

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 230**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/135** (2006.01)

**C07K 14/32** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2016 PCT/US2016/062367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017 WO17091418**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2016 E 16813258 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.08.2021 EP 3380119**

54 Título: **Proteínas de fusión de FMDV y E2 y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**23.11.2015 US 201562259043 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.03.2022**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA  
INC. (100.0%)**

**3239 Satellite Boulevard, Bldg. 500  
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**AUDONNET, JEAN-CHRISTOPHE;  
REYNARD, FREDERIC;  
BOMCHIL, NATALIA y  
SIGOILLOT-CLAUDE, CECILE**

74 Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

ES 2 899 230 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

Proteínas de fusión de FMDV y E2 y usos de las mismas

5 **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de Estados Unidos 62/259,043 presentada el 23 de noviembre de 2015.

10 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0002] La presente invención se refiere a composiciones para la lucha contra la infección por el virus de la enfermedad de fiebre aftosa (FMDV, de sus siglas en inglés) en animales. En el presente documento se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un antígeno del FMDV, procedimientos de vacunación contra el FMDV, procedimientos de producción de antígenos y kits para usar con dichos procedimientos y composiciones.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0003] La fiebre aftosa (FMD) es una de las enfermedades más virulentas y contagiosas que afectan a los animales de granja. Esta enfermedad es endémica en numerosos países del mundo, especialmente en África, Asia y América del Sur. Además, periódicamente pueden producirse brotes epidémicos. La presencia de esta enfermedad en un país puede tener consecuencias económicas muy graves como resultado de la pérdida de productividad, la pérdida de peso y la producción de leche en los rebaños infectados y de los embargos comerciales impuestos a estos países. Las medidas que se toman contra esta enfermedad consisten en la estricta aplicación de restricciones a la importación, controles de higiene y cuarentena, sacrificio de animales enfermos y programas de vacunación con vacunas inactivadas, ya sea como medida preventiva a nivel nacional o regional, o periódicamente cuando se produce un brote epidémico.

[0004] La FMD se caracteriza por su corto período de incubación, su carácter altamente contagioso, la formación de úlceras en la boca y en las patas y, en ocasiones, la muerte de animales jóvenes. La FMD afecta a varias especies animales, en particular bovinos, porcinos, ovinos y caprinos. El agente responsable de esta enfermedad es un virus del ácido ribonucleico (ARN) perteneciente al género *Aphthovirus* de la familia *Picornaviridae* (Cooper et al., 1978, *Intervirology* 10, 165-180). En la actualidad, se conocen al menos siete tipos de virus de la enfermedad de fiebre aftosa (FAF): los tipos europeos (A, O y C), los tipos africanos (SAT1, SAT2 y SAT3) y un tipo asiático (Asia 1). También se han distinguido numerosos subtipos (Kleid et al., 1981, *Science* 214, 1125-1129).

[0005] El FMDV es un virus icosaédrico desnudo de aproximadamente 25 nm de diámetro, que contiene una molécula de ARN monocatenario que consiste en aproximadamente 8500 nucleótidos, con una polaridad positiva. Esta molécula de ARN comprende un único marco de lectura abierto (ORF), que codifica una única poliproteína que contiene, entre otros, el precursor de la cápside también conocido como proteína PI o P88. La proteína PI está miristilada en su extremo amino terminal. Durante el proceso de maduración, la proteína PI es escindida por la proteasa 3C en tres proteínas conocidas como VP0, VP1 y VP3 (o 1AB, 1D y 1C respectivamente; Belsham GJ, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1993, 60, 241-261). En el virión, la proteína VP0 a continuación se escinde en dos proteínas, VP4 y VP2 (o 1A y 1B respectivamente). El mecanismo de conversión de las proteínas VP0 en VP1 y VP3 y para la formación de viriones maduros es desconocido. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 tienen un peso molecular de aproximadamente 26.000 Da, mientras que la proteína VP4 es más pequeña con aproximadamente 8.000 Da.

[0006] Se han desarrollado muchas hipótesis, rutas de investigación y propuestas en un intento de diseñar vacunas eficaces contra la FMD. Cao et al. (*Antiviral Research*, 2013, 97: 145-153; *Veterinary Microbiology*, 2014, 168: 294-301) informaron sobre el diseño de proteínas epítomos específicas con inmunogenicidad contra la exposición al FMDV. Se demostró que un polipéptido sintético correspondiente a la fusión de un epítipo T y dos epítipos B del serotipo Asia induce una respuesta protectora (Ren et al., *Vaccine*, 2011, 29: 7960-7965).

[0007] En la actualidad, las únicas vacunas en el mercado comprenden virus inactivado. Existen preocupaciones sobre la seguridad de la vacuna contra el FMDV, ya que los brotes de FMD en Europa se han asociado con deficiencias en la fabricación de la vacuna (King, AMQ et al., 1981, *Nature*, 293: 479-480). Las vacunas inactivadas no confieren inmunidad a largo plazo, por lo que requieren inyecciones de refuerzo administradas cada año, o con mayor frecuencia en caso de brotes epidémicos. Además, existen riesgos relacionados con la inactivación incompleta y/o el escape de virus durante la producción de vacunas inactivadas (King, AMQ, *ibid*).

[0008] Recientemente, la subunidad E2 de los complejos multienzimáticos de deshidrogenasa se utilizó como almacén para producir proteínas del VIH-1 (Caivano et al., 2010, *Virology*, 407: 296-305; Krebs et al., *PLOS One*, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0113463; Schiavone et al., 2012, *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 5674-5699). Los complejos de piruvato deshidrogenasa (PDH) son enzimas multifuncionales que contienen tres enzimas esenciales: una piruvato descarboxilasa (E1) dependiente de tiamina, una dihidrolipoil acetiltransferasa (E2) y una flavoproteína dihidrolipoil deshidrogenasa (E3) (Lengyel et al., *Structure*, 16: 93-103, 2008). Se descubrió que sesenta copias del polipéptido E2

del complejo PDH de *Bacillus stearothermophilus* se ensamblan para formar un almacén dodecaédrico pentagonal, y el almacén puede modificarse para presentar péptidos y proteínas extraños en su superficie (Domingo et al., 2001, J. Mol. Biol., 305: 259-267). Dalmau et al. (Biotechnology and Bioengineering, 101 (4): 654-664, 2008) describieron mutantes E2 de PDH que se optimizaron para la expresión en *E. coli*. D'Apice et al. (Vaccine, 25: 1993-2000, 2007) discutieron la expresión de un epítipo auxiliar T en tres vehículos de suministro: el bacteriófago filamentoso fd, la proteína E2 del complejo de PDH y la proteína CotC.

[0009] Domingo et al. (2003), Vaccine, 21 (13-14): 1502-1509 se refiere a la inducción de auxiliares T específicas y la respuesta citolítica a epítopos presentadas en un almacén de proteínas parecidas a virus derivadas del complejo multienzimático de piruvato deshidrogenasa. De Berardinis Piergiuseppe et al., (2004), Expert Review of Vaccines., 3 (6): 673-679 se refiere a vacunas recombinantes basadas en el uso de sistemas de presentación de antígenos procarióticos. De Berardinis Piergiuseppe et al., (2003), Current HIV research, 1 (4): 441-446 se relaciona con el uso de proteínas de fusión y sistemas de presentación procariotas para el suministro de antígenos del VIH-1 y el desarrollo de nuevas vacunas para la infección por VIH-1.

Hema et al, Vaccine, 25 (2007), 4784-4794 se refiere a partículas químicas similares a timovirus que presentan epítopos proteicos no estructurales del virus de fiebre aftosa y su uso para la detección de anticuerpos proteicos no estructurales del virus de la fiebre aftosa. El documento WO2014/089036A1 se refiere a proteínas de fusión, que comprenden antígenos del FMDV, para inducir respuestas mejoradas de células T específicas de antígenos patógenos. Tami et al., Vaccine, 23 (2004) 840-845 se refiere a la respuesta inmune y la protección conferida por baculovirus recombinantes o células de insectos infectadas que expresan las fusiones de antígenos de FMDV gp64-P1 y gp64-sitio A.

[0010] Teniendo en cuenta la susceptibilidad de los animales, incluyendo seres humanos, a FMDV, es esencial un procedimiento de prevención de la infección por FMDV y la protección de los animales. Por consiguiente, existe la necesidad de una vacuna eficaz, segura y fácil de producir contra el FMDV.

### **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

[0011] En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un antígeno de FMDV, en la que el antígeno de FMDV es una proteína de fusión FMDV-E2, en la que E2 es dihidrolipoil acetiltransferasa de *Geobacillus stearothermophilus*, en la que la proteína de fusión FMDV-E2 tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO: 6.

[0012] En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de la presente invención para uso en un procedimiento de vacunación de un huésped susceptible a infección por FMDV ovino, bovino, caprino o porcino, o protección o prevención el huésped contra la infección por FMDV, o la provocación de una respuesta inmunitaria protectora en el huésped, que comprende al menos una administración de la composición al huésped.

[0013] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un antígeno de FMDV, en el que el antígeno es una proteína de fusión FMDV-E2 que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 6, en la que E2 es dihidrolipoil acetiltransferasa de *Geobacillus stearothermophilus*.

[0014] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un plásmido que comprende un polinucleótido que codifica un antígeno de fusión de FMDV-E2 tiene la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 6, en el que E2 es dihidrolipoil acetiltransferasa de *Bacillus stearothermophilus*.

[0015] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una célula huésped transformada con el plásmido de la presente invención.

[0016] Se proporcionan composiciones que comprenden un polipéptido antigénico del FMDV y fragmentos y variantes del mismo. Los antígenos del FMDV y sus fragmentos y variantes de los mismos poseen propiedades inmunogénicas y protectoras. Los antígenos del FMDV se pueden producir como una proteína de fusión con E2 de *Geobacillus stearothermophilus*. Las proteínas de fusión del FMDV de la presente invención se ensamblan en partículas que se asemejan a los viriones o VLP naturales del FMDV.

[0017] Los polipéptidos antigénicos y fragmentos y variantes de los mismos pueden ser formulados en vacunas y/o composiciones farmacéuticas. Estas vacunas pueden usarse para vacunar a un animal y proporcionar protección contra al menos una cepa del FMDV.

[0018] Los procedimientos descritos en el presente documento incluyen procedimientos para preparar los polipéptidos antigénicos. Los procedimientos incluyen procedimientos para fabricar antígenos o polipéptidos antigénicos fusionados con E2 de *Geobacillus stearothermophilus*. En el presente documento se describe un procedimiento para construir inmunógenos conformacionalmente correctos que carecen del genoma infeccioso del FMDV para producir vacunas eficaces y seguras. Los procedimientos facilitan la expresión simple y fácil de antígenos del FMDV *in vitro* que replican y simulan la conformación de los viriones o VLP naturales y auténticos del FMDV que son complejos y difíciles de producir.

[0019] Los procedimientos también incluyen procedimientos de uso que incluyen administrar a un animal una cantidad eficaz de un polipéptido antigénico o fragmento o variante del mismo para producir una respuesta inmunogénica protectora. Después de la producción, el polipéptido antigénico se puede purificar parcial o sustancialmente para su uso como vacuna.

[0020] También se proporcionan kits que comprenden al menos un polipéptido antigénico o fragmento o variante del mismo e instrucciones de uso.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0021] La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplo, puede entenderse mejor conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra una tabla que resume las secuencias de ADN y proteínas.

Las Figuras 2A-2F representan las secuencias de ADN y proteínas, y alineaciones de secuencia.

La Figura 3 representa la transferencia Western y la transferencia puntual de la proteína de fusión FMDV-E2 expresada.

Las Figuras 4A-4C representan la producción de partículas de FMDV-E2.

La Figura 5 representa el ELISA indirecto de partículas E2-FMDV.

La Figura 6 representa los resultados de las células plasmáticas en D27 de las vacunas con O1M.

La Figura 7 representa los resultados de las células plasmáticas en D42 de las vacunas con O1M.

La Figura 8 representa el ELISPOT de IFN $\gamma$  en D27 de la vacuna con O1M.

La Figura 9 representa el ELISPOT de IFN $\gamma$  en D42 de la vacuna con O1M.

La Figura 10 representa las células B de memoria en D42 de la vacuna con O1M.

La Figura 11 muestra SN de FMDV O1 Manisa.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

[0022] Se proporcionan composiciones que comprenden un polipéptido de FMDV, antígeno y fragmentos y variantes del mismo que provocan una respuesta inmunogénica en un animal. Los polipéptidos antigénicos o fragmentos o variantes de los mismos se producen como proteínas de fusión o proteínas quiméricas con E2 de *Geobacillus stearothermophilus*. Los polipéptidos antigénicos o fragmentos o variantes pueden formularse en vacunas o composiciones farmacéuticas y usarse para provocar o estimular una respuesta protectora en un animal. Tal como se describe en el presente documento, el antígeno polipeptídico es un antígeno sintético de FMDV VP1 o un fragmento activo o una variante del mismo.

[0023] Se reconoce que los polipéptidos antigénicos o antígenos de la invención pueden ser polipéptidos de longitud completa o fragmentos activos o variantes de los mismos. Por "fragmentos activos" o "variantes activas" se entiende que los fragmentos o variantes conservan la naturaleza antigénica del polipéptido. Por tanto, se describe en el presente documento cualquier polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de FMDV que provoque una respuesta inmunogénica en un animal. El polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno del FMDV puede ser cualquier polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno del FMDV, tal como, pero sin limitación, una proteína, péptido o fragmento o variante del mismo, que provoca, induce o estimula una respuesta en un animal, tal como un ovino, bovino, caprino o porcino.

[0024] Los polipéptidos antigénicos particulares del FMDV incluyen VP1 del FMDV. El FMDV es un virus icosaédrico desnudo de aproximadamente 25 nm de diámetro, que contiene una molécula de ARN monocatenaria que consiste en aproximadamente 8500 nucleótidos, con una polaridad positiva. Esta molécula de ARN comprende un único marco de lectura abierto (ORF), que codifica una única poliproteína que contiene, entre otros, el precursor de la cápside también conocido como proteína PI o P88. La proteína PI está miristilada en su extremo amino terminal. Durante el proceso de maduración, la proteína PI es escindida por la proteasa 3C en tres proteínas conocidas como VP0, VP1 y VP3 (o 1AB, 1D y 1C respectivamente; Belsham GJ, Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1993, 60, 241-261). En el virión, la proteína VP0 a continuación se escinde en dos proteínas, VP4 y VP2 (o 1A y 1B, respectivamente). Se desconoce el mecanismo para la conversión de las proteínas VP0 en VP1 y VP3, y para la formación de viriones maduros. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 tienen un peso molecular de aproximadamente 26.000 Da, mientras que la proteína VP4 es más pequeña con aproximadamente 8.000 Da.

[0025] La simple combinación de las proteínas de la cápside forma el protómero o molécula 5S, que es el constituyente elemental de la cápside de FMDV. Este protómero a continuación se compila en un pentámero para formar la molécula 12S. El virión resulta de la encapsidación de una molécula de ARN genómico mediante el ensamblaje de doce pentámeros 12S, constituyendo así las partículas 146S. La cápside viral también puede formarse sin la presencia de una molécula de ARN en su interior (en adelante, "cápside vacía"). La cápside vacía también se designa como partícula 70S. La formación de cápsides vacías puede tener lugar de forma natural durante la replicación viral o puede producirse artificialmente mediante tratamiento químico.

[0026] La presente invención se refiere a vacunas o composiciones bovina, ovina, caprina o porcina que pueden comprender una cantidad eficaz de un antígeno de FMDV y un portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.



[0027] En algunas realizaciones, las vacunas comprenden además adyuvantes, tales como las emulsiones de aceite en agua (O/W) descritas en la patente US 7.371.395.

5 [0028] En todavía otras realizaciones, los adyuvantes incluyen EMULSIGEN, hidróxido de aluminio y saponina, y CpG, o combinaciones de los mismos.

[0029] En algunas realizaciones, la respuesta en el animal es una respuesta inmune protectora.

10 [0030] Por "animal" se entiende mamíferos, aves, y similares. Animal o huésped incluye mamíferos, artiodáctilos y humanos. El animal puede seleccionarse del grupo que consiste en equinos (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felinos (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros grandes felinos, etc.) y otros felinos, incluidos guepardos y linceos, ovino (por ejemplo, oveja), bovino (por ejemplo, ganado), porcino (por ejemplo, cerdo), caprino (por ejemplo, cabra), aviar (por ejemplo, pollo, pato, ganso, pavo, codorniz, faisán, loro, pinzones, halcón, cuervo, avestruz, emú y casuario), primate (por ejemplo, prosimio, tarsero, mono, gibón, simio) y pez. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluidas las etapas embrionaria y fetal.

20 [0031] A menos que se explique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25 [0032] Cabe indicar que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, términos tales como "comprende" "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que términos, tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados de manera explícita, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

35 [0033] Los polipéptidos antigénicos de la invención son capaces de proteger contra FMDV. Es decir, son capaces de estimular una respuesta inmune en un animal. Por "antígeno" o "inmunógeno" se entiende una sustancia que induce una respuesta inmunitaria específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o porción de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una pieza o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmune al presentarse a un animal huésped; un polipéptido, un epítipo, un hapteno o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.

40 [0034] El término "proteína, polipéptido o péptido inmunogénico", tal como se usa en el presente documento, incluye polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido de que una vez que se administra al huésped, es capaz de evocar una respuesta inmune de tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. Preferiblemente, el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. Por lo tanto, un fragmento de proteína según la invención comprende o consiste esencialmente en o consiste en al menos un epítipo o determinante antigénico. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", tal como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína, análogos de la misma, o fragmentos inmunogénicos de la misma. Por "fragmento inmunogénico" se entiende un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y de este modo provoca la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Tales fragmentos pueden ser identificados usando cualquier técnica de mapeo de epítopos bien conocida en el sector. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando simultáneamente gran cantidad de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en el sector y se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos. No. 4.708.871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. De manera similar, los epítopos conformacionales son fácilmente identificados mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos, tales como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra.

60 [0035] Tal como se describe, la invención abarca fragmentos activos y variantes del polipéptido antigénico. Por tanto, el término "proteína, polipéptido o péptido inmunogénico" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones de la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica, tal como se define en el presente documento. El término "variación conservadora" indica la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservadora, es decir, aquellas

sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos generalmente se dividen en cuatro familias: (1) ácidos: aspartato y glutamato; (2) básicos: lisina, arginina, histidina; (3) no polares: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados: glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican como aminoácidos aromáticos. Ejemplos de variaciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo hidrofóbico, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro residuo hidrofóbico, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina y similares; o una sustitución conservadora similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado que no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por tanto, dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos por estas modificaciones se incluyen en el presente documento. El término "variación conservadora" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido, siempre que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreaccionen con el polipéptido no sustituido.

[0036] El término "epítipo" se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al que responden células B y/o células T específicas. El término también se usa indistintamente con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

[0037] Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Normalmente, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en el composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped presentará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora de modo que se potenciará la resistencia a una nueva infección aumentará y/o se reducirá la gravedad clínica de la enfermedad. Dicha protección se demostrará mediante la reducción o la ausencia de los síntomas que normalmente presenta un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el huésped infectado.

[0038] Los antígenos sintéticos también se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, poliepítopos, epítopos flanqueantes, y otros antígenos recombinantes o derivados sintéticamente. Los fragmentos inmunogénicos, para los propósitos de la presente invención, normalmente incluirán al menos aproximadamente 3 aminoácidos, al menos aproximadamente 5 aminoácidos, al menos aproximadamente 10-15 aminoácidos, o aproximadamente 15-25 aminoácidos o más aminoácidos, de la molécula. No existe un límite superior crítico para la longitud del fragmento, que podría comprender casi la longitud completa de la secuencia de la proteína, o incluso una proteína de fusión que comprenda al menos un epítipo de la proteína.

[0039] Por consiguiente, una estructura mínima de un polinucleótido que expresa un epítipo es que comprende o consiste esencialmente en o consiste en nucleótidos que codifican un epítipo o determinante antigénico de un polipéptido del FMDV. Un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido del FMDV puede comprender o consistir esencialmente en o consistir en un mínimo de 15 nucleótidos, aproximadamente 30-45 nucleótidos, aproximadamente 45-75, o al menos 57, 87 o 150 nucleótidos consecutivos o contiguos de la secuencia que codifica el polipéptido.

[0040] El término "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refiere a ARN o ADN que es lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido de los mismos. El término también abarca híbridos de ARN/ADN. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de unión, tales como fluororibosa y tiolato, y ramas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación, con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluidas en esta definición son los agentes de bloqueo, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, y la introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de marcaje, otros polinucleótidos o soporte sólido. Los polinucleótidos se pueden obtener por síntesis química o derivados de un microorganismo.

[0041] El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier segmento de polinucleótido asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen intrones y exones como en la secuencia genómica, o sólo las secuencias de codificación como en ADNc y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Por ejemplo, el gen también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras.

[0042] Los términos "proteína", "péptido", "polipéptido" y "fragmento de polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos y puede estar interrumpido por restos químicos distintos de los aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un marcaje o componente bioactivo.

[0043] El término "proteína de fusión" o "proteína quimérica", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier proteína recombinante creada a través de la unión de dos o más genes heterólogos. La expresión de los genes heterólogos da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales.

[0044] Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína u orgánulo) se refiere a un componente que se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se produce de forma natural el componente, por ejemplo, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y las proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación estándar. El término también incluye ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante tecnología recombinante, así como síntesis química.

[0045] El término "purificado", tal como se usa en el presente documento, no requiere pureza absoluta; más bien, está pensado como un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación de polipéptido purificada es aquella en la que el polipéptido está más enriquecido que el polipéptido en su entorno natural. Es decir, el polipéptido se separa de los componentes celulares. Por "sustancialmente purificado" se pretende que el polipéptido represente varias realizaciones al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 98% o más de los componentes o materiales celulares se han eliminado. Asimismo, el polipéptido se puede purificar parcialmente. Por "parcialmente purificado" se entiende que se elimina menos del 60% de los componentes o materiales celulares. Lo mismo se aplica a los polinucleótidos. Los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden purificar mediante cualquiera de los medios conocidos en la técnica.

[0046] Tal como se señaló anteriormente, los polipéptidos antigénicos o fragmentos o variantes de los mismos son polipéptidos antigénicos de FMDV que se producen como proteínas de fusión. Los fragmentos y variantes de los polinucleótidos y polipéptidos descritos codificados por los mismos también están incluidos en la presente invención. Por "fragmento" se entiende una parte del polinucleótido o una parte de la secuencia de aminoácidos antigénica codificada por el mismo. Los fragmentos de un polinucleótido pueden codificar fragmentos de proteína que retienen la actividad biológica de la proteína nativa y, por tanto, tienen actividad inmunogénica como se indica en otra parte del presente documento. Los fragmentos de la secuencia polipeptídica conservan la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria protectora en un animal.

[0047] "Variantes" pretende significar secuencias sustancialmente similares. Para polinucleótidos, una variante comprende una delección y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios dentro del polinucleótido nativo y/o una sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en el polinucleótido nativo. Tal como se usa en el presente documento, un polinucleótido o polipéptido "nativo" comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos de origen natural, respectivamente. Las variantes de un polinucleótido particular de la invención (es decir, el polinucleótido de referencia) también pueden evaluarse mediante la comparación del porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por un polinucleótido variante y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Proteína "variante" significa una proteína derivada de la proteína nativa por delección o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa y/o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa. Las proteínas variantes abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, tienen la capacidad de provocar una respuesta inmune.

[0048] En un aspecto, la presente invención proporciona polipéptidos del FMDV de ovino, bovino, caprino o porcino. En otro aspecto, se describe en el presente documento un polipéptido que tiene una secuencia como se indica en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14, y una variante o fragmento de las mismas.

[0049] Además, en el presente documento se describen homólogos de polipéptidos del FMDV de ovinos, bovinos, caprinos o porcinos. Tal como se usa en el presente documento, el término "homólogos" incluye ortólogos, análogos y parálogos. El término "análogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos que tienen la misma función o similar, pero que han evolucionado por separado en organismos no relacionados. El término "ortólogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos de diferentes especies, pero que han evolucionado a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los ortólogos codifican polipéptidos que tienen funciones iguales o similares. El término "parálogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos que están relacionados por duplicación dentro de un genoma. Los parálogos suelen tener diferentes funciones, pero estas funciones pueden estar relacionadas. Análogos, ortólogos y parálogos de un polipéptido de FMDV de tipo salvaje pueden diferir del polipéptido de FMDV de tipo salvaje por modificaciones postraduccionales, por diferencias en la secuencia de aminoácidos o por ambos. En particular, los homólogos descritos en el presente documento generalmente exhibirán al menos 80-85%, 85-90%, 90-95% o 95%,

96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia, con toda o parte de las secuencias de polinucleótidos o FMDV de tipo salvaje, y exhibirán una función similar. Las variantes incluyen variantes alélicas. El término "variante alélica" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que contiene polimorfismos que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de una proteína y que existen dentro de una población natural (por ejemplo, una especie o variedad de virus). Tales variaciones alélicas naturales pueden dar como resultado típicamente una variación del 1 al 5% en un polinucleótido o polipéptido. Las variantes alélicas se pueden identificar secuenciando la secuencia de ácido nucleico de interés en varias especies diferentes, lo que se puede realizar fácilmente usando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético en esas especies. En el presente documento se describen todas y cada una de dichas variaciones de ácido nucleico y polimorfismos o variaciones de aminoácidos resultantes que son el resultado de una variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional del gen de interés.

[0050] En el presente documento se describe que el antígeno de FMDV se fusiona a un E2 de *Geobacillus stearothermophilus*.

[0051] Tal como se usa en el presente documento, el término "derivado" o "variante" se refiere a un polipéptido, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una o más variaciones conservadoras de aminoácidos u otras modificaciones menores de manera que (1) el polipéptido correspondiente tiene sustancialmente una función equivalente cuando se compara con el polipéptido de tipo salvaje o (2) un anticuerpo generado contra el polipéptido es inmunorreactivo con el polipéptido de tipo salvaje. Estas variantes o derivados incluyen polipéptidos que tienen modificaciones menores de las secuencias de aminoácidos primarias del polipéptido de FMDV que pueden dar como resultado péptidos que tienen una actividad sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido homólogo no modificado. Tales modificaciones pueden ser deliberadas, como por mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser espontáneas. El término "variante" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica, tal como se define en el presente documento.

[0052] El término "variación conservativa" indica el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservadora, tal como se describió anteriormente.

[0053] Los polinucleótidos de la divulgación incluyen secuencias que están degeneradas como resultado del código genético, por ejemplo, el uso de codones optimizados para un huésped específico. Tal como se usa en el presente documento, "optimizado" se refiere a un polinucleótido que se modifica genéticamente para aumentar su expresión en una especie determinada. Para proporcionar polinucleótidos optimizados que codifican polipéptidos del FMDV, la secuencia de ADN del gen de la proteína de FMDV se puede modificar para 1) comprender codones preferidos por genes altamente expresados en una especie particular; 2) comprender un contenido de A + T o G + C en la composición de bases de nucleótidos al que se encuentra sustancialmente en dicha especie; 3) formar una secuencia de iniciación de dicha especie; o 4) eliminar secuencias que provocan desestabilización, poliadenilación inapropiada, degradación y terminación del ARN, o que forman horquillas de estructura secundaria o sitios de empalme de ARN. Se puede lograr una mayor expresión de la proteína del FMDV en dicha especie utilizando la frecuencia de distribución del uso de codones en eucariotas y procariotas, o en una especie particular. El término "frecuencia de uso de codones preferidos" se refiere a la preferencia exhibida por una célula huésped específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Hay 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales están especificados por más de un codón. Por lo tanto, todas las secuencias de nucleótidos degeneradas se incluyen en la divulgación siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido del FMDV codificada por la secuencia de nucleótidos permanezca funcionalmente inalterada.

[0054] La identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos puede establecerse por "blast" por parejas y la matriz blosum62 del NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando los parámetros estándar (véase, por ejemplo, el algoritmo BLAST o BLASTX disponible en el servidor de "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, Md., EE. UU.), así como en Altschul et al.; y por lo tanto, el presente documento habla del uso del algoritmo o BLAST o BLASTX y la matriz BLOSUM62 con el término "blasts").

[0055] La "identidad" con respecto a las secuencias puede referirse al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las dos secuencias, en la que el alineamiento de las dos secuencias se puede determinar de acuerdo con el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman), por ejemplo, utilizando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos y una penalización por espacio de 4, y el análisis e interpretación asistidos por ordenador de los datos de la secuencia, incluida la alineación, pueden realizarse convenientemente utilizando programas disponibles comercialmente (por ejemplo, Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc. CA). Cuando se dice que las secuencias de ARN son similares, o tienen un grado de identidad de secuencia u homología con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN. Por tanto, las secuencias de ARN están dentro del alcance de la invención y pueden derivarse de secuencias de ADN, considerándose la timidina (T) en la secuencia de ADN igual al uracilo (U) en las secuencias de ARN.

[0056] La identidad de secuencia o similitud de secuencia de dos secuencias de aminoácidos, o la identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el paquete de software Vector NTI (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA).

[0057] Las reacciones de hibridación se pueden realizar en condiciones de diferente "rigurosidad". Las condiciones que aumentan la rigurosidad de una reacción de hibridación son bien conocidas. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 2014).

[0058] La presente invención abarca además los polinucleótidos del FMDV contenidos en una molécula de vector o un vector de expresión y unidos operativamente a un elemento promotor y opcionalmente a un potenciador.

[0059] Un "vector" se refiere a un plásmido o virus de ADN o ARN recombinante que comprende un polinucleótido heterólogo para ser suministrado a una célula diana, ya sea *in vitro* o *in vivo*. El polinucleótido heterólogo puede comprender una secuencia de interés con fines de prevención o terapia y, opcionalmente, puede estar en forma de un casete de expresión. Tal como se usa en el presente documento, un vector no necesita ser capaz de replicarse en la célula o sujeto diana final. El término incluye vectores de clonación y vectores virales.

[0060] El término "recombinante" significa un polinucleótido semisintético, o de origen sintético, que o bien no se produce en la naturaleza o está unido a otro polinucleótido en una disposición no encontrada en la naturaleza.

[0061] "Heterólogo" significa derivado de una entidad genéticamente distinta del resto de la entidad a la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido puede colocarse mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una fuente diferente, y es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia codificante nativa y unido operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es un promotor heterólogo.

[0062] En el presente documento se describen vacunas o composiciones farmacéuticas o inmunológicas de ovinos, bovinos, caprinos y porcinos que pueden comprender una cantidad eficaz de antígenos del FMDV y un portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

[0063] La materia descrita en el presente documento está dirigida, en parte, a composiciones y procedimientos relacionados con el antígeno del FMDV preparado como una proteína de fusión o proteína quimérica que era altamente inmunogénica y protegía animales contra la exposición a cepas del FMDV homólogas y heterólogas.

#### Composiciones

[0064] En el presente documento se describe una vacuna o composición contra el FMDV que puede comprender una cantidad eficaz de un antígeno del FMDV y un portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. En una realización, el antígeno del FMDV se expresa como una proteína de fusión o proteína quimérica con E2 de *Geobacillus stearothermophilus*.

[0065] En el presente documento se describe una proteína quimérica o de fusión que comprende un antígeno del FMDV.

[0066] En una realización, la materia que se describe en el presente documento se refiere a una vacuna o composición de la invención que comprende un antígeno del FMDV fusionado a E2 de *Geobacillus stearothermophilus*.

[0067] En una realización, la materia que se describe en el presente documento se refiere a una vacuna o composición de la invención que comprende una proteína de fusión o quimérica de FMDV y E2 producida en procariotas o eucariotas. En el presente documento se describe cualquier polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno del FMDV que provoca una respuesta inmunogénica en un animal, tal como un ovino, bovino, caprino o porcino. El polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno del FMDV puede ser cualquier polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno del FMDV, tal como, sin limitación, una proteína, péptido o fragmento del mismo, que provoca, induce o estimula una respuesta en un animal, tal como ovino, bovino, caprino o porcino.

[0068] En una realización, el antígeno del FMDV de la presente invención puede ser un antígeno sintético diseñado a partir de la alineación de secuencias. Se describieron múltiples epítipos B y T en la proteína de la cápside VP1 de la FMD. Se ha demostrado que un polipéptido sintético correspondiente a la fusión de un epítipo T y dos epítipos B del serotipo Asia induce una respuesta protectora (Ren et al., Vaccine 2011). Después de la alineación de secuencias, se podría definir un polipéptido equivalente para todos los demás serotipos. En el presente documento se describe el antígeno del FMDV puede ser un polipéptido VP1. En el presente documento se describe que el antígeno del FMDV puede ser un polipéptido P1-3C. En el presente documento se describe que el antígeno del FMDV puede ser PI solo o P1-2A/2B1. En el presente documento se describe que el antígeno del FMDV puede ser VP0-VP3. En el presente documento se describe que el antígeno del FMDV puede ser VP4-VP2. En el presente documento se describe que el antígeno del FMDV puede ser 3C.

[0069] En el presente documento se describe que el antígeno o polipéptido o proteína de FMDV es una proteína de fusión o quimérica. En el presente documento se describe que el antígeno o polipéptido o proteína del FMDV se fusiona con el dominio catalítico C-terminal del núcleo de E2 de *Geobacillus stearothermophilus*.

5 [0070] En otra realización, el antígeno del FMDV de la invención puede ser derivada de las cepas de FMDV O1 *Manisa*, O1 *BFS* o *Campos*, A24 *Cruzeiro*, Asia 1 *Shamir*, A *Iran'96*, A22 *Iraq*, SAT2 *Arabia Saudita*.

10 [0071] La presente invención se refiere a una vacuna contra FMDV que puede comprender una cantidad eficaz de un antígeno o proteína de FMDV recombinante o de fusión o quimérica o proteína y un portador, adyuvante, excipiente, o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

15 [0072] En el presente documento se describe que el antígeno de FMDV es una proteína de fusión o quimérica de FMDV y E2. La proteína de fusión o quimérica de FMDV-E2 puede producirse en procariotas o eucariotas. En otra realización, el portador, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una emulsión de agua en aceite. En otra realización, el portador, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una emulsión de aceite en agua. En otra realización, la emulsión de agua en aceite puede ser una emulsión triple de agua/aceite/agua (W/O/W).

20 [0073] En el presente documento se describen los polinucleótidos del FMDV contenidos en una molécula de vector o un vector de expresión y unidos operativamente a un elemento promotor y opcionalmente a un potenciador.

25 [0074] En el presente documento se describen polipéptidos del FMDV, particularmente polipéptidos de ovinos, bovinos, caprinos o porcinos, que tienen una secuencia indicada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14, y una variante o fragmento de las mismas.

30 [0075] En el presente documento se describe un polipéptido que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido antigénico de la invención, particularmente con el polipéptido que tiene una secuencia indicada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14.

[0076] En el presente documento se describen fragmentos y variantes de los polipéptidos de FMDV identificados anteriormente (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14) que pueden ser preparados fácilmente por un experto en la técnica utilizando técnicas de biología molecular bien conocidas.

35 [0077] En el presente documento se describe una proteína quimérica o de fusión que comprende el antígeno del FMDV y el dominio E2 de *Geobacillus stearothermophilus*. La proteína de fusión o quimérica de FMDV-E2 puede comprender un polipéptido que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 97%, 98 % o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO: 6, 10 o 14.

40 [0078] Las variantes son polipéptidos homólogos que tienen una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14.

45 [0079] Un fragmento inmunogénico de un polipéptido de FMDV incluye al menos 8, 10, 15, o 20 aminoácidos consecutivos, al menos 21 aminoácidos, al menos 23 aminoácidos, al menos 25 aminoácidos, o al menos 30 aminoácidos de un polipéptido de FMDV que tiene una secuencia indicada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14, o variantes de las mismas. En el presente documento se describe un fragmento de un polipéptido de FMDV que incluye un epítipo antigénico específico que se encuentra en un polipéptido de FMDV.

50 [0080] En el presente documento se describe un polinucleótido que codifica un polipéptido de FMDV, tal como un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia indicada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14. En el presente documento se describe un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia indicada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14, o una variante conservadora, una variante alélica, un homólogo o un fragmento inmunogénico que comprende al menos ocho o al menos diez aminoácidos consecutivos de uno de estos polipéptidos, o una combinación de estos polipéptidos.

60 [0081] En el presente documento se describe un polinucleótido que codifica una proteína de fusión o quimérica FMDV-E2 que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96% , 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia indicada en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14.

65 [0082] En el presente documento se describe un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13, o una variante de las mismas. En el presente documento se describe un polinucleótido que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 95%,

96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia indicada en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13, o una variante de las mismas.

[0083] En el presente documento se describen las secuencias de la proteína E2 (SEQ ID NO: 4) y de ADN (SEQ ID NO: 3), y la secuencia del enlazador E2 (SEQ ID NO: 15).

[0084] Los polinucleótidos como se describen en el presente documento pueden comprender secuencias adicionales, tales como secuencias de codificación adicionales dentro de la misma unidad de transcripción, elementos de control, tales como promotores, sitios de unión a ribosoma, 5'UTR, 3'UTR, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, unidades de transcripción adicionales bajo el control del mismo promotor o de un promotor diferente, secuencias que permiten la clonación, expresión, recombinación homóloga y transformación de una célula huésped, y cualquier construcción que pueda ser deseable como se describe en el presente documento.

[0085] Los elementos para la expresión de un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno del FMDV están presentes de manera ventajosa en un vector de la invención. De manera mínima, comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un codón de iniciación (ATG), un codón de terminación y un promotor, y opcionalmente también una secuencia de poliadenilación para ciertos vectores, tales como plásmidos y ciertos vectores virales, por ejemplo, vectores virales distintos los virus de la viruela ("poxvirus"). Cuando el polinucleótido codifica un fragmento de poliproteína, por ejemplo, un péptido de FMDV, ventajosamente en el vector, se coloca un ATG en 5' del marco de lectura y un codón de terminación en 3'. Pueden estar presentes otros elementos para controlar la expresión, tales como secuencias potenciadoras, secuencias estabilizadoras, tales como secuencias de intrones y señales que permiten la secreción de la proteína.

[0086] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden vectores, tales como vectores de expresión, por ejemplo, composiciones terapéuticas. Las composiciones de la presente invención pueden comprender uno o más vectores, por ejemplo, vectores de expresión, tales como vectores de expresión *in vivo*, que comprenden y expresan uno o más polipéptidos, antígenos, epítipos o inmunógenos del FMDV. En una realización, el vector contiene y expresa un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polinucleótido que codifica (y que expresa ventajosamente) un antígeno, epítipo o inmunógeno del FMDV, en un portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable, o vehículo. Así, según una realización de la invención, el otro vector o vectores en las composiciones comprenden, consisten esencialmente en o consisten en un polinucleótido que codifica, y en circunstancias apropiadas, el vector expresa una o más de otras proteínas de un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno del FMDV, o un fragmento del mismo.

[0087] En el presente documento se describe el vector o vectores que comprenden, o consisten esencialmente en, o consisten en el polinucleótido o polinucleótidos que codifican E2 de *Geobacillus stearothermophilus*.

[0088] Según otra realización de la invención, el vector de expresión es un vector plásmido o un vector plásmido de ADN, en particular un vector de expresión *in vivo* en procariotas o eucariotas. En un ejemplo específico, no limitante, pET30a, pET30b y pET30c (Novagen) se pueden utilizar como vector para la inserción de una secuencia polinucleotídica. Los vectores pET-30a-c llevan un promotor T7 y una configuración His • Tag/trombina/S • Tag/enteroquinasa N-terminal más una secuencia His • Tag C-terminal opcional. En otro ejemplo no limitante, el plásmido pVR1020 o 1012 (VICAL Inc.; Luke et al., 1997; Hartikka et al., 1996, véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nos. 5.846.946 y 6.451.769) se puede utilizar como vector para la inserción de una secuencia de polinucleótidos. El plásmido pVR1020 se deriva de pVR1012 y contiene la secuencia señal de tPA humana. En una realización, la señal de tPA humana comprende desde el aminoácido M(1) hasta el aminoácido S(23) en Genbank con el número de acceso HUMTPA14. En otro ejemplo específico, no limitante, el plásmido utilizado como vector para la inserción de una secuencia de polinucleótidos puede contener la secuencia del péptido señal de IGF1 equino desde el aminoácido M(24) al aminoácido A(48) en Genbank bajo el número de acceso U28070. Se encuentra información adicional sobre plásmidos de ADN que pueden consultarse o emplearse en la práctica, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 6.852.705; 6.818.628; 6.586.412; 6.576.243; 6.558.674; 6.464.984; 6.451.770; 6.376.473 y 6.221.362.

[0089] El término plásmido cubre cualquier unidad de transcripción de ADN que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención y los elementos necesarios para su expresión *in vivo* en una célula o células del huésped o diana deseada; y, a este respecto, cabe indicar que se pretende que un plásmido circular superenrollado o no superenrollado, así como una forma lineal, estén dentro del alcance de la invención.

[0090] Cada plásmido comprende o contiene o consiste esencialmente en, además del polinucleótido que codifica un antígeno, epítipo o inmunógeno del FMDV, opcionalmente fusionado con una secuencia de péptido heterólogo, variante, análogo o fragmento, unido operativamente a un promotor o bajo el control de un promotor o dependiente de un promotor. En general, es ventajoso emplear un promotor fuerte funcional en células eucariotas. El promotor fuerte puede ser, pero no limitado a, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV-IE) de origen humano o murino, u opcionalmente que tenga otro origen, tal como la rata o la cobaya, el Super promotor (Ni, M. et al., Plant J. 7, 661-676, 1995.). El promotor CMV-IE puede comprender la parte promotora real, que puede estar asociada o no con la parte potenciadora. Se puede hacer referencia a EP-A-260148, EP-A-323 597, Patentes de Estados Unidos

Nos. 5.168.062, 5.385.839 y 4.968.615, así como a la Solicitud PCT No WO87/03905. El promotor CMV-IE es ventajosamente un CMV-IE humano (Boshart et al., 1985, Cell 41 (2): 521-30) o CMV-IE murino.

[0091] En términos más generales, el promotor tiene un origen viral, una planta o un origen celular. Un promotor viral fuerte distinto del CMV-IE que puede emplearse de manera útil en la práctica de la invención es el promotor temprano/tardío del virus SV40 o el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous. Un promotor celular fuerte que puede emplearse de manera útil en la práctica de la invención es el promotor de un gen del citoesqueleto, tal como por ejemplo el promotor de desmina (Kwissa et al., 2000, Vaccine 18 (22): 2337-44), o el promotor de actina (Miyazaki et al., 1989, Gene 79 (2): 269-77).

[0092] En cuanto a la señal de poliadenilación (A poli) para los plásmidos y vectores virales distintos de los poxvirus, se puede hacer uso de la señal de poli (A) del gen de la hormona de crecimiento bovina (bGH) (véase el documento US 5.122.458), o la señal poli (A) del gen de la  $\beta$ -globina de conejo o la señal poli (A) del virus SV40.

[0093] Una "célula huésped" indica una célula procariota o eucariota que ha sido alterada genéticamente, o es capaz de ser alterada genéticamente mediante la administración de un polinucleótido exógeno, tal como un plásmido o vector recombinante. Cuando se hace referencia a células genéticamente alteradas, el término se refiere tanto a la célula originalmente alterada como a la progenie de la misma.

[0094] Las procariotas contempladas en la presente invención pueden incluir *Avibacterium*, *Brucella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus suis*), *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella Enteridis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*), *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*, *Shigella*, *Pasteurella*, y *Rimeirella*.

[0095] En los sistemas procariotas, se puede seleccionar un conjunto de vectores de expresión. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, los vectores de expresión y clonación de *E. coli* multifuncionales, tales como los vectores PBLUESCRIPT (Stratagene) y pET (Novagen); vectores pIN (Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 264: 5503-5509 (1989)); y similares; Vectores PGEX (Promega, Madison, Wis.). En sistemas eucariotas, las líneas celulares pueden ser levaduras (tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), células de baculovirus, células de mamíferos, células vegetales. Los vectores de expresión de sistemas eucariotas incluyen, pero no se limitan a, vectores pVR1020 o pVT1012 (Vical Inc., San Diego, CA), *PichiaPink Vector* (Invitrogen, CA, EE.UU.), vector pFasBac TOPO (Invitrogen).

Procedimientos de uso y procedimientos de fabricación.

[0096] En el presente documento se describe un procedimiento para producir o preparar un polipéptido antigénico o antígeno. El procedimiento comprende las etapas de: i) unir un polinucleótido que codifica el antígeno a un polinucleótido que codifica una proteína E2; ii) expresar la proteína de fusión en un huésped; y iii) aislar la proteína de fusión del huésped. En una realización, el antígeno está unido al extremo N-terminal de E2. En el presente documento se describe que la proteína E2 es de *Geobacillus stearothermophilus*.

[0097] En el presente documento se describe un procedimiento para vacunar a un ovino, bovino, caprino o porcino que comprende administrar al ovino, bovino, caprino o porcino una cantidad eficaz de una vacuna que puede comprender una cantidad eficaz de un antígeno o proteína del FMDV recombinante o de fusión o quimérico. y un portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

[0098] En el presente documento el procedimiento comprende una única administración de una composición de vacuna formulada con una emulsión según la invención. Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, la composición inmunológica o de vacuna comprende antígenos del FMDV, incluidos polipéptidos y VLP (partículas similares a virus), mientras que una realización alternativa proporciona una vacuna que comprende las proteínas de fusión o quiméricas FMDV-E2. La microscopía electrónica indica que las proteínas de fusión o quiméricas FMDV-E2 producen partículas de FMDV-E2 que se asemejan a viriones o VLP de FMDV auténticos y, por tanto, las composiciones inmunológicas o de vacuna según la presente invención abarcan las que comprenden partículas de FMDV-E2.

[0099] En el presente documento se describe un procedimiento para vacunar a un ovino, bovino, caprino o porcino que comprende administrar al ovino, bovino, caprino o porcino un antígeno del FMDV de ovino, bovino, caprino o porcino. En el presente documento se describe un procedimiento para provocar una respuesta inmune que comprende administrar al ovino, bovino, caprino o porcino una vacuna que comprende un antígeno del FMDV de ovino, bovino, caprino o porcino. En el presente documento se describe un procedimiento para proteger y/o prevenir enfermedades en un ovino, bovino, caprino o porcino que comprende administrar al ovino, bovino, caprino o porcino una vacuna que comprende un antígeno del FMDV de ovino, bovino, caprino o porcino.

[0100] La administración puede ser por vía subcutánea o intramuscular. La administración puede realizarse sin aguja (por ejemplo, Pigjet o Bioject).

[0101] En una realización de la invención, se puede utilizar un régimen de sensibilización-refuerzo, que se compone de al menos una administración primaria y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido,



antígeno, epítipo o inmunógeno común. Normalmente, la composición inmunológica o vacuna utilizada en la administración primaria es de naturaleza diferente a las utilizadas como refuerzo. Sin embargo, cabe indicar que se puede usar la misma composición como administración primaria y refuerzo. Este protocolo de administración se llama "sensibilización-refuerzo".

[0102] Una sensibilización-refuerzo de acuerdo con la presente invención puede incluir un vector viral recombinante que se usa para expresar una secuencia codificante del FMDV o fragmentos de la misma que codifican un polipéptido antigénico o fragmento o variante del mismo. Específicamente, el vector viral puede expresar un gen de FMDV o un fragmento del mismo que codifica un polipéptido antigénico. Los vectores virales contemplados en este documento incluyen, pero no se limitan a, virus de la viruela [por ejemplo, virus vaccinia o virus vaccinia atenuado, virus de la viruela aviar o virus de la viruela aviar atenuado (por ejemplo, viruela del canario, viruela aviar, viruela de tortola, viruela de la paloma, viruela de codorniz, ALVAC, TROVAC; véase, por ejemplo, US 5.505.941, US 5,494,8070), virus de la viruela del mapache, virus de la viruela porcina, etc.], adenovirus (por ejemplo, adenovirus humano, adenovirus canino), virus del herpes (por ejemplo, virus del herpes canino, virus del herpes de pavo, virus de la enfermedad de Marek, virus de laringotraqueítis infecciosa, herpesvirus felino, virus de la laringotraqueítis (ILT), virus del herpes bovino, virus del herpes porcino), baculovirus, retrovirus, etc. En otra realización, el vector de expresión de la viruela aviar puede ser un vector de viruela del canario, tal como, ALVAC. En otra realización, el vector de expresión de la viruela aviar (avipox) puede ser un vector de la viruela aviar (fowlpox), tal como, TROVAC. El antígeno del FMDV de la invención que se va a expresar se inserta bajo el control de un promotor de virus de la viruela específico, por ejemplo, el promotor 42K del entomopoxvirus *Amsacta moorei* (Barcena, et al. 2000, J Gen Virol 81 (Pt 4): 1073-85), el promotor de vaccinia 7,5 kDa (Cochran et al., 1985, J Virol 54 (1): 30-7), el promotor de vaccinia I3L (Riviere et al., 1992, J Virol 66 (6): 3424-34), el promotor de vaccinia HA (Shida, 1986, Virology 150 (2): 451-62), el promotor de la viruela de vaca ATI (Funahashi et al., 1988, J Gen Virol 69 (Pt 1): 35-47), el promotor de vaccinia H6 (Taylor et al., 1988, Vaccine 6 (6): 504-8; Guo et al., 1989, J Virol 63 (10): 4189-98; Perkus et al., 1989, J Virol 63 (9): 3829-36), entre otros.

[0103] En otra realización, el vector de expresión de la viruela aviar puede ser un vector de viruela del canario, tal como, ALVAC. El antígeno, epítipo o inmunógeno del FMDV puede ser P1-3C del FMDV. El vector viral para expresar el antígeno del FMDV puede ser un virus de la viruela del canario, tal como vCP2186, vCP2181 o vCP2176, o un virus de la viruela aviar, tal como vFP2215 (véase el documento US 7.527.960), o un adenovirus (US2016/0220659).

[0104] Una sensibilización-refuerzo de acuerdo con la presente invención pueden incluir un antígeno o proteína de FMDV recombinante producida en las plantas o algas (véase el documento US 2011/0236416), o células de insecto (US2016/0220659).

[0105] En otro aspecto del protocolo de sensibilización-refuerzo de la invención, se administra una composición que comprende el antígeno del FMDV de la invención seguida de la administración de una vacuna o composición que comprende un vector viral recombinante que contiene y expresa el antígeno del FMDV *in vivo*, o una vacuna viral inactivada o composición que comprende el antígeno del FMDV, o una vacuna o composición de plásmido de ADN que contiene o expresa el antígeno del FMDV, o un antígeno recombinante del FMDV producido en células de plantas, algas o insectos. Asimismo, un protocolo de sensibilización-refuerzo puede comprender la administración de una vacuna o composición que comprenda un vector viral recombinante que contiene y expresa un antígeno del FMDV *in vivo*, o una vacuna viral inactivada o composición que comprenda un antígeno del FMDV, o una vacuna o composición de plásmido de ADN que contiene o expresa un antígeno del FMDV, o un antígeno del FMDV recombinante producido en células de plantas, algas o insectos, seguido de la administración de una composición que comprende el antígeno del FMDV de la invención. Cabe señalar además que tanto la administración primaria como la secundaria pueden comprender la composición que comprende el antígeno del FMDV de la invención.

[0106] Un protocolo de sensibilización-refuerzo comprende al menos una administración de sensibilización y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido común y/o variantes o fragmentos del mismo. La vacuna utilizada en la administración de sensibilización puede ser de naturaleza diferente a las utilizadas como vacuna de refuerzo posterior. La administración de sensibilización puede comprender una o más administraciones. De manera similar, la administración de refuerzo puede comprender una o más administraciones.

[0107] El volumen de dosis de composiciones de especies diana que son mamíferos, por ejemplo, el volumen de dosis de composiciones para ovinos, bovinos, caprinos o porcinos, basados en vectores virales, por ejemplo, composiciones basados en vectores virales no virus de la viruela ("poxvirus"), es generalmente de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5,0 ml, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3,0 ml y entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 2,5 ml.

[0108] La eficacia de las vacunas puede ser probada alrededor de 2 a 4 semanas después de la última inmunización mediante la exposición de los animales, tales como ovinos, bovinos, caprinos o porcinos, a una cepa virulenta de FMDV, ventajosamente las cepas de FMDV *O1 Manisa*, *O1 BFS* o *Campos*, *A24 Cruzeiro*, *Asia 1 Shamir*, *A Iran '96*, *A22 Iraq*, *SAT2 Saudi Arabia*.

[0109] Otras cepas adicionales pueden incluir las cepas del FMDV A10-61, A5, A12, A24/Cruzeiro, C3/Indaial, O1, C1-Santa Pau, C1-C5, A22/550/Azerbaijan/65, SAT1-SAT3, A, A/TNC/71/94, A/IND/2/68, A/IND/3/77, A/IND/5/68,

A/IND/7/82, A/IND/16/82, A/IND/17/77, A/IND/17/82, A/IND/19/76, A/IND/20/82, A/IND/22/82, A/IND/25/81,  
A/IND/26/82, A/IND/54/79, A/IND/57/79, A/IND/73/79, A/IND/85/79, A/IND/86/79, A/APA/25/84, A/APN/41/84,  
A/APS/44/05, A/APS/50/05, A/APS/55/05, A/APS/66/05, A/APS/68/05, A/BIM/46/95, A/GUM/33/84, A/ORS/66/84,  
A/ORS/75/88, A/TNAn/60/947/Asia/1, A/IRN/05, Asia/IRN/05, O/HK/2001, O/UKG/3952/2001, O/UKG/4141/2001,  
O/UKG/7039/2001, O/UKG/9161/2001, O/UKG/7299/2001, O/UKG/4014/2001, O/UKG/4998/2001,  
O/UKG/9443/2001, O/UKG/5470/2001, O/UKG/5681/2001, O/ES/2001, HKN/2002, O5India, O/BKF/2/92, K/37/84/A,  
KEN/176/A, GAM/51/98/A, A10/Holanda, O/KEN/1/91, O/IND49/97, O/IND65/98, O/IND64/98, O/IND48/98,  
O/IND47/98, O/IND82/97, O/IND81/99, O/IND81/98, O/IND79/97, O/IND78/97, O/IND75/97, O/IND74/97, O/IND70/97,  
O/IND66/98, O/IND63/97, O/IND61/97, O/IND57/98, O/IND56/98, O/IND55/98, O/IND54/98, O/IND469/98,  
O/IND465/97, O/IND464/97, O/IND424/97, O/IND423/97, O/IND420/97, O/IND414/97, O/IND411/97, O/IND410/97,  
O/IND409/97, O/IND407/97, O/IND399/97, O/IND39/97, O/IND391/97, O/IND38/97, O/IND384/97, O/IND380/97,  
O/IND37/97, O/IND352/97, O/IND33/97, O/IND31/97, O/IND296/97, O/IND23/99, O/IND463/97, O/IND461/97,  
O/IND427/98, O/IND28/97, O/IND287/99, O/IND285/99, O/IND282/99, O/IND281/97, O/IND27/97, O/IND278/97,  
O/IND256/99, O/IND249/99, O/IND210/99, O/IND208/99, O/IND207/99, O/IND205/99, O/IND185/99, O/IND175/99,  
O/IND170/97, O/IND164/99, O/IND160/99, O/IND 153/99, O/IND148/99, O/IND146/99, O/SKR/2000, A22/India/17/77,

[0110] Más detalles de estas cepas del FMDV se pueden encontrar en las páginas web de European Bioinformatics Information (EMBL-EBI).

[0111] Ambas cepas homólogas y heterólogas se utilizan para la exposición para probar la eficacia de la vacuna. El animal puede exponerse por vía intradérmica, subcutánea, pulverizada, intranasal, intraocular, intratraqueal y/u oral.

[0112] Las administraciones de sensibilización-refuerzo pueden llevarse a cabo ventajosamente de 1 a 6 semanas de diferencia. Según una realización, también se prevé un refuerzo semestral o un refuerzo anual, utilizando ventajosamente la vacuna basada en vectores virales.

[0113] Las composiciones que comprenden los polipéptidos antigénicos recombinantes de la invención usadas en los protocolos de sensibilización-refuerzo están contenidas en un vehículo, diluyente, adyuvante o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable. Los protocolos de la invención protegen al animal del FMDV ovino, bovino, caprino o porcino y/o previenen la progresión de la enfermedad en un animal infectado.

[0114] A partir de la descripción en el presente documento y el conocimiento en la técnica, el experto en la materia puede determinar el número de administraciones, la vía de administración, y las dosis a utilizar para cada protocolo de inyección, sin ninguna experimentación indebida.

[0115] La presente invención contempla al menos una administración a un animal de una cantidad eficiente de la composición terapéutica producida según la invención. El animal puede ser macho, hembra, hembra preñada y recién nacido. Esta administración puede ser a través de diversas rutas incluyendo, pero no limitado a, inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC) o mediante administración intranasal o por vía oral. La composición terapéutica según la invención también se puede administrar mediante un aparato sin aguja (como, por ejemplo, con un Pigjet, Dermojet, Biojector, Avijet (Merial, GA, EE.UU.), aparato Vetjet o Vitajet (Bioject, Oregon, EE.UU.)). Otro enfoque para la administración de composiciones de plásmidos es usar electroporación (véase, por ejemplo Tollefsen et al. 2002; Tollefsen et al. 2003; Babiuk et al. 2002; solicitud PCT No. WO99/01158).

[0116] En el presente documento se describe que la invención proporciona la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación para el suministro y expresión de un antígeno o epítipo del FMDV en una célula diana. La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz es una experimentación de rutina para un experto en la técnica. En el presente documento se describe la formulación que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que expresa un antígeno o epítipo del FMDV y un portador, vehículo, adyuvante o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable. En otra realización, el portador, vehículo, adyuvante o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable facilita la transfección u otros medios de transferencia de polinucleótidos a un animal huésped y/o mejora la conservación del vector o proteína en un huésped.

[0117] En el presente documento se describe un procedimiento de detección para diferenciar entre animales infectados y vacunados (DIVA).

[0118] Tal como se describe en el presente documento, el uso de la vacuna o composición de la presente invención permite la detección de la infección por el FMDV en un animal. Tal como se describe en el presente documento, el uso de la vacuna o composición de la presente invención permite la detección de la infección en animales diferenciando entre animales infectados y vacunados (DIVA). En el presente documento se describe un procedimiento para diagnosticar la infección del FMDV en un animal usando un procedimiento de detección inmunogénico del FMDV, tal como ELISA.

## Artículo de fabricación

[0119] En el presente documento se describe un kit para realizar un procedimiento para provocar o inducir una respuesta inmunitaria que puede comprender cualquiera de las composiciones inmunológicas o vacunas del FMDV recombinante, o composiciones inmunológicas o vacunas del FMDV inactivado, composiciones o vacunas del FMDV recombinante e instrucciones para realizar el procedimiento.

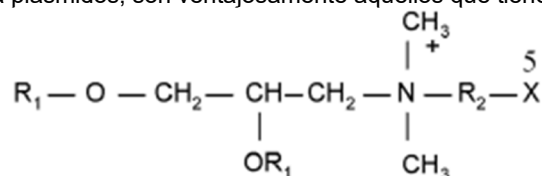
[0120] Tal como se describe en el presente documento, la presente invención es un kit para realizar un procedimiento de inducir una respuesta inmunológica o protectora contra el FMDV en un animal que comprende una composición o vacuna que comprende un antígeno del FMDV de la invención y una composición inmunológica o vacuna viral del FMDV recombinante, e instrucciones para realizar el procedimiento de administración en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el animal.

[0121] En el presente documento se describe un kit para realizar un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica o protectora contra el FMDV en un animal que comprende una composición o vacuna que comprende un antígeno del FMDV de la invención y una composición inmunológica o vacuna del FMDV inactivado, e instrucciones para realizar la procedimiento de administración en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el animal.

[0122] En el presente documento se describe un kit para la vacunación de sensibilización-refuerzo de acuerdo con la presente invención, tal como se describió anteriormente. El kit puede comprender al menos dos viales: un primer vial que contiene una vacuna o composición para la vacunación de sensibilización según la presente invención, y un segundo vial que contiene una vacuna o composición para la vacunación de refuerzo según la presente invención. El kit puede contener ventajosamente un primer o segundo viales adicionales para vacunaciones de sensibilización adicionales o vacunaciones de refuerzo adicionales.

[0123] Los portadores o adyuvantes o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, un portador o vehículo o adyuvante o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o un tampón fosfato. Otros portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables que se pueden utilizar para los procedimientos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, poli-(L-glutamato) o polivinilpirrolidona. Los portadores o vehículos o adyuvantes o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables pueden ser cualquier compuesto o combinación de compuestos que faciliten la administración del vector (o proteína expresada a partir de un vector de la invención *in vitro*); ventajosamente, el portador, adyuvante, vehículo o excipiente puede facilitar la transfección y/o mejorar la conservación del vector (o proteína). Las dosis y volúmenes de dosis se describen en el presente documento en la descripción general y también se pueden determinar por el experto en la materia a partir de esta descripción en relación con el conocimiento en la técnica, sin gran experimentación.

[0124] Los lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario que son ventajosamente, pero no exclusivamente, adecuados para plásmidos, son ventajosamente aquellos que tienen la siguiente fórmula:



en la que R1 es un radical alifático de cadena lineal saturado o insaturado que tiene de 12 a 18 átomos de carbono, R2 es otro radical alifático que contiene 2 o 3 átomos de carbono y X es una amina o un grupo hidroxilo, por ejemplo, el DMRIE. En otra realización, el lípido catiónico se puede asociar con un lípido neutro, por ejemplo, el DOPE.

[0125] Entre estos lípidos catiónicos, se da preferencia a DMRIE (N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propano amonio; WO96/34109), ventajosamente asociado con un lípido neutro, ventajosamente DOPE (dioleoil-fosfatidil-etanol amina; Behr, 1994), para formar DMRIE-DOPE.

[0126] Cuando DOPE está presente, la relación molar DMRIE:DOPE es de aproximadamente 95:aproximadamente 5 a aproximadamente 5:aproximadamente 95, o de aproximadamente 1:aproximadamente 1, por ejemplo, 1:1.

[0127] La relación en peso de adyuvante DMRIE o DMRIE-DOPE:plásmido puede ser de entre aproximadamente 50:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 10, tal como aproximadamente 10:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 5, y aproximadamente 1:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 2, por ejemplo, 1:1 y 1:2.

[0128] En otra realización, el portador, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una emulsión de agua en aceite. Ejemplos de emulsiones de agua en aceite adecuadas incluyen emulsiones de agua en aceite vacunales de base oleosa que son estables y fluidas a 4° C que contienen: de 6 a 50% v/v de una fase acuosa que contiene el antígeno, preferiblemente de 12 a 25% v/v, de 50 a 94% v/v de una fase oleosa que

contiene en total o en parte un aceite no metabolizable (por ejemplo, aceite mineral, tal como aceite de parafina) y/o aceite metabolizable (por ejemplo, aceite vegetal, o ácido graso, un poliol o ésteres de alcohol), de 0,2 a 20% p/v de tensioactivos, preferiblemente de 3 a 8% p/v, estando el último en total o en parte, o en una mezcla, ya sea de ésteres de poliglicerol, siendo dichos ésteres de poliglicerol preferiblemente (poli)ricinoleatos de poliglicerol, o aceites de ricino polioxietilenados u otros aceites de ricino polioxietilenados hidrogenados. Ejemplos de tensioactivos que pueden usarse en una emulsión de agua en aceite incluyen ésteres de sorbitán etoxilados (por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) (TWEEN 80®), disponible de AppliChem, Inc., Cheshire, CT) y ésteres de sorbitán (por ejemplo, monooleato de sorbitán (SPAN 80®), disponible de Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Además, con respecto a una emulsión de agua en aceite, véase también el documento US 6.919.084. En algunas realizaciones, la fase acuosa que contiene antígeno comprende una solución salina que comprende uno o más agentes tamponantes. Un ejemplo de una solución tampón adecuada es solución salina tamponada con fosfato. En una realización ventajosa, la emulsión de agua en aceite puede ser una emulsión triple agua/aceite/agua (W/O/W) (US 6.358.500). Ejemplos de otras emulsiones adecuadas se describen en el documento US 7.371.395.

[0129] Las composiciones y vacunas inmunológicas según la presente invención pueden comprender o consistir esencialmente en uno o más adyuvantes. Los adyuvantes adecuados para uso en la práctica de la presente invención son (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, anhídrido maleico y polímeros derivados con alquenilo, (2) secuencias inmunoestimulantes (ISS), tales como secuencias de oligodesoxirribonucleótidos que tienen una o más unidades CpG no metiladas (Klinman et al, 1996; documento WO98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua, tal como la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach", publicado por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de la misma obra, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, por ejemplo, DDA (5) citoquinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, (7) saponina u (8) otros adyuvantes tratados en cualquier documento citado o (9) cualquier combinación o mezclas de los mismos.

[0130] La emulsión de aceite en agua (3) puede basarse en: aceite de parafina líquido ligero (tipo farmacopea europea), aceite de isoprenoide, tal como escualano, escualeno, aceite resultante de la oligomerización de alquenos, por ejemplo, isobuteno o deceno, ésteres de ácidos o alcoholes que tienen un grupo alquilo de cadena lineal, tales como aceites vegetales, oleato de etilo, propilenglicol, di(caprilato/caprato), tri(caprilato/caprato) de glicerol y dioleato de propilenglicol, o ésteres de alcoholes o ácidos grasos ramificados, especialmente ésteres de ácido isoesteárico.

[0131] El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar una emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como: ésteres de, por una parte, sorbitán, manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol o propilenglicol y, por otra parte, ácidos oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, estando dichos ésteres opcionalmente etoxilados, o bloques de copolímeros de polioxipropileno-polioxietileno, tal como Pluronic, por ejemplo, L121. Algunas de las emulsiones, tales como las emulsiones TS6, TS7, TS8 y TS9, se describen en los documentos US 7.608.279 y US 7.371.395.

[0132] Los polímeros de ácido acrílico o metacrílico (1) están preferiblemente reticulados, en particular con polialquenil éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos bajo el nombre de carbómero (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, junio de 1996). Un experto en la técnica también puede hacer referencia a la patente de Estados Unidos No. 2,909,462, que proporciona tales polímeros acrílicos reticulados por un compuesto polihidroxílico que tiene al menos tres grupos hidroxilo, preferiblemente no más de ocho de tales grupos, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres grupos hidroxilo sustituidos por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos dos átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados también pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son especialmente adecuados. Se reticulan por alil sacarosa o por alilpentaeritritol. Entre ellos, se hace referencia a Carbopol 974P, 934P y 971P.

[0133] Entre los copolímeros de anhídrido maleico y de derivado con alquenilo, se prefieren los copolímeros EMA™ (Monsanto) que son copolímeros de anhídrido maleico y de etileno, que son lineales o reticulado, por ejemplo reticulado con divinil éter.

[0134] Las proporciones de adyuvante que son útiles son bien conocidas y fácilmente disponibles para el experto en la técnica. A modo de ejemplo, la concentración de polímeros de ácido acrílico o metacrílico o de copolímeros de anhídrido maleico y alquenilo en la composición final de la vacuna será del 0,01% al 1,5% p/v, más particularmente del 0,05 al 1% p/v, preferiblemente de 0,1 a 0,4% p/v.

[0135] En una realización, el adyuvante puede incluir TS6 (US 7,371,395), LR2, LR3 y LR4 (US 7,691,368), TSAP (US20110129494), TRIGEN™ (Newport Labs), dsARNs sintéticos (por ejemplo, adyuvantes poli-IC, poli-ICLC [HILTONOL®]) y MONTANIDE™ (W/O, W/O/W, O/W, IMS y Gel; todos producidos por SEPPIC).

[0136] La citoquina o citoquinas (5) pueden estar en forma de proteína en la composición inmunológica o de vacuna, o pueden coexpresarse en el huésped con el inmunógeno o inmunógenos o epítipo o epítopos de las mismas. Se da

preferencia a la coexpresión de la citoquina o citoquinas, ya sea por el mismo vector que el que expresa el inmunógeno o inmunógenos o epítipo o epítopos de las mismas, o por un vector separado de las mismas.

[0137] En el presente documento se describe la preparación de dichas composiciones de combinación; por ejemplo, mezclando los componentes activos, ventajosamente juntos y con un adyuvante, portador, citoquina y/o diluyente.

[0138] Las citoquinas que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), interferón  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), interferón  $\beta$  (IFN $\beta$ ), interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-2 (IL-2), interleucina-3 (IL-3), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-7 (IL-7), interleucina-8 (IL-8), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10), interleucina-11 (IL-11), interleucina-12 (IL-12), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF $\beta$ ) y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Se entiende que las citoquinas pueden coadministrarse y/o administrarse secuencialmente con la composición inmunológica o de vacuna de la presente invención. Así, por ejemplo, la vacuna de la presente invención también puede contener una molécula de ácido nucleico exógena que expresa *in vivo* una citoquina adecuada, por ejemplo, una citoquina emparejada con este huésped a vacunar o en el que se debe provocar una respuesta inmunológica (por ejemplo, una citoquina de cerdo para preparaciones a administrar en cerdos).

[0139] La composición inmunológica y/o vacuna, tal como se describe en el presente documento, comprende o consiste esencialmente en o consiste en una cantidad eficaz para provocar una respuesta terapéutica de uno o más polipéptidos expresados *in vitro* como se describe en el presente documento; y se puede determinar una cantidad eficaz a partir de esta descripción sin gran experimentación.

[0140] La composición o vacuna puede contener una dosis de aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^{20}$ , de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^{18}$ , de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^{16}$ , de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{12}$  VLP (partículas similares a virus) producidas *in vitro* o *in vivo* a partir de un vector viral, un plásmido o baculovirus. El vector viral puede titularse en base a cualquier procedimiento de titulación del virus, incluidos, pero sin limitación, FFA (ensayo de formación de focos) o FFU (unidad de formación de focos), TCID<sub>50</sub> (50% de dosis infecciosa de cultivo tisular), PFU (unidades formadoras de placas) y FAID<sub>50</sub> (50% de dosis infecciosa de anticuerpo fluorescente) y las VLP producidas *in vitro* (tales como plásmidos o baculovirus) pueden titularse mediante ensayo de hemaglutinación, ELISA y microscopía electrónica. También pueden aplicarse otros procedimientos dependiendo del tipo de VLP.

[0141] Los volúmenes de dosis pueden estar entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml, de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 5 ml.

[0142] La invención se describirá ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

## **EJEMPLOS**

[0143] La construcción de insertos de ADN, plásmidos y vectores virales recombinantes se llevó a cabo utilizando las técnicas de biología molecular estándar descritas por J. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4<sup>a</sup> Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2014).

### **Ejemplo 1 Clonación y expresión de la proteína de fusión FMDV-E2**

[0144] El gen VP1 de FMDV del serotipo O1 Manisa (SEQ ID NO: 1 que codifica SEQ ID NO: 2) se amplificó por PCR y se clonó en el vector pET30b (Novagen). El plásmido resultante pPX216 contiene la fusión FMDV-E2 que tiene el gen VP1 del FMDV en el extremo 5' y el dominio central del gen E2 (SEQ ID NO: 3 que codifica la SEQ ID NO: 4) en el extremo 3'.

[0145] El gen VP1 de FMDV de serotipo A24 (SEQ ID NO: 7 que codifica SEQ ID NO: 8) se amplificó por PCR y se clonó en el vector pET30b (Novagen). El plásmido resultante pPX236 contiene la fusión FMDV-E2 que tiene el gen VP1 del FMDV en el extremo 5' y el dominio central del gen E2 (SEQ ID NO: 3 que codifica SEQ ID NO: 4) en el extremo 3'.

[0146] El gen VP1 de FMDV de serotipo Asia Shamir (SEQ ID NO: 13 que codifica SEQ ID NO: 14) se amplificó por PCR y se clonó en el vector pET30b (Novagen). El plásmido resultante pPX237 contiene la fusión FMDV-E2 que tiene el gen VP1 del FMDV en el extremo 5' y el dominio central del gen E2 (SEQ ID NO: 3 que codifica SEQ ID NO: 4) en el extremo 3'.

[0147] Las cepas de expresión químicamente competentes BLR (DE3) (Novagen) fueron transformadas por las construcciones generadas y por el vector vacío correspondiente. Las bacterias se cultivaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cultivos se centrifugaron a 3200 g 4 °C durante 15 min. Los sobrenadantes se separaron de los sedimentos. Los sedimentos se resuspendieron en un volumen de tampón: tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, leupeptina 1  $\mu$ g/ml, pepstatina 1  $\mu$ g/ml y 0,1 mg/ml de lisosima para alcanzar 8,0 de

DO<sub>600 nm</sub> final. La lisis celular se realizó mediante 3 ciclos de congelación/descongelación. Los lisados se incubaron durante 15 minutos a 4°C con 1 µl de Benzonase Nuclease (Novagen)/por litro de cultivo. Se analizaron 10 µl de proteínas de lisados para determinar el nivel de expresión mediante electroforesis Bistris con SDS-PAGE 4-12% seguida de tinción con azul de Coomassie y análisis de transferencia Western. Para cada condición, se analizaron 2 clones.

[0148] La proteína de fusión FMDV-E2 se produjo como fracción insoluble sin etiqueta de His y se purificó adicionalmente por IEX y SEC, antes de replegarse. La transferencia Western y la transferencia de puntos (ver Figura 3) han demostrado que la proteína de fusión FMDV-E2 produjo el tamaño correcto y el FMD-E2 expresado reaccionó con suero de cerdo vacunado con vacunas contra el FMDV.

[0149] La caracterización física y bioquímica de las nanopartículas de FMDV-E2 se llevó a cabo tal como se muestra en las figuras 4 y 5. Los antígenos expresados se comprobaron por microscopía electrónica para la presencia de estructuras de nanopartículas. La figura 4A muestra las partículas de proteína E2 sola. La figura 4B muestra las partículas de la proteína de fusión E2-FMDV-E2. La Figura 4C muestra las partículas de la proteína cdE2-FMDV que contiene la mezcla de proteína E2 independiente y proteína de fusión FMDV-E2 en la proporción 2:1. Los resultados demostraron que la fusión FMDV-E2 formó partículas de 60 unidades similares al dominio central de E2 de tipo salvaje.

[0150] Las nanopartículas se evaluaron adicionalmente por su reconocimiento usando una prueba de ELISA indirecta por tres nanocuerpos anti-VHH de FMDV que tienen diferentes especificidades para partículas de FMDV (cápside completa de 146S, o cápsidas desnaturalizadas = capsómeros 12S) (véase la Tabla 1).

Tabla 1 Nanocuerpos VHH del FMDV

Nanocuerpos	serotipo	partículas de FMDV reconocidas
VHH M8	específico de O1M	50 % 146S/50 % 12S
VHH M170	específico de O1M	100% de partículas 146S
VHH M3	todos los serotipos	100% de partículas 12S

[0151] Los resultados (véase la Figura 5) han demostrado que el nanocuerpo M170 VHH, específico para las cápsides completas de O1M 146S de FMDV, produjo una fuerte señal sólo cuando el péptido quimérico está fusionado a la proteína E2 y ensamblados en una nanopartícula. Esto indica que el péptido quimérico VP1 del FMDV se expresa en la nanopartícula E2 en la misma confirmación que en la partícula viral del FMDV de tipo salvaje.

## Ejemplo 2 Estudio clínico y serológico de animales vacunados

### Ejemplo 2.1 Estudio clínico y serológico de las vacunas O1 Manisa

[0152] El objetivo del estudio fue evaluar la inmunogenicidad en cerdos convencionales de la vacuna contra FMD O1 Manisa. La vacuna se probó en TS6 y formulaciones de polímero de ácido poliácrico. Cada formulación se administró en dos inyecciones con tres semanas de diferencia (D0 - D21) a los cerdos (ver Tabla 2). Los cerdos tenían entre 8 y 9 semanas de edad el día D0. La inmunogenicidad se evaluó mediante un estudio serológico y ensayos de inmunidad mediada por células (CMI) (D27, D42), tal como se describe en la Tabla 3. Los parámetros monitorizados incluyen: peso corporal en D1 para la aleatorización y D42 antes de la eutanasia, serología en D1, D20 y D42, ensayo CMI en D27 y D42, signos clínicos (reacciones generales de D1 a D21 y D21 a D23) y reacciones locales en los lugares de inyección (D0 a D2 y D21 a D23).

Tabla 2 Esquema de vacunación de la vacuna O1 Manisa con dos inyecciones en D0 y D21

Grupo	antígeno	adyuvante	ug Ag/dosis	volumen/dosis	inyección en D0	inyección en D21
G1 (n = 6)	FMD solo	TS6*	100	1 ml	IM- lado izquierdo del cuello	IM- lado derecho del cuello
G2 (n = 6)	antígeno de FMDV-E2 (partículas de fusión FMDV-E2)	TS6	394	1ml		
G3 (n = 6)	E2 + FMDV-E2	TS6	394	1ml		
G4 (n = 6)	antígeno de FMDV-E2 (partículas de fusión FMDV-E2)	Polímero de ácido poliácrico	394	1 ml		

G5 (n = 6)	Control no tratado	/	/	/		
TS6* = adyuvante/emulsión TS6 tal como se describe en los documentos US 7,608,279 y US 7,371,395						

Tabla 2.1 Emulsión TS6 (premulsión descrita en los documentos US 7,608,279 y US 7,371,395)

Fase oleosa (20 ml)	
Monooleato de sorbitán (SPAN 80®)	1,8 % p/v
Trioleato de sorbitán (20 OE) (TWEEN 85®)	10,2 % p/v
Aceite de parafina (MARCOL 82 ®)	88 % p/v
Fase acuosa (120 ml)	
Solución al 20% (p/v) de monooleato de sorbitán (20 OE) (TWEEN 80®)	11,25 % p/v
Tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8)	85,75 % p/v
Mercurotiolato de sodio (Thionersal®) al 1% en agua	1,5 % p/v

Tabla 3 Monitorización de la respuesta inmune celular

Ensayo	Reestimulación de PBMC		D27	D42
ELISPOT de IFN $\gamma$	Ingredientes activos: - AI O1 Manisa inactivado - Calcivirus felino inactivado (control negativo)		X	X
	Proteína: - Péptido FMDV solo - Proteína FMDV-E2 - Proteína E2+FMDV-E2 - Proteína GapC (Calcivirus felino, control negativo)		X	X
Citoquinas LUMINEX	Proteína: - Péptido FMDV solo - Proteína FMDV-E2 - Proteína E2+FMDV-E2 - Proteína GapC			X
Células plasmáticas	Placas se recubrieron con: - AI O1 Manisa inactivado - Calcivirus felino inactivado (control negativo)		X	
	- Péptido FMDV solo - Proteína FMDV-E2 - Proteína E2+FMDV-E2 - Proteína GapC			
Células B de memoria	7 días de reestimulación con FMDV-E2	Placas se recubrieron con: - Péptido FMDV solo - Proteína FMDV-E2 - Proteína E2+FMDV-E2 - Proteína GapC		X

5

[0153] Los resultados de la serología se muestran en la Tabla 4 y la Figura 11.

Tabla 4 Seroneutralización (SN) de FMDV O1 Manisa

Número de animales positivos mediante SN					
Fecha	G1	G2	G3	G4	G5
D1	0/6	0/6	0/6	0/6	0/3
D20	3*/6	1*/6	1+3*/6	2*/6	0/3
D42	3+3*/6	6/6	5+1*/6	1+3*/6	1*/3
*: título no concluyente					

10 [0154] Los resultados de la Tabla 3 y la figura 10 han demostrado que existe diferencia significativa entre grupos ( $p = 0,001$ ) a favor de los grupos G2 y G3.

15 [0155] Los resultados de las Figuras 6 y 7 han mostrado que se detectaron células plasmáticas específicas en todos los grupos FMDV-E2 con una respuesta muy débil para G1 (FMDV solo). Se obtuvieron mejores respuestas con G2 en comparación con G3 y G4. El grupo G2 mostró respuestas prominentes usando el recubrimiento FMDV-E2.

[0156] Las figuras 8 y 9 han demostrado que se detectaron respuestas de IFN $\gamma$  específicas para todos los grupos vacunados utilizando cualquier reestimulación con la respuesta más alta de IFN $\gamma$  detectada utilizando la reestimulación de FMDV-E2 para todos los grupos.

[0156] La Figura 10 muestra los resultados después de 7 días de reestimulación con la proteína FMDV-E2 (número de células B de memoria que secretan anticuerpos). Los resultados han demostrado que se detectaron células B específicas para todos los grupos de FMDV-E2 y una respuesta débil para el G1 (solo el FMDV). Se obtuvieron mejores respuestas con G2 en comparación con G3 y G4. Se obtuvieron respuestas más bajas o nulas usando el péptido de FMDV de recubrimiento y Al O1M. Los mejores resultados se obtuvieron en los grupos G2 y G3 utilizando el recubrimiento de FMDV-E2.

[0158] En conclusión, las vacunas con O1M indujeron respuestas humerales y celulares con fuertes respuestas de anticuerpos neutralizantes, específicas de serotipo, proporción constante de las respuestas de IFN $\gamma$  específicas, la presencia de células B de memoria, lo que indica un buen nivel de protección contra las infecciones de FMDV homólogos y heterólogos. La eficacia de los productos sometidos a prueba se evaluó serológicamente mediante la prueba de seroneutralización del FMDV e inmunológicamente mediante ensayos de respuesta inmune celular. Los mejores resultados se obtuvieron con las partículas FMDV-E2 adyuvadas con TS6.

[0159] Se conoce en los campos de investigación de FMDV que se necesitan viriones completamente ensamblados o VLP que presentan epítopos conformacionales de FMD auténticos para la protección de FMD en animales. Los resultados de ELISA muestran que las partículas de FMDV-E2 producidas se asemejan a la conformación de la superficie del virión cuando se comparan con E2 + FMDV-E2 o el péptido de FMDV solo. Los resultados demuestran que entre los tres candidatos, el FMDV-E2 es el mejor para inducir anticuerpos neutralizantes. En conjunto, los resultados indican que la proteína de fusión FMDV-E2 podría provocar una respuesta inmune suficiente para proteger contra la exposición al FMDV.

#### Ejemplo 2.2 Estudio clínico y serológico de las vacunas A24 Cruzeiro y Asia1 Shamir

[0160] El objetivo del estudio fue evaluar la inmunogenicidad en cerdos convencionales, de las vacunas A24 Cruzeiro y Asia1 Shamir. La eficacia protectora inducida por la composición o vacuna se evalúa frente al patógeno de FMDV mediante la exposición a vacunación en animales. El efecto protector se evalúa mediante observaciones clínicas y/o carga viral del patógeno específico en tejidos y sangre. Las muestras de sangre de los animales vacunados se toman en varias etapas y se analizan para pruebas de serología y CMI. Los resultados muestran que la composición o vacuna de la presente invención es inmunogénica y proporciona protección a los animales.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Meria1, Inc.  
Audonnet, Jean-Christophe  
Reynard, Frederic  
Bomchil, Natalia  
Sigoillot-Claude, Cecile

<120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE FMDV Y E2 Y USOS DE LAS MISMAS

<130> MER 15-283.PCT

<150> 62/259,043

<151> 2015-11-23

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 246

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polinucleótido que codifica el antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV O1 Manisa

<400> 1

atggaaaatt atggtgtga aaccaggtt cagcgctgc agcataccga tgtagcttt 60

attctggatc gttttgttaa agtgaccccg tataatggca atagcaaata tggatgatggc 120



# ES 2 899 230 T3

	accgttgcaa atgttcgtgg tgatctgcag gttctggcac agaaagcagc acgtgcactg	180
5	ccgaccagtc cggatcaggc acgtcataaa cagaaaattg ttgcaccggt taaacagctg	240
	ctgtaa	246
10	<210> 2 <211> 81 <212> PRT <213> secuencia artificial	
15	<220> <223> antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV 01 Manisa	
	<400> 2	
20	Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Val Gln Arg Arg Gln His Thr 1 5 10 15	
25	Asp Val Ser Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Val Thr Pro Tyr Asn 20 25 30	
30	Gly Asn Ser Lys Tyr Gly Asp Gly Thr Val Ala Asn Val Arg Gly Asp 35 40 45	
	Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala Arg Ala Leu Pro Thr Ser Pro 50 55 60	
35	Asp Gln Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Leu 65 70 75 80	
40	Leu	
45	<210> 3 <211> 768 <212> ADN <213> secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencia de polinucleótido para enlazador y dominio catalítico C-terminal central de E2 de Geobacillus stearothermophilus	
	<400> 3	
55	aagcttgacag cagcagaaga aaaagcagca ccggcagcag caaaaccggc aaccaccgaa	60
	ggtgaatttc cggaaacccg tgaaaaaatg agcgggtattc gtcgtgcaat tgcaaaagca	120
	atggttcata gcaaacatac cgcaccgcat gttaccctga tggatgaagc agatgttacc	180
60	aaactgggttg cccaccgcaa aaaattcaaa gcaattgcag cagagaaagg cattaaactg	240
	acctttctgc cgtatgttgt taaagcactg gttagcgcac tgcgtgaata tccggttctg	300
	aataccagca ttgatgatga aaccgaagag atcatccaga aacactatta caatattggc	360
65	attgcagcag ataccgatcg tggctctgctg gttccgggtta ttaaacaatgc agatcgtaaa	420
	ccgatttttg cactggccca agaaattaat gaactggcag aaaaagcacg tgatggtaaa	480

# ES 2 899 230 T3

ctgacaccgg gtgaaatgaa aggtgcaagc tgtaccatta caaatattgg tagtgccggg 540  
 ggtcagtggg ttacaccggg tattaatcat ccggaagttg ccattctggg tattggctcg 600  
 5 attgcagaaa aaccgattgt tcgtgatggg gaaattgttg cagcaccgat gctggcactg 660  
 agcctgagct ttgatcatcg tatgattgat ggtgcaaccg cacagaaagc actgaatcat 720  
 10 attaaacgtc tgctgagcga tccggaactg ctgctgatgg aagcatga 768  
  
 <210> 4  
 <211> 255  
 15 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia de proteína para enlazador y dominio catalítico C-terminal  
 20 central de E2 de Geobacillus stearothermophilus  
  
 <400> 4  
 25 Lys Leu Ala Ala Ala Glu Glu Lys Ala Ala Pro Ala Ala Ala Lys Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Thr Glu Gly Glu Phe Pro Glu Thr Arg Glu Lys Met Ser Gly  
 30 20 25 30  
 Ile Arg Arg Ala Ile Ala Lys Ala Met Val His Ser Lys His Thr Ala  
 35 35 40 45  
 Pro His Val Thr Leu Met Asp Glu Ala Asp Val Thr Lys Leu Val Ala  
 50 50 55 60  
 40 His Arg Lys Lys Phe Lys Ala Ile Ala Ala Glu Lys Gly Ile Lys Leu  
 65 65 70 75 80  
 Thr Phe Leu Pro Tyr Val Val Lys Ala Leu Val Ser Ala Leu Arg Glu  
 45 85 90 95  
 Tyr Pro Val Leu Asn Thr Ser Ile Asp Asp Glu Thr Glu Glu Ile Ile  
 50 100 105 110  
 Gln Lys His Tyr Tyr Asn Ile Gly Ile Ala Ala Asp Thr Asp Arg Gly  
 55 115 120 125  
 Leu Leu Val Pro Val Ile Lys His Ala Asp Arg Lys Pro Ile Phe Ala  
 130 135 140  
 60 Leu Ala Gln Glu Ile Asn Glu Leu Ala Glu Lys Ala Arg Asp Gly Lys  
 145 150 155 160  
 65 Leu Thr Pro Gly Glu Met Lys Gly Ala Ser Cys Thr Ile Thr Asn Ile  
 165 170 175

# ES 2 899 230 T3

Gly Ser Ala Gly Gly Gln Trp Phe Thr Pro Val Ile Asn His Pro Glu  
180 185 190

5 Val Ala Ile Leu Gly Ile Gly Arg Ile Ala Glu Lys Pro Ile Val Arg  
195 200 205

10 Asp Gly Glu Ile Val Ala Ala Pro Met Leu Ala Leu Ser Leu Ser Phe  
210 215 220

15 Asp His Arg Met Ile Asp Gly Ala Thr Ala Gln Lys Ala Leu Asn His  
225 230 235 240

Ile Lys Arg Leu Leu Ser Asp Pro Glu Leu Leu Leu Met Glu Ala  
245 250 255

20  
<210> 5  
<211> 1011  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

25  
<220>  
<223> Polinucleótido que codifica la proteína de fusión FMDV-E2

30  
<400> 5  
atggaaaatt atggtggtga aaccaggtt cagcgtcgtc agcataccga tgtagcttt 60  
attctggatc gttttgttaa agtgaccccg tataatggca atagcaaata tggtgatggc 120  
accgttgcaa atgttcgtgg tgatctgcag gttctggcac agaaagcagc acgtgcactg 180  
35 ccgaccagtc cggatcaggc acgtcataaa cagaaaattg ttgcaccggt taaacagctg 240  
ctgaagcttg cagcagcaga agaaaaagca gcaccggcag cagcaaaacc ggcaaccacc 300  
40 gaaggtgaat ttccggaaac ccgtgaaaaa atgagcggta ttcgtcgtgc aattgcaaaa 360  
gcaatggttc atagcaaaca taccgcaccg catgttacc tcatggatga agcagatggt 420  
accaaactgg ttgccaccg caaaaaattc aaagcaattg cagcagagaa aggcattaaa 480  
45 ctgacctttc tgccgtatgt tgtaaagca ctggttagcg cactgcgtga atatccggtt 540  
ctgaatacca gcattgatga tgaaaccgaa gagatcatcc agaaacacta ttacaatatt 600  
50 ggcattgcag cagataccga tcgtggtctg ctggttccgg ttattaaaca tgcagatcgt 660  
aaaccgattt ttgcactggc ccaagaaatt aatgaactgg cagaaaaagc acgtgatggt 720  
aaactgacac cgggtgaaat gaaagggtgca agctgtacca ttacaaatat tggtagtgcc 780  
55 ggtggctcagt gggttacacc gggtattaat catccggaag ttgccattct gggtattggt 840  
cgtattgcag aaaaaccgat tgctcgtgat ggtgaaattg ttgcagcacc gatgctggca 900  
60 ctgagcctga gctttgatca tcgtatgatt gatggtgcaa ccgcacagaa agcactgaat 960  
catattaaac gtctgctgag cgatccggaa ctgctgctga tggaagcatg a 1011

65  
<210> 6  
<211> 336  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

# ES 2 899 230 T3

<220>

<223> Secuencia de la proteína de fusión FMDV-E2

5 <400> 6

Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Val Gln Arg Arg Gln His Thr  
1 5 10 15

10 Asp Val Ser Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Val Thr Pro Tyr Asn  
20 25 30

15 Gly Asn Ser Lys Tyr Gly Asp Gly Thr Val Ala Asn Val Arg Gly Asp  
35 40 45

20 Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala Arg Ala Leu Pro Thr Ser Pro  
50 55 60

25 Asp Gln Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Leu  
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ala Ala Ala Glu Glu Lys Ala Ala Pro Ala Ala Ala Lys  
85 90 95

30 Pro Ala Thr Thr Glu Gly Glu Phe Pro Glu Thr Arg Glu Lys Met Ser  
100 105 110

35 Gly Ile Arg Arg Ala Ile Ala Lys Ala Met Val His Ser Lys His Thr  
115 120 125

40 Ala Pro His Val Thr Leu Met Asp Glu Ala Asp Val Thr Lys Leu Val  
130 135 140

45 Ala His Arg Lys Lys Phe Lys Ala Ile Ala Ala Glu Lys Gly Ile Lys  
145 150 155 160

Leu Thr Phe Leu Pro Tyr Val Val Lys Ala Leu Val Ser Ala Leu Arg  
165 170 175

50 Glu Tyr Pro Val Leu Asn Thr Ser Ile Asp Asp Glu Thr Glu Glu Ile  
180 185 190

55 Ile Gln Lys His Tyr Tyr Asn Ile Gly Ile Ala Ala Asp Thr Asp Arg  
195 200 205

60 Gly Leu Leu Val Pro Val Ile Lys His Ala Asp Arg Lys Pro Ile Phe  
210 215 220

65 Ala Leu Ala Gln Glu Ile Asn Glu Leu Ala Glu Lys Ala Arg Asp Gly  
225 230 235 240

Lys Leu Thr Pro Gly Glu Met Lys Gly Ala Ser Cys Thr Ile Thr Asn  
245 250 255

# ES 2 899 230 T3

5 Ile Gly Ser Ala Gly Gly Gln Trp Phe Thr Pro Val Ile Asn His Pro  
 260 265 270  
 Glu Val Ala Ile Leu Gly Ile Gly Arg Ile Ala Glu Lys Pro Ile Val  
 275 280 285  
 10 Arg Asp Gly Glu Ile Val Ala Ala Pro Met Leu Ala Leu Ser Leu Ser  
 290 295 300  
 15 Phe Asp His Arg Met Ile Asp Gly Ala Thr Ala Gln Lys Ala Leu Asn  
 305 310 315 320  
 20 His Ile Lys Arg Leu Leu Ser Asp Pro Glu Leu Leu Leu Met Glu Ala  
 325 330 335  
 25 <210> 7  
 <211> 246  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polinucleótido que codifica el antígeno de FMDV sintético correspondiente  
 30 a VP1 de la cepa de FMDV A24 en pET30b  
 <400> 7  
 atggaaaatt atggtggtga aaccagatt cagcgctgctc atcataccga tattggcttt 60  
 35 attatggatc gcttcgtgaa aatccagagc tataatggca ccagcaaata tgcagttggt 120  
 ggtagcggtc gtcgtggtga tatgggtagc ctggcagcac gtgttgtaa acagctgcct 180  
 40 gcaagcggtta gcagccagga tcgtcataaa cagaaaatta tcgcaccggc aaaacaactg 240  
 ctgtga 246  
 45 <210> 8  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV A24  
 en pET30b (pPX238)  
 <400> 8  
 55 Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Ile Gln Arg Arg His His Thr  
 1 5 10 15  
 60 Asp Ile Gly Phe Ile Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln Ser Tyr Asn  
 20 25 30  
 Gly Thr Ser Lys Tyr Ala Val Gly Gly Ser Gly Arg Arg Gly Asp Met  
 35 40 45  
 65 Gly Ser Leu Ala Ala Arg Val Val Lys Gln Leu Pro Ala Ser Val Ser  
 50 55 60

# ES 2 899 230 T3

Ser Gln Asp Arg His Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln Leu  
65 70 75 80

5 Leu

10  
<210> 9  
<211> 1011  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

15  
<220>  
<223> Polinucleótido que codifica la proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV A24)-E2 en pET30b (pPX236)

20  
<400> 9  
atggaaaatt atggtggtga aaccagatt cagcgtcgtc atcataccga tattggcttt 60  
attatggatc gcttcgtgaa aatccagagc tataatggca ccagcaaata tgcagttggt 120  
25 ggtagcggtc gtcgtggtga tatgggtagc ctggcagcac gtgttgtaa acagctgcct 180  
gcaagcggtta gcagccagga tcgtcataaa cagaaaatta tcgcaccggc aaaacaactg 240  
ctgaagcttg cagcagcaga agaaaaagca gcaccggcag cagcaaaacc ggcaaccacc 300  
30 gaaggtgaat ttccggaaac ccgtgaaaaa atgagcggta ttcgtcgtgc aattgcaaaa 360  
gcaatggttc atagcaaaca taccgcaccg catgttacc c tgatggatga agcagatggt 420  
35 accaaactgg ttgcccaccg caaaaaattc aaagcaattg cagcagagaa aggcattaaa 480  
ctgacctttc tgccgtatgt tgttaaagca ctggttagcg cactgcgtga atatccgggt 540  
ctgaatacca gcattgatga tgaaaccgaa gagatcatcc agaaacacta ttacaatatt 600  
40 ggcattgcag cagataccga tcgtggtctg ctggttccgg ttattaaaca tgcagatcgt 660  
aaaccgattt ttgcaactggc ccaagaaatt aatgaactgg cagaaaaagc acgtgatgggt 720  
45 aaactgacac cgggtgaaat gaaaggtgca agctgtacca ttacaaatat tggtagtgcc 780  
ggtggtcagt ggtttacacc ggttattaat catccggaag ttgccattct gggatttggt 840  
cgtattgcag aaaaaccgat tgttcgtgat ggtgaaattg ttgcagcacc gatgctggca 900  
50 ctgagcctga gctttgatca tcgtatgatt gatggtgcaa ccgcacagaa agcactgaat 960  
catattaaac gtctgctgag cgatccggaa ctgctgctga tggaagcatg a 1011

55  
<210> 10  
<211> 336  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

60  
<220>  
<223> Proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV A24)-E2 en pET30b (pPX236)

65  
<400> 10  
Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Ile Gln Arg Arg His His Thr  
1 5 10 15

# ES 2 899 230 T3

5 Asp Ile Gly Phe Ile Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln Ser Tyr Asn  
 20 25 30  
 Gly Thr Ser Lys Tyr Ala Val Gly Gly Ser Gly Arg Arg Gly Asp Met  
 35 40 45  
 10 Gly Ser Leu Ala Ala Arg Val Val Lys Gln Leu Pro Ala Ser Val Ser  
 50 55 60  
 15 Ser Gln Asp Arg His Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln Leu  
 65 70 75 80  
 20 Leu Lys Leu Ala Ala Ala Glu Glu Lys Ala Ala Pro Ala Ala Ala Lys  
 85 90 95  
 25 Pro Ala Thr Thr Glu Gly Glu Phe Pro Glu Thr Arg Glu Lys Met Ser  
 100 105 110  
 Gly Ile Arg Arg Ala Ile Ala Lys Ala Met Val His Ser Lys His Thr  
 115 120 125  
 30 Ala Pro His Val Thr Leu Met Asp Glu Ala Asp Val Thr Lys Leu Val  
 130 135 140  
 35 Ala His Arg Lys Lys Phe Lys Ala Ile Ala Ala Glu Lys Gly Ile Lys  
 145 150 155 160  
 40 Leu Thr Phe Leu Pro Tyr Val Val Lys Ala Leu Val Ser Ala Leu Arg  
 165 170 175  
 45 Glu Tyr Pro Val Leu Asn Thr Ser Ile Asp Asp Glu Thr Glu Glu Ile  
 180 185 190  
 Ile Gln Lys His Tyr Tyr Asn Ile Gly Ile Ala Ala Asp Thr Asp Arg  
 195 200 205  
 50 Gly Leu Leu Val Pro Val Ile Lys His Ala Asp Arg Lys Pro Ile Phe  
 210 215 220  
 55 Ala Leu Ala Gln Glu Ile Asn Glu Leu Ala Glu Lys Ala Arg Asp Gly  
 225 230 235 240  
 60 Lys Leu Thr Pro Gly Glu Met Lys Gly Ala Ser Cys Thr Ile Thr Asn  
 245 250 255  
 65 Ile Gly Ser Ala Gly Gly Gln Trp Phe Thr Pro Val Ile Asn His Pro  
 260 265 270  
 Glu Val Ala Ile Leu Gly Ile Gly Arg Ile Ala Glu Lys Pro Ile Val  
 275 280 285

# ES 2 899 230 T3

5 Arg Asp Gly Glu Ile Val Ala Ala Pro Met Leu Ala Leu Ser Leu Ser  
 290 295 300  
 Phe Asp His Arg Met Ile Asp Gly Ala Thr Ala Gln Lys Ala Leu Asn  
 305 310 315 320  
 10 His Ile Lys Arg Leu Leu Ser Asp Pro Glu Leu Leu Leu Met Glu Ala  
 325 330 335  
 15 <210> 11  
 <211> 240  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> polinucleótido que codifica el antígeno de FMDV sintético correspondiente  
 a VP1 de la cepa de FMDV Asia Shamir en pET30b (pPX239)  
 <400> 11  
 25 atggaaaatt atggtggtga aaccagacc gcacgtcgtc tgcataccga tgttgcatTT 60  
 attctggatc gttttgttaa actgaccgcc tataatggta aaaccgccta tggtgaaaca 120  
 accagccgtc gtggtgatat ggcagcactg gcacagcgtc tgagcgcacg tctgccgacc 180  
 30 agcaccaccc aggatcgtcg taaacaagaa attattgcac cggaaaaaca ggtgctgtga 240  
 35 <210> 12  
 <211> 79  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV Asia  
 Shamir en pET30b (pPX239)  
 <400> 12  
 45 Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Thr Ala Arg Arg Leu His Thr  
 1 5 10 15  
 50 Asp Val Ala Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Leu Thr Ala Tyr Asn  
 20 25 30  
 Gly Lys Thr Ala Tyr Gly Glu Thr Thr Ser Arg Arg Gly Asp Met Ala  
 35 40 45  
 55 Ala Leu Ala Gln Arg Leu Ser Ala Arg Leu Pro Thr Ser Thr Thr Gln  
 50 55 60  
 60 Asp Arg Arg Lys Gln Glu Ile Ile Ala Pro Glu Lys Gln Val Leu  
 65 70 75  
 65 <210> 13  
 <211> 1005  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial



<220>  
 <223> Polinucleótido que codifica la proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV Asia Shamir)-E2 en pET30b (pPX237)

5 <400> 13  
 atggaaaatt atggtggtga aaccagacc gcacgtcgtc tgcataccga tgttgcatTT 60  
 attctggatc gttttgttaa actgaccgcc tataatggta aaaccgccta tggtgaaaca 120  
 10 accagccgtc gtggtgatat ggcagcactg gcacagcgtc tgagcgcacg tctgccgacc 180  
 agcaccaccc aggatcgtcg taaacaagaa attattgcac cggaaaaaca ggtgctgaag 240  
 15 cttgcagcag cagaagaaaa agcagcaccg gcagcagcaa aaccggcaac caccgaaggt 300  
 gaatttccgg aaaccgtga aaaaatgagc ggtattcgtc gtgcaattgc aaaagcaatg 360  
 gttcatagca aacataccgc accgcatgtt accctgatgg atgaagcaga tgttaccaaa 420  
 20 ctggttgccc accgcaaaaa attcaaagca attgcagcag agaaaggcat taaactgacc 480  
 tttctgccgt atgttggttaa agcactgggt agcgcactgc gtgaatatcc ggttctgaat 540  
 25 accagcattg atgatgaaac cgaagagatc atccagaaac actattacaa tattggcatt 600  
 gcagcagata ccgatcgtgg tctgctgggt ccggttatta aacatgcaga tcgtaaaccg 660  
 atttttgcac tggcccaaga aattaatgaa ctggcagaaa aagcacgtga tggtaaactg 720  
 30 acaccgggtg aaatgaaagg tgcaagctgt accattacaa atattggtag tgccgggtgg 780  
 cagtggttta caccggttat taatcatccg gaagttgcca ttctgggtat tggtcgtatt 840  
 35 gcagaaaaac cgattgttcg tgatggtgaa attggtgcag caccgatgct ggactgagc 900  
 ctgagctttg atcatcgtat gattgatggg gcaaccgcac agaaagcact gaatcatatt 960  
 aaacgtctgc tgagcgatcc ggaactgctg ctgatggaag catga 1005

40  
 <210> 14  
 <211> 334  
 <212> PRT  
 45 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV Asia Shamir)-E2 en pET30b (pPX237)

50 <400> 14  
 Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Thr Ala Arg Arg Leu His Thr  
 1 5 10 15  
 55 Asp Val Ala Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Leu Thr Ala Tyr Asn  
 20 25 30  
 60 Gly Lys Thr Ala Tyr Gly Glu Thr Thr Ser Arg Arg Gly Asp Met Ala  
 35 40 45  
 65 Ala Leu Ala Gln Arg Leu Ser Ala Arg Leu Pro Thr Ser Thr Thr Gln  
 50 55 60

# ES 2 899 230 T3

	Asp	Arg	Arg	Lys	Gln	Glu	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Lys	Gln	Val	Leu	Lys	65	70	75	80
5	Leu	Ala	Ala	Ala	Glu	Glu	Lys	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Lys	Pro	Ala	85	90	95	
10	Thr	Thr	Glu	Gly	Glu	Phe	Pro	Glu	Thr	Arg	Glu	Lys	Met	Ser	Gly	Ile	100	105	110	
15	Arg	Arg	Ala	Ile	Ala	Lys	Ala	Met	Val	His	Ser	Lys	His	Thr	Ala	Pro	115	120	125	
20	His	Val	Thr	Leu	Met	Asp	Glu	Ala	Asp	Val	Thr	Lys	Leu	Val	Ala	His	130	135	140	
25	Arg	Lys	Lys	Phe	Lys	Ala	Ile	Ala	Ala	Glu	Lys	Gly	Ile	Lys	Leu	Thr	145	150	155	160
30	Phe	Leu	Pro	Tyr	Val	Val	Lys	Ala	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Arg	Glu	Tyr	165	170	175	
35	Pro	Val	Leu	Asn	Thr	Ser	Ile	Asp	Asp	Glu	Thr	Glu	Glu	Ile	Ile	Gln	180	185	190	
40	Lys	His	Tyr	Tyr	Asn	Ile	Gly	Ile	Ala	Ala	Asp	Thr	Asp	Arg	Gly	Leu	195	200	205	
45	Leu	Val	Pro	Val	Ile	Lys	His	Ala	Asp	Arg	Lys	Pro	Ile	Phe	Ala	Leu	210	215	220	
50	Ala	Gln	Glu	Ile	Asn	Glu	Leu	Ala	Glu	Lys	Ala	Arg	Asp	Gly	Lys	Leu	225	230	235	240
55	Thr	Pro	Gly	Glu	Met	Lys	Gly	Ala	Ser	Cys	Thr	Ile	Thr	Asn	Ile	Gly	245	250	255	
60	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Trp	Phe	Thr	Pro	Val	Ile	Asn	His	Pro	Glu	Val	260	265	270	
65	Ala	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	Arg	Ile	Ala	Glu	Lys	Pro	Ile	Val	Arg	Asp	275	280	285	
	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Ala	Pro	Met	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Ser	Phe	Asp	290	295	300	
	His	Arg	Met	Ile	Asp	Gly	Ala	Thr	Ala	Gln	Lys	Ala	Leu	Asn	His	Ile	305	310	315	320
	Lys	Arg	Leu	Leu	Ser	Asp	Pro	Glu	Leu	Leu	Leu	Met	Glu	Ala			325	330		

<210> 15  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Enlazador de E2  
 <400> 15  
 10 Ala Ala Ala Glu Glu Lys Ala Ala Pro Ala Ala Ala Lys Pro Ala Thr  
 1 5 10 15  
 15 Thr Glu Gly Glu Phe Pro Glu Thr Arg Glu Lys Met Ser Gly Ile Arg  
 20 25 30  
 20 Arg Ala Ile Ala Lys Ala  
 35

## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un antígeno del FMDV, en la que el antígeno del FMDV es una proteína de fusión FMDV-E2, en la que E2 es dihidrolipoil acetiltransferasa de *Geobacillus stearothermophilus*, en la que la proteína de fusión FMDV-E2 tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO: 6.
2. Composición de la reivindicación 1, en la que el antígeno del FMDV es codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 5.
3. Composición de cualquier reivindicación anterior, que comprende además un portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.
4. Composición de la reivindicación 3, en la que el adyuvante comprende TS6.
5. Composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un procedimiento de vacunación de un huésped susceptible a la infección por el FMDV ovino, bovino, caprino o porcino, o para proteger o prevenir al huésped contra la infección por el FMDV, o para provocar una respuesta inmunitaria protectora en el huésped, que comprende al menos una administración de la composición al huésped.
6. Composición para su uso de la reivindicación 5, en la que el procedimiento comprende un régimen de administración de sensibilización-refuerzo.
7. Composición para su uso de la reivindicación 6, en la que dicha administración de sensibilización-refuerzo comprende una administración de sensibilización de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y una administración de refuerzo de una vacuna o composición que comprende un vector viral recombinante que contiene y expresa el antígeno del FMDV *in vivo*, o una vacuna viral inactivada que comprende el antígeno del FMDV, o una vacuna o composición de plásmido de ADN que contiene o expresa el antígeno del FMDV, o un antígeno del FMDV recombinante producido en plantas o algas.
8. Composición para su uso de la reivindicación 6, en la que el procedimiento comprende un régimen de administración de sensibilización-refuerzo, preferiblemente en el que la administración de sensibilización-refuerzo comprende una administración de sensibilización de una vacuna o composición que comprende un vector viral recombinante que contiene y expresa el antígeno del FMDV *in vivo*, o una vacuna viral inactivada que comprende el FMDV, o una vacuna o composición de plásmido de ADN que contiene o expresa el antígeno del FMDV, o un antígeno del FMDV recombinante producido en plantas o algas, y una administración de refuerzo de la composición de cualquiera de reivindicaciones 1-4.
9. Composición para su uso de la reivindicación 6, en la que el procedimiento comprende un régimen de administración de sensibilización-refuerzo, preferiblemente en el que la administración de sensibilización-refuerzo comprende una administración de sensibilización de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y una administración de refuerzo de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
10. Composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en la que el huésped es ovino, bovino, caprino o porcino.
11. Antígeno del FMDV, en el que el antígeno es una proteína de fusión FMDV-E2 que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO: 6, en la que E2 es dihidrolipoil acetiltransferasa de *Geobacillus stearothermophilus*.
12. Plásmido que comprende un polinucleótido que codifica un antígeno de fusión FMDV-E2 que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO: 6, en el que E2 es dihidrolipoil acetiltransferasa de *Geobacillus stearothermophilus*.
13. Plásmido de la reivindicación 12, en el que el polinucleótido tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia del polinucleótido indicada en SEQ ID NO: 5.
14. Célula huésped transformada con el plásmido de la reivindicación 12.

Figura 1

SEQ ID NO:	Tipo	Descripción del gen:
1	ADN	Polinucleótido que codifica antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV O1 Manisa
2	Proteína	Antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV O1 Manisa
3	ADN	Polinucleótido que codifica E2 de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
4	Proteína	E2 de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
5	ADN	Polinucleótido que codifica la proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de O1 Manisa de FMDV)-E2
6	Proteína	Proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de O1 Manisa de FMDV)-E2
7	ADN	Polinucleótido que codifica antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV A24
8	Proteína	Antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV A24
9	ADN	Polinucleótido que codifica la proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV A24)-E2
10	Proteína	Proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV A24)-E2
11	ADN	Polinucleótido que codifica antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV Asia Shamir
12	Proteína	Antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV Asia Shamir
13	ADN	Polinucleótido que codifica la proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV Asia Shamir)-E2
14	Proteína	Proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV Asia Shamir)-E2
15	Proteína	Enlazador de E2

Figura 2A

**Polinucleótido que codifica antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV O1 Manisa (SEQ ID NO: 1)**

atggaaaattatggtggtgaaaccaggttcagcgtcgtcagcataccgatgtagctt  
tattctggatcggtttgttaaagtgaccccgataatggcaatagcaaataatggtgatg  
gcaccggttgcaaagtgttcgtggtgatctgcaggttctggcacagaaagcagcacgtgca  
ctgccgaccagtcggatcaggcacgtcataaacagaaaattggtgcaccggttaaaca  
gctgctgtaa

**Antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV O1 Manisa (SEQ ID NO: 2) (81 aa)**

MENYGGETQVQRRQHTDVSFILDRFVKVTPYNGNSKYGDGTVANVRGDLQVLAQKAARA  
LPTS PDQARHKQKIVAPVKQLL

Epítipo T; Epítipo B1; Epítipo B2

**Secuencia de polinucleótidos para el enlazador y dominio catalítico C-terminal central de E2 de Geobacillus stearothermophilus (SEQ ID NO: 3)**

aagcttgcagcagcagaagaaaaagcagcaccggcagcagcaaaaccggcaaccaccga  
aggtgaatttccggaaccggtgaaaaaatgagcgggtattcgtcgtgcaattgcaaaag  
caatgggttcatagcaaacataccgcaccgcatgttaccctgatggatgaagcagatggt  
accaaactggttgcccaccgcaaaaaattcaaagcaattgcagcagagaaaggcattaa  
actgacctttctgccgtatggtgttaaagcactgggttagcgcactgctgaatatccgg  
ttctgaataaccagcattgatgatgaaaccgaagagatcatccagaaacactattacaat  
attggcattgcagcagataccgatcgtggtctgctgggttccggttattaacatgcaga  
tcgtaaaccgatttttgcactggcccaagaaattaatgaactggcagaaaaagcacgtg  
atggtaaactgacaccgggtgaaatgaaagggtgcaagctgtaccattacaaatattggt  
agtgcgggtggtcagtggtttacaccgggttattaatcatccggaagttgccattctggg  
tattggctgctattgcagaaaaaccgattgttcgtgatggtgaaattggtgcagcaccga  
tgctggcactgagcctgagctttgatcatcgtatgattgatggtgcaaccgcacagaaa  
gcactgaatcatattaaacgtctgctgagcgatccggaactgctgctgatggaagcatg  
a

**Secuencia de proteínas para el enlazador y dominio catalítico C-terminal central de E2 de Geobacillus stearothermophilus (SEQ ID NO: 4) (255 aa)**

KLAAAEKAAAPAAKPATTEGEFPE TREKMSGIRRAIAKAMVHSHKHTAPHVTLMDEADV  
TKLVAHRKKFKAIAAEKGIKLTFLPYVVKALVSALREYPVLNTSIDDETEEIIQKHYYN  
IGIAADTDRLLPVVIKHADRKPIFALAQEINELA EKARDGKLTPGEMKGASCTITNIG  
SAGGQWF T PVI NHPEVAILGIGRIA EKPIVRDGEIVAAPMLALSLSFDHRMIDGATAQK  
ALNHIKRLLSDP ELLMEA

residuos de clonación

**enlazador natural de E2**

**dominio catalítico C-terminal central de E2**

Figura 2B

**Polinucleótido que codifica la proteína de fusión FMDV-E2 (SEQ ID NO: 5)**

atggaaaattatggtggtgaaacccaggttcagcgtcgtcagcataccgatgttagctt  
tattctggatcggttttgttaaagtgaccccggtataatggcaatagcaaatatggtgatg  
gcaccggttgcaaatgttcgtggtgatctgcaggttctggcacagaaagcagcacgtgca  
ctgccgaccagtcaggatcaggcacgtcataaacagaaaattggttgaccggttaaaca  
gctgctgaagcttgagcagcagagaagaaaaagcagcacccggcagcagcaaaaccggcaa  
ccaccgaaggtgaatttcgggaaacccgtgaaaaaatgagcgggtattcgtcgtgcaatt  
gcaaaagcaatggttcataagcaaacataccgcaccgcatgttacctgatggatgaagc  
agatgttaccaaactggttgcccaccgcaaaaaattcaaagcaattgcagcagagaaaag  
gcattaaactgacctttctgccgtatgttggttaaagcactgggttagcgcactgctgaa  
tatccggttctgaataccagcattgatgatgaaaccgaagagatcatccagaaacacta  
ttacaatattggcattgcagcagataccgatcgtggtctgctggttccggttattaaac  
atgcagatcgtaaaccgatttttgcactggcccaagaaattaatgaactggcagaaaaa  
gcacgtgatggtaaactgacaccgggtgaaatgaaagggtgcaagctgtaccattacaaa  
tattggtagtgcgggtggtcagtggtttacaccggttattaatcatccggaagttgcc  
ttctgggtattggtcgtattgcagaaaaaccgattgttcgtgatgggtgaaattggtgca  
gcaccgatgctggcactgagcctgagccttgatcatcgtatgattgatgggtgcaaccgc  
acagaaagcactgaatcatattaaacgtctgctgagcgtatccggaactgctgctgatgg  
aagcatga

**Secuencia de proteína de la proteína de fusión FMDV-E2 (SEQ ID NO: 6) (336 aa)**

MENYGGETQVQRROHTDVSFILDRFVKVTPYNGNSKYGDGTVANVRGDLQVLAQKAARALPTSPDQ  
ARHKQKIVAPVKQLLKLAIAAEKAAAPAAKPATTEGEFPETREKMSGIRRAIAKAMVHSHKHTAP  
HVTLMDEADVTKLVHRKKFKIAIAAEKGIKLTFLPYVVKALVSALREYPVLNTSIDDETEEII  
OKHYYNIGIAADTDRLLPVVIKHADRKPIFALAEINELAEKARDGKLTGEMKSGASCTIT  
NIGSAGGQWFTPVINHPEVAILGIGRIAEKPIVRDGEIVAAPMLALSLSFDHRMIDGATAOKA  
LNHIKRLLSDPPELLLMEA

Epítipo T Epítipo B1 Epítipo B1 residuos de clonación enlazador natural de E2  
dominio catalítico C-terminal central de E2

**Polinucleótido que codifica el antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV A24 (SEQ ID NO: 8) en pET30b (pPX238)**

atggaaaattatggtggtgaaacccagattcagcgtcgtcatcataccgatattggctt  
tattatggatcgcttcgtgaaatccagagctataatggcaccagcaaatatgcagttg  
gtggttagcggtcgtcgtggtgatattgggtagcctggcagcacgtgttggttaaagcgtg  
cctgcaagcgttagcagccaggatcgtcataaacagaaaattatcgcaccgggcaaaaca  
actgctgtga

**Antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV A24 (SEQ ID NO: 8) en pET30b (pPX238) 81 aa**

MENYGGETQIQRRHHTDIGFIMDRFVKIQSYNGTSKYAVGGSGRRGDMGSLAARVVKQLPASVSS  
QDRHKQKI IAPAKQLL

Figura 2C

**Polinucleótido que codifica la proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV A24)-E2 (SEQ ID NO: 9) en pET30b (pPX236)**

atggaaaattatggtggtgaaacccagattcagcgtcgtcatcataccgatattggctt  
tattatggatcgcttcgtgaaaatccagagctataatggcaccagcaaatatgcagttg  
gtggtagcggctcgtcgtggtgatattgggtagcctggcagcacgtgttgtaaacagctg  
cctgcaagcgttagcagccaggatcgtcataaacagaaaattatcgcaccggcaaaaaca  
actgctgaagcttgcagcagcagaagaaaaagcagcaccggcagcagcaaaaaccggcaa  
ccaccgaagggtgaatttccggaaacccgtgaaaaaatgagcgggtattcgtcgtgcaatt  
gcaaaaagcaattggttcatagcaaacataaccgcaccgcatgttaccctgatggatgaagc  
agatgtttaccaaactggttgccaccgcaaaaaattcaaagcaattgcagcagagaaag  
gcattaaactgacctttctgccgtatgtttgttaaagcactggttagcgcactgcgtgaa  
tatccgggttctgaataaccagcattgatgatgaaacgaagagatcatccagaaacacta  
ttacaatatattggcattgcagcagataccgatcgtggttctgctggttccgggttattaaac  
atgcagatcgtaaacccgatttttgcactggcccaagaaattaatgaactggcagaaaaa  
gcacgtgatggtaaacctgacaccgggtgaaatgaaagggtgcaagctgtaccattacaaa  
tattggttagtgccgggtggtcagtggtttacaccgggttattaatcatccggaagttgcc  
ttctgggtattggtcgtattgcagaaaaaccgattgttcgtgatgggtgaaattgttgca  
gcaccgatgctggcactgagcctgagctttgatcatcgtatgattgatgggtgcaaccgc  
acagaaagcactgaatcataattaaacgtctgctgagcgtatccggaactgctgctgatgg  
aagcatga

Polinucleótido de FMDV A24 Residuos de clonación **E2**

**Proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV A24)-E2 (SEQ ID NO: 10) en pET30b (pPX236) (336 aa)**

MENYGGETQIQRRHHTDIGFIMDRFVKIQSYNGTSKYAVGGSGRRGDMGSLAARVVKQLPASVSS  
QDRHKQKI IAPAKQLLKLAAAEKAAPAAAKPATTEGEFPETREKMSGIRRAIAKAMVHSHKHTAP  
HVTLMDEADVTKLVHRKKFKAI AAEKGIKLTFLPYVVKALVSALREYPVLNTSIDDETEEI IQK  
HYYNIGIAADTDRLLPVVIKHADRKPI FALAQEINELAEKARDGKLTPEGEMKGASCTITNIGSA  
GGQWFTPVINHPEVAILGIGRIAEKPIVRDGEIVAAPMLALSLSFDHRMIDGATAQKALNHIKRL  
LSDPELLLMEA

**Polinucleótido que codifica antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV Asia Shamir (SEQ ID NO: 11) en pET30b (pPX239)**

atggaaaattatggtggtgaaacccagacccgcacgtcgtctgcataccgatgttgcaatt  
tattctggatcgcttttgttaaactgaccgcctataatggtaaaaccgcctatgggtgaaa  
caaccagccgctcgtggtgatattggcagcactggcacagcgtctgagcgcacgtctgccg  
accagcaccaccaggatcgtcgttaaacaagaaattattgcaccggaaaaaacaggtgct  
gtga



IFigura 2D

**Antígeno de FMDV sintético correspondiente a VP1 de la cepa de FMDV Asia Shamir (SEQ ID NO: 12) en pET30b (pPX239) (79 aa)**

MENYGGETQTARRLHTDVAFILDRFVKLTAYNGKTAYGETTSRRGDMAALAQRLSARLPTSTTQD  
RRKQEIIAPEKQVL

**Polinucleótido que codifica la proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV Asia Shamir)-E2 (SEQ ID NO: 13) en pET30b (pPX237)**

atggaaaattatggtggtgaaaccagaccgcacgtcgtctgcataccgatgttgcaatt  
tattctggatcgttttgttaaactgaccgcctataatggtaaaaccgcctatggtgaaa  
caaccagccgctcgtggtgatatggcagcactggcacagcgtctgagcgcacgtctgccg  
accagcaccaccaggatcgctgtaaacagaattattgcaccggaaaaacaggtgct  
gaagccttgcagcagcagaagaaaaagcagcaccggcagcagcaaaaccggcaaccaccg  
aaggtgaatttccggaaaccggtgaaaaaatgagcggtaattcgtcgtgcaattgcaaaa  
gcaatggttcatagcaaacataccgcaccgcatgttaccctgatggatgaagcagatgt  
taccaaaactggttggccaccgcaaaaaattcaaagcaattgcagcagagaaaggcatta  
aactgacctttctgccgtatgttgttaaagcactggttagcgcactgctggaataccg  
gttctgaataccagcattgatgatgaaaccgaagagatcatccagaaacactattacaa  
tattggcattgcagcagataccgatcgtggtctgctggttccggttattaaacatgcag  
atcgtaaaccgatttttgcactggcccaagaaattaatgaactggcagaaaaagcacgt  
gatggtaaaactgacaccgggtgaaatgaaagggtgcaagctgtaccattacaaatattgg  
tagtgccggtggtcagtggtttacaccggttattaatcatccggaagtggcattctgg  
gtattggtcgtattgcagaaaaaccgattgttcgtgatgggtgaaattgttgcagcaccg  
atgctggcactgagcctgagctttgatcatcgtatgattgatgggtgcaaccgcacagaa  
agcactgaaatcataattaaacgtctgctgagcgaatccggaactgctgctgatggaagcat  
ga

Polinucleótido de FMDV Asia Shamir Residuos de clonación E2

**Proteína de fusión FMDV (VP1 sintética de la cepa de FMDV Asia Shamir)-E2 (SEQ ID NO: 14) en pET30b (pPX237) (334 aa)**

MENYGGETQTARRLHTDVAFILDRFVKLTAYNGKTAYGETTSRRGDMAALAQRLSARLPTSTTQDRRKQEIIA  
PEKQVLKLAEEKAAPAAAKPATTEGEFPETREKMSGIRRAIAKAMVHSKHTAPHVTLMDADVTKLVAHR  
KKFKAIAAEKGKLTFLPYVVKALVSALREYPVLNTSIDDETEEIIQKHYYNIGIAADTDRLVLPVIKHADRKPIFA  
LAQEINELA EKARDGKLTGEMKGASCTITNIGSAGGQWFTPVINHPEVAILGIGRIAEKPIVRDGEIVAAPML  
ALSLSFDHRMIDGATAQKALNHKRLSDPELLLMEA

**Enlazador de E2 (SEQ ID NO: 15)**

AAAEKKAAPAAAKPATTEGEFPETREKMSGIRRAIAKA

Figura 2E

	1		50
SEQ ID NO:12	(1)	MENYGGETQTAPPLHTDVAFIIDREFVKLTAYNGKTAYGETTSR--FGUMA	
SEQ ID NO:2	(1)	MENYGGETQVQPPQHTDVSEIIDREFVKVTPYNGNSKYGDGTVANVFGLIQ	
SEQ ID NO:8	(1)	MENYGGETQIQPFHHTDIGEIMLREFVKIQSYNGTSKYAVGGSEGR-FGDMG	
	51		82
SEQ ID NO:12	(49)	ALAQRLSARLPST-TQNRKQEIITAPEKQVL	
SEQ ID NO:2	(51)	VLAQKAARALPTSP-DQARHKQKIIVAPVKQLL	
SEQ ID NO:8	(50)	SLAARVVKQLPASVSSQDRHKQKLIAPAKQLL	

Identidad de secuencia:

SEQ ID NO:12 v. SEQ ID NO:2	63%
SEQ ID NO:12 v. SEQ ID NO:8	61%
SEQ ID NO:2 v. SEQ ID NO:8	62%

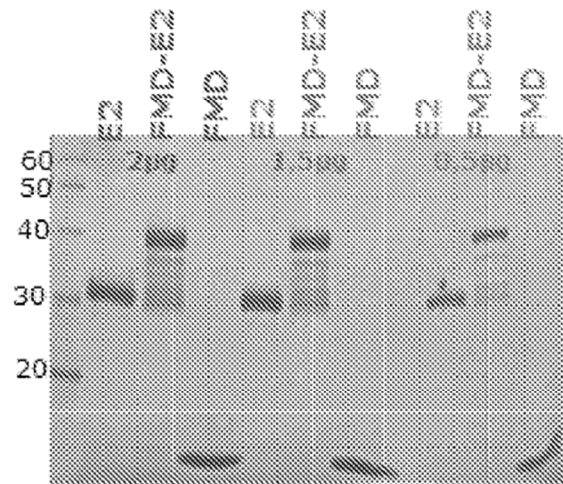
Figura 2F

		1		50
SEQ ID NO:10	(1)	MENYGGGETQIQPFHNTDIGFIMURFVKIQSYNGTSK/AVGGG-EPGDMG		
SEQ ID NO:14	(1)	MENYGGGETQTAPFLNTDVAFLIDREFVKLTAYNGKTA/GETTS--EPGUMA		
SEQ ID NO:6	(1)	MENYGGGETQVQPPQHTDVSFLLIDREFVKVTPYNGNSKYGDSTVANVAGDLQ		
		51		100
SEQ ID NO:10	(50)	SLAARVVKQLPACVSSQDRHKQKIIPAKQILKLAAAEKKAAPAAAKPAT		
SEQ ID NO:14	(49)	ALAQRLSARLPSTTT-QDRRKQEIIPAEKQVLKLAAAEKKAAPAAAKPAT		
SEQ ID NO:6	(51)	VLAQKAAALPTSPP-QARHKQKIVAPVKQILKLAAAEKKAAPAAAKPAT		
		101		150
SEQ ID NO:10	(100)	TEGEFFPETREKMSGIRRAIAKAMVHESKHTAPHVTIMDEADVTKLVAHRKK		
SEQ ID NO:14	(98)	TEGEFFPETREKMSGIRRAIAKAMVHESKHTAPHVTIMDEADVTKLVAHRKK		
SEQ ID NO:6	(100)	TEGEFFPETREKMSGIRRAIAKAMVHESKHTAPHVTIMDEADVTKLVAHRKK		
		151		200
SEQ ID NO:10	(150)	FKAIAAEKGIKLTFLFYVVKALVSALREYPVLNTSIDDETEELIQKHYYN		
SEQ ID NO:14	(148)	FKAIAAEKGIKLTFLFYVVKALVSALREYPVLNTSIDDETEELIQKHYYN		
SEQ ID NO:6	(150)	FKAIAAEKGIKLTFLFYVVKALVSALREYPVLNTSIDDETEELIQKHYYN		
		201		250
SEQ ID NO:10	(200)	IGIAADTDGRLLVPVVIKHADPKPIFALAQEINELA EKARDGKLTTPGEMKG		
SEQ ID NO:14	(198)	IGIAADTDGRLLVPVVIKHADPKPIFALAQEINELA EKARDGKLTTPGEMKG		
SEQ ID NO:6	(200)	IGIAADTDGRLLVPVVIKHADPKPIFALAQEINELA EKARDGKLTTPGEMKG		
		251		300
SEQ ID NO:10	(250)	ASCTITNIGSAGGQWFTFVINHPEVAILGIGPIAEKPIVPDGEIVAAPML		
SEQ ID NO:14	(248)	ASCTITNIGSAGGQWFTFVINHPEVAILGIGPIAEKPIVPDGEIVAAPML		
SEQ ID NO:6	(250)	ASCTITNIGSAGGQWFTFVINHPEVAILGIGPIAEKPIVPDGEIVAAPML		
		301		337
SEQ ID NO:10	(300)	ALSLSFDHRMIDGATAQKALNNHKRLLSDPELLMEA		
SEQ ID NO:14	(298)	ALSLSFDHRMIDGATAQKALNNHKRLLSDPELLMEA		
SEQ ID NO:6	(300)	ALSLSFDHRMIDGATAQKALNNHKRLLSDPELLMEA		

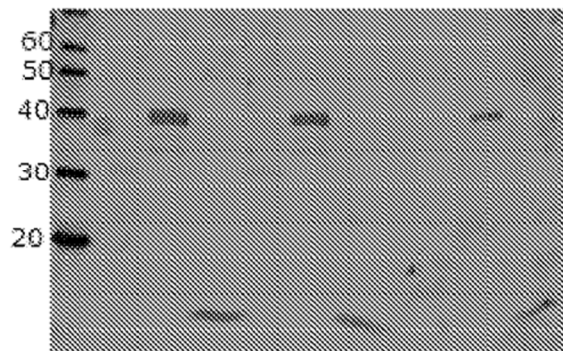
## Identidad de secuencia:

SEQ ID NO:6 v. SEQ ID NO:10	91%
SEQ ID NO:6 v. SEQ ID NO:14	91%
SEQ ID NO:10 v. SEQ ID NO:14	91%

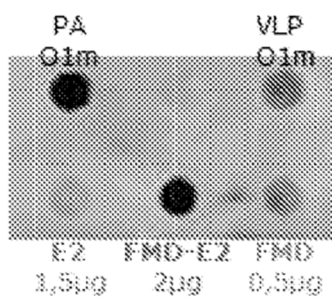
Figura 3  
Transferencia Western



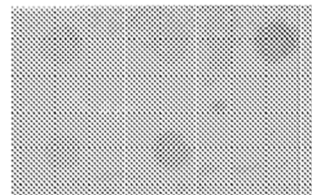
Tinción Coomassie con  
tinte seguro de Simply  
Blue



Transferencia Western con  
suero porcino vacunado en  
D56



Suero porcino  
vacunado en D56



Suero porcino  
no vacunado

Transf. puntos

Figura 4A-4C  
Producción de partículas de E2 y FMDV-E2

FIG.4A Partículas de proteína E2

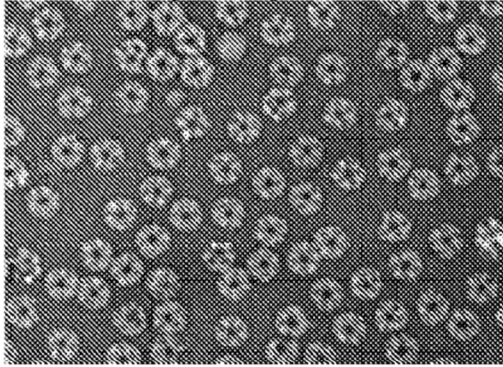


FIG.4B Partículas de proteína de fusión FMDV-E2

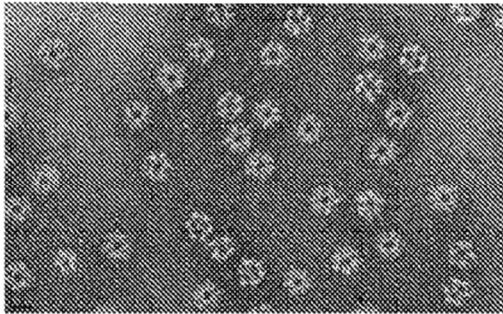


FIG. 4C: Mezcla de proporción 2:1 de "proteína E2 sola" + "proteína de fusión E2-FMDV" = proteína cdE2-FMDV

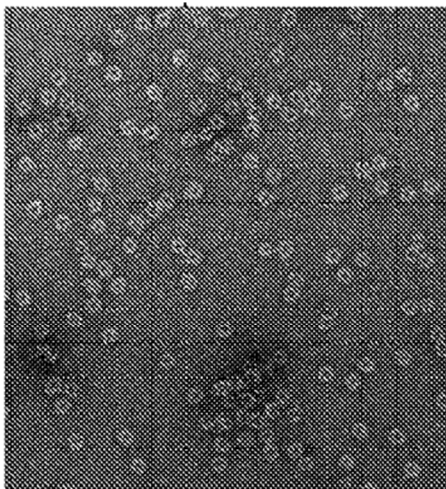


Figura 5

ELISA indirecto de partículas de E2-FMDV

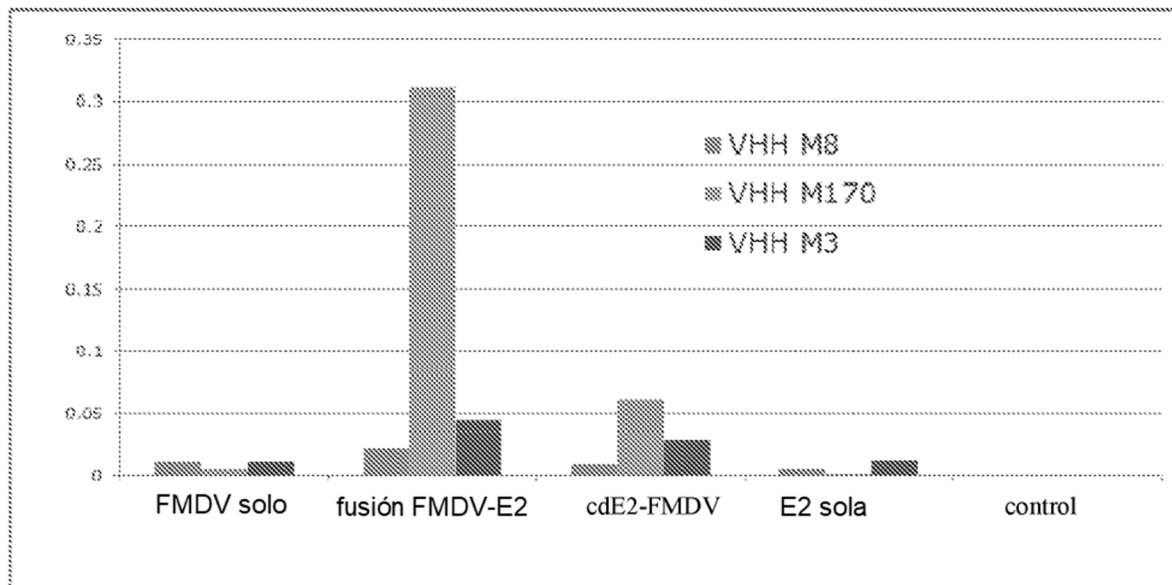


Figura 6

Resultados de células plasmáticas en D27 de vacunas O1M

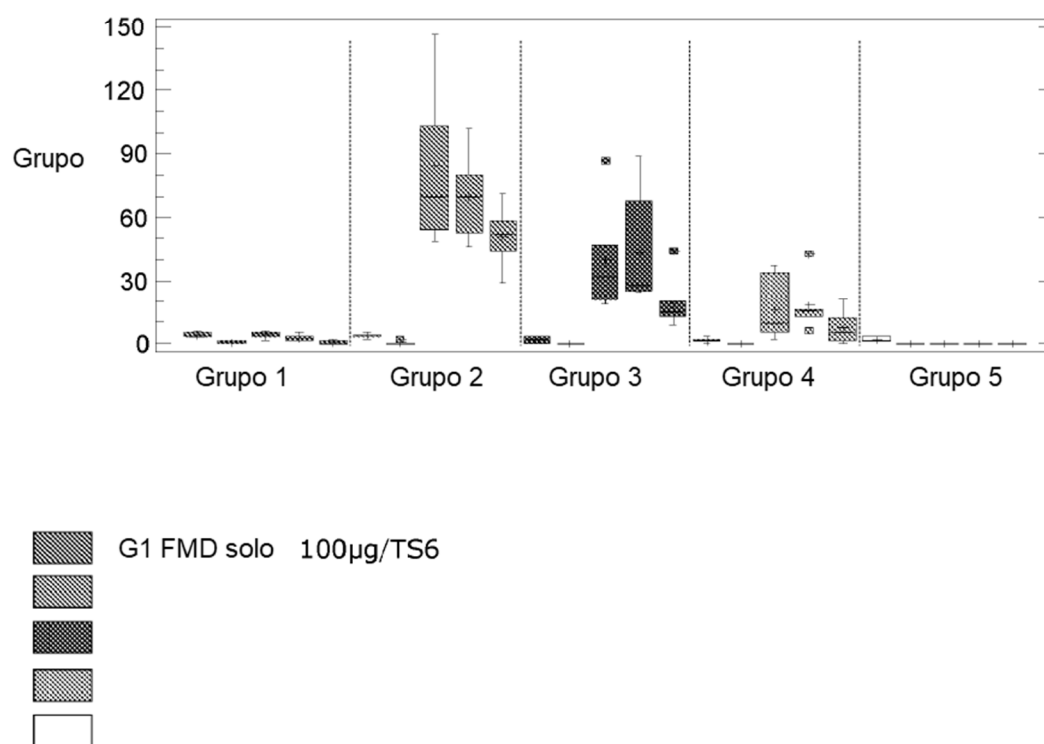


Figura 7

Resultados de células plasmáticas en D27 de vacunas con O1M

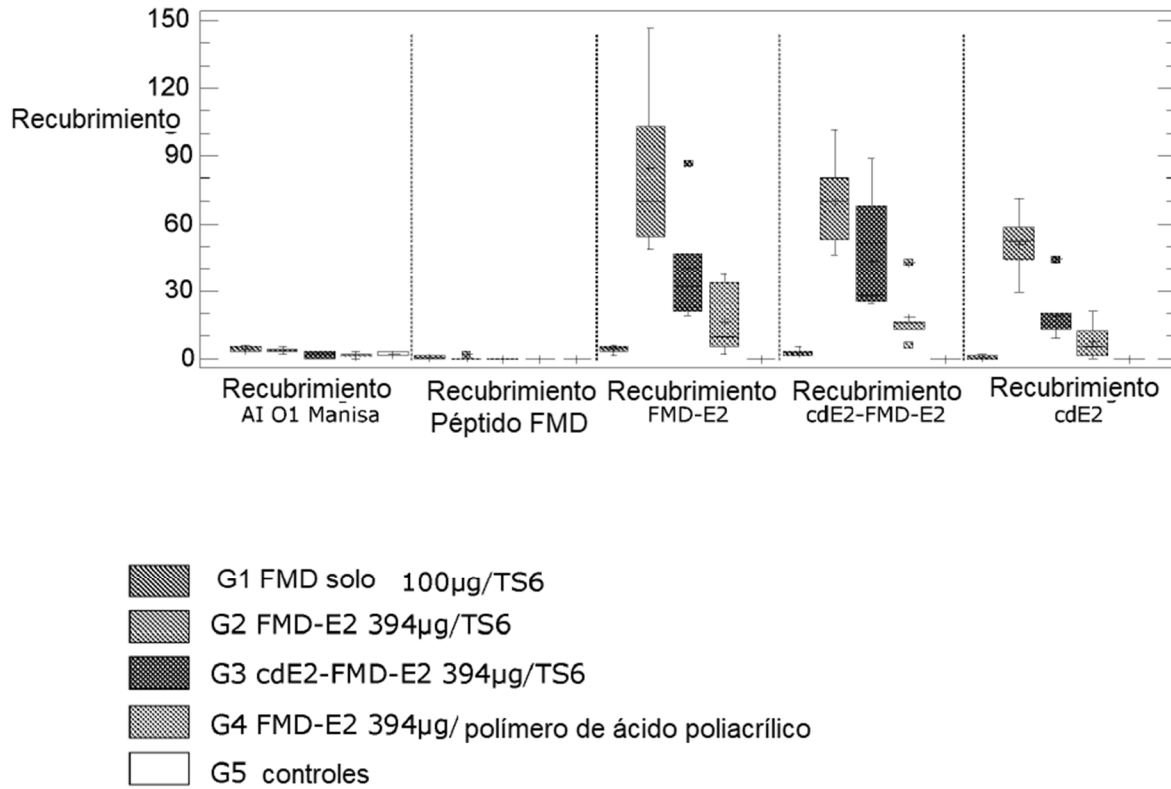




Figura 8

ELISPOT IFNgamma en D27 de vacuna con O1M

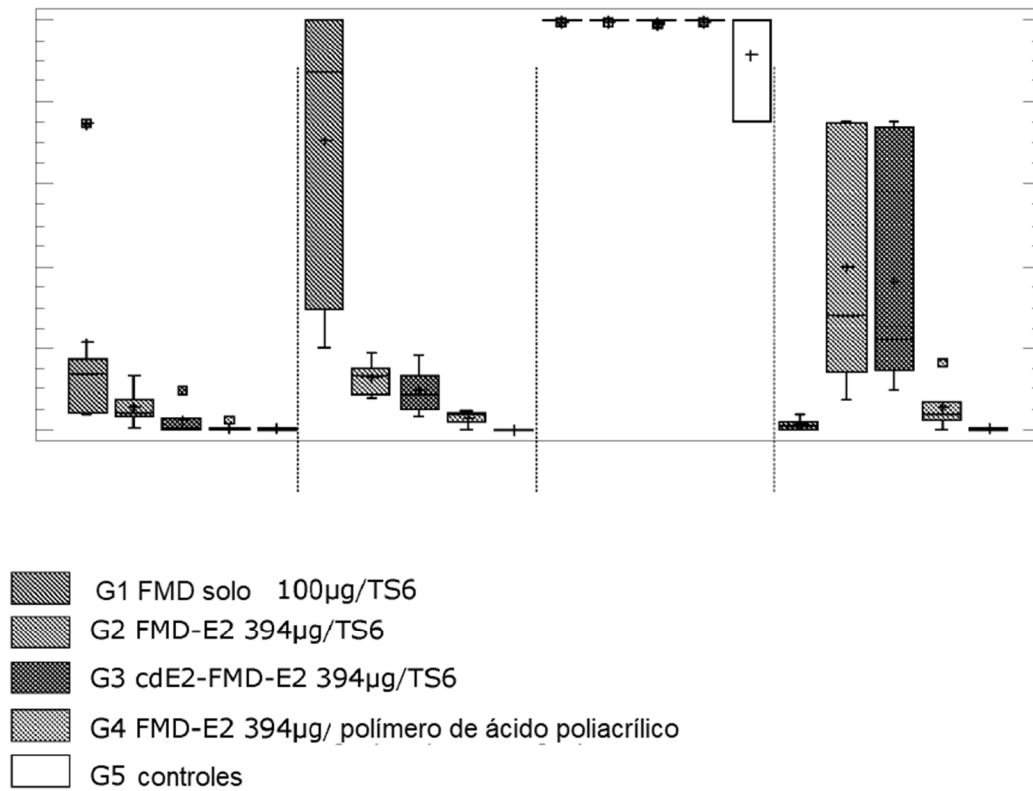


Figura 9

ELISPOT de IFNgamma en D42 de vacuna con O1M

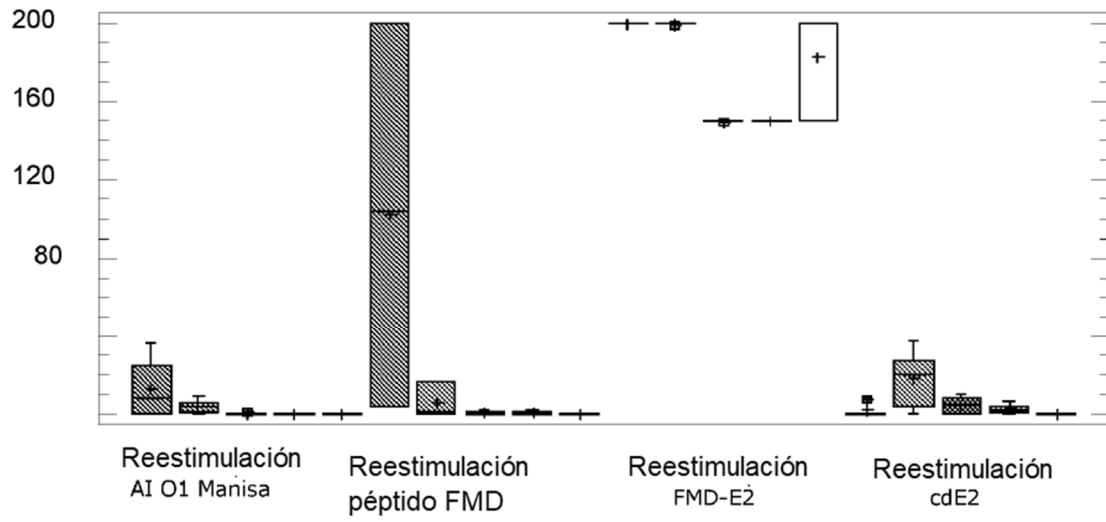


Figura 10

Resultados de células B de memoria en D42

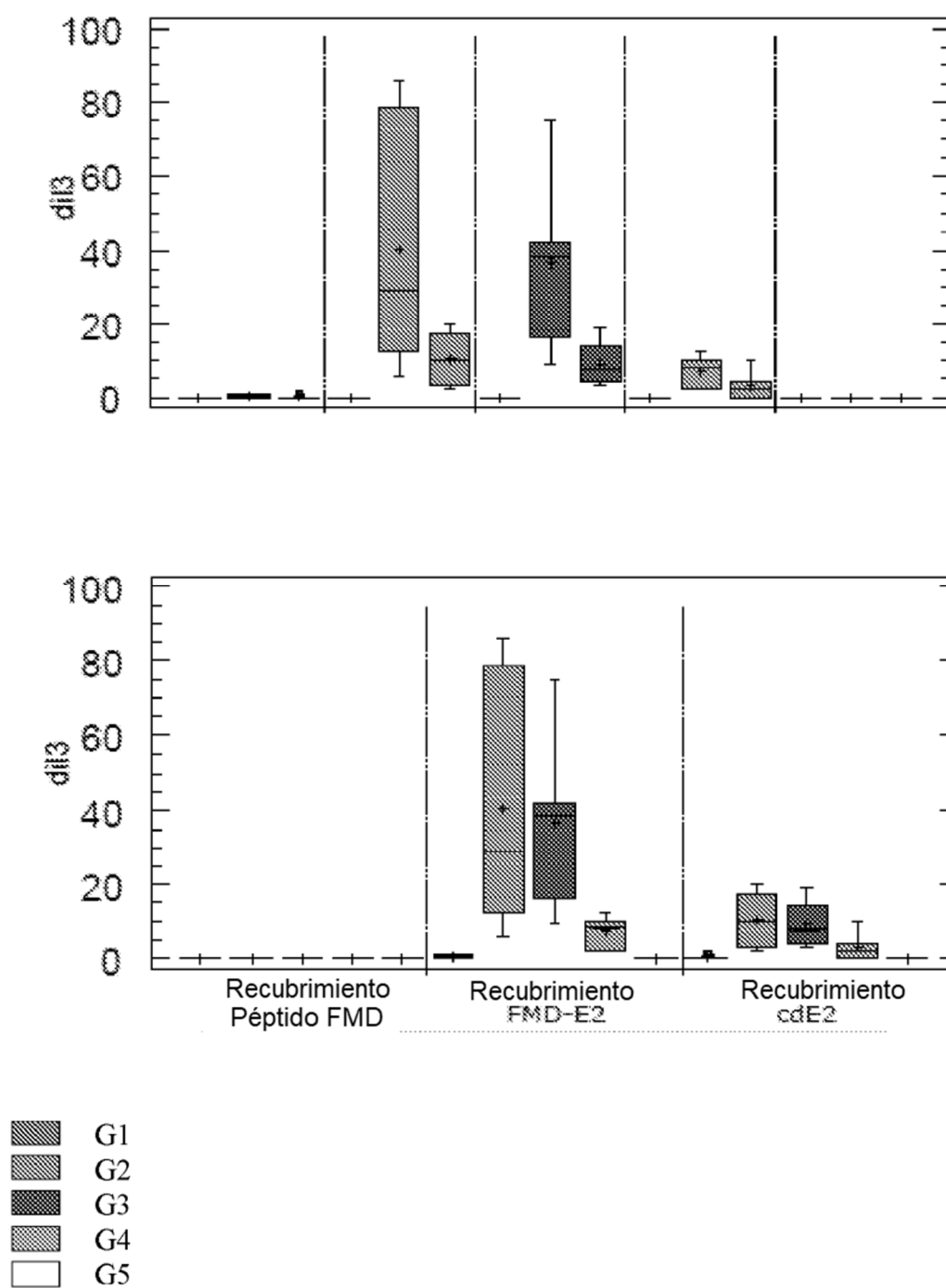


Figura 11

