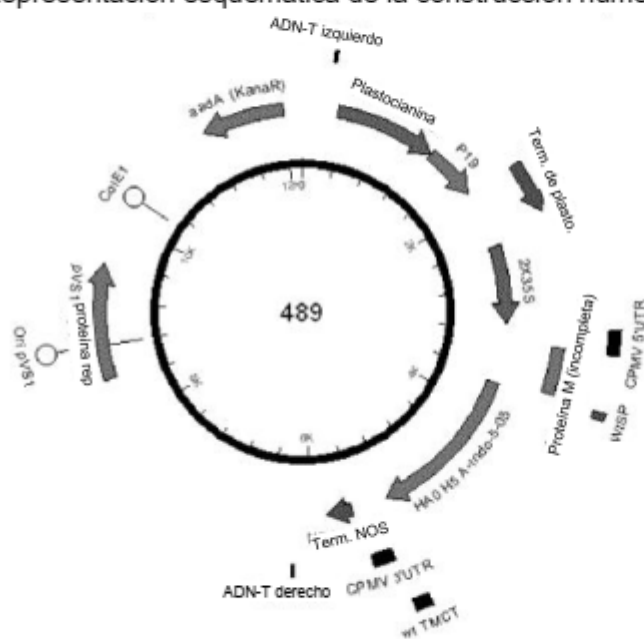
Figura 43B

Secuencia de aminoácidos de H5 Indonesia nativa. (SEQ ID NO: 116)

```
MEKIVLLLAIVSLVKSQDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAGWL
LGNPMCDEFINPEWSYIIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLISRINHFEKIQIIPKSSWSDEASSGVSSACPYL
GSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVLPKIAT
RSKVNQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKQCTPMGAINSSMPFH
NIHPLTIGECPKYVKSRLVLTGLRNSPQRESRRKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKE
STQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVK
NLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTV
ASSLALAIMMAGLSLWMCNGLQCRICI*
```


Figura 43C

Representación esquemática de la construcción número 489 (2X35S/CPMV HT)



2X35S/CPMV-HT*(-Mprot)/PDISP/H3 Victoria/NOS (Construcción número 1800)

Figura 44A

IF**(SacII)-PDI.s1+4c

ACAGGGCCCAATACCGCGGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCT (SEQ ID NO: 117)

Figura 44B

IF-H3V36111.s1-4r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTCAAATGCAAATGTTGCACCTAATGTTGCCCTT (SEQ ID NO: 118)

Figura 44C

Secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Victoria. (SEQ ID NO: 119)

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCCCAAAA
 ACTTCTCTGGAAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAAACGGAACGATAGTGAAAA
 CAATCAGCAATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAATTCCTCAATAGGTGAAATATGCGAC
 AGTCCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACCTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCCTCAGTGTGATGGCTT
 CCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGAAGCAAAGCCTACAGCAACTGTTACCCCTTATGATGTGCCGGATT
 ATGCCTCCCTTAGGTCAGTGTGCCTCATCCGGCACACTGGAGTTTAAACAATGAAAGCTTCAATTGGACTGGAGTC
 ACTCAAAACGGAACAAGTTCTGCTTGCATAAGGAGATCTAATAATAGTTTCTTTAGTAGATTAAATTGGTTGACCCA
 CTTAAACTTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACAATGAACAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGG
 TTCACCACCCGGGTACGGACAAGGACCAAATCTTCCTGTATGCTCAATCATCAGGAAGAATCACAGTATCTACCAA
 AGAAGCCAACAAGCTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAATAAGGAATATCCCTAGCAGAATAAGCATCTA
 TTGGACAATAGTAAACCGGGAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTCA
 AAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCCA
 AATGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTCCAAATGTAAACAGGATCACATACGGGGCCTGTCCCAGATATGTTAA
 GCAAAGCACTCTGAAATTGGCAACAGGAATGCGAAATGTACCAGAGAAACAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATAG
 CGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGTTTCAGGCATCAAAATTCGAGGGAAGA
 GGACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAAATCAATGGGAAGCTGAATCGATTGATCGGGAA
 AACCAACGAGAAATTCATCAGATTGAAAAAGAATTCTCAGAAGTCGAAGGGAGAATTCAGGACCTTGAGAAATATG
 TTGAGGACACTAAAAATAGATCTCTGGTCATACACGCGGAGCTTCTTGTGCCCCTGGAGAACCAACATACAATTGAT
 CTAAGTACTCAGAAATGAACAACTGTTTGAATAAAACAAAGAGCAACTAAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAA
 TGGTTGTTTCAAAATATACCACAAATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACCTTATGACCACGATG
 TATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCGGTTCCAGATCAAGGGAGTTGAGCTGAAGTCAGGGTACAAAGATTGGATC
 CTATGGATTTCTTTGCCATATCATGTTTTTTGCTTTGTGTTGCTTTGTTGGGGTTTCATCATGTGGGCCTGCCAAA
 GGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATTGTA

Figura 44D

Representación esquemática de la construcción 2171. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

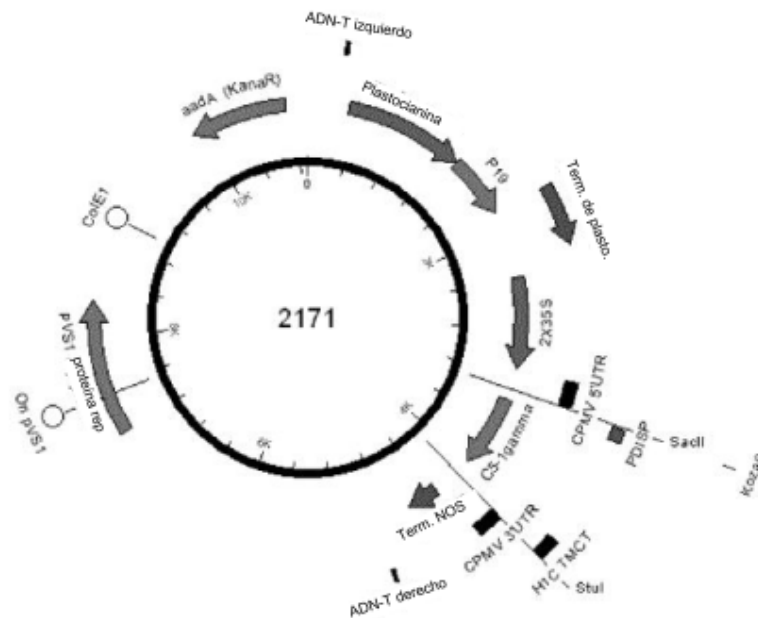


Figura 44E

Construcción 2171 desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT*(-Mprot)/NOS con casete de expresión de inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina (SEQ ID NO: 120)

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACTTAATAACACATTGCCGACGTTTTTAATGTACT
GAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTTAAGTTAGCA
AGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAAACATTAGAGTAAAGAA
ATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTGCAACATTTGAGAAAATTTTGTGTTCT
CTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAG
AAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAAATAAGGG
TTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAGAA
AAAGAAATAAATTATTTTAAATTAAGGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGA
GTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGC
CCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAA
AAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCA
ATCCAACCAATCACAAACATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAA
ATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCATTCTATAAAAAATCACA
CTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAG
AGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGAACAAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGA
GGTACCCTTCTCCCTTCAAACCTTCTGACGAAAGTCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGTACATAACGATGAGACGAA
TTCGAATCAAGATAAATCCCTTGGTTTCAAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGAT
ACGACAGGACGGAAGCTTCACTGCACAGAGTCTTGGATCTTGGACGGGAGATTTCGGTTAACTATGCAGCATCTCGA
TTTTTCGGTTTCGACCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCCTTCTGGAGGGTC
GCGAATCTTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAAGTCTACAGCTTGCCCCAATCGAAGTGG
AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAATGCTTCTT
CGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATG
AAATACTATTTGTATGAGATGAAGTGGTGTAAATGTAATTCATTACATAAGTGAGTCAAGATCAGAAATGTTTCTC
CATACTAACTAGACATGAAGACCTGCCGCTACAATTTGTCTTATATTTGAACAACTAAAATGAACATCTTTTGCC
ACAACCTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAGTTATCG
AAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACCTACTAATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAA
TTAGGAAGGAGCATGCTCCGCTAGGAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGCAAGCTGCTCTAGCCGTGTAGCCAA
TACGCAACCGCCTCTCCCGCGCGTGGGAATTTACTAGCGCGTGTGACAAAGCTTGCATGCGGTCAACATGGTGG
AGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAGGGCAATTGAGACTTTTCAA
CAAAGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAA
GGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTCTGCCGACAGTGGTC
CCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAAGAACGTTCCAACACGCTCTCAAAGCAAGTGGAT
TGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAG
GGCAATTGAGACTTTTCAAACAAAGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTTCACTTTTA
TTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGAT
GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAAGAACGTTCCAACAC
GTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAG
ACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGTTTTGATAAAAGCGAACG
TGGGGAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCACTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTCTTGTCTTCTTGT
CGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTGGCACCCAGTACAGGGCCCAATACCGCGGAGAAAAATGGCGAAA
AACGTTGCGATTTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCTTCTCAGATCTTCGCGACGTCACCTCAG
CCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGA
TGCTTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACAC
CTTCCAGCTGTCTGACGTCGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCG
AGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTTGCCAGGGATTGTGGT
TGTAAGCCTTGCAATGTACAGTCCAGAGATCATCTGTCTTCACTCTTCCCCCAAGCCCAAGGATGTGCTCAC
CATTACTCTGACTCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTACAGTGGT
TTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTC
AGTGAACCTTCCCATCATGCACAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGACGTCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTC
GCCAGTTCAATGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAG
AATATGTATTTAAAGCCATTTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGG
TTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCTGCCCTCA

GCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTTATTAATAAAGACCGGGAATTGATATCAAGCTTATCGA
 CCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCAT
 ATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTA
 TGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCG
 CGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGTCTGGCGCGCCACGTGACTAGTGGCACTGGCCGT
 CGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCA
 GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGC
 AGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTAACTATCAGTGTTGACAGGATATATTGGCGGGT
AAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTA

Figura 44F

Casete de expresión número 1800 del promotor 2X35S al terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Victoria está subrayada. SEQ ID NO: 121

GTCAACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTT
 TCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAG
 GTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC
 CCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCA
 CGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATAT
 CCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGC
 CATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCAT
 CGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAAT
 CCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGGTTTTGATAA
 AAGCGAACGTTGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTCTCTCTGTCTTTCTTG
 CGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAGGGCCCAATACCGCGGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCG
 ATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCTCTCAGATCTTCGCCCAAAACTTCTCGGAAATGACAACAGCAGCGG
 AACGCTGTGCTTGGGACCATGCACTACCAACCGAACGATAGTGAACCAATCAGCAATGACCAAAATTGAAGTTACTAATGCTA
 CTGAGCTGGTTAGAAATTCCTCAATAGGTGAAATATGCGAGTCTCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAAGTGCACACTAATAGAT
 GCTCTATTGGGAGACCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAAAAGAAATGGGACCTTTTGTGAACGAAGCAAGCCTACAGCAACTG
 TTACCTTATGATGTGCCGATTATGCTCCCTTAGGTCAGTGTGCTCATCCGGCAGCTGGAGTTTAAACATGAAGCTTCA
 ATTGGACTGGAGTCACTCAAAACCGAACAGTTCTGCTGCATAAGGAGATCTAATAATAGTTTCTTTAGTAGATTAAATGGTTG
 ACCCACTTAACTTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACATGAACAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTCA
 CCACCGGGTACGGAAGGACCAAACTCTTCTGTATGCTCAATCATCAGGAAGAATCAGAGTATCTACCAAAAGAACCAACAAAG
 CTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAATAAGGAATATCCCTAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAAACCGGGA
 GACATACTTTTGATTAAACAGCAGAGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAATTAATGAG
 ATCAGATGCACCCATTGGCAATGCAATCTGAATGCATCACTCCAATGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTCCAAAATGTAA
 ACAGATCACATACGGGGCTTCCAGATATGTTAAGCAAGGACCTCTGAAATTTGGCAACAGGAATGCGAAATGTACAGAGAAA
 CAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATAGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGTTTCAGGCA
 TCAAAATCTGAGGGAGAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAAATCAATGGGAAGCTGAATCGAT
 TGATCGGGAACCAACGAGAAATCCATCAGATTGAAAAAGAAATCTCAGAAGTCAAGGGGAGAAATTCAGGACCTTGAGAAATAT
 GTTGAGGACTCAAAATGCTCTGCTATACAAACGCGAGCTTCTGTTGTCCTGGAGAACCAACATACAAATGATCTAATGATCTA
 CTCAGAAATGAACAACTGTTGAAAAAACAAGAAGCACTAAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGGTTGTTTCAAAATAT
 ACCCAAAATGTGACAAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACCTTATGACCACGATGTATACAGAGATGAAGCATTAAACAAC
 CGGTTCCAGATCAAGGGAGTTGAGCTGAAGTCAGGGTACAAAGATTGGATCCTATGGATTTCCCTTGGCCATATCATGTTTTTGCT
 TTGTTGCTTTGTTGGGGTTTCATCATGTGGGCTTGCACAAAGGGCAACATTAGGTGCAACATTGCATTGGAAGGCCATTTTCT
 TTAGTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTATGTAAT
 TTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTTATTAATAAAGAAAAA
 AAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGT
 TGCCGGTCTTGCAGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTAGCTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTA
 TGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAA
 TTATCGCGCGGGTGTCTATGTTACTAGAT

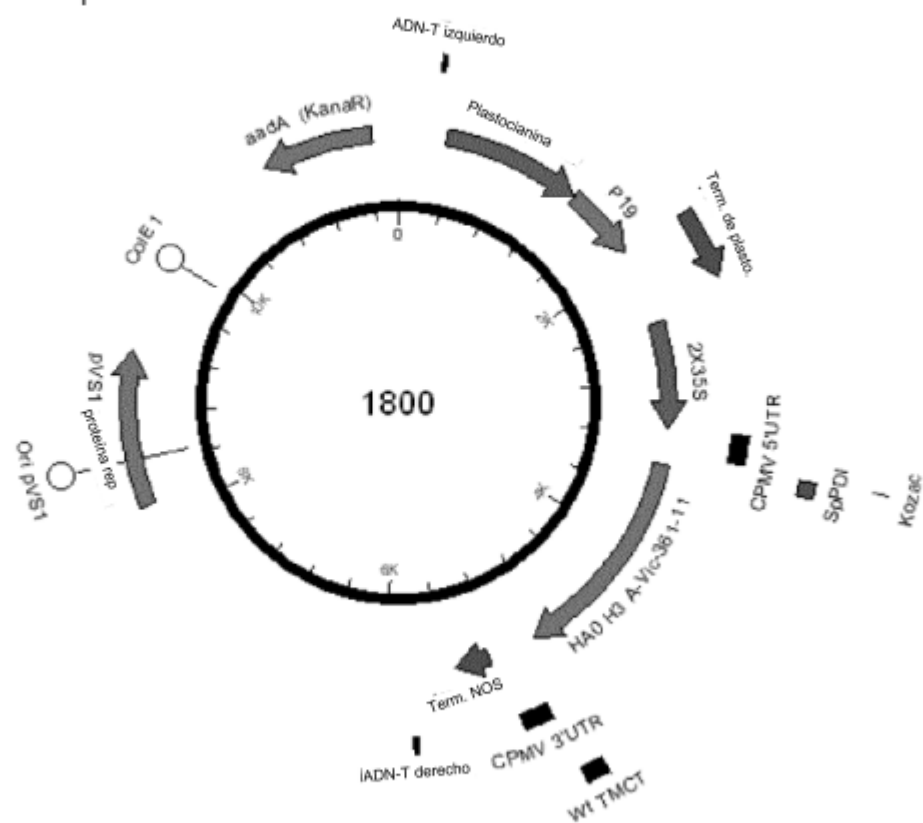
Figura 44G

Secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 Victoria (SEQ ID NO: 122)

MAKNVAIFGLLFLVLVPSQIFAQKLPNGNDSTATLCLGHVAVPNGTIVKTIITNDQIEVTNATELVQNSSIGEICDSPHQILDGE
 NCTLIDALLGDPQCDGFQNKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFNWGTQNGTSSACIRRSNNSSF
 SRLNLWTLNFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKQDIFLYAQSSGRITVSTKRSQQAVIPNIGSRPRIRNIPSRISIYW
 TIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGISIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGM
 RNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRI
 QDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFKTKKQLRENAEDMNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYR
 DEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIWMAQKGNIRNCICI*

Figura 44H

Representación esquemática de la construcción número 1800



2X3B-2X35S/CPMV-HT*/ PDISP/H3 Victoria/ NOS (Construcción número 1819)

Figura 45A

IF(SacII)-Kozac_PDI.c

GTCGGGGCCCAATACCGCGGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTC (SEQ ID NO: 123)

Figura 45B

IF-H3V36111.s1-4r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTCAAATGCAAATGTTGCACCTAATGTTGCCCTT (SEQ ID NO: 124)

Figura 45C

Representación esquemática de la construcción 2181. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

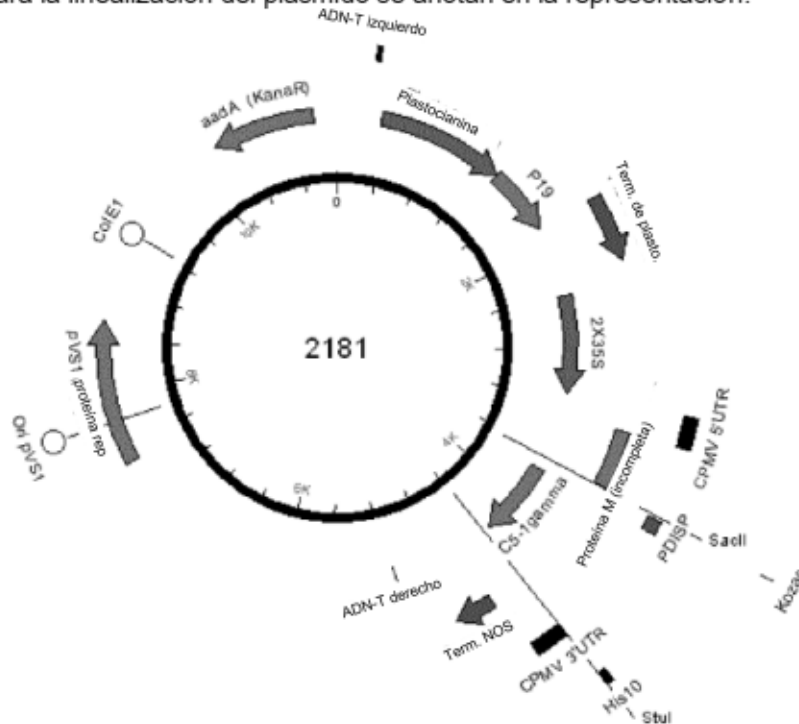


Figura 45D,

Construcción 2181 desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV-HT*/NOS con casete de expresión de inhibidor de silenciamiento de plastocianina-P19-plastocianina (SEQ ID NO: 125)

TGGCAGGATATATTGTTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTAATGTACTGAATTAACG
CCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATATAAAGTTTAAGTTAGCAAGTGTGTACATTTTACT
TGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTG
ATATTTTGACAAACAATTTGTTGCAACATTTGAGAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAA
AGGAAGAGGGGAGAATAAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAAATAGTTGTACAAATATCATT
GAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGA
ATTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTAAAAATTAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAAT
GAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATAT

ATTGCCCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAAA
 AAAACGGTATATTTACTAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCA
 CAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAAATCACACATTTCTCCACACATC
 TGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCTTTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAA
 ACACATACAAAGAGAAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAACGAGCTATACAAGGAAACGACGCTAGGGA
 ACAAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGAGGTACCCTTCTCCCTTCAAACCTCTCTGACGAAAGTCCGAGTTGGACTG
 AGTGGCGGCTACATAACGATGAGACGAATTCGAATCAAGATAATCCCTTTGGTTTCAAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTA
 TTAAAGAGATATCTCAGATACGACAGGACGGAAGCTTCACTGCACAGAGTCTTGGATCTTGGACGGGAGATTCCGGTTAACTATGC
 AGCATCTCGATTTTTCGGTTTCGACCAGATCGGATGTACCTATAGTATTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGT
 CGCGAACTCTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAACTGCTACAGCTTGCCCAATCGAAGTGGAAGTAAT
 GTATCAAGAGGATGCCCTGAAGGTACTCAAACCTTCGAAAAAGAAAGCGAGTAAGTTAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTATTAAT
 ATGGTTTGTATTGTAAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTGTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAAGT
 GTGTAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAAATCAGAAATGTTTCTCCATAACTAAGTAGACATGAAGACCTGCCCGGTACA
 ATTGTCTTATATTTGAACAACTAAATTTGAACATCTTTGCCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGT
 TCAATAGATTAAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCAGTAATCAACTTAACGTTTATTACTACTTTTATATATCTATATCCC
 CTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGCATGCTCGCTAGGAGATTGTCTGTTTCCCGCTTCAGTTTGCAAGCTGCTC
 TAGCCGTGTAGCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTGGGAATTACTAGCGCGTGTGACAGCTTGATGCCGGTCAACA
 TGGTGGAGCACGACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAA
 AGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTC
 CTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCCACCCA
 CGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAGCGTTCCAACACGCTCTCAAAGCAAGTGGAATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACA
 CTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAA
 CCTCCTCGGATTCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATT
 GCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCCACCCAGGAGCATCGTGGAA
 AAAGAAGACGTTCCAACACGCTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCACTGACGTAAGGGATGACGCAATCCCACTA
 TCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAA
 CGTGGGAAACCCGAACCAACCTTCTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTTGTCTTCTTCTGCGTGAGC
 GATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGTCTCGGCACAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAGATCTCTTTGTGGACAC
 GTAGTGGCGGCCATTAAATAACGTGTACTGTCTATTCTGTGCGTGTGGTCTTGGGAAAGAAAGCTTGCTGGAGGCTGCTGT
 TCAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCC
 GTACTTCTTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAAACAGAGTTTCCCGTGGTTTTCGAA
 CTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAATTTGTGGGCCCAATACCGCGGAGAAAATGGCGAAAACGTTGCG
 ATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTCTTGTGTTGGTTCTTCTCAGATCTTTCGCGACGTCACCTCAGCCAAAACGACACCCCAT
 CTGCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACTAATCCATGGTGACCTGGGATGCCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAG
 CCAGTGACAGTGAACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGACGCTGACCTTACACTCT
 GAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCCGGCCAGCAGCACCAGG
 TGGACAAAGAAATTTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAAGCCTTGCAATGTACAGTCCAGAAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCC
 CCAAGGCCAAGGATGTGCTCACCATTACTGACTCCTAAGGTACAGTGTGTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCGAGGT
 CCAGTTCACTGTTGTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCT
 CAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGCGATCGCTCACCATCACCATCACCATCACCATCACC
 ATTAAGGCCATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAAGCGTTTCTGTGCTCAGAGT
 GTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTACAGGTCGTCCCTCAGCAAGGACACAAAAGATTTTAATTT
 TATTAAAAAAGAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAACATTTGGCAATAAAGTTT
 CTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGT
 AATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAATATAG
 CGCGCAAACTAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCTATGTATTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCACGTTGACT
 AGTGGCACTGGCGCTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTT
 TCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGC
 TTGAGCTTGGATCAGATTGTCTGTTCCCGCTTCAGTTTAACTATCAGTGTGTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGA
AAAGAGCGTTTA

Figura 45E

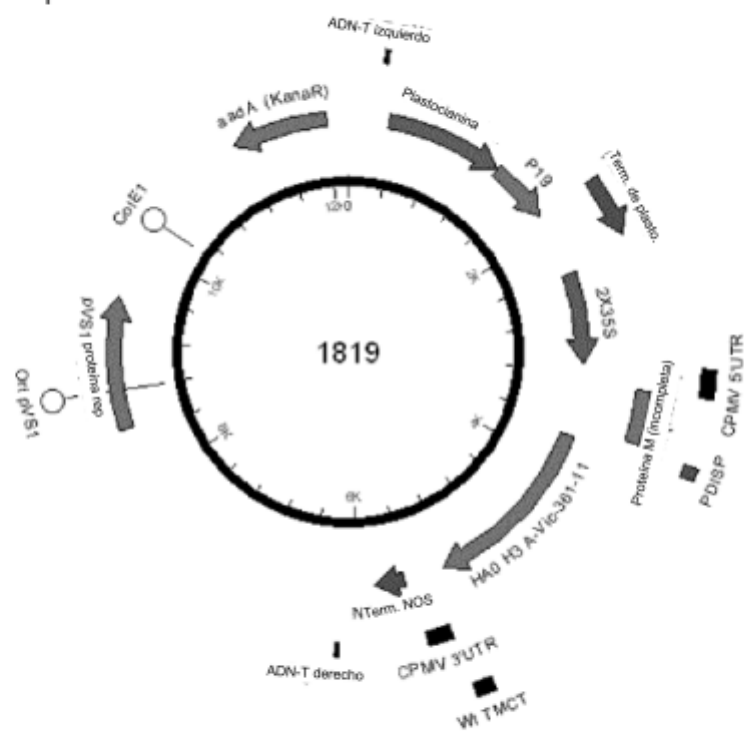
Casete de expresión número 1819 del promotor 2X35S al terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Victoria está subrayada. (SEQ ID NO: 126)

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAGGGCAATTGAGACTTT
 TCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAG
 GTGGCTCCTACAAATGCCATCATTCGATATAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTGCGGACAGTGGTCCCAAGATGGACCC
 CCACCCAGGAGGATCGTGGAAAAGAGAGCTTCAAGTCAAGTCTTCAAAGCAAGTGGAATTGATGATAACATGGTGGAGCA
 CGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATAT
 CCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGC
 CATATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCCACCCAGGAGCAT
 CGTGGAAAAGAGAGCTTCCAACACGCTTCAAAGCAAGTGGAATTGATGTGATATCTCACTGACGTAAGGGATGACGCAAT

CCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCAATTTTCATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTTTGATAA
 AAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTG
 CGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCTAGATCGTGCTTCGGCACCAAGTACAAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTG
 TGGACACGTAGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTATTTCTTGTCTGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTCTGGAGG
 CTGCTGTTTACGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGAGGTATT
 GTTGCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGTCTGATTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGT
 TTTTGAACCTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCAAATTTGTCTGGGCCCAATACCGCGGAGAAAATGGCGAAAAA
 CGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCTTCTCAGATCTTCGCCCAAAAACCTTCTTGGAAATGACAACA
 GCACGGCAACGCTGTGCTTGGGCACCATGCAGTACCAAAACGGAACGATAGTGAAAAACAATCACGAATGACCAAAATGAAGTTACT
 AATGCTACTGAGCTGGTTTCAAGATTCCTCAATAGGTGAAATATGCGACAGTCTCTCATCAGATCCTTGATGGAGAAAACCTGCACACT
 AATAGATGCTCTATTGGGAGACCCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATAGAAATGGGACCTTTTGTGTAACGAAGCAAAGCCTACA
 GCAACTGTTACCCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTGCCTCATCCGGCACACTGGAGTTTAAACAATGAA
 AGCTTCAATTGGACTGGAGTCACTCAAAACGGAACAAAGTCTGCTTGCATAAGGAGATCTAATAATAGTTTCTTTAGTAGATTAAA
 TTGGTTGACCCACTTAAACTTCAAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACAATGAACAATTTGACAAATTTGTACATTTGGG
 GGGTTTACCACCCGGGTACGACAAAGGACCAATCTTCTGTATGCTCAATCATCAGGAAGAATCACAGTATCTACCAAAAGAAGC
 CAACAAGCTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAATAAGGAATATCCCTAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAAA
 ACCGGGAGACATATTTTGATTAAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCTAGGGGTACTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTCAA
 TAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAAATGCAATTTCTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATTCCCAATGACAAACCATTCCAA
 AATGTAAACAGGATCACATACGGGGCTGTCCAGATATGTTAAGCAAAGCACTCTGAAATTTGGCAACAGGAATGCGAAATGTACC
 AGAGAAACAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATAGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGTT
 TCAGGCATCAAAATCTGAGGGAAGAGGACAAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAATCAATGGGAAGCTG
 AATCGATTGATCGGGAAAACCAACGAGAAATTCATCAGATTGAAAAAGAAATCTCAGAAGTCGAAGGGAGAATTCAGGACCTTGA
 GAAATATGTTGAGGACACTAAAATAGATCTCTGGTCATACAACGCGGAGCTTCTTGTGCTTGGAGAACCAACATACAATTGATC
 TAACTGACTCAGAAATGAACAAACTGTTTGAAAAAACAAAGAACAACTAAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGGTTGTTTC
 AAAATATACCACAAATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACCTTATGACCACGATGTATACAGAGATGAAGCATT
 AAACAACCCGTTCCAGATCAAGGGAGTTGAGCTGAAGTCAGGTACAAAGATTGGATCCTATGGATTTCTTTGCCATATCATGTT
 TTTTGCTTTGTGTTGCTTTGTGGGGTTTCATCATGTGGGCTGCCAAAAGGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATTTGAAGGCCT
 ATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTT
 ATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCTGCCCTTTCAGCAAGGACACAAAAGATTTTAATTTTATTAATAA
 AAAAAAAGAACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGA
 ATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACG
 TTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTA
 GGATAAATATCGCGCGGGTGTCTATGTTACTAGAT

Figura 45F

Representación esquemática de la construcción número 1819



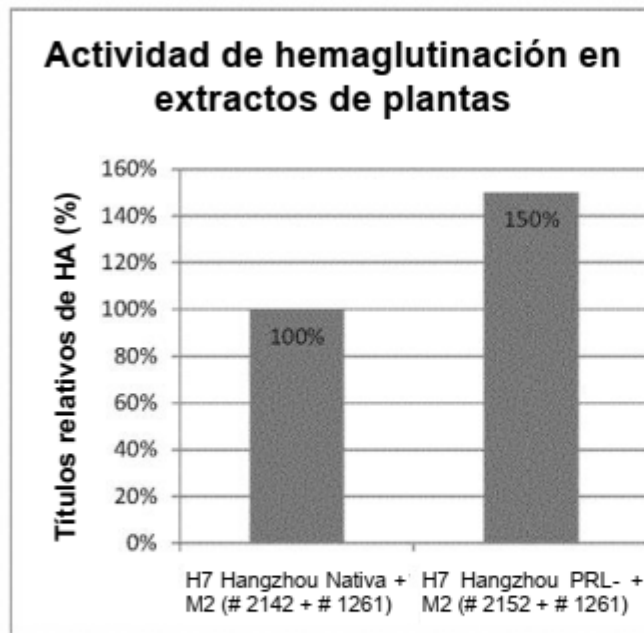


Figura 46A

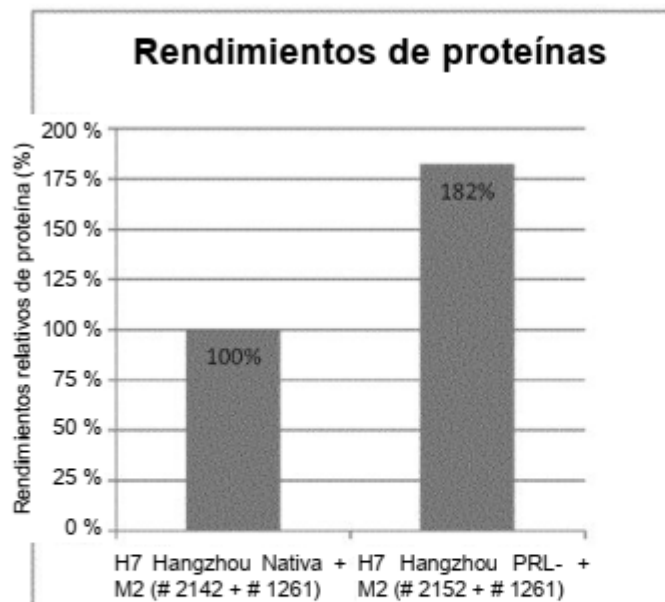


Figura 46B

Figura 46C

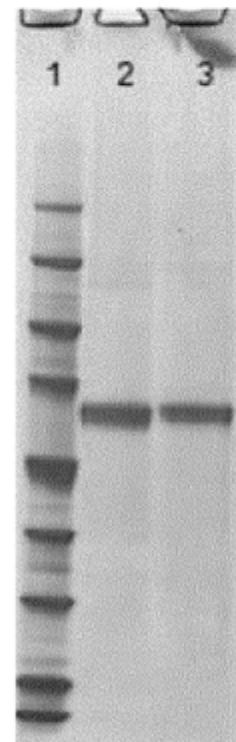


Figura 47A

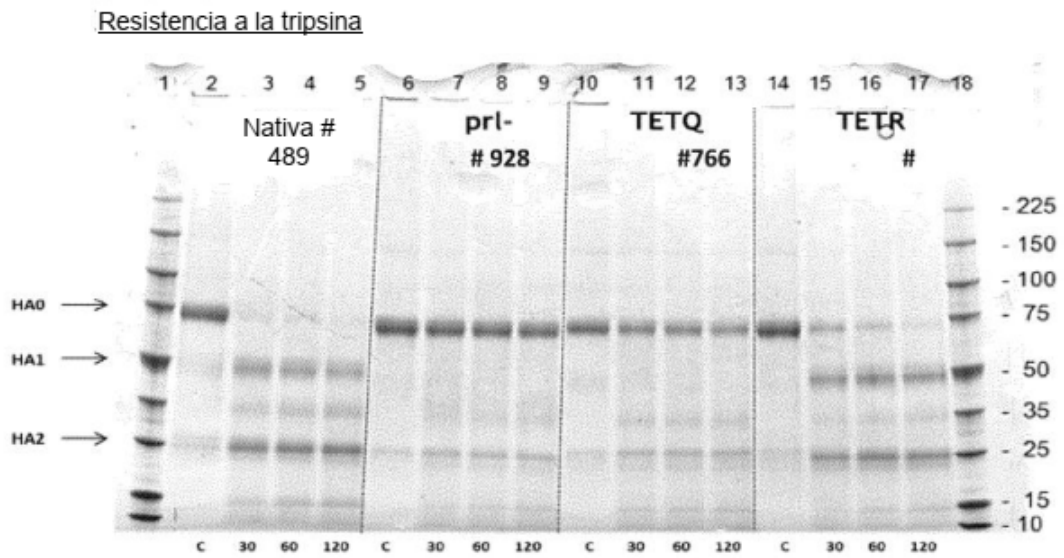
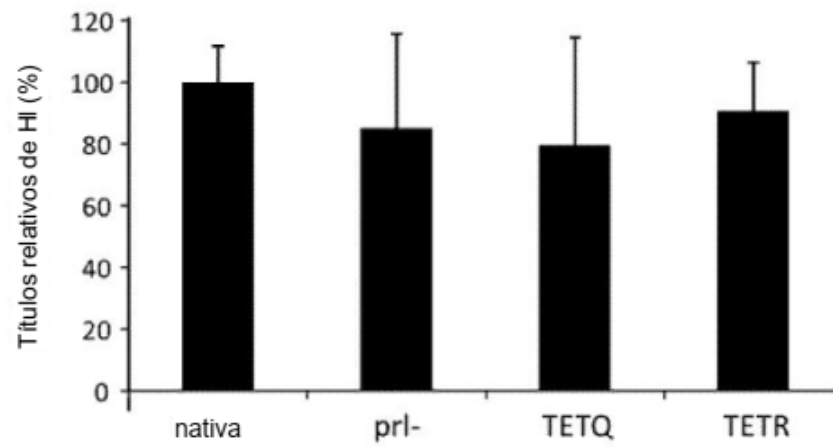


Figura 47B



2X35S/CPMV HT+/PDISP/H2 Singapore/NOS (Construcción número 2220)

Figura 48A, SEQ ID NO: 127

IF*-H2S157.s1-6r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTCATATGCAGATCCTGCACTGCAGAGACCCGT

Figura 48B, SEQ ID NO: 128

Secuencia de nucleótidos de PDISP/H2 Singapore.

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGGACCAAA
TATGCATTGGATACCATGCCAATAATCCACAGAGAAGGTCGACACAATCTAGAGCGGAACGTCCTGTGACTCATGC
CAAGGACATTCTTGAGAAGACCATAACGGAAGTTATGCAACTAAACGGAATCCCTCCACTTGAAGTAGGGGACTGT
AGCATTGCCGGATGGCTCCTTGGAATCCAGAATGTGATAGGCTTCTAAGTGTGCCAGAATGGTCTATATAATGGAGA
AAGAAAACCGAGAGACGGTTTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAATGATTATGAAGAATTGAAACATCTCCTCAGCAGCGT
GAAACATTTTCGAGAAAAGTAAAGATTCTGCCCAAAGATAGATGGACACAGCATAACAACACTGGAGGTTACCGGCCTGC
GCGGTGTCTGGTAATCCATCATTCTTCAGGAACATGGTCTGGCTGACAAAGAAAGAATCAAATATCCGGTTGCCAAAG
GATCGTACAACAATACAAGCGGAGAACAAATGCTAATAATTTGGGGGGTGCACCATCCCAATGATGAGACAGAACAAAG
AACATTGTACCAGAATGTGGGAACCTATGTTTCCGTAGGCACATCAACATTGAACAAAAGGTCAACCCAGACATAGCA
ACAAGGCCTAAAGTGAATGGACTAGGAAGTAGAATGGAGTTCTCTTGGACCCTATTGGATATGTGGGACACCAATAAAT
TTGAGAGTACTGGTAATCTAATTGCACAGAGTATGGATTCAAAATATCGAAAAGAGGTAGTTCAGGGATCATGAAAAC
AGAAGGAACACTTGAGAAGTGTGAGACCAATGCCAACTCCTTTGGGAGCAATAAATACAACATTGCCTTTTCACAAT
GTCCACCCACTGACAATAGGTGAGTGCCCAATATGTAAATCGGAGAAGTTGGTCTTAGCAACAGGACTAAGGAATG
TTCCCAGATTGAATCAAGAGGATTGTTTGGGGCAATAGCTGGTTTATAGAAGGAGGATGGCAAGGAATGGTTGATGG
TTGGTATGGATACCATCACAGCAATGACCAGGGATCAGGGTATGCAGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCATTTGAT
GGAATCACCAACAAGGTAAATCTGTGATTGAAAAGATGAACACCCAATTTGAAGCTGTTGGGAAAGAGTTTCAGTAAT
TAGAGAGAAGACTGGAGAAGTGAACAAAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTGTGGACATACAATGCTGAGCTTCT
AGTTCTGATGGAAGATGAGAGGACACTTGACTTTCATGATTCTAATGTCAAGAATCTGTATGATAAGTCAGAATGCAG
CTGAGAGACAACGTCAAAGAAGTAGGAAATGGATGTTTGAATTTATCACAATGTGATGATGAATGCATGAATAGTG
TGAAAAACGGGACGTATGATTATCCCAAGTATGAAGAAGAGTCTAACTAAATAGAAATGAAATCAAAGGGGTAAATTT
GAGCAGCATGGGGGTTTATCAAATCCTTGCCATTATGCTACAGTAGCAGGTTCTCTGCTACTGGCAATCATGATGGCT
GGGATCTCTTCTGGATGTGCTCCAACGGGTCTCTGCAGTGCAGGATCTGCATATGA

Figura 48C, SEQ ID NO: 129

Casete de expresión número 2220 desde el promotor 2X35S al terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H2 Singapore está subrayada.

GTCAACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAGGGCAATTG
AGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGAT
AGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGAC
AGTGGTCCCAAGATGGACCCCAACACGAGGAGCATCGTGGAAAAGAAAGACGTTCCAACCAGCTCTCAAAGCAAG
TGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCA
AAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTT
ATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATG
CCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCAACACGAGGAGCATCGTGGAAAAGAAAGACGTTCCAACCACGTC
TTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTT
TCCTCTATATAAGGAAGTTCAATTCATTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTTGGGGAA
ACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTTGTCTTTCTTGGTGGAGCGA
TCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTGTG
GACACGATGTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCT
GGAGGCTGCTGTTAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCT
TGACGAGGTATTGTTGCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGA

AACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGGGGCCC
AATACCGCGGAGAAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCTTCTCAGA
TCTTCGCGGACCAAATATGCATTGGATACCATGCCAATAATTCCACAGAGAAGGTCGACACAATTCTAGAGCGGAACGT
CACTGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTGAGAAGACCCATAACGGAAAGTTATGCAAACCTAAACGGAATCCCTCCACTT
GAACTAGGGGACTGTAGCATTGCCGGATGGCTCCTTGGAATCCAGAATGTGATAGGCTTCTAAGTGTGCCGAATGGT
CCTATATAATGGAGAAAAGAAAACCCGAGAGACGGTTTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAATGATTATGAAGAATTGAAACA
TCTCCTCAGCAGCGTGAACATTTGAGAAAAGTAAAGATTCTGCCCAAAGATAGATGGACACAGCATACAACAACCTGGA
GGTTCACGGGCTCGCGCGGTCTGGTAATCCATCATTCTTCAGGAACATGGTCTGGCTGACAAAGAAAGAATCAAATT
ATCCGGTTGCCAAAGGATCGTACAACAATACAAGCGGAGAACAAATGCTAATAATTGGGGGGTGCACCATCCCAATGA
TGAGACAGAACAAGAACATTGTACCAGAATGTGGGAACCTATGTTTCCGTAGGCACATCAACATTGAACAAAAGGTCA
ACCCAGACATAGCAACAAGGCCCTAAAGTGAATGGACTAGGAAGTAGAATGGAGTTCTCTTGGACCCTATTGGATATGT
GGGACACCATAAATTTGAGAGTACTGGTAATCTAATTGCACCAGAGTATGGATTCAAATATCGAAAAGAGGTAGTTC
AGGGATCATGAAAACAGAAGGAACACTTGAGAACTGTGAGACCAATGCCAACTCCTTTGGGAGCAATAAATACAACA
TTGCCTTTTCACAATGTCCACCCACTGACAATAGGTGAGTGCCCCAAATATGTAATAATCGGAGAAAGTTGGTCTTAGCAA
CAGGACTAAGGAATGTTCCCGAGATTGAATCAAGAGGATTGTTTGGGGCAATAGCTGGTTTTATAGAAGGAGGATGGCA
AGGAATGGTTGATGGTTGGTATGGATACCATCACAGCAATGACCAGGGATCAGGGTATGCAGCAGACAAAGAATCCACT
CAAAAGGCATTTGATGGAATCACCAACAAGGTAAATTCTGTGATTGAAAAGATGAACACCAATTTGAAGCTGTTGGGA
AAGAGTTCAGTAACCTAGAGAGAAGACTGGAGAACTTGAACAAAAGATGGAAGACGGGTTCTAGATGTGTGGACATA
CAATGCTGAGCTTCTAGTTCTGATGGAATAAGAGGACACTTGACTTTTCATGATTCTAATGTCAAGAATCTGTATGAT
AAAGTCAGAATGCAGCTGAGAGACAACGTCAAAGAACTAGGAATGGATGTTTGAATTTTATCACAAATGTGATGATG
AATGCATGAATAGTGTGAAAAACGGGACGTATGATTATCCCAAGTATGAAGAAGAGTCTAAACTAAATAGAAATGAAAT
CAAAGGGGTAAATTTGAGCAGCATGGGGGTTTATCAAATCCTTGCCATTTATGCTACAGTAGCAGGTTCTCTGTCACTG
GCAATCATGATGGCTGGGATCTCTTCTGGATGTGCTCCAAACGGGTCTCTGCAGTGCAGGATCTGCATATGAAGGCCTA
TTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTT
TATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTAAT
TTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCA
ATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCAT
GTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAAT
ACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAACTAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTATCTATGTTACTAGAT

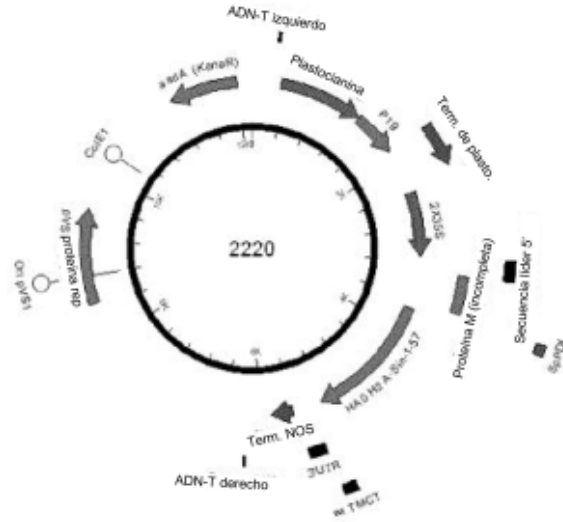
Figura 48D, SEQ ID NO: 130

.Secuencia de aminoácidos de PDISP/H2 Singapore

MAKNVAIFGLLFSLVLVPSQIFADQICIGYHANNSTEKVDITILERNVTVTHAKDILEKTHNGKLCKLNGIPPLELGDG
SIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYPGSFNDYEELKHLSSVKHFEKVILPKDRWTQHTTTGGSRA
AVSGNPSFFRNMVWLTKKESNYPVAKGSYNNTSGEQMLIIWGVHHPNDETEQRTLYQNVGTVSVGTSTLNKRSTPDIA
TRPKVNLGSRMEFSWTLDDMDWTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLENCETKQCTPLGAINTTLPFHN
VHPLTIGECPKYVKSEKLVLATGLRNVPIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHNSNDQSGGYAADKESTQKAFD
GITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLERLENLNKKMEDGFLDVWYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQ
LRDNVKELGNGCFEYHKCDDECMNSVKNGTYDYPKYEESKLNREIKGVKLSSMGVYQILAIYATVAGSLSLAIMMA
GISFWMCSNGSLQCRICI*

Figura 48E

Representación esquemática de la construcción número 2220

**2X35S/CPMV HT+/PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado/NOS (Construcción número 2221)****Figura 49A, SEQ ID NO: 131**

H2S157(Prl-).r

TGCCATCCTCCGCCGGGAACATTCTTAGTCCTGTTGCTAAGACCAAC

Figura 49B, SEQ ID NO: 132

H2S157(Prl-).c

AGGAATGTTCCCGCGGAGGATGGCAAGGAATGGTTGATGGTTGGTATGG

Figura 49C, SEQ ID NO: 133

Casete de expresión número 2221 del promotor 2X35S al terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado está subrayada.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTG
 AGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGAT
 AGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTGCGCGAC
 AGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAG
 TGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCA
 AAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTT
 ATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATG
 CCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTC
 TTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCT
 TCCTCTATATAAGGAAGTTCAATTCATTGGAGAGGTATTAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAGCGAACGTGGGGAA
 ACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTTCGCGTGAGCGA

TCTTCAACGTTGTGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTG
GACACGTAGTGC GGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTATTCTTGTGCGGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCT
GGAGGCTGCTGTTTTCAGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCT
TGACGAGGTATTGTTGCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGA
AACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAAGTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGGGGCCC
AATACCGCGGAGAAAATGGCGAAAACGTTGCGATTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTCTGTTGGTTCTTCTCAGA
TCTTCGCGGACCAAATATGCATTGGATACCATGCCAATAATCCACAGAGAAGGTCGACACAATTCTAGAGCGGAACGT
CACTGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTGAGAAGACCATAACGGAAGTTATGCAAACTAAACGGAATCCCTCCACTT
GAACTAGGGGACTGTAGCATTGCCGGATGGCTCCTTGGAATCCAGAATGTGATAGGCTTCTAAGTGTGCCAGAATGGT
CCTATATAATGGAGAAAAGAAACCCGAGAGACGGTTTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAATGATTATGAAGAATTGAAACA
TCTCTCAGCAGCGTGAAACATTTTCGAGAAAGTAAAGATTCTGCCCAAAGATAGATGGACACAGCATACAACAACCTGGA
GGTTCACGGGCTTGCGCGGTGTCTGGTAATCCATCATTTCTTCAGGAACATGGTCTGGCTGACAAAGAAAAGAAATCAAAT
ATCCGGTTTGCCAAAGGATCGTACAACAATACAAGCGGAGAACAAATGCTAATAATTTGGGGGGTGACCATCCCAATGA
TGAGACAGAACAAAGAACATTGTACCAGAATGTGGGAACCTATGTTTCCGTAGGCACATCAACATTGAACAAAAGGTCA
ACCCACAGACATAGCAACAAGGCCTAAAGTGAATGGACTAGGAAGTAGAATGGAGTTCTCTTGGACCTATTGGATATGT
GGGACACCATAAATTTTGTAGAGTACTGGTAATCTAATTCACACAGAGTATGGATTCAAAATATCGAAAAGAGGTAGTTC
AGGGATCATGAAAACAGAAAGAACACTTGAGAAGTGTGAGACCAAATGCCAAACTCCTTTGGGAGCAATAAATACAACA
TTGCCTTTTCAATGTCCACCCACTGACAATAGGTGAGTGCCCCAAATATGTAATAATCGGAGAAGTTGGTCTTAGCAA
CAGGACTAAGGAATGTTCCCGCGGAGGATGGCAAGGAATGGTTGATGGTTGGTATGGATACCATCACAGCAATGACCA
GGGATCAGGGTATGCAGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCATTTGATGGAATCACCACAAAGGTAATTTCTGTGATT
GAAAAGATGAACACCCAATTGAAGCTGTTGGGAAAGAGTTGAGTAACCTAGAGAGAAGACTGGAGAAGTTGAACAAAA
AGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTGTGGACATACAATGCTGAGCTTCTAGTTCTGATGGAATAAGAGGACACTTGA
CTTTATGATTCTAATGTCAAGAATCTGTATGATAAAGTCAGAATGCAGCTGAGAGACAACGTCAAAGAAGTAGGAAAT
GGATGTTTTGAATTTTATCAAAATGTGATGATGAATGCATGAATAGTGTGAAAAACGGGACGTATGATTATCCCAAGT
ATGAAGAAGAGTCTAAACTAAATAGAAATGAAATCAAAGGGGTAAATTTGAGCAGCATGGGGGTTATCAAATCCTTGC
CATTTATGCTACAGTAGCAGGTTCTCTGTCTACTGGCAATCATGATGGCTGGGATCTCTTTCTGGATGTGCTCCAACGGG
TCTCTGCAGTGCAGGATCTGCATATGAAGGCCATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCCGTGTGCATTTCTATG
TTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGT
CGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAG
CTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGAT
TATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTT
TTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATAT
CGCGCGCGGTGTCTCTATGTTACTAGAT

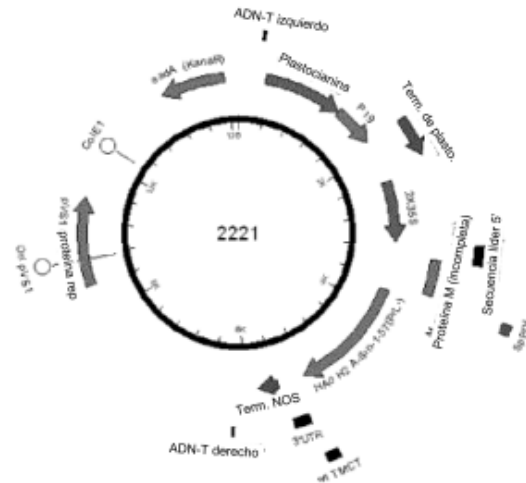
Figura 49D, SEQ ID NO: 134

Secuencia de aminoácidos de PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado

MAKNVAIFGLLFSLLVPSQIFADQICIGYHANNSTEKVDILERNVTYTHAKDILEKTHNGKLCKLNGIPPELGDCSIAGWLLGNPECD
RLLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYPGSFNDYEEKHLLSSVKHFEKVILPKDRWTQHHTTGGSRACAVSGNPSFFRNMVWLTKKESNYP
VAKGSYNNTSGEQMLIHWGVHHPNDETEQRTLYQNVGTYVSVGTSLNKRSTPDIAIRPKVNLGSRMEFSWTLDMWDTINFESTG
NLIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGLENCETKCQTPLGAINITLPHFHVHPLTIGECPKYVKSEKLVLATGLRNVPGGGWQGMVDGWYG
YHHSNDQSGSYADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLERRLENLNKKMEDGFLDVWYNAELLVLMENERTLDF
HDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELNGCGFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDPKYEEESKLRNRIKGVKLSMVGYYQILAIYATVAGSLSL
AIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI*

Figura 49E

Representación esquemática de la construcción número 2221



PDISP/H2 Singapore (Construcción número 2222) y PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado (Construcción número 2223) en el sistema de expresión 2X35S/CPMV 160 +/NOS

Figura 50A, SEQ ID NO: 135

Casete de expresión número 2222 del promotor 2X35S al terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H2 Singapore está subrayada.

GTCAACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTG
AGACTTTTCAACAAAGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGAT
AGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGAC
AGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCCTTCAAAGCAAG
TGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCA
AAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTT
ATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATG
CCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTC
TTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCT
TCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTTGGGAA
ACCCGAACCAAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTTCTTGGTGGAGCGA
TCTTCAACGTTTGTGATCGTGTCTTGGCACCAGTACAGGGCCCAATACCGCGGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGAT
TTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTGTGTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGGACCAATATGCATTGGATACCATGCC
AATAATTCCACAGAGAAGGTGACACAAATCTAGAGCGGAACGTCAGTGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTGAGAAGA
CCCATACCGGAAAGTTATGCAACTAAACGGAATCCCTCCACTTGAAGTGGGACTGTAGCATTGCCGATGGCTCCT
TGGAAATCCAGAAATGTGATAGGCTTCTAAGTGTGCCAGAAATGGTCTATATAATGGAGAAAGAAAACCCGAGAGACGGT
TTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAATGATTATGAAGAATTGAAACATCTCCTCAGCAGCGTGAAACATTTTCGAGAAAGTAA
AGATTCTGCCCAAAGATAGATGGACACAGCATACAACAACCTGGAGGTTACGGGCTTGCAGCGGTCTGGTAATCCATC
ATTCTTCAGGAACATGGTCTGGCTGACAAAGAAAGAATCAAATTATCCGGTTGCCAAAGGATCGTACAACAATACAAGC
GGAGAACAAATGCTAATAATTTGGGGGGTGACCATCCCAATGATGAGACAGAACAAAGAACATTGTACCAGAATGTGG
GAACCTATGTTTCCGTAGGCACATCAACATTGAACAAAGGTCAACCCAGACATAGCAACAAGGCCTAAAGTGAATGG
ACTAGGAAGTAGAATGGAGTTCCTTGGACCTATTGGATATGTGGACACCATAAATTTTGAGAGTACTGGTAATCTA

ATTGCACCAGAGTATGGATTCAAAATATCGAAAAGAGGTAGTTTCAGGGATCATGAAAACAGAAGGAACACTTGAGAACT
GTGAGACCAAATGCCAACTCCTTTGGGAGCAATAAATACAACATTGCCTTTTCACAAATGTCCACCCACTGACAATAGG
TGAGTGCCCCAAATATGTAATAATCGGAGAAGTTGGTCTTAGCAACAGGACTAAGGAATGTTCCCCAGATTGAATCAAGA
GGATTGTTTGGGGCAATAGCTGTTTATAGAAGGAGGATGGCAAGGAATGGTTGATGGTTGGTATGGATACCATCACA
GCAATGACCAGGGATCAGGGTATGCAGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCATTGATGGAATCACCAACAAGGTAAA
TTCTGTGATTGAAAAGATGAACACCCAAATTTGAAGCTGTTGGGAAAAGAGTTTCAGTAACCTTAGAGAGAAGACTGGAGAAC
TTGAACAAAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTGTGGACATACAATGCTGAGCTTCTAGTTCTGATGGAATGAGA
GGACACTTGACTTTTCATGATTCTAATGTCAAGAATCTGTATGATAAAGTCAGAATGCAGCTGAGAGACAACGTCAAAGA
ACTAGGAAATGGATGTTTGAATTTTATCACAATGTGATGATGAATGCATGAATAGTGTGAAAAACGGGACGTATGAT
TATCCCAAGTATGAAGAAGAGTCTAACTAAATAGAAATGAAATCAAGGGGTAAAATTGAGCAGCATGGGGGTTTATC
AAATCCTTGCCATTATGCTACAGTAGCAGGTTCTCTGTCACTGGCAATCATGATGGCTGGGATCTCTTTCTGGATGTG
CTCCAACGGGTCTCTGCAGTCAGGATCTGCATATGAAGGCCATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCCGTGTG
CATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTATTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTG
TTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAGATTTAATTTTATTAAAAAAGACCCGGGAATT
CGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGCTC
TTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTAT
GAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAACTAG
GATAAATTATCGCGCGCGGTGCATCTATGTTACTAGAT

Figura 50B, SEQ ID NO: 136

Casete de expresión número 2223 del promotor 2X35S al terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H2 Singapore con bucle proteolítico eliminado está subrayada.

GTCAACATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTG
AGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGAT
AGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGAC
AGTGGTCCCAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCCAGTCTTCAAAGCAAG
TGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCA
AAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTT
ATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATG
CCTTGCCGACAGTGGTCCCAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCCAGTCT
TTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGAAGACCCCT
TCCTCTATATAAGGAAGTTCAATTTATTGGAGAGGTATTAATAGGTTTGGATAAAGCGAAGCTGGGGAA
ACCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTCTCTTGTCTTTCTTGGTGTAGCGA
TCTTCAACGTTGTGATCGTCTTCCGCAACAGTACAGGCCCCAATACCGCGAGAAAATGGCGAAAACGTTGCGAT
TTTGGGCTTATTGTTTCTCTTCTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGACCAATATGCATTGGATACCATGCC
AATAATTCACAGAGAAGGTCGACACAATTCTAGAGCGGAACGTCACGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTGAGAAGA
CCCATACCGGAAAGTTATGCAAACTAAACGGAATCCCTCCACTTGAAGTGGGAGTGTAGCATTGCCGGATGGCTCCT
TGGAAATCCAGAATGTGATAGGCTTCTAAGTGTGCCAGAATGGTCTATATAATGGAGAAAGAAAACCCGAGAGACGGT
TTGTGTTATCCAGGCAGCTTCAATGATTATGAAGAATTGAAACATCTCCTCAGCAGCGTGAAACATTTCCAGAAAGTAA
AGATTCTGCCCAAAGATAGATGGACACAGCATAACAACACTGGAGGTTACGGGCTGCGCGGTGTCTGGTAATCCATC
ATTCTTCAGGAACATGGTCTGGCTGACAAAGAAAGAAATCAAAATTATCCGGTTGCCAAAGGATCGTACAACAATACAGC
GGAGAACAATGCTAATAATTTGGGGGTGCACCATCCCAATGATGAGACAGAACAAGAACATTGTACCAGAATGTGG
GAACCTATGTTTCCGTAGGCACATCAACATTGAACAAAAGGTCAACCCAGACATAGCAACAAGGCCTAAAGTGAATGG
ACTAGGAAGTAGAATGGAGTTCTCTTGGACCTATTGGATATGTGGGACACCATAAATTTTGAAGTACTGGTAATCTA
ATTGCACCAGAGTATGGATTCAAAATATCGAAAAGAGGTAGTTTCAGGGATCATGAAAACAGAAGGAACACTTGAGAACT
GTGAGACCAAATGCCAACTCCTTTGGGAGCAATAAATACAACATTGCCTTTTCACAAATGTCCACCCACTGACAATAGG
TGAGTGCCCCAAATATGTAATAATCGGAGAAGTTGGTCTTAGCAACAGGACTAAGGAATGTTCCCGGCGGAGGATGGCAA
GGAAATGGTTGATGGTTGGTATGGATACCATCACAGCAATGACCAGGGATCAGGGTATGCAGCAGACAAAGAATCCACTC
AAAAGGCATTGATGGAATCACCAACAAGGTAAATCTGTGATTGAAAAGATGAACACCCAATTTGAAGCTGTTGGGAA
AGAGTTTCACTTAAGTATGAGAGAGACTGGAGAATTGAACAAAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTGTGGACATAC
AATGCTGAGCTTCTAGTTCTGATGGAATAAGAGGACACTTGACTTTTCATGATTCTAATGTCAAGAATCTGTATGATA
AAGTCAGAATGCAGCTGAGAGACAACGTCAAAGAACTAGGAAATGGATGTTTGAATTTTATCACAATGTGATGATGA
ATGCATGAATAGTGTGAAAAACGGGACGTATGATTATCCCAAGTATGAAGAAGAGTCTAACTAAATAGAAATGAAATC

AAAGGGGTAAATTTGAGCAGCATGGGGGTTTATCAAATCCTTGCCATTATGCTACAGTAGCAGGTTCTCTGTCACTGG
CAATCATGATGGCTGGGATCTCTTTCTGGATGTGCTCCAACGGGTCTCTGCAGTGCAGGATCTGCATATGAAGGCCTAT
TTCTTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTT
ATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAGATTTTAATT
TTATTAAGGATTTTGAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAGATTTTAATT
TAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATG
TAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTAAATA
CGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGAT

Figura 50C

Representación esquemática de la construcción número 2222

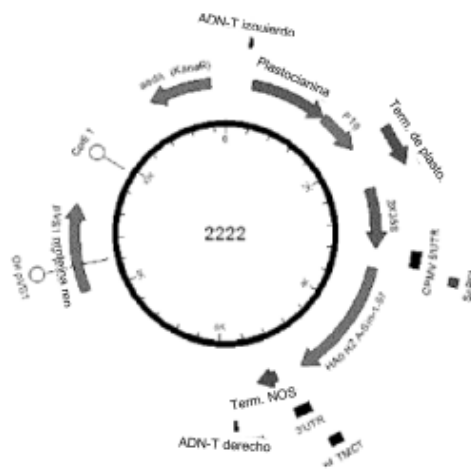
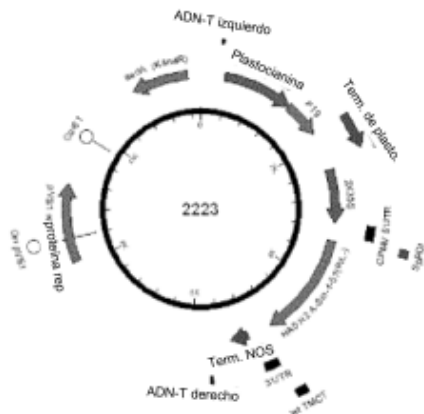


Figura 50D

Representación esquemática de la construcción número 2223



2X355/CPMV HT+ (construcción núm. 2019) y 160+ (construcción núm. 2139) para PDISP/H3 Perth

Figura 51A, SEQ ID NO: 137

Secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Perth

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCCTTCTCAGATCTTCGCGCAAAAAC
 TTCTTGGAAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGAAAACAAT
 CACGAATGACCAAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAGTTCCTCAACAGGTGAAATATGCGACAGTCCCT
 CATCAGATCCCTTGATGGAAAAAAGTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATA
 AGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGCAGCAAAGCCTACAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCGATTATGCCTCCCT
 TAGGTCACTAGTTGCCTCATCCGGCACACTGGAGTTTAACAATGAAAGCTTCAATTGGAGTGGAGTCACTCAAAACGGA
 ACAAGCTCTGCTTGATAAGGAGATCTAAAAACAGTTTCTTTAGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAAACTTCAAAT
 ACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACAAATGAACAATTTGACAAATTTGACATTTGGGGGGTTACCACCCGGGTAC
 GGACAAAGACCAAAATCTTCTGTATGCTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAGAAGCCAACAAACCGTA
 AGCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAGTAAGGAATATCCCTAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAAACCGG
 GAGACATACTTTTGATTAAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTCAAATACGAAGTGGGAAAAGCTC
 AATAATGAGATCAGATGCAACCATTTGGCAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCAAATGGAAGCATTCCAATGACAAA
 CCATTCCAAAATGTAAACAGGATCACATACGGGGCCTGTCCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCAACAG
 GGATGCGAAATGTACCAGAGAAACAACTAGAGGCATATTTGGCGCAATCGCGGGTTTCATAGAAAATGGTTGGGAGGG
 AATGGTGGATGGTTGGTACGGTTTCAGGCATCAAATTTCTGAGGGAAGAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAGCACTCAA
 GCAGCAATCGATCAAATCAATGGGAAGCTGAATAGATTGATCGGGAACCAACGAGAAATTCATCAGATTGAAAAAG
 AATTCTCAGAAGTCGAAGGGAGAATTGAGACCTTGAGAAATATGTTGAGGACACTAAAATAGATCTCTGGTCATACAA
 CGCGGAGCTTCTTGTGCTTGGGAGAACCAACATACAAATTGATCTAACTGACTCAGAAATGAACAACTGTTTGAAAAA
 ACAAAGAAGCAACTGAGGGAAAATGCTGAGGATATGGGCAATGGTTGTTTCAAATATACCACAAATGTGACAATGCCT
 GCATAGGATCAATCAGAAATGGAATTTATGACCACGATGTATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCGGTTTCAGATCAA
 GGGAGTTGAGCTGAAGTCAGGGTACAAAGATTGGATCCTATGGATTTCCTTTGCCATATCATGTTTTTTGCTTTGTGTT
 GCTTTGTTGGGGTTTCATCATGTGGCCTGCCAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTCGATTTGA

Figura 51B, SEQ ID NO: 138

IF*-H3P1609.S1-6r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTCAAATGCAAATGTTGCACCTAATGTTGCCTT

Figura 51C, SEQ ID NO: 139

Secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 Perth

MAKNVAIFGLLFSLVLVPSQIFAQKLPNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTIITNDQIEVTNATELVQSSSTGEICDSP
 HQILDGKNCTLIDALLGDPQCDGFQNKWDLFVERS KAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFPNWTGVTQNG
 TSSACIRRSKNSFFSRLNWLTHLNFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQASGRITVSTKRSQQT
 VSPNIGSRPRVRNIPSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYPKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDK
 PFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFHQNSEGRGQAADLKSTQ
 AADQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVBGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLPK
 TTKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCV
 ALLGFIMWACQKGNIRCNICI *

Figura 51D

Representación esquemática de la construcción número 2019

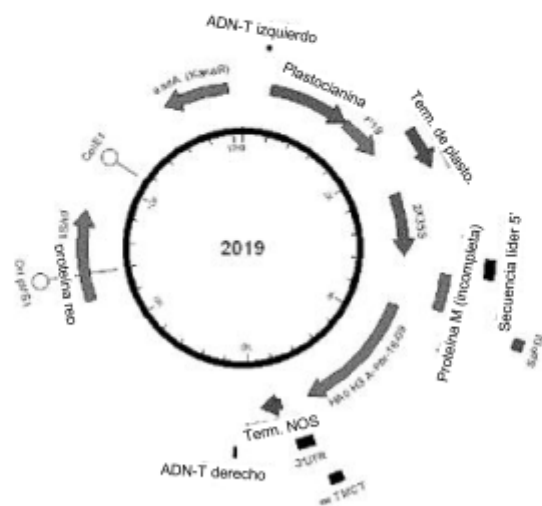


Figura 51E

Representación esquemática de la construcción número 2139



2X35S/CPMV HT+ (construcción núm. 2039) y 160+ (construcción núm. 2159) para PDISP/H3 Perth con bucle proteolítico eliminado

Figura 52A, SEQ ID NO: 140

Secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Perth con bucle proteolítico eliminado

ATGCGGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGCAAAAC
 TTCTTGAAATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTGAAAACAAT
 CACGAATGACCAAATTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAGTTCCTCAACAGGTGAAATATGCGACAGTCCT
 CATCAGATCCTTGATGGAAGAACTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATA
 AGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGACGCAAGCCTACAGCAACTGTTACCTTATGATGTGCCGATTATGCCTCCCT
 TAGGTCACTAGTTGCCTCATCCGGCACACTGGAGTTTAAACAATGAAAGCTTCAATTGGACTGGAGTCACTCAAAACGGA
 ACAAGCTCTGCTTGACATAAGGAGATCTAAAAACAGTTTCTTTAGTAGATTGAATTGGTTGACCCACTTAAACTTCAAAT
 ACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACAATGAACAATTTGACAAATTGTACATTTGGGGGGTTACCCACCCGGGTAC
 GGACAAAGACCAAATCTTCTGTATGCTCAAGCATCAGGAAGAATCACAGTCTCTACCAAAGAGCAACAAACCGTA
 AGCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAGTAAGGAATATCCCTAGCAGAATAAGCATCTATTGGACAATAGTAAACCCGG
 GAGACATACTTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCCTAGGGGTTACTTCAAAATACGAAGTGGGAAAAGCTC
 AATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATTCCCAATGACAAA
 CCATTCCAAAATGTAAACAGGATCACATACGGGGCCTGTCCAGATATGTTAAGCAAAACACTCTGAAATTGGCAACAG
 GGATGCGAAATGTACCAGGCGGAGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGTTTCAGGCATCAAAATTCTGAGGG
 AAGAGGACAAGCAGCAGATCTCAAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAAATCAATGGGAAGCTGAATAGATTGATCGGG
 AAAACCAACGAGAAATTCCATCAGATTGAAAAAGAATTCTCAGAAAGTCAAGGGAGAATTGAGGACCTTGAGAAATATG
 TTGAGGACACTAAATAGATCTCTGGTCATACACGCGGAGCTTCTTGTGCCCCTGGAGAACCAACATACAAATTGATCT
 AACTGACTCAGAAATGAACAAACTGTTTGAAGAAAACAAAGAAGCAACTGAGGGAAAATGCTGAGGATATGGCAATGGT
 TGTTCCTCAAAATATACCACAAATGTGACAATGCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACTTATGACCACGATGTATACA
 GAGATGAAGCATTAAACAACCGGTTTCAGATCAAGGGAGTTGAGCTGAAGTCAAGGGTACAAAGATTGGATCCTATGGAT
 TTCTTTGCCATATCATGTTTTTGTGTTGCTTTGTTGGGGTTCATCATGTGGGCTGCCAAAAGGCAACATT
 AGGTGCAACATTTGCATTGTA

Figura 52B, SEQ ID NO: 141

H3P1609(PrI-)#2.r

CCCTCCCAACCTCCGCTGGTACATTTGCGATCCCTGTTGCCAATTTT

Figura 52C, SEQ ID NO: 142

H3P1609(PrI-)#2.c

AATGTACCAGGCGGAGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGT

Figura 52D, SEQ ID NO: 143

Secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 Perth con bucle proteolítico eliminado

MAKNVAIFGLLSLLVLPVPSQIFAQKLPNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTIITNDQIEVTNATELVQSSSTGEICDSP
 HQILDGKNCTLIDALLGDPQCDGFQNKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNEFPNWTGVTQNG
 TSSACIRRSKNSFFSRLNLTHLNFYKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQASGRITVSTKRSQQTV
 SPNIGSRPRVRNIPSRISYIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAIGKCNSECITPNGISIPNDK
 PFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPGGWEGMVDGWYGFHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIG
 KTNEKPHQIEKEPSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFKTKKQLRENAEDMGNG
 CFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRPQIKGVELKSGYKDILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKNGI
 RCNICI*

Figura 52E

Representación esquemática de la construcción número 2039

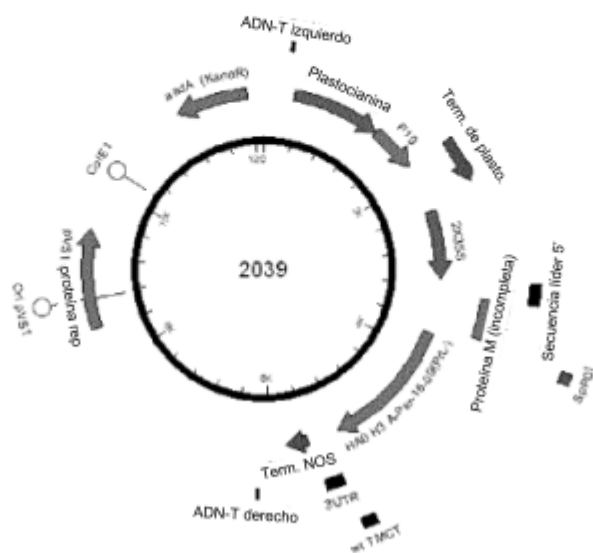


Figura 52F

Representación esquemática de la construcción número 2159



2X35S/CPMV HT+ (construcción núm. 2230) y 160+ (construcción núm. 2250) para PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado

Figura 53A, SEQ ID NO: 144

Secuencia de nucleótidos de PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGCAAAAACCTTCTGGAA
ATGACAACAGCACGGCAACGCTGTGCTTGGGCACCATGCAGTACCAAACGGAACGATAGTAAAAACAATCACGAATGACCAAA
TTGAAGTTACTAATGCTACTGAGCTGGTTCAGAATTCCTCAATAGGTGAAATATGCGACAGTCTCATCAGATCCTTGATGGAGAA
AACTGCACACTAATAGATGCTCTATTGGGAGACCCTCAGTGTGATGGCTTCCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTTGTTGAACGAAG
CAAAGCTACAGCAACTGTTACCTTATGATGTGCCGATTATGCCTCCCTTAGGTCACTAGTTGCCTCATCCGGCACACTGGAGTT
TAACAATGAAAGCTCAATTGGACTGGAGTCACTAAAACGGAACAAGTCTGCTTGCAATAGGAGATCTAATAATAGTTTCTTTA
GTAGATTAAATTGGTTGACCCACTTAACTTCAAATACCCAGCATTGAACGTGACTATGCCAAACAATGAACAATTTGACAAATTG
TACATTTGGGGGGTTCACCAACCCGGGTACGGACAAGGACCAAAATCTTCTGTATGCTCAATCATCAGGAAGAATCACAGTATCTAC
CAAAAGAAGCCAACAAGCTGTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGAATAAGGAATATCCCTAGCAGAATAAGCATCTATTGG
ACAATAGTAAAACCGGGAGACATACTTTGATTAACAGCACAGGGAATCTAATTGCTCTAGGGGTTACTTCAAAATACGAAGTG
GGAAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCACCCATTGGCAAATGCAATTCTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATTCCCAATGA
CAAACCATTCAAAATGTAACAGGATCACATACGGGGCTGTCCAGATATGTTAAGCAAAGCACTCTGAAATTGGCAACAGGA
ATGCGAAATGTACCAGGCGGAGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGTTTCAGGCATCAAAATCTGAGGGAAGAGG
ACAAGCAGCAGATCTCAAAGCACTCAAGCAGCAATCGATCAAATCAATGGGAAGCTGAATCGATTGATCGGGAAAACCAACGA
GAAATTCATCAGATTGAAAAAGAATTCTCAGAAGTCGAAGGGAGAATTCAGGACCTTGAGAAATATGTTGAGGACACTAAAATA
GATCTCTGGTCATAACACGCGGAGCTTCTTGTGCCCTGGAGAACCAACATACAAATTGATCTAACTGACTCAGAAATGAACAACT
GTTTGAAAAAACAAAGAAGCAACTAAGGGAATGCTGAGGATATGGGCAATGGTTGTTTCAAAATATACCACAAATGTGACAAT
GCCTGCATAGGATCAATCAGAAATGGAACCTATGACCACGATGTATACAGAGATGAAGCATTAAACAACCGGTTCCAGATCAAGG
GAGTTGAGCTGAAGTCAGGGTACAAAGATTGGATCCTATGGATTTCTTTGCCATATCATGTTTTTCTTTGTGTTGCTTTGTTGG
GGTTCATCATGTGGGCTGCCAAAAGGGCAACATTAGGTGCAACATTGCATTTGA

Figura 53B, SEQ ID NO: 145

H3V36111(Prl-).r

CCCTCCCAACCTCCGCCTGGTACATTCGCATTCCTGTTGCCAATTC

Figura 53C, SEQ ID NO: 146

H3V36111(Prl-).c

AATGTACCAGGCGGAGGTTGGGAGGGAATGGTGGATGGTTGGTACGGT

Figura 53D, SEQ ID NO: 147

Secuencia de aminoácidos de PDISP/H3 Victoria con bucle proteolítico eliminado

MAKNVAIFGLLFSLLVLVPSQIFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKITNDQIEVTNATELVQNSSIGEICDSPHQILDGENCTLID
ALLGDPQCDGFQNKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLSLVASSGTLEFNNEFNFWTGVTQNGTSSACIRRSNNSFFSRLNLWTH
LNFKYPALNVTMPNNEQFDKLYWGVHHPGTDKDKQIFLYAQSSGRITVSTKRSQQAVIPNIGSRPRIRNIPSRISYWTIVKPGDILLINST
GNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPPGGWEGMVDGWY
GFRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDS
EMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVALL
GFIMWACQKGNIRCNICI*

Figura 53E

Representación esquemática de la construcción número 2230

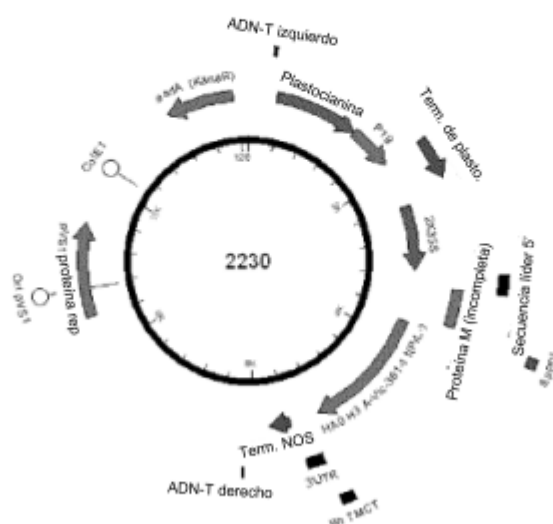
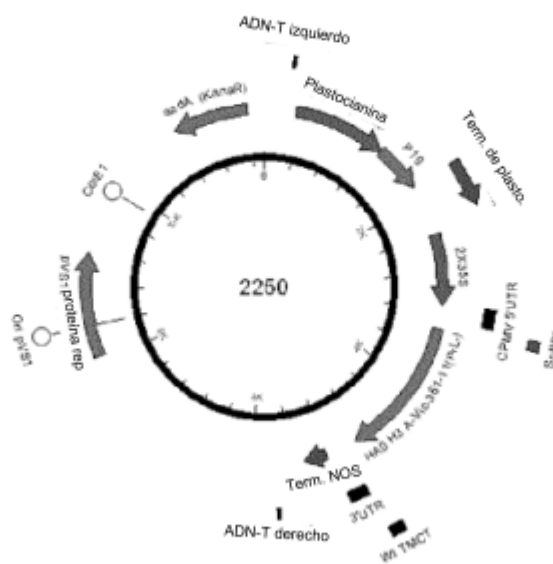


Figura 53F

Representación esquemática de la construcción número 2250



2X35S/CPMV HT+/PDISP/H7 Hangzhou/NOS (Construcción núm. 2142)

Figura 54A, SEQ ID NO: 148

Secuencia de nucleótidos de PDISP/H7 Hangzhou

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGGACAAAATCTGCCTCG
GACATCATGCCGTGTCAAACGGAACCAAAGTAAACACATTAAGTAAAGAGGAGTGGAAGTCGTCAATGCAACTGAAACAGTGG
AACGAACAAACATCCCAGGATCTGCTCAAAGGGAAAAGGACAGTTGACCTCGGTCAATGTGGACTCCTGGGACAACTCACTG
GACCACCTCAATGTGACCAATTCCTAGAATTTTCAGCCGATTTAATTATTGAGAGGCGAGAAGGAAGTGATGTCTGTTATCCTGGG
AAATTCGTGAATGAAGAAGCTCTGAGGCAAATCTCAGAGAATCAGGCGGAATTGACAAGGAAGCAATGGGATTACATACAGT
GGAATAAGAACTAATGGAGCAACCAAGTGCATGTAGGAGATCAGGATCTTCATTCTATGCAGAAATGAAATGGCTCCTGTCAAACA
CAGATAATGCTGCATTCCCGCAGATGACTAAGTCATATAAAAAACAAGAAAAAGCCAGCTCTAATAGTATGGGGGATCCATCA
TTCCGTATCAACTGCAGAGCAAACCAAGCTATATGGGAGTGGAACAAAAGTGGTACAGTTGGGAGTTCTAATTATCAACAATCT
TTTGTACCGAGTCCAGGAGCGAGACCACAAGTTAATGGTATATCTGGAAGAATTGACTTTTATTGGCTAATGCTAAATCCCAATGA
TACAGTCACTTTTCAAGTTTCAATGGGGCTTTCATAGCTCCAGACCGTCAAGCTTCTGAGAGGAAAATCTATGGGAATCCAGAGTG
GAGTACAGGTTGATGCCAATTGTGAAGGGGACTGCTATCATAGTGAGGGGACAATAATAAGTAAGTAACTTCCATTTCAGAACATAGA
TAGCAGGGCAGTTGGAATAATGTCGAGATATGTTAAGCAAAGGAGTCTGCTGCTAGCAACAGGGATGAAGAATGTTCTGAGAT
TCCAAAGGGAAGAGGCTATTTGGTGTATAGCGGTTTTCATTGAAAATGGATGGGAAGGCCTAATTGATGGTTGGTATGGTTTC
AGACACCAGAATGCACAGGGAGAGGGAAGTCTGCAGATTACAAAAGCACTCAATCGGCAATTGATCAAATAACAGGAAAATTA
AACCAGGCTTATAGAAAAAACCAACCAATTTGAGTTGATCGACAATGAATCAATGAGGTAGAGAAGCAAATCGGTAATGTGA
TAAATTGGACCAGAGATTCTATAACAGAAGTGTGTCATACAATGCTGAAGTCTTGGTAGCAATGGAGAACCAGCATACAATTGA
TCTGGCTGATTAGAAAATGGACAACTGTACGAACGAGTGAAGAGACAGCTGAGAGAGAATGCTGAAGAAGATGGCACTGGTTG
CTTTGAAATATTTACAAAGTGTGATGATGACTGTATGGCCAGTATTAGAAATAACACCTATGATCACAGCAAATACAGGGAAGAG
GCAATGCAAAATAGAATACAGATTGACCCAGTCAAATAAGCAGCGGCTACAAAGATGTGATACTTTGGTTTACGTTTCGGGGCAT
CATGTTTCATACTTCTAGCCATTGTAATGGGCCTTGTCTTCATATGTGTAAGAATGGAAACATGCGGTGCACTATTTGTATATAA

Figura 54B, SEQ ID NO: 149

IF*-H7H113.s1-6r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTATATACAAATAGTGACCCGCATGTTTCCAT

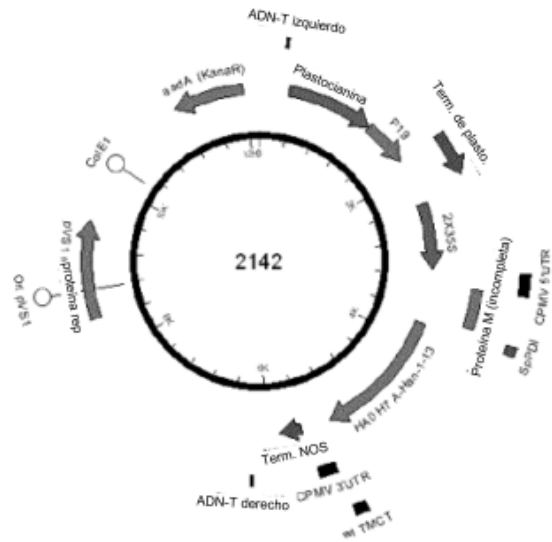
Figura 54C, SEQ ID NO: 150

Secuencia de aminoácidos de PDISP/H7 Hangzhou

MAKNVAIFGLLFSLLVLPSTQIFADKICLGHVAVSNGTKVNTLTERGVEVVNATETVERTNIPRICSKGKRTVDLQCGLLGITGPPQCD
QFLEFSADLIERREGSDVCPYGFVNEALRQILRESGGIDKEAMGFTYSGIRTNGATSACRRSGSSFYAEMKWLLSNTDAAFPQMTK
SYKNTRKSPALIVWGIHHSVSTAEQTKLYGSGNKLTVGSSNYQQSFVPSPGARPQVNGISGRIDFWLMLNPNNDTVTSFNGAFIAPD
RASFLRGKSMGIQSGVQVDANCEGDCYHSGGTIISNLPFQNIIDSRVAGKCPRYVKQRSLLATGMKNVPEIPKGRGLFGAIAAGFIENGW
EGLIDGWYGFHRHQAQEGTAADYKSTQSAIDQITGKLNRLIEKTNQQFELIDNEFNEVEKQIGNVINWTRDSITEVWSYNAELLVAME
NQHTIDLADSEMDKLYERVKRQLRENAEEDGTGCFEIFHKDDDCMASIRNNTYDHSKYREEAMQNRIQIDPVKLSSGYKDVILWFSFG
ASCFILLAIVMGLVFICVKNMNRCTICI*

Figura 54D

Representación esquemática de la construcción número 2142



2X35S/CPMV HT+/PDISP/H7 Hangzhou con bucle proteolítico eliminado/NOS (Construcción núm. 2152)

Figura 55A, SEQ ID NO: 151

Secuencia de nucleótidos de PDISP/H7 Hangzhou con bucle proteolítico eliminado

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGGACAAAATCTGCCTCG
GACATCATGCCGTGTCAAACGGAACCAAAGTAAACACATTAACTGAAAGAGGAGTGGAAGTCGTAATGCAACTGAAACAGTGG
AACGAACAAACATCCCAGGATCTGCTCAAAGGGAAAAGGACAGTTGACCTCGGTCAATGTGGACTCCTGGGGACAATCACTG
GACCACCTCAATGTGACCAATTCCTAGAATTTTCAGCCGATTTAATTATTGAGAGGCGAGAAGGAAGTGATGTCTGTTATCCTGGG
AAATTCGTGAATGAAGAAGCTCTGAGGCAAATTCAGAGAATCAGGCGGAATTGACAAGGAAGCAATGGGATTCACATACAGT
GGAATAAGAACTAATGGAGCAACCAAGTGCATGTAGGAGATCAGGATCTTCATTCTATGCAGAAATGAAATGGCTCCTGTCAAACA
CAGATAATGCTGCATTCCCGCAGATGACTAAGTCATATAAAATACAAGAAAAAGCCAGCTCTAATAGTATGGGGATCCATCA
TTCCGTATCAACTGCAGAGCAAACCAAGCTATATGGGAGTGGAACAACTGGTGACAGTTGGGAGTTCTAATTATCAACAATCT
TTTGATCCGAGTCCAGGAGCGAGACCACAAGTTAATGGTATATCTGGAAGAATTGACTTTCAATTGGCTAATGCTAAATCCCAATGA
TACAGTCACTTTCAGTTTCAATGGGGTTTCATAGCTCCAGACCGTGCAAGCTTCCTGAGAGGAAAATCTATGGGAATCCAGAGTG
GAGTACAGGTTGATGCCAATTGTGAAGGGGACTGCTATCATAGTGGAGGGACAATAAAGTAACTTGCCATTTCAGAACATAGA
TAGCAGGGCAGTTGAAAAATGTCCGAGATATGTTAAGCAAAGGAGTCTGCTGCTAGCAACAGGGATGAAGAATGTTCTGGCGG
ATGGGAAGGCCTAATTGATGGTTGGTATGGTTTCAGACACCAGAATGCACAGGGAGAGGGAACTGCTGCAGATTACAAAAGCAC
TCAATCGGCAATTGATCAAATAACAGGAAAATTAACCGGCTTATAGAAAAACCAACCAACAATTTGAGTTGATCGACAATGAA
TTCAATGAGGTAGAGAAGCAAATCGGTAATGTGATAAATTGGACCAGAGATTCTATAACAGAAGTGTGGTCATACAATGCTGAAC
TCTTGGTAGCAATGGAGAACCAGCATAAATTGATCTGGCTGATTGAGAAATGGACAACTGTACGAACGAGTGAAAAGACAGCT
GAGAGAGAATGCTGAAGAAGATGGCACTGGTTGCTTTGAAATATTTCAAGTGTGATGATGACTGTATGGCCAGTATTAGAAAT
AACACCTATGATCACAGCAAATACAGGGAAGAGGCAATGCAAAATAGAATACAGATTGACCCAGTCAAATAAGCAGCGGCTAC
AAAGATGTGATACTTTGGTTTACGCTCGGGGCATCATGTTTCATACTTCTAGCCATTGTAATGGGCCTTGCTTTCATATGTGTAAG
AATGGAACATGCGGTGCACTATTTGTATATAA

Figura 55B, SEQ ID NO: 152

H7H113(PrL-).r

CCTTCCCATCCGCCAGGAACATTCTTCATCCCTGTTGCTAGCAGCAGAC

Figura 55C, SEQ ID NO: 153

H7H113(PrL-).c

AGAATGTTCTCGCGGATGGGAAGGCCTAATTGATGGTTGGTATGGTT

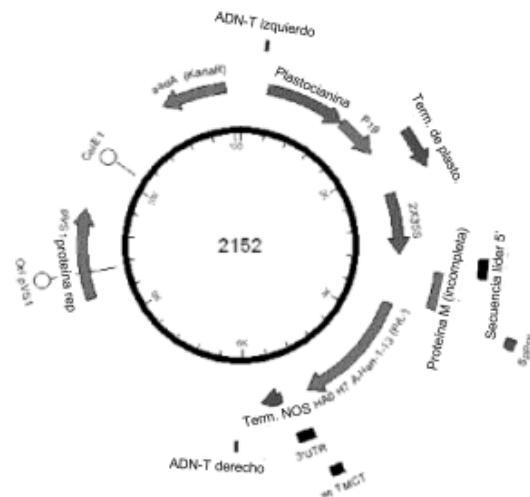
Figura 55D, SEQ ID NO: 154

Secuencia de aminoácidos de PDISP/H7 Hangzhou con bucle proteolítico eliminado

MAKNVAIFGLLFSLVLVPSQIFADKICLGHHAVSNGTKVNTLTERGVEVVNATETVERTNIPRICSKGKRTVDLGQCGLLTITGPPQCD
QFLEFSADLIERREGSDVCYPGKFVNEEALRQILRESGGIDKEAMGFTYSGIRTNGATSACRRSGSSFYAEMKWLLSNTDAAFPQMTK
SYKNTRKSPALIVWGIHHSVSTAEQTKLYSGNKLVTVGSSNYQQSFVPSPGARPQVNGISGRIDFWLMLNPNNDTVTFNGAFIAPD
RASFLRGKSMGIQSGVQVDANCEGDCYHSGGTIISNLPFQNIIDRAVKGCPRYVKQRSLLATGMKNVPGGWEGLDGWYGFHRQNA
QGEGTAADYKSTQSAIDQITGKLNRLIEKTNQFELIDNEFNEVEKQIGNVINWTRDSITEVWSYNAELLVAMENQHTIDLADSEMDKL
YERVKRQLRENAEEDGTGCFEIFHKDDDCMASIRNNTYDHSKYREEAMQNRIQIDPVKLSSGYKDVLWFSFGASCILLAIVMGLVFIC
VKNGNMRCTICI*

Figura 55E

Representación esquemática de la construcción número 2152



2X35S/CPMV HT+ (construcción núm. 2224) y 160+ (construcción núm. 2226) para PDISP/H9 Hong Kong

Figura 56A, SEQ ID NO: 155

Secuencia de nucleótidos de PDISP/H9 Hong Kong

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTATTGTTTTCTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGGATAAAATCTGCATCG
GCCACCAGTCAACAACTCCACAGAACTGTGGACACGCTAACAGAAACCAATGTTCTGTGACACATGCCAAAGAATTGCTCCAC
ACAGAGCATAATGGAATGCTGTGTGCAACAAGCTGGGACATCCCCTCATTCTAGACACATGCACTATTGAAGGACTAGTCTATG
GCAACCCTTCTGTGACCTGCTGTTGGGAGGAAGAGAATGGTCTACATCGTCGAAAGATCATCAGCTGTAATGGAACGTGTTA
CCCTGGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAAGTCAAGGACACTTTTATGTTCCGCTAGTTCCTACCAAGAATCCAAATCTCCAGACA
CAACCTGGAATGTGACTTACACTGGAACAAGCAGAGCATGTTCAAGTTCATTCTACAGGAGTATGAGATGGCTGACTCAAAAGAG
CGTTTTTACCTGTTCAAGACGCCCAATACACAATAACAGGGGAAAGAGCATTCTTTCTGTGTTGGGCATACATCACCACCCA
CCTATACCGAGCAACAAATTTGTACATAAGAAACGACACAACAACAGCGTGACAACAGAAGATTTGAATAGGACCTTCAAACC
AGTGATAGGGCCAAGGCCCTTGTCAATGGTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTATTGGTCTGTTACTAAACAGGCCAAACATTG
CGAGTACGATCCAATGGGAATCTAATTGCTCCATGGTATGGACACGTTCTTTCAGGAGGGAGCCATGGAAGAATCCTGAAGACTG
ATTTAAAGGTGGTAATTGTGTAGTGAATGTCAGACTGAAAAGGTGGCTTAAACAGTACATTGCCATTCCACAATATCAGTAA
TATGCAATTTGGAACCTGCCCAATATGTAAGAGTTAATAGTCTCAAACTGGCAGTCGGTCTGAGGAACGTGCCTGCTAGATCAA
GTAGAGGACTATTTGGAGCCATAGCTGGATTATAGAAGGAGGTTGGCCAGGACTAGTCGCTGGCTGGTATGGTTCCAGCATTC
AAATGATCAAGGGGTTGGTATGGCTGCAGATAGGGATTCAACTCAAAAGGCAATTGATAAAATAACATCCAAGGTGAATAATATA
GTCGACAAGATGAACAAGCAATATGAAATAATTGATCATGAATTTAGTGAGGTTGAACTAGACTCAATATGATCAATAATAAGA
TTGATGACCAATAACAAGACGTATGGGCATATAATGCAGAATTGCTAGTACTCTTGAATAACAAAACTCGATGAGCATGA
TGCGAACGTGAACAATCTATATAACAAGGTGAAGAGGGCACTGGGCTCCAATGCTATGGAAGATGGGAAAGGCTGTTTCGAGCT
ATACCATAAATGTGATGATCAGTGATGGAACAATTCGGAACGGGACCTATAATAGGAGAAAGTATAGAGAGGAATCAAGACT
AGAAAGGCAGAAAATAGAGGGGGTTAAGCTGGAATCTGAGGGAACCTACAAAATCCTCACCATTATTGCTGCTGCCTCATCT
CTGTGCTTGAATGGGGTTTCTGCTTCTGCTGGCCATGTCCAATGGATCTTGCAGATGCAACATTTGTATATAA

Figura 56B, SEQ ID NO: 156

IF*-H9HK107399.S1-6r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTATATACAAATGTTGCATCTGCAAGATCCAT

Figura 56C, SEQ ID NO: 157

Secuencia de aminoácidos de PDISP/H9 Hong Kong

MAKNVAIFGLLFSLLVLPQIFADKICIGHQSTNSTETVDTLTETNPVTHAKELLHTEHNGMLCATSLGHPLILDCTIEGLVYGNPSCD
LLGGREWSYIVERSSAVNGTCYPGNVENLEELRTLFSSASSYQRIQIFPDTTWNVYTGTSRACSGSFYRSMRWLTQKSGFYPVQDAQ
YTNNRGKSILFVWGIHPPPTYEQTNLYIRNDTTTSVTEDLNRTFKPVIGPRPLVNLQGRIDYYWSVLKPGQTLRVRNNGNLIAPWYG
HVLSSGSHGRILKTDLKGNGCVVQCQTEKGLNSTLPFHNSKYAFGTCPKYVRVNSLKLAVGLRNVPARSSRGLFGAIAAGFIEGGWPGL
VAGWYGFQHSNDQGVGMAARDSTQKAIDKITSKVNNIVDKMKNQYEIDHEFSEVETRLNMINNKIDQIQDVWAYNAELLVLEN
QKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGSNAMEDGKGCFFELYHKDDQCMETIRNGTYNRRKYREESRLERQKIEGVKLESEGTYKILTYSTVA
SSLVLAMGFAAFLFWAMSNNGSCRCNICI*

Figura 56D

Representación esquemática de la construcción número 2224

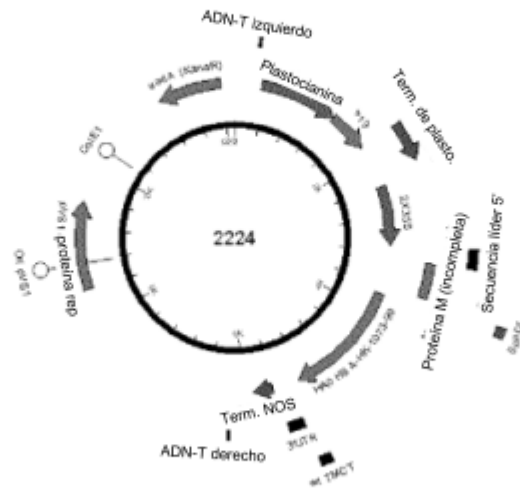
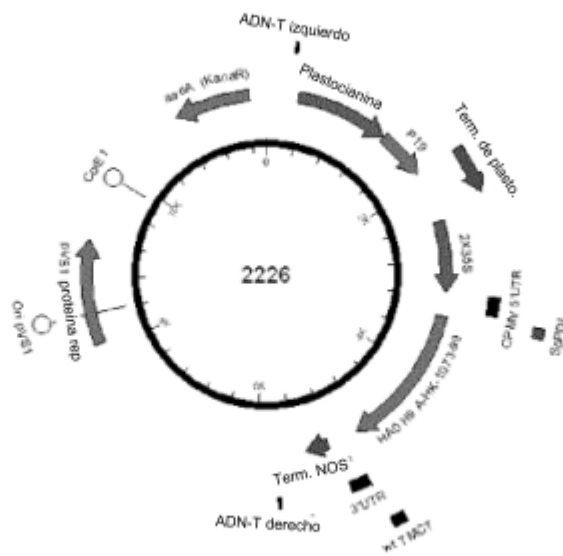


Figura 56E

Representación esquemática de la construcción número 2226



2X35S/CPMV HT+ (construcción núm. 2225) y 160+ (construcción núm. 2227) para PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado

Figura 57A, SEQ ID NO: 158

Secuencia de nucleótidos de PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGGATAAAATCTGCATCG
GCCACCACTCAACAACTCCACAGAACTGTGGACACGCTAACAGAAACCAATGTTCTGTGACACATGCCAAGAATTGCTCCAC
ACAGAGCATAATGGAATGCTGTGTGCAACAAGCCTGGGACATCCCCTCATTCTAGACACATGCACTATTGAAGGACTAGTCTATG
GCAACCTTCTTGTGACCTGCTGTTGGGAGGAAGAGAATGGTCTACATCGTCAAGATCATCAGCTGTAATGGAACGTGTTA
CCCTGGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTCAGGACACTTTTATGTTCCGCTAGTTCCTACCAAGAATCCAAATCTCCAGACA
CAACCTGGAATGTGACTTACACTGGAACAAGCAGAGCATGTTAGGTTTCTTCTACAGGAGTATGAGATGGCTGACTCAAAGAG
CGGTTTTTACCCTGTTCAAGACGCCAATACACAATAACAGGGGAAAGAGCATTCTTTCTGTGGGGCATACATCACCCACCCA
CCTATACCGAGCAAACAAATTTGTACATAAGAAACGACACAACAACAGCGTGACAACAGAGATTGTAATAGGACCTTCAAACC
AGTGATAGGGCCAAGGCCCTTGTCAATGGTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTATTGGTCCGTACTAAAACAGGCCAAACATTG
CGAGTACGATCCAATGGGAATCTAATTGCTCCATGGTATGGACACGTTCTTTCAGGAGGGAGCCATGGAAGAATCCTGAAGACTG
ATTTAAAGGTGGTAATTGTGTAGTGAATGTGAGACTGAAAAAGGTGGCTTAAACAGTACATTGCCATTCCACAATATCAGTAAA
TATGCAATTTGGAACCTGCCCAATATGTAAGAGTTAATAGTCTCAAACCTGGCAGTCGGTCTGAGGAACGTGCCTGGCGGAGGTT
GGCCAGGACTAGTCGCTGGCTGGTATGGTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGGTTGGTATGGCTGCAGATAGGGATTCAACTCA
AAAGGAATTGATAAAATAACATCAAGGTGAATAATATAGTCGACAAGATGAACAAGCAATATGAAATAATTGATCATGAATTT
AGTGAGGTTGAACTAGACTCAATATGATCAATAATAAGATTGATGACCAAATACAAGACGATGGGCATATAATGCAGAATTGC
TAGTACTACTTGAAATCAAAAAACACTCGATGAGCATGATGCGAACGTGAACAATCTATATAACAAGGTGAAGAGGGCACTGG
GCTCCAATGCTATGGAAGATGGGAAAGGCTGTTTCGAGCTATACCATAAATGTGATGATCAGTGCATGGAACAATTCGGAACGG
GACCTATAATAGGAGAAAGTATAGAGAGGAATCAAGACTAGAAAGGCAGAAAATAGAGGGGGTTAAGCTGGAATCTGAGGGAA
CTTACAAAATCCTCACCATTATTTCGACTGTGCGCTCATCTCTGTGCTTGCAATGGGGTTTGCTGCCTTCTGCTGGCCATGTC
CAATGGATCTGCAGATGCAACATTTGTATATAA

Figura 57B, SEQ ID NO: 159

H9HK107399(Prl-).r

GTCTGGCCAACCTCCGCCAGGCACGTTCTCAGACCGACTGCCAGTT

Figura 57C, SEQ ID NO: 160

H9HK107399(Prl-).c

GGAACGTGCCTGGCGGAGGTTGGCCAGGACTAGTCGCTGGCTGGTATG

Figura 57D, SEQ ID NO: 161

Secuencia de aminoácidos de PDISP/H9 Hong Kong con bucle proteolítico eliminado

MAKNVAIFGLLSLLVLPVPSQIFADKICIGHQSTNSTETVDTLTETNPVPTHAKELLHTEHNGMLCATSLGHPLIDTCTIEGLVYGNPSCD
LLLGREWSYIYVERSSAVNGTCYPGNVENLEELRTLFSASSYQRIQIFPDTTWNVYTGTSRACSGSFYRSMRWLTQKSGFYPVQDAQ
YTNNRGKSILFVWGIHPPTYTEQTNLYIRNDTTTSTTTEDLNRTFKPVIGPRPLVNLQGRIDYYWSVLKPGQTLRVRNNGNLIAPWYG
HVLGGSGHGRILKTDLKGNCVVQCQTEKGLNSTLPHNISKYAFGTCPKYVRVNSLKLAVGLRNVPGGGWPGLVAGWYGFQHSND
QGVGMAARDSTQKAIDKITSKVNINIVDKMNKQYEIIDHEFSEVETRLNMINKIDDQIQDVWAYNAELLVLENQKTLDEHDANVN
NLYNKVKRALGSNAMEDGKGFELYHKDDQCMETIRNGTYNRRKYREESRLERQKIEGVKLESEGYTKILTIYSTVASSLVLAMGFAAF
LFWAMSNNGSCRCNICI*

Figura 57E

Representación esquemática de la construcción número 2225

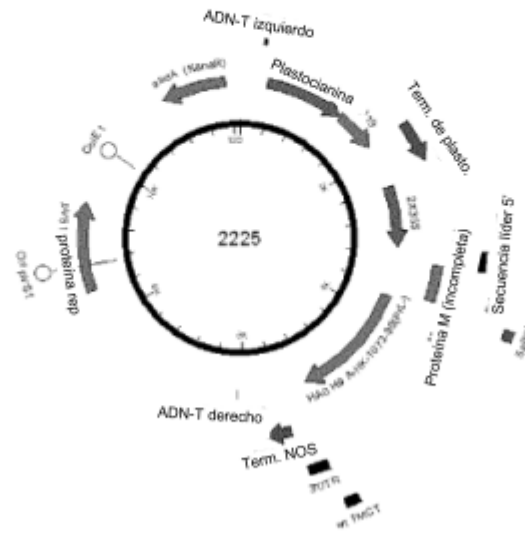


Figura 57F

Representación esquemática de la construcción número 2227



2X35S/CPMV 160+/PDISP/HA B Malaysia/NOS (Construcción núm. 2013)

Figura 58A, SEQ ID NO: 162

Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Malaysia

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCTTCTCAGATCTTCGCGGATCGAATCTGCACTG
GGATAACATCGTCAAACCTACCACATGTTGTCAAACTGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGAATACCACTGACAAC
AACACCCACCAAATCTCATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACCAGAGGGAACTATGCCCAAAATGCCTCAACTGCACAGATC
TGGACGTGGCCTTGGGCGAGACCAAAATGCACGGGGAACATACCTCGGCAAGAGTTTCAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTAC
ATCTGGGTGCTTCTATAATGCACGACAGAACAAAAATTAGACAGCTGCCTAACTTCTCAGAGGATACGAACATATCAGGTTAT
CAACTCATAACGTTATCAATGCAGAAAATGCACAGGAGGACCTACAAAATTGGAACTCAGGGTCTTGCCCTAACGTTACCAAT
GGAAACGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCGTCCCAAAAAACGACAACAACAAACAGCAACAAATTCATTAACAATAGAAG
TACCATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCAAAATTACGTTTGGGGGTTCCACTCTGATAACGAAACCCAAATGGCAAAGCTCTAT
GGGGACTCAAAGCCCCAGAGTTACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTACAGATTGGTGGCTTCCCAATCA
AACAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGTAGAAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAATCTGGGAAAACAGGAACAATTAC
CTATCAAAGAGGTATTTTATGCTCAAAAAGTGTGGTGCAGAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCGTTGCCTTTAATT
GGAGAAGCAGATTGCTCCACGAAAAATACGGTGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCATA
GGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTTGAAGCTGGCAATGGAACCAATATAGACCTCTGCAAACTATTAAGGAAA
GGGGTTTCTCGGAGCTATTGCTGTTTCTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCAGGATACACATCCCATG
GGGCACATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACTCAAGAGGCCATAAACAAGATAACAAAAAATCTCAACTCTTGA
GTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCCATGGATGAATCCACAACGAAATACTAGAAGTAGACGAGAAAG
TGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAATAGAACTCGCAGTCTGCTTCCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGA
TGAGCATCTCTGGCGCTTGAAGAAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAACC
AAACACAAGTGAACACAGACCTGTCTGCAGAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTTCTCTCCCACTTTTGATTCA
CTGAATATTACTGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTG
GCTGTAACATTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTGCTCCATCTGTCTATAA

Figura 58B, SEQ ID NO: 163

IF**-HBM250604.S1-6r

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTATAGACAGATGGAGCAAGAAACATTGTCTC

Figura 58C, SEQ ID NO: 164

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Malaysia

MAKNVAIFGLFSLVLPVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGIPLTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLVALG
RPKCTGNIPSARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPKLLRGYEHRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCPNTVNGNGFFATMAW
AVPKNDNNKTATNSLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSQJGGFPNQTEDGGLPQSGRI
VVDYIMVQKSGKGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKSLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYTGHAHAIGNCPIWVKPLKLANGTK
YRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHVAVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEIL
ELDEKVDLRLADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSL
ITAASLNDGDLNHTILLYSTAASSLAVTLMIAIFVVMVSRDNVSCSICL*

Figura 58D

Representación esquemática de la construcción número 2013

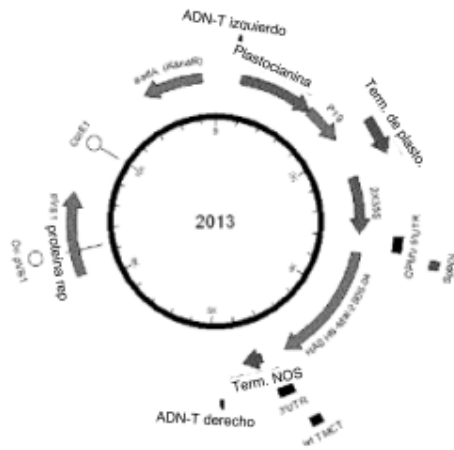
2X35S/CPMV 160+/PDISP/HA B Malaysia con bucle proteolítico eliminado/NOS (Construcción núm. 2014)

Figura 59A, SEQ ID NO: 165

Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Malaysia con bucle proteolítico eliminado

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGGATCGAA
 TCTGCACTGGGATAACATCGTCAAACCTCACCACATGTTGTCAAACCTGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGT
 AATACCACTGACAACAACACCCACCAAATCTCATTTTGCAAATCTCAAAGGAACAGAAACAGAGGGAAACTATGCCCA
 AAATGCCTCAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAAATGCACGGGGAACATACCCCTCGGCAAGAGTTT
 CAATACTCCATGAAGTCAGACCTGTTACATCTGGGTGCTTTCTATAATGCACGACAGAACAATAATTAGACAGCTGCC
 TAAACTTCTCAGAGGATACGAACATATCAGGTTATCAACTCATAACGTTATCAATGCAGAAATGCACCAAGGAGGACCC
 TACAAAATTGGAACCTCAGGGTCTTGCCCTAACGTTACCAATGGAACCGGATTTTTCGCAACAATGGCTTGGGCCGTCC
 CAAAAACGACAACAACAAAACAGCAACAATTCATTAACAATAGAAGTACCATACATTTGTACAGAAGGAGAAGACCA
 AATTACCGTTTGGGGGTCCACTCTGATAACGAAACCCAAATGGCAAAGCTCTATGGGGACTCAAAGCCCCAGAAGTTC
 ACCTCATCTGCCAACGGAGTGACCACACATTACGTTTCACAGATTGGTGGCTTCCCAAATCAAACAGAAGACGGAGGAC
 TACCACAAAGCGGTAGAAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAATCTGGGAAAACAGGAACAATTACCTATCAAAGAGG
 TATTTTATTGCCTCAAAAAGTGTGGTGCAGAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAGGATCGTTGCCTTTAATTGGAGAA
 GCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGGGAACATGCAAAGGCCATAG
 GAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGA
 AGGAATGATTGCAGGTTGGCAGGATACACATCCCATGGGGCAGATGGAGTAGCGGTGGCAGCAGACCTTAAGAGCACT
 CAAGAGGCCATAAAACAGATAACAAAAATCTCAACTCTTGAGTGAGCTGGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGCG
 GTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTAGAAGTAGACGAGAAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTC
 ACAAAATAGAAGCTCGCAGTCTGCTTTCCAATGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTCTTGGCGCTTGAAAGA
 AAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCTCTGCTGTAGAGATAGGGAATGGATGCTTTGAAACCAACACAAGTGCAACCAGA
 CCTGTCTCGACAGAATAGCTGCTGGTACCTTTGATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCACTTTTGATTCACTGAATATTAC
 TGCTGCATCTTTAAATGACGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTTTACTACTCAACTGCTGCCTCCAGTTTGGCT
 GTAACATTGATGATAGCTATCTTTGTTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCTATAA

Figura 59B, SEQ ID NO: 166

HBM250604(PrL).r

CATTCTTCCCATCTCCACCAGGAGGTCTATATTTGGTTCATTGGC

Figura 59C, SEQ ID NO: 167

HBM250604(PrL-).c

AGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCACGGA

Figura 59D, SEQ ID NO: 168

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Malaysia con bucle proteolítico eliminado

MAKNVAIFGLLSLLVLPVSIQIFADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLDAVG
RPKCTGNIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPKLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCPNVTNGNGFFATMAW
AVPKNDNNKTATNSLTIEVPYICTEGEDQITVWGFSHDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSANGVTTHYVSIQIGFPNQTEGGLPQSGRI
VVDYMVQKSGKGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIGSLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYTGHAHAIGNCPIVVKTPKLKANGTK
YRPPGGGWEGMIAGWHGYTSHGAHVAVAADLKSTQEAINKITKNLSLELVKNLQRLSGAMDELHNEILEDEKVDLDRADTISS
QIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNCGFETKHCKNQCTLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSLNTAASLNDDGLDNHT
ILLYSTAASSLAVTLMAIFVVMVSRDNVSCSICL*

Figura 59E

Representación esquemática de la construcción número 2014



2X35S/CPMV HT (construcción núm. 2070), HT+ (construcción núm. 2080) y 160+ (-Mprot) (construcción núm. 2090) para PDISP/HA B Massachusetts

Figura 60A, SEQ ID NO: 169

Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Massachusetts

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGCGCTATTGTTTCTCTTCTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCCGATCGAATCTGCACTG
GGATAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCTACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGTGATACCACTAACAAC
AACACCAACAAAATCTTATTTTGAAATCTCAAAGGAACAAAGACCAGAGGGAAATATGCCCAGACTGTCTCAACTGTACAGATC
TGGATGTGGCCCTGGGCAGGCCAATGTGTGTGGGAACACACCTTCTGCGAAAGCTTCAATACTTCACGAAGTCAGACCTGTTAC
ATCCGGGTGCTTCCCTATAATGCACGACAGAACAAAATCAGGCAACTAGCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGTTAT

CAACCCAAAACGTTATCGATGCAGAAAAGGCACAGGAGGACCTACAGACTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAG
TAAAGCGGATTTTCGCAACAATGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAAATGCAACGAACCCATTAAACAGTAGAAGTA
CCATACATTTGTGAGAAGGGGAAGACCAAACTACTGTTTGGGGGTTCCATTAGATAACAAAACCCAAATGAAGAACCTCTATG
GAGACTCAAATCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACACACATTATGTTTCTCAGATTGGCGGCTTCCCAGATCAAA
CAGAAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGAATTGTCGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCT
ATCAAAGAGGTGTTTTGTTGCTCAAAAGGTGTGGTGCAGGAGTGGCAGGAGCAAGTAATAAAAGGGTCTTGCTTTAATTGG
TGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGG
AAATTGCCCAATATGGGTGAAAAACCTTTGAAGCTTGCCAATGGAACCAATATAGACCTCTGCAAACTATTAAAGGAAAGG
GGTTTCTCGGAGCTATTGCTGTTTCTAGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGAGGTTGGCAGGATACACATCTCACGGA
GCACATGGAGTGGCAGTTGCTGCAGACCTTAAGAGCACACAAGAAGCTATAACAAGATAACAAAAATCTCACTCTTTGAGTG
AGCTAGAAGTAAAGAATCTCAAAGGCTAAGTGGTCCATGGATGAATCCACAACGAAATACTCAGCTGGATGAGAAAGTGG
ATGACCTCAGAGCTGACACTATAAGTTCACAAATAGAAGTTCAGTCTTCTTCCAACGAAGGAATAATAACAGTGAAGACGA
GCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAATAAGAAAATGCTGGTCCCTCTGCTGTAGACATAGGAAATGGATGCTTCGAAACCAAA
CACAAATGCAACAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTAATGCAGGAGAGTTTTCTCTCCCACTTTTGATTCAATG
AACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACCATATACTGCTTATTACTCACTGCTGCTTCTAGTTTGGCTG
TAACATTGATGCTAGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTCTATAA

Figura 60B, SEQ ID NO: 170

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Massachusetts

MAKNVAIFGLLFSLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTPTKSYFANLKGKTRGKLCPCDCLNCTDLVALG
RPMCVGTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHRTKIRQLANLLRGYENIRLSTQNVDAEKAPGGPYRLGTSGPCPNATSKSGFFATMA
WAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICAEDEDQITVWGFHSDNKTQMKNLGDSNPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFPDQTEDGGLPQSG
RIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYTGHEHAKAIGNCPIVVKTPKLAN
GTYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWHGYTSHGAHVAVAADLKSTQEAINKITKNLSLELVKNLQRLSGAMDELH
NEILELDEKVDLRLADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTF
DSLNTAASLNDGLDNHTILLYSTAASSLAVTLMILAIFIVYMVSRDNVSCSICL*

Figura 60C

Representación esquemática de la construcción número 2070

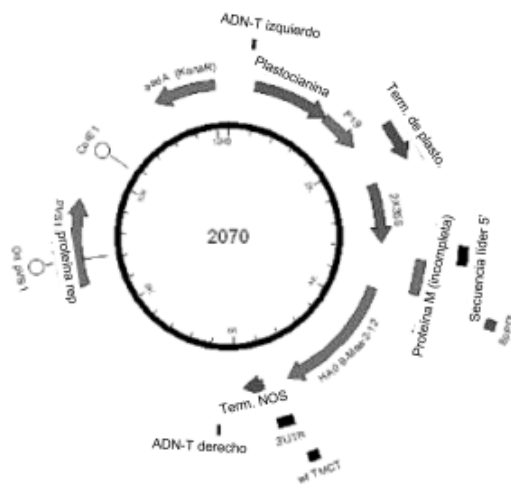


Figura 60D

Representación esquemática de la construcción número 2080

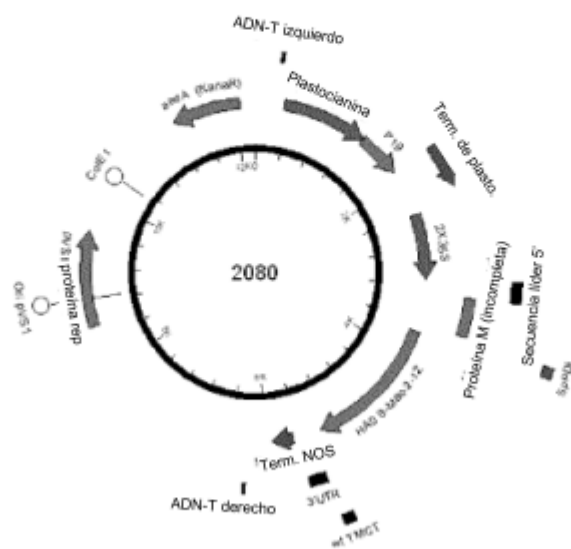
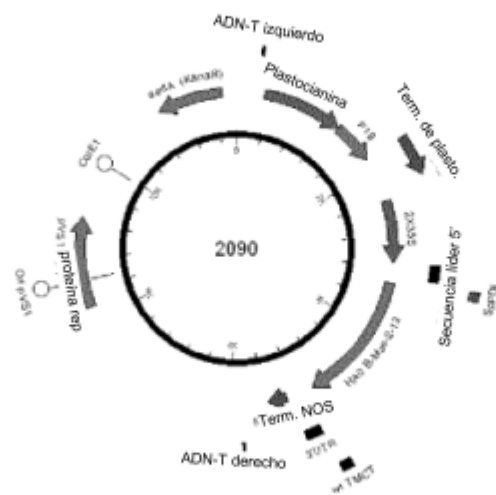


Figura 60E

Representación esquemática de la construcción número 2090



**2X35S/CPMV HT+/PDISP/B Florida con bucle proteolítico eliminado/NOS (Construcción número 2102) y
2X35S/CPMV HT+/BeYDV/PDISP/B Florida con bucle proteolítico eliminado/NOS (Construcción número 2104)**

Figura 61A SEQ ID NO: 190

HBF406(PrL-).r (construcciones 2102 y 2104)

TCCTTCCCCTCCTCCACCAGGAGGTCTATATTTGGTTCCATTGGCGAGCTTCAAAG

Figura 61B SEQ ID NO: 191

HBF406(PrL-).c (construcciones 2102 y 2104)

ATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGCTGGCACGGA

Figura 61C SEQ ID NO: 192

IF*-HBF406.s1-6r (construcciones 2102 y 2104)

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTATAGACAGATGGAGCATGAAACGTTGTCTC

Figura 61D SEQ ID NO: 193

Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Florida con bucle proteolítico eliminado (construcciones 2102 y 2104)

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTTCTCAGATCTTCGCGGATCGAA
TCTGCACTGGAATAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGTCAAAACAGCCACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGT
GATACCACTAACCAACACCAACAAAATCTTATTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGAACTATGCCCA
GACTGTCTCAACTGCACAGATCTGGATGTGGCTTTGGGCAGACCAATGTGTGTGGGGACCAACACCTTCGGCGAAGGCTT
CAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCTCTATAATGCACGACAGAAACAAAATCAGGCAACTACC
CAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGCTATCAACCCAAAACGTCATCGATGCGGAAAAGGCACAGGAGGACCC
TACAGACTTGGAACTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACAGTAAGAGCGGATTTTCGCAACAATGGCTTGGGCTGTCC
CAAAGGACAACAACAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACTTTGTACAGAAGGGGAAGACCAAT
CACTGTTTGGGGGTTCCATTGAGATAACAAAACCCAAATGAAGAACCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAGTTCAACC
TCATCTGCTAATGGAGTAACACACACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCCAGATCAACAGAAAGACGGAGGACTAC
CACAAAGCGGCAGGATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTCTACCAAAGAGGTGT
TTTGTTCCTCAAAGGTGTGGTGCAGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCCTTGCCCTTAATTGGTGAAGCA
GATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAA
ATTGCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTCGCCAATGGAACCAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGG
AATGATTGCAGGCTGGCACGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGGCGGACCTTAAGAGTACGCAA
GAAGCTATAACAAGATAACAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGTGGTG
CCATGGATGAAGTCCACAACGAATACTCGAGCTGGATGAGAAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCGCA
AATAGAACTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAA
CTAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGAGATAGGAAATGGATGCTTCGAAACCAACACAAGTGCAACCAGACCT
GCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCTTTTGATTCACTGAACATTACTGC
TGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTCTAGTTTGGCTGTA
ACATTGATGCTAGCTATTTTATGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTGTCTATAA

Figura 61E SEQ ID NO: 194

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Florida con bucle proteolítico eliminado (construcciones 2102 y 2104)

MAKNVAIFGLLFSLLVLPVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVIPLTTPTKSYFANLKGTRTRGKLCF
DCLNCTDLDLVALGRPMC VGTTTPSAKASILHEVKPVTSGCFPIIMHDKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEKAPGGP
YRLGTSGSCP NATSKSGFFATMAWAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMKNLYGDSNPQKFT
SSANGVTTHYVSQIGSPFDQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPKGTGTIVYQRGVLLPQKVCASGRSKVIGKSLPLIGEA

DCLHEKYGGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPGGGWEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQ
EAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERK
LKKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSLNI TAASLNDGDLDNHTILLYSTAASSLAV
TLMLAIFIVYMVSRDNDVSCSICL*

Figura 61F SEQ ID NO: 195

Casete de expresión número 2102 del promotor 2X35S al terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de
|PDISP/HA B Florida con bucle proteolítico eliminado está subrayada.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTG
AGACTTTTCAACAAAGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGAT
AGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGAC
AGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAG
TGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCA
AAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTT
ATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATG
CCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTC
TTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCT
TCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTTGGGAA
ACCCGAACCAACCTTCTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTTCTTGGCTGAGCGA
TCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTG
GACACGTAGTGGCGGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTATTCTTGTGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTCT
GGAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCT
TGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTGTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGA
AACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAAGCTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGGGCCC
AATACCGCGGAGAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTTCGGCTTATTGTTTTCTTCTTGTGTTGGTTCTTCTCAGA
TCTTCGCGGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCCACTCAAGGGGAGGT
CAATGTGACTGGTGTGATACCACTAACAAACACCAACAAATCTTATTTGCAAATCTCAAAGGAACAGGACACAGA
GGGAAATATGCCCAGACTGTCTCAACTGCACAGATCTGGATGTGGCTTTGGGCAGACCAATGTGTGTGGGGACACAC
CTTCGGCGAAGGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTTACATCGGGTGCTTTCTTATAATGCACGACAGAACAA
AATCAGGCAACTACCAATCTTCTCAGAGGATATGAAATATCAGGCTATCAACCCAAAACGTATCGATGCGGAAAAG
GCACAGGAGGACCTACAGACTTGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAGAGCGGATTTTTCGCAACAA
TGGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAAACAAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGA
AGGGGAAGACCAATCACTGTTTGGGGGTTCCATTTCAGATAACAAACCCAAATGAAGAACCTCTATGGAGACTCAAAT
CCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACACACACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCCAGATCAAACAG
AAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGGATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGT
CTACCAAGAGGTTGTTTTGCTTCAAAGGTGTGGTGGCGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCTTGCCT
TTAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATG
CAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTCGCCAATGGAACCAATATAGACCTCCTGG
TGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGCTGGCAGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGGCGGAC
CTTAAGAGTACGCAAGAAGCTATAACAAGATAACAAAAATCTCAATCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAATCTTC
AAAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAACTCCACAACGAAATACCTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGA
CACTATAAGCTCGCAAATAGAACTTGCACTTGTCTTCCAAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTATTG
GCATTGAGAGAAAACTAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGAGATAGGAAATGGATGCTTCGAAACCAAAACACA
AGTGCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTAAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCCACTTTTGATTC
ACTGAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACCACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCT
TCTAGTTTGGCTGTAACATTGATGCTAGCTATTTTTATTGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCT
GTCTATAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAAGCGGTTTTCTG
TGCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACA
CAAAAGATTTTAAATTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCG
TTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTATCATATAATTTCTGTTG
AATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGC
AATTATACATTTAATACCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAACTAGGATAAATATCGCGCGGTTGTCATCTAT
GTTACTAGAT

Figura 61G

Representación esquemática de la construcción número 2102

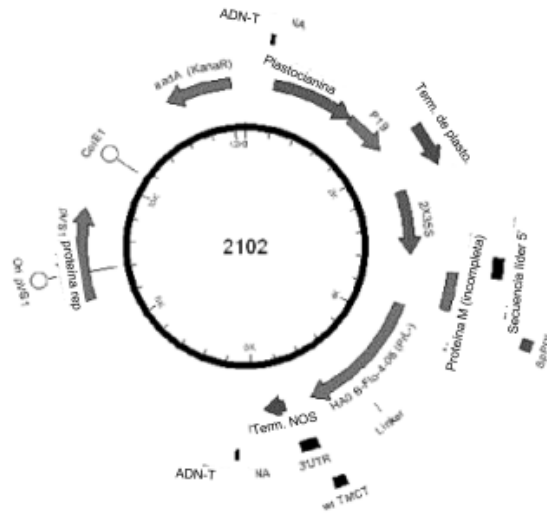


Figura 61H SEQ ID NO: 196

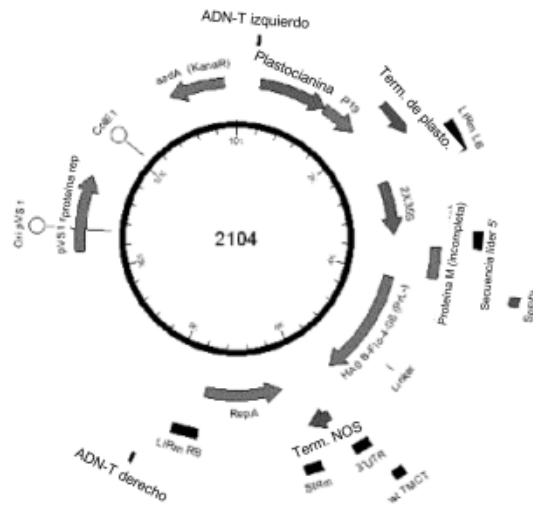
Casete de expresión número 2104 de LIR izquierda a derecha. La secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Florida con bucle proteolítico eliminado está subrayada.

TGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTTATAACCGGCGTGAGGCATGGAGGCAGGGGTATTTTGGT
 CATTTTAAATAGATAGTGGAAAATGACGTGGAATTTACTTAAAGACGAAGTCTTTGCGACAAGGGGGGGCCACGCCGAA
 TTTAATATTACCGGCGTGGCCCCCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTTAAAGTAGAAAATTTCCC
 GCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACTATATAAAGCATATACGATGTGATGGTATTGGTCGACAAGCTTGCATGCCGG
 TCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAGGGCAATTGA
 GACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
 GTGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTGCGGACA
 GTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAACGTTCCAACACGTCTTCAAAGCAAGT
 GGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTA
 TTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGC
 CTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAACGTTCCAACACGTCTT
 TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTT
 CCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGTATTTAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAA
 CCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTTCTGCGTGAGCGAT
 CTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAAGTACACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGG
 ACACGTAGTGCAGCGCCATTAATAACGTGTACTTGTCTTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGCTG
 GAGGCTGTCTTTCAGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTT
 GACGAGGTATTGTGCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAA
 ACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTCGAACCTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATCTGCCCCAAATTTGTGGGGCCA
 ATACCGCGGAGAAAATGGCGAAAACGTTTTCGATTTTTCGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCTTCTCAGAT
CTTCGCGGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCCACTCAAGGGGAGGTC
AATGTGACTGGTGTGATACCACTAACAAACACCAACAAAATCTTATTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAG
GGAAACTATGCCGAGACTGTCTCAACTGCACAGATCTGGATGTGGCTTTGGGCAGACCAATGTGTGTGGGGACCACACC
TTCCGCGAAGGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCTTATAATGCACGACAGAACAAAA

ATCAGGCAACTACCCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGCTATCAACCCAAAACGTCATCGATGCGGAAAAGG
 CACCAGGAGGACCCTACAGACTTGGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAGAGCGGATTTTTCGCAACAAT
 GGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAA
 GGGGAAGACCAAATCACTGTTTGGGGTTCATTTCAGATAACAAAACCCAAATGAAGAACCCTATGGAGACTCAAATC
 CTCAAAAGTTCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACCACACACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCAGATCAAAACAGA
 AGACGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGGATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTC
 TACCAAAGAGGTGTTTTGTTGCCTCAAAGGTGTGGTGCAGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAAGGGTCCTTGCCTT
 TAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGC
 AAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTCGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCCTGGT
 GGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGCTGGCAGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGGCGGACC
 TTAAGAGTACGCAAGAAGCTATAACAAGATAACAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAATCTTCA
 AAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAACCTCACACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGAC
 ACTATAAGCTCGCAATAGAACTTGCACTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAAACAGTGAAGATGAGCATCTATTGG
 CACTTGAGAGAAAATAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGAGATAGGAAATGGATGCTTCGAAACCAAACACAA
 GTGCAACCAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAATTTTCTCTCCCACTTTTGATTCA
 CTGAACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACCATACTATACTGCTCTATTACTCAACTGCTGCTT
 CTAGTTTGGCTGTAACATTGATGCTAGCTATTTTTATGTTTATATGGTCTCCAGAGACAACGTTTCATGCTCCATCTG
 TCTATAAAGGCCATTTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGT
 GCTCAGAGTGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCTGCCCTTCAGCAAGGACAC
 AAAAGATTTTAATTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGT
 TCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGA
 ATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCA
 ATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAACTAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCATCTATG
 TTAGTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCATAAAATGATTATTTTATGAATATATTTTATTGTGCAAGTAGAT
 AGAAATTACATATGTTACATAACACAGAAATAAACAAAAAAGACAATCCAAAAACAAACACCCCAAAAAAATAATC
 ACTTTAGATAAACTCGTATGAGGAGAGGCACGTTCACTGACTCGACGATTCCCGAGCAAAAAAGTCTCCCGTCAAC
 ATATAGTGGGTGACGCAATTATCTTTAAAGTAATCCTTCTGTTGACTTGTCAATGATAACATCCAGTCTTCGTGAGGAT
 TGCAAGAATTATAGAAGGGATCCACCTTTATTTTCTTTTCCATATTAGGGTTGACAGTGAAATCAGACTG
 GCAACCTATTAATTGCTTCCACAATGGGACGAACCTGAAGGGGATGTCGTGATGATATTATAGGTGGCGTGTTCATCG
 TAGTTGGTGAAATCGATGGTACCGTTCCAATAGTTGTGTCGTCCGAGACTTCTAGCCAGGTGGTCTTTCCGGTACGAG
 TTGGTCCGCAGATGTAGAGGCTGGGGTGTGCGATTCCATTCTTCCATTGTCTGGTTAAATCGGCCATCCATTCAAGG
 TCAGATTGAGCTTGTGGTATGAGACAGGATGTATGTAAGTATAAGCGTCTATGCTTACATGGTATAGATGGGTTTCCC
 TCCAGGAGTGTAGATCTTCGTGGCAGCGAAGATCTGATTCTGTGAAGGGCGACACATACGGTTCAGGTTGTGGAGGGAA
 TAATTTGTTGGCTGAATATTCAGCCATTGAAGTTTTGTTGCCCATTCATGAGGGAATCTTCTCTGATCATGTCAAGA
 TATTCTCCTTAGACGTTGCAGTCTGGATAATAGTTCTCCATCGTGCCTCAGATTGCGAGGAGAGACCTTATGATCTC
 GGAAATCTCCTCTGGTTTTAATATCTCCGTCCTTTGATATGTAATCAAGGACTTGTTTAGAGTTTCTAGCTGGCTGGAT
 ATTAGGGTGATTTCTTCAAATCGAAAAAAGAAGGATCCCTAATACAAGGTTTTTATCAAGCTGGAGAAGAGCATGA
 TAGTGGGTAGTGCCATCTTGATGAAGCTCAGAAGCAACCAAGGAAGAAAATAAGAAAAGGTGTGAGTTTCTCCAGA
 GAACTGGAATAAATCATCTCTTTGAGATGAGCACTTGGGATAGGTAAGGAAAACATATTTAGATTGGAGTCTGAAGTT
 CTTACTAGCAGAAGGCATGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTGCTCAAACCTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGA
 GGCAGGGGTATTTTGGTCATTTTAATAGATAGTGGAAAATGACGTGGAATTTACTTAAAGACGAAGTCTTTGCGACAAG
 GGGGGGCCACGCCGAATTTAATATTACCGGCGTGGCCCCCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATT
 AAAGTAGAAAATTTCCCGCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACTATATAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTG

Figura 61I

Representación esquemática de la construcción número 2104



2X35S/CPMV HT+/PDISP/B Florida+H1 California TMCT con bucle proteolítico eliminado/NOS
(Construcción número 2106) y 2X35S/CPMV HT+/BeYDV/PDISP/B Florida + H1 California TMCT con
bucle proteolítico eliminado/NOS (Construcción número 2108)

Figura 62A SEQ ID NO: 197

IF-H1cTMCT.S1-4r (Construcciones 2106 y 2108)

ACTAAAGAAAATAGGCCTTTAAATACATATTCTACACTGTAGAGAC

Figura 62B SEQ ID NO: 198

Secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Florida+H1Cal TMCT con bucle proteolítico eliminado (construcciones
2106 y 2108)

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTTGGTTTCCTTCTCAGATCTTCGCGGATCGAA
TCTGCACTGGAATAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAACAGCCACTCAAGGGGAGGTCAATGTGACTGGTGT
GATACCACTAACAAACACCAACAAAATCTTATTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAGGGAACTATGCCCA
GACTGTCTCAACTGCACAGATCTGGATGTGGCTTTGGGCGAGACCAATGTGTGTGGGAGACCACACCTTCGGCGAAGGCTT
CAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCTCTATAATGCACGACAGAACAAAAATCAGGCAACTACC
CAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGCTATCAACCCAAAACGTCATCGATGCGGAAAAGGCACAGGAGGACCC
TACAGACTTGGAACTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAAGTAAGAGCGGATTTTCGCAACAATGGCTTGGGCTGTCC
CAAAGGACAACAACAAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTGTACAGAAGGGGAAGACCAAT
CACTGTTTGGGGGTTCCATTGAGATAACAAAACCCAAATGAAGAACCTCTATGGAGACTCAAATCCTCAAAGTTTCAAC
TCATCTGCTAATGGAGTAACACACACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCAGATCAAACAGAGACGGAGGACTAC
CACAAAGCGGCAGGATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTTGCTACCAAAGAGGTGT
TTTGTGTCCTCAAAGGTGTGGTGCAGGAGTGGCAGGAGCAAAAGTAATAAAAGGGTCCTTGCCCTTAATTGGTGAAGCA
GATTGCCTTCATGAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAA
ATTGCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTCGCCAAATGGAACCAATATAGACCTCCTGGTGGAGGATGGGAAGG
AATGATTGCAGGCTGGCACGGATACACTCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGGCGGACCTTAAGAGTACGCAA

GAAGCTATAAACAAGATAACAAAAATCTCAATTCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAATCTTCAAAGACTAAGTGGTG
CCATGGATGAACTCCACAACGAAATACTCGAGCTGGATGAGAAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGACACTATAAGCTCGCA
AATAGAACTTGAGTCTTGTCTTCCACGAAGGAATAATAACAGTGAAGATGAGCATCTATTGGCACTTGAGAGAAAA
CTAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGAGATAGGAAATGGATGCTTCGAAACCAAACACAAGTGCAACCAGACCT
GCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAGAAATTTCTCTCCCACTTTTGATTCACTGAACATTACTGC
TGCATCTTTAAATGATGATGGATTGGATAACTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTCGCCAGTTTATTGGTACTG
GTAGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAA

Figura 62C SEQ ID NO: 199

Secuencia de aminoácidos de PDISP/HA B Florida+H1Cal TMCT con bucle proteolítico eliminado (construcción 2106 y 2108)

MAKNVAIFGLFSLVLVPSQIFADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVIPLTTTPTKSYFANLKGTRTRGKLC
DCLNCTDLVALGRPMC VGTTTPSAKASILHEVKPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEPGGP
YRLGTSGSCP NATSKSGFFATMAWAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMKNLGYDSNPQKFT
SSANGVTTHYVSQIGSFPDQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVCASGRSKVIKGSPLIGEA
DCLHEKYGGLNKSPPYTGHEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPGGWEGMIAGWHGYTSHGAHVAVAADLKSTQ
EAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDLDRADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERK
LKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEPSLPTFDSLNI TAASLNDDGLDNYQILAIYSTVASSLVL
VVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*

Figura 62D SEQ. ID. NO: 200

Casete de expresión número 2106 del promotor 2X35S al terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Florida+H1Cal TMCT con bucle proteolítico eliminado está subrayada.

GTCAACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTG
AGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGAT
AGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTCTGCCGAC
AGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAGAAAGACGTTCCAACCACGCTCTTCAAAGCAAG
TGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCAGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCA
AAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTT
ATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATG
CCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAGAAAGACGTTCCAACCACGTC
TTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCT
TCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTATTGGAGAGGTATTTAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAGCGAACGTGGGGAA
ACCCGAACCAAACTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGA
TCTTCAACGTTGTGAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTG
GACACGTAGTGGCGGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTG
GGAGGTGCTGTTTCAAGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCT
TGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGA
AACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGTGGGGCC
AATACCGCGGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCTTCTCAGA
TCTTTCGGGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCCACTCAAGGGGAGGT
CAATGTGACTGGTGTGATACCACTAACAACAACCAACAAATCTTATTTGCAAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGA
GGGAAACTATGCCAGACTGTCTCAACTGCACAGATCTGGATGTGGCTTTGGGCAGACCAATGTGTGTGGGGACCACAC
CTTCGGCGAAGGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTTACATCCGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAA
AATCAGGCAACTACCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGCTATCAACCCAAAACGTCATCGATGCGGAAAAG
GCACCAGGAGGACCTACAGACTTGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAGAGCGGATTTTTCGCAACAA
TGGCTTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAAATGCAACGAACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGA
AGGGGAAGACCAAACTACTGTTTGGGGGTTCCATTGAGATAACAAACCCAAATGAAGAACCTCTATGGAGACTCAAAT
CCTCAAAGTTCACCTCATCTGCTAATGGAGTAACACACACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCAGATCAAACAG
AAGACGGAGGACTACCACAAAGCGGCAGGATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGT
CTACCAAAGAGGTGTTTTGTTGCTTCAAAGGTGTGGTGCGGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAGGGTCTTGCCT
TTAATTGGTGAAGCAGATTGCCCTCATGAAAATACGGTGGATTAAACAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATG

Figura 62E

Figura 62F SEQ ID NO: 201

Casete de expresión número 2108 de LIR izquierda a derecha. La secuencia de nucleótidos de PDISP/HA B Florida+H1Cal TMCT con bucle proteolítico eliminado está subrayada.

TGTTGTTGTGACTCCGAGGGGTTGCCTCAAACCTCTATCTTATAACCGGCGTGGAGGCATGGAGGCAGGGGTATTTTGGT
 CATTTTAATAGATAGTGAAAAATGACGTGGAATTTACTTAAAGACGAAGTCTTTGCGACAAGGGGGGGCCACGCCGAA
 TTTAATATTACCGCGTGGCCCCCTTATCGCGAGTGCTTTAGCACGAGCGGTCCAGATTAAAGTAGAAAAATTTCCC
 GCCCACTAGGGTTAAAGGTGTTCACTATAAAAGCATATACGATGTGATGGTATTTGGTCGACAAGCTTGCATGCCGG
 TCAACATGGTGGAGCACGACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGCAATTGA
 GACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATA
 GTGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACA
 GTGGTCCCAAAGATGGACCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAACGTTCCAACACGCTTTCAAAGCAAGT
 GGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
 AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTA
 TTGTGAAGATAGTGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGC
 CTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAACGTTCCAACACGCTCT
 TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTT
 CCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTATTGGAGAGGTATTAATCTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTGGGGAAA
 CCCGAACCAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACTTCTCTTGTCTTTCTTGTGAGCGAT
 CTTCAACGTTGTGATCGTCTTCCGACACAGTACAAGTTTTCTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGG
 ACACGTAGTGCAGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTCTG
 GAGGCTGCTGTTAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGTGACTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTT
 GACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTCTATAAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAA
 ACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTGCAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCAAATTTGTCCGGCCCA
 ATACCGCGGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTCTCTTCTTGTGTTGGTTCCTCTCAGAT
 CTTTCGCGGATCGAATCTGCACTGGAATAACATCTTCAAACCTCACCTCATGTGGTCAAAACAGCCACTCAAGGGGAGGTC
 AATGTGACTGGTGTGATACCACTAACAAACACCAACAAATCTTATTTGCAATCTCAAAGGAACAAGGACCAGAG
 GGAACTATGCCAGACTGTCTCAACTGCACAGATCTGGATGTGGCTTTGGGAGACCAATGTGTGTGGGGACCACACC
 TTCGGCGAAGGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTACATCCGGGTGCTTTCCTATAATGCAGACAGAACAAAA
 ATCAGGCAACTACCAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGCTATCAACCAAAACGTCATCGATGCGGAAAAGG
 CACCAGGAGGACCTACAGACTTGAACCTCAGGATCTTGCCCTAACGCTACCAGTAAGAGCGGATTTTTCGCAACAAAT
 GGCTTGGGCTGTCCCAAAGGACAACAACAAAAATGCAACGAACCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTACAGAA
 GGGGAAGACCAATCACTGTTTGGGGTTCATTGAGATAAACCACCAATGAAGAACCCTATGGAGACTCAAATC
 CTCAAAGTTTCACTCTGCTAATGGAGTAACACACACTATGTTTCTCAGATTGGCAGCTTCCAGATCAAAACAGA
 AGACGGAGGACTACCACAAAGCGGAGGATTGTTGTTGATTACATGATGCAAAACCTGGGAAAACAGGAACAATTGTC
 TACCAAGAGGTGTTTTGTTGCTCAAAGGTGTGGTGCAGAGTGGCAGGAGCAAAGTAATAAAGGGTCTTTCGCTT
 TAATTGGTGAAGCAGATTGCCTTCATGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAACATGC
 AAAAGCCATAGGAAATGCCCCAATATGGGTGAAAACACCTTTGAAGCTCGCCAATGGAACCAATATAGACCTCTGGT
 GGAGGATGGGAAGGAATGATTGAGGCTGGCAGGATACACATCTCACGGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCGCGGACC
 TTAAGAGTACGCAAGAAGCTATAAACAAGATAACAAAAATCTCAATCTTTGAGTGAGCTAGAAGTAAAGAAATCTTCA
 AAGACTAAGTGGTGCCATGGATGAATCCACAACGAAATCTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGAC
 ACTATAAGCTCGCAATAGAACTTGCAGTCTTGTCTTCCAAAGGAAGTAATAAACAAGTGAAGATGAGCATCTATTGG
 CACTTGAGAGAAAATAAAGAAAATGCTGGGTCCCTCTGCTGTAGAGATAGGAAATGGATGCTTCGAAACCAACACAA
 GTGCAACAGACCTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTAAATGCAGGAGAAATTTCTCTCCCACTTTTGATTCA
 CTGAACATTACTGCTGCATCTTAAATGATGATGGATTGGATAACTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTGCCCA
 GTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATG
 TATTTAAAGGCCTATTTTCTTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGT
 GCTCAGAGTGTGTTTATTTATGTAATTTAATTTCTTGTGAGCTCCTGTTAGCAGGTCGTCCTTCAGCAAGGACAC
 AAAAGATTTTAAATTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGT
 TCAAACATTTGGCAATAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCAGATGATTATCATATAATTTCTGTTGA
 ATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCA
 ATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCTATG
 TTAGTAGATCTTAGAGTCTCAAGCTTGGCGCGCCATAAAATGATTATTTTATGAATATATTTTATTGTGCAAGTAGAT
 AGAAATTACATATGTTACATAACACAGAAATAAACAAGAACAAATCCAAAAACAAACACCCCAAAAAAATAATC

Figura 62G

