

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 903**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/125 (2006.01)

A61K 39/135 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014** **PCT/US2014/030809**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14145951**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014** **E 14765406 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 2968519**

54 Título: **Proteínas de consenso del virus de la Fiebre Aftosa (VFA), secuencias codificantes y vacunas preparadas a partir de las mismas**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361794197 P

15.03.2013 US 201361802225 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2021

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (50.0%)**

3160 Chestnut Street Suite 200

Philadelphia, PA 19104, US y

INOVIO PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

WEINER, DAVID B.;

MUTHUMANI, KARUPPIAH;

YAN, JIAN y

SARDESAI, NIRANJAN Y.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 817 903 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 consenso del virus de la Fiebre Aftosa (VFA), secuencias codificantes y vacunas preparadas a partir de las mismas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos codificantes de proteínas inmunogénicas de consenso sintéticas del virus de la fiebre aftosa (VFA), a vacunas contra el VFA, a vacunas para la utilización en métodos de inducción de respuestas inmunitarias contra el VFA, a vacunas para la utilización en métodos para distinguir entre individuos infectados por VFA frente a los vacunados contra el VFA y vacunas para la utilización en métodos de inmunización profiláctica y/o terapéutica de individuos frente al VFA.

Antecedentes de la invención

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad altamente contagiosa de animales domésticos y biungulados salvajes, incluyendo vacas, cerdos, cabras y ciervos, que se replica rápidamente en el huésped y se extiende a animales susceptibles en contacto. La enfermedad se caracteriza por fiebre, cojera y lesiones vesiculares en lengua, patas, hocico y pezones que resultan en una elevada morbilidad, aunque baja mortalidad, en animales adultos. La infección del VFA induce una enfermedad vesicular aguda en vacas, búfalos, ovejas, cabras y cerdos, que puede desarrollarse en infección persistente (a excepción de los cerdos). El VFA puede infectar muchas otras especies de mamífero, incluyendo antílopes, elefantes y erizos, entre otros. Se cree que el huésped natural original del VFA podría ser el búfalo africano, ya que: i) resulta infectado persistentemente, y ii) la enfermedad se observa raramente.

El agente causante de la FA es el virus de la fiebre aftosa (VFA), un virus ARNcs de grupo IV (+) del género *Aphthovirus*, de la familia *Picornaviridae*. El VFA presenta siete serotipos principales: O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1. Estos serotipos están regionalmente restringidos, siendo el serotipo O el más común globalmente. El genoma de ARN de sentido positivo de cadena sencilla del VFA es de aproximadamente 8500 bases, circundado por una cápside icosaédrica con 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales, VP1-VP4. Las proteínas víricas son antigénicamente muy variables dentro de los varios subtipos, incluyendo A, Asia 1, O, C, SAT1, SAT2 y SAT3.

La FA resulta económicamente devastadora y la infección del ganado biungulado puede resultar en pérdidas significativas. Los brotes recientes han resultado en pérdidas de miles de millones de dólares. Se han producido brotes recientemente en varios países anteriormente libres de la enfermedad, incluyendo Taiwan en 1997, el Reino Unido y los Países Bajos en 2001 y el surgimiento en varios países sudamericanos ha despertado la conciencia de la importancia de este virus económicamente destructivo. Además, hay una preocupación global de un posible ataque terrorista económico que utilice el VFA con diana en países con grandes industrias ganaderas, tal como la industria ganadera de los Estados Unidos, con 100.000 millones de dólares/año.

Entre las medidas anteriores para controlar el VFA se incluyen el sacrificio de los animales infectados o en contacto y la descontaminación. Los países que han sacrificado su ganado debido a un brote de VFA sólo pueden reiniciar las actividades ganaderas si presentan un estado libre de VFA durante 3 meses desde el último brote. Los países habitualmente la vacunación de los animales para tratar un brote de VFA como último recurso, debido a que los países que han vacunado y no han sacrificado los animales, deben esperar un año entero para obtener nuevamente el estado de libre de VFA. Sin embargo, los países están buscando de vacunar sus animales antes de ningún brote de VFA para poder conservar su estado de libre de VFA.

En el pasado, las vacunas de VFA incluían antígeno de virus completo inactivado químicamente junto con un adyuvante; sin embargo, existen desventajas a ello, ya que requiere caras instalaciones de fabricación de alta contención para producir la vacuna. Durante los últimos 25 a 30 años, los investigadores han estado intentando desarrollar una vacuna que proporcione protección tras una única inoculación. Entre estos esfuerzos se incluyen la utilización de VP1 purificado a partir de partículas víricas, VP1 de bioingeniería, péptidos VP1, péptidos VP1 de síntesis química, vectores vivos que expresan epítopos de VP1, la inoculación con ADN codificante de epítopos de VP1 y la utilización de proteína VP1-VP4 de cápside completa producida a partir de cultivos infectados por VFA o la administración de la cápside VP1-VP4 mediante un vector adenovirus tipo 5 (Ad5) humano de replicación defectuosa. La totalidad de dichos enfoques presentan sólo un número limitado de epítopos de todos los subtipos de virus VFA en el animal inoculado.

De acuerdo con lo anterior, existe una necesidad en la técnica de una vacuna y métodos de diagnóstico de mamíferos infectados por el VFA que resulten adecuados para proporcionar protección frente a una pluralidad de epítopos del VFA de los diversos subtipos de VFA.

Nagarajan, et al. Indian J. Virol. 22: 50, 2011, dan a conocer una vacuna génica autorreplicante portadora del gen PI-2A del VFA de serotipo O y sus efectos sobre las respuestas inmunitarias de bovinos.

Fowler et al., Antiviral Research, volumen 94, número 1, abril 2012, páginas 25 a 34 dan a conocer un régimen de vacunación de ADN que incluye refuerzo proteico y electroporación que protege a los bovinos frente a la enfermedad de la fiebre aftosa.

Li et al., Vaccine, volumen 26, número 21, 19 de mayo de 2008, páginas 2647 a 2656 dan a conocer una mejora en la eficacia de la vacuna de ADN del VFA e inducción de anticuerpos de diferentes serotipos en cerdos tras un refuerzo proteico

Robertson et al., Journal of Virology 54.3: 651-660, 1985, dan a conocer secuencias de nucleótidos y aminoácidos para polipéptidos del virus de la fiebre aftosa de tipo A12. Subramanian et al., Antiviral Research 96.3: 288-295, 2012, da a conocer el desarrollo de partículas de tipo vírico (PTV) de virus de la fiebre aftosa (VFA) de serotipo O. Ramanathan et al., Vaccine 27.32:4370-4380, 2009 dan a conocer que la coinmunización con un adyuvante de plásmido de IL15 optimizado potencia la inmunidad humoral mediante la estimulación de células B inducidas por vacunas de ADN genéticamente manipulado que expresa JEV de consenso y WNV E DIII.

Los documentos nº US 2012/282217 y nº WO 2011/054011 dan a conocer un ácido nucleico que comprende una secuencia de aminoácidos de consenso de proteínas de cubierta VP1-4 del VFA de la enfermedad de la fiebre aftosa; el documento nº WO 2013/019603 da a conocer casetes de expresión de ácidos nucleicos lineales y métodos de utilización de los mismos en un método de vacunación no invasivo.

Descripción resumida de la invención

La invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 9 y SEC ID nº 11.

La invención proporciona además un plásmido que comprende una molécula de ácidos nucleicos de la invención.

La invención proporciona además una vacuna que comprende uno o más plásmidos de la invención.

La invención proporciona además vacunas de la invención para la utilización en un método de generación de una respuesta inmunitaria contra el VFA en un individuo.

La invención proporciona además vacunas de la invención para la utilización en un método de prevención de la infección por el VFA en un individuo.

La invención proporciona además vacunas de la invención para la utilización en un método de tratamiento de un individuo que ha sido infectado por el VFA.

Se da a conocer una molécula de ácidos nucleicos que comprende secuencias codificantes de la proteína vírica VP4 unida en su extremo C-terminal a un sitio de corte de proteasa unido en su extremo C-terminal a la proteína vírica VP2 unida en su extremo C-terminal a un sitio de corte de proteasa unido en su extremo C-terminal a la proteína vírica VP3 unida en su extremo C-terminal a un sitio de corte de proteasa unido a la proteína vírica VP1 en su extremo C-terminal a un sitio de corte de proteasa unido a la proteína vírica 2A. La molécula de ácidos nucleicos puede comprender además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia líder en el extremo 5' de la secuencia codificante de la proteína vírica VP4. En algunas realizaciones, la secuencia codificante de la proteína vírica VP4 se omite. En algunas realizaciones, la secuencia codificante de la proteína vírica 2A se omite. En algunas realizaciones, la secuencia codificante que codifica la secuencia líder N-terminal se omite. En algunas realizaciones, la secuencia codificante que codifica la secuencia líder N-terminal es una secuencia líder de Ig, tal como una secuencia líder de IgG o IgE. En algunas realizaciones, el sitio de corte es reconocido por la furina.

Se proporcionan plásmidos que comprenden moléculas de ácidos nucleicos, incluyendo plásmidos en los que las proteínas víricas proceden de un subtipo de VFA seleccionado del grupo que consiste en A, Asia1, C, O, SAT1, SAT2 y SAT3. Se proporciona la vacuna que comprende cuatro plásmidos, en la que las proteínas víricas codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos son de cada subtipo de VFA del grupo que consiste en A, Asia1, C y O. En algunas realizaciones, se proporcionan además vacunas que comprenden siete plásmidos, en las que las proteínas víricas codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos de cada subtipo de VFA del grupo que consiste en A, Asia1, C, O, SAT1, SAT2 y SAT3. En algunas realizaciones, se proporcionan vacunas que comprenden menos de siete, es decir, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis plásmidos, en las que las proteínas víricas están codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos de los subtipos de VFA seleccionados del grupo que consiste en A, Asia1, C, O, SAT1, SAT2 y SAT3.

Se da a conocer en la presente memoria una molécula de ácidos nucleicos que comprende secuencias codificantes de la proteína vírica VP4 unida en su extremo C-terminal a secuencias codificantes de un sitio de corte de proteasa unido en su extremo C-terminal a secuencias codificantes de la proteína vírica VP2 unidas en su extremo C-terminal a secuencias codificantes de un sitio de corte de proteasa unido en su extremo C-terminal a secuencias codificantes de la proteína vírica VP3 unidas en su extremo C-terminal a secuencias codificantes de un sitio de corte de proteasa unido en su extremo a secuencias codificantes de la proteína vírica VP1 unida en su extremo C-terminal a secuencias codificantes de la proteína vírica 2A, denominada versiones largas o "larga". En la presente memoria se da a conocer una molécula de ácidos nucleicos que comprende secuencias codificantes de la proteína vírica VP2 unida en su extremo C-terminal a secuencias codificantes de un sitio de corte de proteasa unido en su extremo C-terminal a secuencias codificantes de la proteína vírica VP3 unido en su extremo C-terminal a secuencias codificantes de un sitio de corte de proteasa unido a secuencias codificantes de la proteína vírica VP1 unida en su extremo C-terminal a

secuencias codificantes de la proteína vírica 2A, denominada versiones cortas o “corta”. En las versiones tanto larga como corta, las secuencias codificantes del sitio de corte de proteasa que está unido al extremo 3' de la secuencia codificante de la proteína vírica VP1 y la secuencia codificante de la proteína vírica 2A pueden omitirse. En las versiones tanto larga como corta, la secuencia codificante de una secuencia líder N-terminal está unida al extremo N-terminal de la secuencia codificante de la proteína vírica VP4 en el caso de la versión larga y la secuencia codificante de la proteína vírica VP2 en el caso de la secuencia larga. El líder N-terminal es preferentemente un líder de Ig, tal como una secuencia de señal de IgG o de IgE. En algunas realizaciones, el sitio de corte es reconocido por la furina.

En algunas realizaciones, se proporcionan plásmidos que comprende las moléculas de ácidos nucleicos, incluyendo plásmidos en los que las proteínas víricas son de un subtipo de VFA seleccionado del grupo que consiste en A, Asia1, C, O, SAT1, SAT2 y SAT3. En algunas realizaciones, se proporciona una vacuna que comprende cuatro plásmidos, en la que las proteínas víricas codificadas por la secuencia de ácidos nucleicos son de cada subtipo de VFA del grupo que consiste en A, Asia1, C y O. En algunas realizaciones, se proporcionan además vacunas que comprenden siete plásmidos, en las que las proteínas víricas codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos de cada subtipo de VFA del grupo que consiste en A, Asia1, C, O, SAT1, SAT2 y SAT3.

Se dan a conocer métodos para generar una respuesta inmunitaria contra el VFA en un individuo mediante la administración en el mismo de las vacunas dadas a conocer.

Se dan a conocer métodos de prevención de la infección por el VFA en un individuo, mediante la administración en el individuo de una de las vacunas dadas a conocer.

En la presente memoria se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos de consenso de por lo menos VP1-VP3, y preferentemente, VP1-VP4 del virus de la fiebre aftosa, que induce una respuesta inmunitaria de reactividad cruzada en un sujeto vacunado contra múltiples subtipos de VFA, incluyendo A, Asia1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 y SAT4. El ácido nucleico puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (a) un constructo derivado de VFA-A24cruzeiro que comprende una secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 1 codificante de VP4-VP2-VP3-VP1 (larga) tal como se indica en SEC ID nº 2; (b) un constructo derivado de VFA-A24cruzeiro que comprende una secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 3 codificante de VP2-VP3-VP1 (corta) tal como se indica en SEC ID nº 4; (c) un constructo derivado de VFA-As1-Shamir89 que comprende una secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 5 codificante de VP4-VP2-VP3-VP1 (larga) tal como se indica en SEC ID nº 6; (d) un constructo derivado de VFA-As1-Shamir89 que comprende una secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 7 codificante de VP2-VP3-VP1 (corta) tal como se indica en SEC ID nº 8; (e) un constructo derivado de VFA-SAT2 que comprende una secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 9 codificante de VP4-VP2-VP3-VP1 (larga) tal como se indica en SEC ID nº 10; (f) un constructo derivado de VFA-SAT2 que comprende una secuencia de nucleótidos indicada en SEC ID nº 11 codificante de VP2-VP3-VP1 (corta) tal como se indica en SEC ID nº 12.

En la presente memoria se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos tales como las seleccionadas del grupo que consiste en: a) un VFA-A24cruzeiro derivado de una secuencia de nucleótidos modificada, tal como la indicada en SEC ID nº 1 (VFA-A24cruzeiro-larga) insertada en un plásmido, tal como pVAX que presenta la secuencia indicada en SEC ID nº 13, b) una secuencia de nucleótidos modificada derivada de VFA-A24cruzeiro tal como la indicada en SEC ID nº 3 (FMDV-A24cruzeiro-corta) insertada en un plásmido, tal como pVAX que presenta la secuencia indicada en SEC ID nº 14; c) una secuencia de nucleótidos modificada derivada de VFA-As1-Shamir89, tal como la indicada en SEC ID nº 5 (FMDV-As1-Shamir89-larga) insertada en un plásmido, tal como pVAX que presenta la secuencia indicada en SEC ID nº 15, y d) una secuencia de nucleótidos modificada derivada de VFA-As1-Shamir89, tal como la indicada en SEC ID nº 7 (FMDV-As1-Shamir89-larga) insertada en un plásmido, tal como pVAX que presenta la secuencia indicada en SEC ID nº 16.

Las moléculas de ácidos nucleicos en las composiciones pueden comprender las secuencias de ácidos nucleicos siguientes, y/o fragmentos de los mismos, y/o secuencias homólogas de las secuencias, y/o fragmentos de dichas secuencias homólogas, siendo las secuencias de ácidos nucleicos: a) una secuencia de ácidos nucleicos derivada de VFA-As1-Shamir89 que codifica VP4, tal como la indicada en la SEC ID nº 17; b) una secuencia de ácidos nucleicos derivada de VFA-A24cruzeiro que codifica VP4, tal como la indicada en SEC ID nº 18; c) una secuencia de ácidos nucleicos derivada de VFA-As1-Shamir89 que codifica VP2, tal como la indicada en SEC ID nº 19; d) una secuencia de ácidos nucleicos derivada de VFA-A24cruzeiro que codifica VP2, tal como la indicada en SEC ID nº 20; e) una secuencia de ácidos nucleicos derivada de VFA-As1-Shamir89 que codifica 2A, tal como la indicada en SEC ID nº 21; f) una secuencia de ácidos nucleicos derivada de VFA-A24cruzeiro que codifica 2A, tal como la indicada en SEC ID nº 22; g) una secuencia de ácidos nucleicos derivada de VFA-As1-Shamir89 que codifica VP3, tal como la indicada en SEC ID nº 23; h) una secuencia de ácidos nucleicos derivada de VFA-A24cruzeiro que codifica VP3, tal como la indicada en SEC ID nº 24; i) una secuencia de ácidos nucleicos derivada de VFA-As1-Shamir89 que codifica VP1, tal como la indicada en SEC ID nº 25; j) una secuencia de ácidos nucleicos derivada de VFA-A24cruzeiro que codifica VP1, tal como la indicada en SEC ID nº 26.

La secuencia de aminoácidos del sitio de corte reconocido por la proteasa furina es la secuencia indicada en SEC ID nº 27.

En algunas realizaciones, los constructos pueden incluir una secuencia codificante de consenso C3 (SEC ID nº 28) que codifica una proteína de consenso de proteasa C3 (SEC ID nº 29).

5 Se proporciona además en la presente memoria una vacuna capaz de generar en un mamífero una respuesta inmunitaria contra una pluralidad de subtipos de virus de la fiebre aftosa (VFA), en los que la vacuna comprende un plásmido de ADN que comprende un promotor operablemente ligado a una secuencia codificante que codifica un antígeno del VFA de consenso que comprende las proteínas de cápside VP1-VP4 de uno o más subtipos de VFA y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que el plásmido de ADN es capaz de expresar el antígeno de VFA
10 de consenso en una célula del mamífero en una cantidad eficaz para inducir una amplia respuesta inmunitaria de reactividad cruzada en el mamífero. La vacuna puede generar una respuesta inmunitaria contra el VFA de subtipos A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 o combinaciones de los mismos.

15 En la presente memoria se proporciona además una vacuna capaz de generar en un mamífero una respuesta inmunitaria contra una pluralidad de subtipos del virus de la fiebre aftosa (VFA), en el que la vacuna comprende uno o más plásmidos de ADN que comprenden un promotor operablemente ligado a una secuencia codificante que codifican un antígeno de VFA de consenso que comprende las proteínas de cápside VP1-VP4 de uno o más subtipos de VFA seleccionados del grupo que consiste en los subtipos A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 o una combinación de los mismos y un excipiente farmacéuticamente aceptable de los mismos, en el que los plásmidos de ADN son
20 capaces de expresar un antígeno de VFA de consenso en una célula del mamífero en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero. La vacuna puede administrarse en un mamífero, tal como un cerdo, rumiante, ser humano o primate. La vacuna puede inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero, tal como una respuesta humoral, celular o ambas: una respuesta humoral y una respuesta celular.

25 En la presente memoria se proporciona además una vacuna capaz de generar en un mamífero una respuesta inmunitaria contra una pluralidad de subtipos de VFA, en la que la vacuna comprende un antígeno que comprende una o más secuencias de aminoácidos de consenso codificantes de las proteínas de cápside VP1-VP4 del virus de la fiebre aftosa (VFA) subtipos A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2 o SAT3 y un excipiente farmacéuticamente aceptable de los mismos. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en
30 IL-2 e IL-15. El excipiente farmacéuticamente aceptable de la vacuna puede ser un agente facilitador de la transfección. El agente facilitador de la transfección puede ser un polianión, policación o un lípido, tal como poli-L-glutamato, a una concentración inferior a 6 mg/ml. La vacuna puede administrarse en un mamífero, tal como un cerdo, rumiante, ser humano o primate. La vacuna puede inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero, tal como una respuesta humoral, celular o ambas: una respuesta humoral y una respuesta celular.

35 En la presente memoria se proporciona además un método para inducir una respuesta inmunitaria contra una pluralidad de subtipos de virus VFA en un mamífero, que comprende administrar la vacuna de plásmido de ADN indicada en la presente memoria en el tejido del mamífero y electroporar células del tejido con un pulso de energía a una corriente constante eficaz para permitir la entrada del plásmido de ADN en las células. La administración de las
40 vacunas de plásmido de ADN indicadas en la presente memoria puede llevarse a cabo mediante un método que puede comprender inyectar la vacuna de plásmido de ADN en el tejido intradérmico, subcutáneo o muscular. El plásmido de ADN del método puede administrarse prefijando la corriente y el pulso de energía a una corriente constante que equivalente a la presente corriente. La etapa de electroporación del método puede comprender además medir la impedancia en las células electroporadas, ajustando el nivel de energía del pulso de energía respecto a la impedancia
45 medida para mantener una corriente constante en las células electroporadas, en el que la etapa de medición y ajuste se produce dentro del tiempo de vida del pulso energético. La etapa de electroporación puede comprender además la administración del pulso energético en una pluralidad de electrodos según un patrón de secuencia de los pulsos que administra el pulso energético en un patrón descentralizado.

50 Se da a conocer además un método e diagnóstico de mamíferos infectados por el VFA, en el que el método comprende aislar una muestra de líquido a partir del mamífero, aislar anticuerpos a partir de la muestra de líquido del mamífero y comparar los anticuerpos aislados con un mamífero de control en el que se ha inoculado la vacuna indicada en la presente memoria, en el que el mamífero de control sólo presenta anticuerpos contra las proteínas VP1-VP4 del VFA y el mamífero infectado por VFA presenta anticuerpos contra las proteínas VP1-VP4 del VFA y proteínas no
55 estructurales del VFA. Las proteínas no estructurales pueden ser las polimerasas 2C, 3A y 3D del VFA.

Se dan a conocer métodos de inducir una respuesta inmunitaria contra uno o más subtipos del virus VFA en un mamífero. Los métodos comprenden utilizar una vacuna dada a conocer en la presente memoria y, en algunas realizaciones, incluyen las etapas de administración de una molécula de ácidos nucleicos codificantes de una proteína
60 con secuencia inmunogénica del VFA en el tejido del mamífero, y electroporar las células del tejido con un pulso energético a una corriente constante eficaz para permitir la entrada del plásmido de ADN en las células.

Se da a conocer además un método de diagnóstico de un mamífero infectado por el VFA en un mamífero infectado según los procedimientos dados a conocer en la presente memoria. Los métodos comprenden aislar una muestra de
65 líquido a partir del mamífero vacunado y detectar la presencia de proteínas del VFA no incluidas en dicha vacuna y/o

anticuerpos contra proteínas del VFA no incluidas en dicha vacuna. La presencia de dichas proteínas y/o anticuerpos del VFA contra dichas proteínas del VFA indica que el mamífero vacunado ha sido infectado por el VFA.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una representación esquemática de un constructo de vacuna de ADN VFA-As1-Shamir-89 para el serotipo Asia 1 que indica que un inserto de As1 Shamir89 ha sido clonado en los sitios BamHI y Xho-1. El mapa plasmídico se basa en el plásmido pVAX. Pueden ser ejemplos del inserto de VFA-As1-Shamir, la forma larga, que se muestra en la figura 1, como pVFA-As1 Shamir-89-L, o la forma corta, que se muestra en la figura 1, como pVFA-As1 Shamir-89-S.

La figura 2 muestra un par de geles teñidos que muestran la clonación de As1-Shamir89-S (izquierda - SEC ID nº 7) y As1-Shamir89-L (derecha- SEC ID nº 5) y la secuencia de aminoácidos para FMDV-As1-Shamir89-L forma larga (SEC ID nº 6 es una secuencia de VFA-As1-Shamir89-L forma larga). La secuencia incluía la secuencia líder de IgE en el extremo N-terminal sombreada, los sitios de corte proteolítico en minúscula y las secuencias de VP4 en negrita entre el líder de IgE y el primer sitio de corte proteolítico. La secuencia de VP1 se muestra en negrita entre el tercer y cuarto sitios de corte proteolítico y la secuencia de 2a entre el cuarto (último) sitio de corte proteolítico y la parada.

La figura 3 muestra una representación esquemática de un constructo de vacuna de ADN VFA-A24cruzeiro que indica que un inserto de A24cruzeiro ha sido clonado en los sitios BamHI y Xho-1. El mapa plasmídico se basa en el plásmido pVAX. Pueden ser ejemplos del inserto de VFA-A24cruzeiro, la forma larga, que se muestra en la figura 3, como pVFA-A24cruzeiro-L, o la forma corta, que se muestra en la figura 3, como pVFA-A24cruzeiro-S.

La figura 4 muestra un par de geles teñidos que muestran la clonación de A24cruzeiro-S (izquierda - SEC ID nº 3) y A24cruzeiro-L (derecha- SEC ID nº 1) y la secuencia de aminoácidos para FMDV-A24cruzeiro-L forma larga (SEC ID nº 2 es una secuencia de VFA-A24cruzeiro-L forma larga). La secuencia incluía la secuencia líder de IgE en el extremo N-terminal sombreada, los sitios de corte proteolítico en minúscula y las secuencias de VP4 se muestra entre el líder de IgE y el primer sitio de corte proteolítico. La secuencia de VP1 muestra entre el tercer y cuarto sitios de corte proteolítico y la secuencia de 2a entre el último (cuarto) sitio de corte proteolítico y la parada.

La figura 5 muestra una representación esquemática de un constructo de vacuna de ADN VFA-Sat2, que indica que un inserto de Sat2 se clona en los sitios BamHI1 y Xho-1. El mapa plasmídico se basa en el plásmido pVAX. Pueden ser ejemplos del inserto de VFA-Sat la forma larga, que se muestra en la figura 4 como pVFA-As1-Sat2-L o la forma corta, que se muestra en la figura 5 como pVFA-Sat2-S.

La figura 6 muestra un par de geles teñidos que muestran la clonación de Sat2-S (izquierda - SEC ID nº 11) y Sat2-L (derecha- SEC ID nº 9) y la secuencia de aminoácidos para FMDV-Sat2-L forma larga (SEC ID nº 10 es una secuencia de VFA-Sat2-L forma larga). La secuencia incluía la secuencia líder de IgE en el extremo N-terminal sombreada, los sitios de corte proteolítico en minúscula y las secuencias de VP4 se muestra entre el líder de IgE y el primer sitio de corte proteolítico. La secuencia de VP1 muestra entre el tercer y cuarto sitios de corte proteolítico y la secuencia de 2a entre el último (cuarto) sitio de corte proteolítico y la parada.

La figura 7 muestra los resultados experimentales de expresión de proteínas.

La figura 8 muestra un protocolo experimental de experimentos de inmunización utilizando la electroporación para evaluar las respuestas inmunitarias tras la administración de: 1) pVAX, 2) FMDV-A24cruzeiro-L, 3) FMDV-A24cruzeiro-S, 4) FMDV-Shamir89-L, 5) FMDV-Shamir89-S, FMDV-Sat2-L, FMDV-Sat2-S frente a la no exposición.

La figura 9 muestra datos de las respuestas inmunitarias celulares inducidas por las vacunas de VFA-A24cruzeiro-L y VFA-A24cruzeiro-S.

La figura 10 muestra datos de las respuestas inmunitarias celulares inducidas por las vacunas de VFA-As1-Shamir89-L y VFA-As1-Shamir89-S.

La figura 11 muestra datos de las respuestas inmunitarias celulares inducidas por las vacunas de VFA-Sat2-L y VFA-Sat2-S.

La figura 12 muestra un protocolo experimental de transfección de ADN y preparación de lisados celulares para el análisis de ELISA.

La figura 13 muestra datos de inducción de anticuerpos en ratones inducidos por vacunas de VFA-A24cruzeiro-L y VFA-A24cruzeiro-S y por las vacunas VFA-As1-Shamir89-L y VFA-As1-Shamir89-S.

La figura 14 muestra datos del análisis de ELISA de la unión de proteínas utilizando lisados de proteínas preparados a partir de células transfectadas por VFA-A24cruzeiro-L y células transfectadas por VFA-As1-Shamir89-L.

La figura 15 muestra comparaciones de secuencias de aminoácidos entre las secuencias Shamir y Cruzeiro. Las secuencias de VP4 Shamir (SEC ID nº 17) se muestran en comparación con las secuencias de VP4 Cruzeiro (SEC ID nº 18); se muestran las secuencias de VP2 Shamir (SEC ID nº 19) en comparación con secuencias de VP2 Cruzeiro (SEC ID nº 20) y secuencias 2A Shamir (SEC ID nº 21) en comparación con 2A Cruzeiro (SEC ID nº 22).

La figura 16 muestra comparaciones de secuencias de aminoácidos entre las secuencias Shamir y Cruzeiro. Se muestran las secuencias de VP3 Shamir (SEC ID nº 23) en comparación con secuencias de VP3 Cruzeiro (SEC ID nº 24) y se muestran secuencias de VP1 Shamir (SEC ID nº 25) en comparación con secuencias de VP1 Cruzeiro (SEC ID nº 26).

La figura 17 muestra una representación esquemática de un constructo genérico de vacuna de ADN de VFA, que indica que un inserto de Sat2 se clona en los sitios BamHI1 y Xho-1. Un mapa plasmídico de la vacuna genérica de VFA se basa en el plásmido pVAX. Pueden ser ejemplos de los insertos de VFA la forma larga, que se muestra

en la figura 17 como inserto de forma larga, o la forma corta, que se muestra en la figura 7 como inserto de forma corta. El líder de IgE mostrado en cada forma se indica que es opcional o puede sustituirse con un líder diferente. La secuencia de 2A se indica como opcional y el sitio de corte de furina (rgrkrrs - SEC ID nº 27) se indica como sustituible.

Descripción detallada

Se han generado secuencias de aminoácidos de consenso para proteínas de fusión que comprende múltiples proteínas del VFA y proteínas del VFA individuales de diversos serotipos. También se han generado moléculas de ácidos nucleicos codificantes de las proteínas.

En un aspecto de la presente exposición, hay proteínas de fusión que comprenden las proteínas del VFA, VP1, VP2, VP3, VP4 y/o 2A y/o 3C y secuencias de ácidos nucleicos codificantes de dichas proteínas, que pueden generarse y utilizarse en una vacuna para proporcionar protección de los mamíferos frente a la enfermedad de la fiebre aftosa en uno o más subtipos del VFA, incluyendo A, Asia 1, O, C, SAT1, SAT2 y SAT3. Preferentemente, el gen de VP1 es un consenso para un subtipo seleccionado del VFA, p.ej., tal como se indica en la presente memoria es VFA-Sat2, en el que VP1 es una VP1 de consenso Sat2.

Aunque sin respaldo de ninguna teoría científica, una vacuna dirigida contra las secuencias de aminoácidos de consenso de VP1, VP2, VP3 y/o VP4 para uno o más subtipos del VFA presentará un gran repertorio de epítomos que resultarán eficaces para la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz (humoral, celular o ambos) contra una mayoría de las especies de cada subtipo de VFA. Aunque sin respaldo de ninguna teoría científica, VP1 es una excelente diana inmunogénica para una vacuna dirigida contra las secuencias de aminoácidos de consenso de VP1. VP1 es un inmunógeno predominante.

Entre los constructos de algunas realizaciones se incluyen una forma larga y una forma corta. Los constructos de algunas realizaciones proporcionan las proteínas víricas VP1, VP2, VP3 y VP4 en un orden específico. VP4 - VP2 - VP3 - VP1. Se proporciona además una cola opcional, 2A. Los constructos presentan una secuencia líder de IgE opcional. Al expresarse, se proporciona un sitio de corte proteolítico "SC" entre cada una de VP4, VP2, VP3 y VP1 y en caso de presencia de 2A. La proteasa que puede procesar el sitio puede ser furina en algunas realizaciones, o una proteasa del VFA en algunas realizaciones. Pueden utilizarse otros sitios de proteasa. El sitio debe ser reconocido por una proteasa observada comúnmente en células en la que se expresa la vacuna.

En un aspecto de la presente exposición, hay proteínas de fusión que comprenden las proteínas del VFA de consenso VP1, VP2, VP3, VP4 y/o 2A y/o 3C, y en un aspecto de la presente invención, se proporcionan secuencias de los ácidos nucleicos codificantes de dichas proteínas, que pueden generarse y utilizarse en una vacuna para proporcionar protección a mamíferos frente a la enfermedad de la fiebre aftosa en uno o más subtipos del VFA, incluyendo A, Asia 1, O, C, SAT1, SAT2 y SAT3.

En otro aspecto de la presente exposición, hay proteínas de fusión que comprenden la proteína del VFA de consenso VP1, y en un aspecto de la presente invención, se proporcionan las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de dicha proteína, de dos subtipos diferentes que pueden generarse y utilizarse en una vacuna para proporcionar protección a mamíferos frente a la enfermedad de la fiebre aftosa en uno o más subtipos del VFA, incluyendo A, Asia 1, O, C, SAT1, SAT2 y SAT3.

En otro aspecto de la presente exposición, hay proteínas del VFA de consenso VP1 y, en un aspecto de la presente invención, se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos codificantes de ellas que pueden generarse y utilizarse en una vacuna para proporcionar protección a mamíferos frente a la enfermedad de la fiebre aftosa en uno o más subtipos del VFA, incluyendo A, Asia 1, O, C, SAT1, SAT2 y SAT3.

1. Definiciones.

La terminología utilizada en la presente memoria presenta el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitativa. Tal como se utiliza en la especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas individuales "un", "una" y "el" o "la", incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Para la recitación de intervalos numéricos en la presente memoria, se encuentra explícitamente contemplado cada número comprendido entre los extremos de los intervalos con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo de 6 a 9, los números 7 y 8 se encuentran contemplados además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0-7,0, se encuentran explícitamente contemplados los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

a. Adyuvante

"Adyuvante" tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a cualquier molécula añadida a las vacunas de plásmido de ADN indicadas en la presente memoria para potenciar la antigenicidad del antígeno del virus de la

fiebre aftosa (VFA) codificado por los plásmidos de ADN y secuencias de ácidos nucleicos codificantes indicadas posteriormente en la presente memoria.

b. Anticuerpo

“Anticuerpo” puede significar un anticuerpo de las clases IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, o fragmentos, fragmentos o derivados de los mismos, incluyendo Fab, F(ab')₂, Fd y anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos bifuncionales y derivados de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo aislado a partir de la muestra de suero del mamífero, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo purificado por afinidad o mezclas de los mismos, que muestran suficiente especificidad de unión para un epítipo deseado o una secuencia derivada del mismo.

c. Secuencia codificante

“Secuencia codificante” o “ácido nucleico codificante” tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse al ácido nucleico (molécula de ARN o ADN) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificante puede incluir además señales de inicio y terminación operablemente ligadas a elementos reguladores, incluyendo un promotor y señal de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células de un individuo o mamífero en el que se administra el ácido nucleico.

d. Complemento

“Complemento” o “complementario” tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a un ácido nucleico, puede referirse a apareamiento de bases de Watson-Crick (p.ej., A-T/U y C-G) o de Hoogsteen entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de las moléculas de ácidos nucleicos.

e. Consenso o secuencia de consenso

“Consenso” o “secuencia de consenso” tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a una secuencia de ácidos nucleicos sintético o secuencia polipeptídica correspondiente, construida basándose en el análisis de una alineación de múltiples subtipos de un antígeno de influenza particular, que puede utilizarse para inducir una inmunidad amplia contra múltiples subtipos o serotipos de un antígeno de influenza particular. Entre los antígenos del VFA de consenso pueden incluirse secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de VP1, VP2, VP3, VP4 y proteasa C2. Además, pueden manipularse antígenos sintéticos, tales como proteínas de fusión, formando secuencias de consenso (o antígenos de consenso).

f. Corriente constante

“Corriente constante” tal como se utiliza en la presente memoria define una corriente que resulta recibida o experimentada por un tejido, o células que definen dicho tejido, a lo largo de la duración de un pulso eléctrico suministrado a dicho tejido. El pulso eléctrico se administra a partir del dispositivo de electroporación indicado en la presente memoria. Dicha corriente mantiene un amperaje constante en dicho tejido durante la vida del pulso eléctrico debido a que el dispositivo de electroporación dado a conocer en la presente memoria presenta un elemento de retroalimentación, preferentemente presenta una retroalimentación instantánea. El elemento de retroalimentación puede medir la resistencia del tejido (o células) durante toda la duración del pulso y causar que el dispositivo de electroporación altere su producción de energía eléctrica (p.ej., un voltaje incrementado), de manera que la corriente en el mismo tejido se mantiene constante durante todo el pulso eléctrico (del orden de microsegundos), y de pulso a pulso. En algunas realizaciones, el elemento de retroalimentación comprende un controlador.

g. Retroalimentación de corriente o retroalimentación

“Retroalimentación de corriente” o “retroalimentación” tal como se utiliza en la presente memoria puede utilizarse intercambiamente y puede significar la respuesta activa de los dispositivos de electroporación dados a conocer, que comprende medir la corriente en el tejido entre los electrodos y alterar la salida de energía administrada por el dispositivo de EP correspondientemente a fin de mantener la corriente en un nivel constante. Dicho nivel constante es prefijado por el usuario antes de iniciar una secuencia de pulsos o tratamiento eléctrico. La retroalimentación puede conseguirse con el componente de electroporación, p.ej., el controlador, del dispositivo de electroporación, ya que el circuito eléctrico en el mismo es capaz de monitorizar continuamente la corriente en el tejido entre los electrodos y comparar la corriente monitorizada (o corriente dentro del tejido) con una corriente prefijada y realizar continuamente ajustes de la salida energética a fin de mantener la corriente monitorizada en los niveles prefijados. El bucle de retroalimentación puede ser instantáneo, ya que es una retroalimentación de bucle cerrado analógica.

h. Corriente descentralizada

“Corriente descentralizada” tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse al patrón de corrientes eléctricas administradas a partir de las diversas matrices de electrodos de aguja de los dispositivos de electroporación indicados

en la presente memoria, en los que los patrones minimizan, o preferentemente eliminan, la incidencia de estrés térmico relacionado con la electroporación en cualquier zona de tejido sometido a electroporación.

i Electroporación

“Electroporación”, “electro-permeabilización” o “potenciación electrocinética” (“PE”) tal como se utilizan intercambiamente en la presente memoria pueden referirse a la utilización de un pulso de campo eléctrico transmembranal para inducir rutas microscópicas (poros) en una membrana biológica; su presencia permite que moléculas biológicas tales como plásmidos, oligonucleótidos, ARNip, fármacos, iones y agua pasen de una cara de la

j. Mecanismo de retroalimentación

“Mecanismo de retroalimentación” tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a un procedimiento llevado a cabo mediante software o hardware (o firmware), en el que se recibe y compara la impedancia del tejido deseado (antes, durante y/o después de la administración de un pulso de energía) con un valor actual, preferentemente de corriente, y ajusta el pulso de energía administrado para conseguir el valor prefijado. Puede utilizarse un mecanismo de retroalimentación mediante un circuito de bucle cerrado analógico.

k. Fragmento

“Fragmento” tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a una parte o a un ácido nucleico que codifica un polipéptido capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero sustancialmente similar al del no fragmento para por lo menos un subtipo de VFA, tal como A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2 o SAT3. Los fragmentos pueden comprender por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90% o por lo menos 95% de una proteína del VFA codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID nº 1, 3, 5, 7, 9 o 11. Los fragmentos de ADN pueden presentar una longitud de 30 o más nucleótidos, de 45 o más, de 60 o más, de 75 o más, de 90 o más, de 120 o más, de 150 o más, de 180 o más, de 210 o más, de 240 o más, de 270 o más, de 300 o más, de 360 o más, de 420 o más, de 480 o más, de 540 o más, de 600 o más, de 660 o más, de 720 o más, de 780 o más, de 840 o más, de 900 o más, de 960 o más, de 1020 o más, de 1080 o más, de 1140 o más, de 1200 o más, de 1260 o más, de 1320 o más, de 1380 o más, de 1440 o más, de 1500 o más, de 1560 o más, de 1620 o más, de 1680 o más, de 1740 o más, de 1800 o más, de 1860 o más, de 1820 o más, 1880 o más, 1940 o más, 2000 o más, 2600 o más, de 2700 o más, 2800 o más, 2900 o más, 2910 o más, de 2920 o más, de 2930 o más, de 2931 o más, de 2932 o más, de 2933 o más, de 2934 o más, de 2935 o más, de 2936 o más, de 2937 o más, o de 2938 o más.

Los fragmentos de ADN pueden comprender secuencias codificantes del líder de inmunoglobulina, tal como secuencias de IgE o IgG.

Los fragmentos de ADN pueden presentar menos de 10 nucleótidos, menos de 20, menos de 30, menos de 40, menos de 50, menos de 60, menos de 75, menos de 90, menos de 120, menos de 150, menos de 180, menos de 210, menos de 240, menos de 270, menos de 300, menos de 360, menos de 420, menos de 480, menos de 540, menos de 600, menos de 660, menos de 720, menos de 780, menos de 840, menos de 900, menos de 960, menos de 1020, menos de 1080, menos de 1140, menos de 1200, menos de 1260, menos de 1320, menos de 1380, menos de 1440, menos de 1500, menos de 1560, menos de 1620, menos de 1680, o menos de 1740 nucleótidos, menos de 1800, menos de 1860, menos de 1820, menos de 1880, menos de 1940, menos de 2000, menos de 2600, menos de 2700, menos de 2800, menos de 2900, menos de 2910, menos de 2920, menos de 2930, menos de 2931, menos de 2932, menos de 2933, menos de 2934, menos de 2935, menos de 2936, menos de 2937, o menos de 2938.

“Fragmento” también puede referirse a un fragmento polipeptídico que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero sustancialmente similar a la del no fragmento para como mínimo un subtipo de VFA, tal como A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2 o SAT3. El fragmento puede ser un fragmento polipeptídico seleccionado de por lo menos una de las diversas secuencias polipeptídicas de la presente exposición, incluyendo las SEC ID nº 2, 4, 6, 8, 10 o 12. El fragmento polipeptídico puede analizarse para entrar en contacto con por lo menos un epítipo antigénico tal como proporciona una base de datos disponible públicamente, tal como la base de datos de secuencias de VFA del Los Alamos National Laboratory. Los fragmentos de proteínas pueden comprender por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90% o por lo menos 95% de una proteína del VFA indicada en las poliproteínas mostradas en SEC ID nº 2, 4, 6, 8, 10 o 12. Los polipéptidos pueden comprender secuencias de aminoácidos del líder de inmunoglobulina, tal como IgE o IgG. Los fragmentos polipeptídicos pueden presentar una longitud de 30 o más aminoácidos, de 45 o más, de 60 o más, de 75 o más, de 90 o más, de 120 o más, de 150 o más, de 180 o más, de 210 o más, de 240 o más, de 270 o más, de 300 o más, de 360 o más, de 420 o más, de 480 o más, de 540 o más, de 600 o más, de 660 o más, o de 710 aminoácidos o más. Los fragmentos de polipéptido pueden presentar una longitud de menos de 10 aminoácidos, de menos de 20, de menos de 30, de menos de 40, de menos de 50, de menos de 60, de menos de 75, de menos de 90, de menos de 120, de menos de 150, de menos de 180, de menos de 210, de menos de 240, de menos de 270, de menos de 300, de menos de 360, de menos de 420, de menos de 480, de menos de 540, de menos

de 600, de menos de 660, de menos de 700, de menos de 701, de menos de 702, de menos de 703, de menos de 704, de menos de 705, de menos de 706, de menos de 707, de menos de 708, de menos de 709, o de menos de 710 aminoácidos.

5 1. Homología

Puede generarse homología de múltiples alineaciones de secuencias utilizando ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

10 m. Idéntico

“Idéntico” o “identidad” tal como se utiliza en la presente memoria en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, puede referirse a que las secuencias presentan un porcentaje especificado de residuos que son iguales a lo largo de una región especificada. El porcentaje puede calcularse mediante alineación óptima de las dos secuencias, comparando las dos secuencias a lo largo de la región especificada, determinando el número de posiciones en las que se encuentra un residuo idéntico en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la región específica y multiplicando el resultado por 100, que rinde el porcentaje de identidad de secuencias. En los casos en que dos secuencias son de longitud diferente o la alineación produce uno o más extremos escalonados y la región especificada de comparación incluye únicamente una sola secuencia, los residuos de la secuencia única se incluyen en el denominador, aunque no en el denominador del cálculo. Al comparar ADN y ARN, la timina (T) y el uracilo (U) pueden considerarse equivalentes. La identidad puede calcularse manualmente o mediante la utilización de un algoritmo de secuenciación informático, tal como BLAST o BLAST 2.0.

25 n. Impedancia

“Impedancia” tal como se utiliza en la presente memoria puede utilizarse al comentar el mecanismo de retroalimentación y puede convertirse en el valor actual según la ley de Ohm, permitiendo de esta manera comparaciones con la corriente prefijada.

30 o. Respuesta inmunitaria

“Respuesta inmunitaria” tal como se utiliza en la presente memoria puede significar la activación del sistema inmunitario del huésped, p.ej., de un mamífero, en respuesta a la introducción de un antígeno de consenso del VFA mediante las vacunas de plásmido de ADN proporcionadas. La respuesta inmunitaria puede ser en forma de una respuesta celular o humoral, o ambas.

p. Ácido nucleico

“Ácido nucleico” u “oligonucleótido” o “polinucleótido” tal como se utiliza en la presente memoria puede significar por lo menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. La ilustración de una sola cadena también define la secuencia de la cadena complementaria. De esta manera, un ácido nucleico también comprende la cadena complementaria de una cadena sencilla ilustrada. Pueden utilizarse muchas variantes de un ácido nucleico con el mismo fin como ácido nucleico dado. De esta manera, un ácido nucleico comprende además ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y complementos de los mismos. Una cadena sencilla proporciona una sonda que puede hibridarse con una secuencia diana bajo condiciones de hibridación restrictivas. De esta manera, un ácido nucleico comprende además una sonda que se hibrida bajo condiciones de hibridación restrictivas.

Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena, o pueden contener partes de secuencia de doble cadena y de cadena sencilla. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, en el que el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, y combinaciones de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Pueden obtenerse ácidos nucleicos mediante métodos de síntesis química o mediante métodos recombinantes.

Un ácido nucleico generalmente contiene enlaces fosfodiéster, aunque pueden incluirse análogos de ácidos nucleicos que pueden presentar por lo menos un enlace diferente, p.ej., enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato o O-metilfosforamidita y esqueletos y enlaces de ácido péptido-nucleico. Entre otros ácidos nucleicos análogos se incluyen aquellos con esqueletos positivos, esqueletos no iónicos y esqueletos no de ribosa, incluyendo los indicados en la patente US nº 5.235.033 y nº 5.034.506. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más nucleótidos no naturales o modificados también se encuentran incluidos en la definición de ácidos nucleicos. El análogo de nucleótido modificado puede estar situado, por ejemplo, en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la molécula de ácidos nucleicos. Pueden seleccionarse ejemplos representativos de análogos de nucleótidos a partir de ribonucleótidos de sacárido o esqueleto modificado. Sin embargo, debe indicarse que también resultan adecuados ribonucleótidos de nucleobase modificada, es decir, ribonucleótidos, que contienen una nucleobase no natural en lugar de una nucleobase natural, tal como uridinas o citidinas modificadas en la posición 5, p.ej., 5-(2-amino)propil-uridina, 5-bromo-uridina; adenosinas

y guanosinas modificadas en la posición 8, p.ej., 8-bromo-guanosina; nucleótidos deaza, p.ej., 7-deaza-adenosina, nucleótidos O- y N-alquilados, p.ej., N-6-metil-adenosina. El grupo 2'-OH puede sustituirse por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en el que R es alquilo C₁-C₆, alqueno o alquino, y halo es F, Cl, Br o I. Entre los nucleótidos modificados se incluyen además nucleótidos conjugados con colesterol mediante, p.ej., un enlace hidroxiprolinol, tal como se indica en Krutzfeldt et al., Nature (oct. 30, 2005), Soutschek et al., Nature 432:173-178, 2004 y la publicación de patente US nº 20050107325. Los nucleótidos y ácidos nucleicos modificados también pueden incluir ácidos nucleicos bloqueados (ANB), tal como se indica en la patente US nº 2002/0115080. Se describen nucleótidos y ácidos nucleicos modificados adicionales en la publicación de patente US nº 2005/0182005. Pueden llevarse a cabo modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato por una diversidad de motivos, p.ej., para incrementar la estabilidad y semivida de dichas moléculas en medios fisiológicos, para potenciar la difusión a través de las membranas celulares o como sondas en un biochip. Pueden prepararse mezclas de ácidos nucleicos naturales y análogos; alternativamente, pueden prepararse mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos y mezclas de ácidos nucleicos naturales y análogos.

q. Operablemente ligado

"Operablemente ligado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que la expresión de un gen se encuentra bajo el control de un promotor con el que se encuentra conectado espacialmente. Un promotor puede estar situado 5' (cadena arriba) o 3' (cadena abajo) de un gen bajo su control. La distancia entre el promotor y un gen puede ser aproximadamente igual a la distancia entre dicho promotor y el gen que controla en el gen a partir del cual se deriva el promotor. Tal como es conocido de la técnica, la variación en dicha distancia puede incluirse sin pérdida de función del promotor.

r. Promotor

"Promotor" tal como se utiliza en la presente memoria puede significar una molécula sintética o de origen natural que es capaz de conferir, activar o potenciar la expresión de un ácido nucleico en una célula. Un promotor puede comprender una o más secuencias reguladoras de la transcripción específicas para potenciar adicionalmente la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal del mismo. Un promotor puede comprender además elementos potenciadores o represores distales, que pueden estar situados hasta a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor puede derivarse de fuentes víricas, bacterianas, fúngicas, vegetales, de insecto y de animales. Un promotor puede regular la expresión de un componente génico constitutivamente, o diferencialmente con respecto a la célula, el tejido u órgano en el que se produce la expresión o con respecto a la etapa de desarrollo en la que se produce la expresión, o en respuesta a estímulos externos, tales como tensiones fisiológicas, patógenos, iones metálicos o agentes inductores. Entre los ejemplos representativos de promotores se incluyen el promotor del bacteriófago T7, el promotor del bacteriófago T3, el promotor SP6, el promotor del operador lac, el promotor tac, el promotor tardío de SV40, el promotor temprano de SV40, el promotor RSV-LTR, el promotor IE del CMV, el promotor temprano de SV40 o el promotor tardío de SV40 y el promotor IE del CMV.

s. Condiciones de hibridación restrictiva

"Condiciones de hibridación restrictivas" tal como se utiliza en la presente memoria puede significar condiciones bajo las que una primera secuencia de ácidos nucleicos (p.ej., una sonda) se hibridará con una segunda secuencia de ácidos nucleicos (p.ej., una diana), tal como en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia y serán diferentes bajo diferentes circunstancias. Las condiciones restrictivas pueden seleccionarse de manera que sean aproximadamente 5°C a 10°C más bajas que el punto de fusión térmica (T_f) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T_f puede ser la temperatura (bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (debido a que las secuencias diana se encuentran presentes en exceso, a T_f, el 50% de las sondas se encuentran ocupadas en el equilibrio). Las condiciones restrictivas pueden ser aquellas en las que la concentración salina es inferior a aproximadamente 1,0 M de ion sodio, tal como entre aproximadamente 0,01 y 1,0 M de concentración de ion sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es por lo menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (p.ej., aproximadamente 10 a 50 nucleótidos) y por lo menos aproximadamente 60°C para sondas largas (p.ej., de más de aproximadamente 50 nucleótidos). También pueden conseguirse condiciones restrictivas con la adición de agentes desestabilizadores, tales como la formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser por lo menos 2 a 10 veces la hibridación de fondo. Entre las condiciones ejemplares de hibridación restrictiva se incluyen las siguientes: Formamida al 50%, 5x SSC y SDS al 1%, incubando a 42°C, o 5x SSC, SDS al 1%, incubando a 65°C con un lavado en 0,2x SSC y SDS al 0,1% a 65°C.

t. Sustancialmente complementario

"Sustancialmente complementario" tal como se utiliza en la presente memoria puede significar que una primera secuencia es por lo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica al complemento de una segunda secuencia en una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35,

40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleótidos o aminoácidos, o que las dos secuencias se hibridan bajo condiciones de hibridación restrictiva.

u. Sustancialmente idéntico

“Sustancialmente idéntico” tal como se utiliza en la presente memoria puede significar que una primera y una segunda secuencias son por lo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticas en una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleótidos o aminoácidos, o con respecto a ácidos nucleicos, en el caso de que la primera secuencia sea sustancialmente complementaria al complemento de la segunda secuencia.

v. Subtipo o serotipo

“Subtipo” o “serotipo” tal como se utiliza en la presente memoria intercambiamente y en referencia a los virus VFA, y se refiere a variantes genéticas de un antígeno del virus VFA en las que un subtipo es reconocido por el sistema inmunitario como diferente de otro subtipo.

w. Variante

“Variante” utilizada en la presente memoria con respecto a un ácido nucleico puede significar: (i) una parte o fragmento de una secuencia de nucleótidos mencionada, (ii) el complemento de una secuencia de nucleótidos mencionada o parte de la misma, (iii) un ácido nucleico que es sustancialmente idéntico a un ácido nucleico mencionado o el complemento del mismo, o (iv) un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones restrictivas con el ácido nucleico mencionado, complemento del mismo, o una secuencia sustancialmente idéntica al mismo.

“Variante” con respecto a un péptido o polipéptido que difiere en su secuencia de aminoácidos por inserción, delección o sustitución conservadora de aminoácidos, aunque conserva por lo menos una actividad biológica. Variante puede significar también una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína mencionada con una secuencia de aminoácidos que conserva por lo menos una actividad biológica. Una sustitución conservadora de un aminoácido, es decir, sustituir un aminoácido por un aminoácido diferente de propiedades similares (p.ej., hidrofiliidad, grado y distribución de zonas con carga) se reconoce en la técnica que típicamente implica un cambio menor. Dichos cambios menores pueden identificarse, en parte, mediante la consideración del índice hidropático de aminoácidos, tal como se entiende en la técnica. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132, 1982. El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de su hidrofobicidad y carga. Es conocido de la técnica que los aminoácidos de índices hidropáticos similares pueden sustituirse y todavía conservan la función de la proteína. En un aspecto, se sustituyen los aminoácidos con índices hidropáticos de ± 2 . El hidrofiliidad de aminoácidos también puede utilizarse para revelar sustituciones que resultarían en proteínas que conservan la función biológica. Una consideración de la hidrofiliidad de los aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la hidrofiliidad media local máxima de ese péptido, una medida útil que se ha informado que se correlaciona bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad. Se hace referencia a la patente US nº 4.554.101 en la presente memoria. La sustitución de aminoácidos con valores de hidrofiliidad similares puede resultar en péptidos que conservan la actividad biológica, por ejemplo la inmunogenicidad, tal como se entiende en la técnica. Pueden llevarse a cabo sustituciones con aminoácidos que presentan valores de hidrofiliidad a ± 2 unos de otros. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofiliidad de los aminoácidos están influidos por la cadena lateral particular de ese aminoácido. En concordancia con dichas observaciones, las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica se entiende que dependen de la similitud relativa de los aminoácidos y particularmente de las cadenas laterales de dichos aminoácidos, tal como revela la hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y otras propiedades.

x. Vector

“Vector”, utilizado en la presente memoria, puede referirse a una secuencia de ácidos nucleicos que contiene un origen de replicación. Un vector puede ser un plásmido, bacteriófago, cromosoma bacteriano artificial o cromosoma artificial de levadura. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. Un vector puede ser un vector extracromosómico autorreplicante o un vector que se integra en el genoma del huésped.

2. Proteínas y secuencias codificantes del VFA

Los genomas de cada uno de los subtipos A, C, O, Asia, SAT1, SAT2 y SAT3 se encuentran en GenBank en los números de acceso siguientes:

A: JF749843
C: NC_002554
O: JF749851
Asia: DQ533483
SAT-1: JF749860

SAT-2: JF749862
SAT-3: NC_011452

- Estos pueden utilizarse para localizar secuencias codificantes para cada uno de VP1, VP2, VP3 y VP4 para cada uno de los subtipos A, C, O, Asia, SAT1, SAT2 y SAT3. De manera similar, tal como se ha indicado anteriormente, el documento n° WO 2011/054011, da a conocer vacunas del VFA con VP1, VP2, VP3, VP4 de subtipos de VFA, A, C, O, Asia, SAT1, SAT2 y SAT3, aunque utilizando un diseño diferente. El experto en la materia podría identificar secuencias codificantes de cada una de las proteínas de VFA, VP1, VP2, VP3 y VP4 de subtipos A, C, O, Asia, SAT1, SAT2 y SAT3, utilizando la información en el documento n° WO 2011/054011 y GenBank.
- En algunos constructos pueden utilizarse proteínas homólogas que son 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, o 99% o más homólogas respecto a las proteínas de VFA, VP1, VP2, VP3 o VP4 de los subtipos A, C, O, Asia, SAT1, SAT2 o SAT3.
- En algunos constructos pueden utilizarse fragmentos de proteínas de VFA VP1, VP2, VP3 o VP4 de los subtipos A, C, O, Asia, SAT1, SAT2 o SAT3 con 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, o 99% o más de la secuencia de longitud completa.
- En algunos constructos pueden utilizarse fragmentos de proteínas que son 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, o 99% o más homólogas respecto a las proteínas de VFA VP1, VP2, VP3 o VP4 de los subtipos A, C, O, Asia, SAT1, SAT2 o SAT3, y que presentan 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, o 99% o más de la secuencia de longitud completa.
- En constructos pueden utilizarse secuencias codificantes de dichas proteínas de VFA, proteínas homólogas, fragmentos de proteínas de VFA y fragmentos de proteínas homólogas.
- Puede encontrarse presente un sitio de corte proteolítico nativo entre cada una de las secuencias de antígeno de consenso, tal como la secuencia de aminoácidos: RGRKRRS.
- En la presente memoria se proporciona un antígeno capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero contra uno o más e los subtipos de virus de la enfermedad de la fiebre aftosa (VFA). El antígeno puede ser un antígeno de VFA que comprende las proteínas de cápside VP1, VP2, VP3, VP4, un consenso de las mismas, una variante de las mismas, un fragmento de las mismas o una combinación de las mismas. El antígeno de VFA puede ser VFA de subtipo A, Asia 1, C, O, SAT, SAT2 o SAT3. El antígeno de VFA puede contener por lo menos un epítipo antigénico que puede resultar eficaz contra inmunógenos particulares del VFA contra los que puede inducirse una respuesta inmunitaria. Las proteínas de cápside vírica vacía VP1-VP4 del antígeno de VFA proporcionan un repertorio completo de sitios inmunogénicos y epítipos presentes en un virus VFA intacto. La secuencia de VFA de consenso puede derivarse de las secuencias de antígeno del VFA de una pluralidad de virus VFA de un subtipo de VFA. El antígeno de VFA de consenso puede comprender secuencias de proteína de consenso de VP1, VP2, VP3 y VP4 de subtipo de VFA, que puede ser una proteína de consenso VP1-VP4. La proteína VP1-VP4 de consenso puede comprender por lo menos un sitio de corte de proteasa 3C del VFA. El sitio de corte de proteasa 3C puede encontrarse presente entre cada una de las secuencias de VP1, VP2, VP3 y VP4 de consenso de la proteína VP1-4 de consenso. El corte de la proteína VP1-VP4 de consenso por la proteasa 3C puede cortar la proteína VP1-VP4 de consenso para producir una proteína VP1- de consenso, una proteína VP2- de consenso, una proteína VP3- de consenso y una proteína VP4 de consenso. Puede encontrarse presente un sitio de corte proteolítico nativo entre cada una de las secuencias de antígeno de consenso, tal como la secuencia de aminoácidos: RGRKRRS.
- En algunas realizaciones, las proteínas son 80% homólogas. En algunas realizaciones, las proteínas son 90% homólogas. En algunas realizaciones, las proteínas son 95% homólogas. En algunas realizaciones, las proteínas son 96% homólogas. En algunas realizaciones, las proteínas son 97% homólogas. En algunas realizaciones, las proteínas son 98% homólogas. En algunas realizaciones, las proteínas son 99% homólogas.
- En la presente memoria se proporcionan secuencias codificantes de antígenos capaces de inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero contra uno o más subtipos del virus de la fiebre aftosa (VFA). El antígeno puede ser un antígeno de VFA que comprende las proteínas de cápside VP1, VP2, VP3, VP4, un consenso de las mismas, una variante de las mismas, un fragmento de las mismas o una combinación de las mismas. El antígeno de VFA puede ser VFA de subtipo A, Asia 1, C, O, SAT, SAT2 o SAT3. El antígeno de VFA puede contener por lo menos un epítipo antigénico que puede resultar eficaz contra inmunógenos particulares del VFA contra los que puede inducirse una respuesta inmunitaria. Las proteínas de cápside vírica vacía VP1-4 del antígeno de VFA proporcionan un repertorio completo de sitios inmunogénicos y epítipos presentes en un virus VFA intacto. La secuencia de VFA de consenso puede derivarse de las secuencias de antígeno del VFA de una pluralidad de virus VFA de un subtipo de VFA. El antígeno de VFA de consenso puede comprender secuencias de proteína de consenso de VP1, VP2, VP3 y VP4 de subtipo de VFA, que puede ser una proteína de consenso VP1-4. La proteína VP1-4 de consenso puede comprender por lo menos un sitio de corte 3C de proteína del VFA. El sitio de corte de proteasa 3C puede encontrarse presente entre cada una de las secuencias de VP1, VP2, VP3 y VP4 de consenso de la proteína VP1-4 de consenso. El corte de la proteína VP1-4 de consenso por la proteasa 3C puede cortar la proteína VP1-4 de consenso para producir una

proteína VP1- de consenso, una proteína VP2- de consenso, una proteína VP3- de consenso y una proteína VP4 de consenso. Puede encontrarse presente un sitio de corte proteolítico nativo entre cada una de las secuencias de antígeno de consenso, tal como la secuencia de aminoácidos: RGRKRRS. Se proporcionan secuencias codificantes de proteínas de fusión que comprenden el consenso de la proteasa 3C.

Adicionalmente, las secuencias codificantes pueden codificar proteínas o pueden ser fragmentos de las proteínas indicadas en la presente memoria. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 20% de la proteína de consenso. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 30% de la proteína de consenso. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 40% de la proteína de consenso. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 50% de la proteína de consenso. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 60% de la proteína de consenso. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 70% de la proteína de consenso. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 85% de la proteína de consenso. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 90% de la proteína de consenso. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 95% de la proteína de consenso. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 96% de la proteína de consenso. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 97% de la proteína de consenso. I

Adicionalmente, las secuencias codificantes pueden codificar proteínas que son homólogas respecto a las proteínas dadas a conocer en la presente memoria. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 80% homólogas. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 90% homólogas. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 95% homólogas. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 96% homólogas. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 97% homólogas. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 98% homólogas. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 99% homólogas.

Adicionalmente, las secuencias codificantes codifican proteínas que son fragmentos de proteínas homólogas de las proteínas indicadas en la presente memoria. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 20% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 30% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 40% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 50% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 60% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 70% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 80% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 90% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 95% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 96% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 97% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 98% de la proteína homóloga. En algunas realizaciones, las secuencias codificantes codifican proteínas que son 99% de la proteína homóloga.

3. Plásmido

En la presente memoria se proporciona un vector que es capaz de expresar uno o más antígenos del VFA en la célula de un mamífero en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero. El vector puede comprender ácido nucleico heterólogo codificante del antígeno del VFA. El vector puede ser un plásmido. El plásmido puede resultar útil para transfectar células con ácidos nucleicos codificantes de un antígeno del VFA, en el que la célula huésped transformada se cultiva y se mantiene bajo condiciones en las que tiene lugar la expresión del antígeno de VFA.

El plásmido puede comprender un ácido nucleico codificante de un antígeno de VFA seleccionado de las proteínas dadas a conocer en la presente memoria, fragmentos de las mismas, secuencias homólogas de las mismas y fragmentos de homólogas. El plásmido puede comprender además un codón de inicio o secuencia líder, que puede encontrarse cadena arriba de la secuencia codificante y un codón de parada, que puede encontrarse cadena abajo de la secuencia codificante. El codón de inicio y terminación puede encontrarse en el mismo marco que la secuencia codificante.

El plásmido puede comprender además un promotor que se encuentra operablemente ligado a la secuencia codificante. El promotor operablemente ligado a la secuencia codificante puede ser un promotor del virus 40 del simio (SV40), un promotor del virus del tumor mamario de ratón (VTMR), un promotor del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tal como el promotor de la repetición terminal larga (RTL) del virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), un promotor del virus de Moloney, un promotor del virus la leucosis aviar (VLA), un promotor de citomegalovirus (CMV), tal como el promotor temprano inmediato del CMV, un promotor del virus de Epstein-Barr (VEB) o un promotor de virus

del sarcoma de Rous (VSR). El promotor puede ser además un promotor de un gen humano, tal como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana o metalotioneína humana. El promotor puede ser además un promotor específico de tejido, tal como un promotor específico muscular o cutáneo, natural o sintético. Se indican ejemplos de dichos promotores en la solicitud publicada de patente US nº US2004/0175727.

El plásmido puede comprender además una señal de poliadenilación, que puede encontrarse cadena abajo de la secuencia codificante. La señal de poliadenilación puede ser una señal de poliadenilación de SV40, una señal de poliadenilación de RTL, una señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina (HCb), una señal de poliadenilación de hormona del crecimiento humana (HCh) o una señal de poliadenilación de β -globina humana. La señal de poliadenilación de SV40 puede ser una señal de poliadenilación de un plásmido pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA).

El plásmido puede comprender además un intensificador situado cadena arriba de la secuencia codificante. El intensificador puede ser actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana o un intensificador vírico, tal como uno de CMV, VFA, VSR o VEB. Los potenciadores de la función de polinucleótidos se describen en las patentes US nº 5.593.972 y nº 5.962.428 y en el documento nº WO94/016737.

El plásmido puede comprender además un origen de replicación de mamífero a fin de mantener el plásmido extracromosómicamente y producir múltiples copias del plásmido en una célula. El plásmido puede ser pVAX1, pCEP4 o pREP4 de Invitrogen (San Diego, CA), que pueden comprender el origen de replicación del virus de Epstein-Barr y la región codificante del antígeno nuclear EBNA-1, que puede producir una replicación episómica de alto número de copia sin integración. El esqueleto del plásmido puede ser pAV0242. El plásmido puede ser un plásmido de adenovirus de tipo 5 (Ad5) de replicación defectuosa.

El plásmido puede comprender además una secuencia reguladora, que puede ser idónea para la expresión génica en una célula en la que se administre el plásmido. La secuencia codificante puede comprender un codón, que puede permitir una transcripción más eficiente de la secuencia codificante en la célula huésped.

La secuencia codificante puede comprender una secuencia líder de Ig. La secuencia líder puede encontrarse en el lado 5' de la secuencia codificante. La proteína de consenso codificada por dicha secuencia puede comprender un líder de Ig N-terminal seguido de una proteína de consenso. El líder de Ig N-terminal puede ser IgE o IgG.

El plásmido puede ser pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en *Escherichia coli* (*E. coli*). El plásmido también puede ser pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El plásmido también puede ser del sistema de expresión baculovírica completa MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en células de insecto. El plásmido también puede ser pcADN1 o pcADN3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en células de mamífero, tal como células de ovario de hámster chino (CHO).

Los plásmidos pueden comprender una o más secuencias codificantes que codifican una o más de VP1, VP2, VP3, VP4 y 3C de uno o más subtipos, tales como Asia, A, O, C, SAT1, SAT2 y SAT3.

En algunas realizaciones, un plásmido comprende secuencias codificantes de múltiples antígenos de VFA de consenso diferentes, VP1, VP2, VP3, VP4 y 3C del subtipo Asia, A, O, C, SAT1, SAT2 o SAT3.

En algunas realizaciones, un plásmido comprende secuencias de múltiples antígenos de VFA de consenso diferentes, VP1, VP2, VP3 y VP4 del subtipo Asia, A, O, C, SAT1, SAT2 o SAT3.

En algunas realizaciones, un plásmido comprende secuencias codificantes de dos antígenos VP1 de VFA de consenso diferentes de dos de los subtipos Asia, A, O y C, tal como VP1 del subtipo Asia, VP1 del subtipo O, o VP1 del subtipo A y VP1 del subtipo C.

En algunas realizaciones, un plásmido comprende secuencias codificantes de un antígeno de VFA de consenso VP1, tal como VP1 de subtipo Asia, VP1 de subtipo A, VP1 de subtipo O o VP1 de subtipo C.

La secuencia codificante puede estar codificada por un plásmido de ADN diferente, todos regulados por un promotor operablemente ligado, p.ej., un plásmido de ADN que presenta una secuencia codificante regulada por uno o más promotores, comprendiendo la secuencia codificante múltiples antígenos de VFA de consenso.

El vector puede ser pVAX1 o una variante de pVax1 con cambios, tal como el plásmido variante indicado en la presente memoria. El plásmido pVax1 variante es una variante de 2998 pares de bases del plásmido vector de esqueleto pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El promotor del CMV está situado en las bases 137 a 724. El promotor/sitio de cebado de T7 se encuentra en las bases 664 a 683. Se encuentran sitios de clonación múltiple en las bases 696 a 811. La señal de poliadenilación de GH bovina se encuentra en las bases 829 a 1053. El gen de resistencia a la canamicina se encuentra en las bases 1226 a 2020. El origen de pUC se encuentra en las bases 2320 a 2993.

Basándose en la secuencia de pVAX1 disponible de Invitrogen, se encontraron las mutaciones siguientes en la secuencia de pVAX1 que se utilizaron como el esqueleto para los plásmidos 1 a 6 indicados en la presente memoria:

- 5 C>G241 en el promotor de CMV
C>T 1942 esqueleto, cadena abajo de la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (HCbpoliA)
A> - 2876 esqueleto, cadena abajo del gen de canamicina
C>T 3277 en el origen de replicación de pUC (Ori) mutación de alto número de copia (ver Nucleic Acid Research 1985)
- 10 G>C 3753 en el mismo extremo de Ori de pUC cadena arriba del sitio de ARNasaH
Los pares de bases 2, 3 y 4 se cambiaron de ACT a CTG en el esqueleto, cadena arriba del promotor de CMV.

El esqueleto del vector puede ser pAV0242. El vector puede ser un vector adenovirus de tipo 5 (Ad5) de replicación defectuosa.

- 15 El plásmido puede comprender además una secuencia reguladora, que puede resultar idónea para la expresión génica en una célula en la que se administre el plásmido. La secuencia codificante puede comprender un codón, que puede permitir una transcripción más eficiente de la secuencia codificante en la célula huésped.
- 20 La secuencia codificante puede comprender, además, una secuencia líder de Ig. La secuencia líder puede encontrarse en el lado 5' de la secuencia codificante. Los antígenos de consenso codificados por dicha secuencia pueden comprender un líder de Ig N-terminal seguido de una proteína de antígeno de consenso. El líder de Ig N-terminal puede ser IgE o IgG.
- 25 El plásmido puede ser pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en *Escherichia coli* (*E. coli*). El plásmido también puede ser pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El plásmido también puede ser del sistema de expresión baculovírica completa MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en células de insecto. El plásmido puede ser además pcADN1 o pcADN3 (Invitrogen, San
- 30 Diego, Calif.), que puede utilizarse para la producción de proteínas en células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO).

4. Vacuna

- 35 Aunque sin restringirse a ninguna teoría científica, una vacuna que puede utilizarse para inducir una respuesta inmunitaria (humoral, celular, o ambas) ampliamente contra el VFA puede comprender una o más secuencias codificantes indicadas anteriormente, es decir, secuencias de ácidos nucleicos que codifican una o más proteínas VP1, VP2, VP3, CVP4 y 2A de los subtipos seleccionados del grupo que consiste en: subtipos de VFA, tales como A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la vacuna puede
- 40 comprender además un ácido nucleico codificante de una proteasa C3 de VFA, que puede ser un ácido nucleico de proteasa C3 de consenso.

Lo anterior incluye:

- 45 Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos de consenso de por lo menos VP1-VP3, y preferentemente VP1-4 del virus de la fiebre aftosa que induce una respuesta inmunitaria de reactividad cruzada en un sujeto vacunado contra múltiples subtipos de VFA, incluyendo A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 y SAT4. El ácido nucleico puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (a) SEC ID nº 1; una secuencia de nucleótidos codificante SEC ID nº 2; (b) SEC ID nº 3; una secuencia de nucleótidos codificante SEC ID nº 4; (c) SEC ID nº 5; una secuencia de nucleótidos codificante SEC ID nº 6; d) SEC ID nº 7; una
- 50 secuencia de nucleótidos codificante SEC ID nº 8; e) SEC ID nº 9; una secuencia de nucleótidos codificante SEC ID nº 1 y f) SEC ID nº 11; una secuencia de nucleótidos codificante SEC ID nº 12.

- En la presente memoria se proporciona una vacuna capaz de generar en un mamífero una respuesta inmunitaria contra uno o más subtipos de VFA. La vacuna puede comprender el plásmido comentado anteriormente. La vacuna
- 55 puede comprender una pluralidad de plásmidos, cada uno de ellos dirigidos a uno o más subtipos del VFA, tales como A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 o combinaciones de los mismos. La vacuna puede comprender además los antígenos de VFA mismos dirigidos contra uno o más subtipos de VFA, tales como A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 o combinaciones de los mismos. La vacuna puede comprender además plásmidos dirigidos a subtipos de VFA de zonas particulares del mundo, por ejemplo, Asia, Europa y sub-África. Alternativa o adicionalmente, la vacuna puede
- 60 comprender proteínas de uno o más subtipos de VFA, tales como A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 o combinaciones de los mismos. La vacuna puede comprender además los antígenos de VFA mismos dirigidos contra uno o más subtipos de VFA, tales como A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 o combinaciones de los mismos. La vacuna puede comprender además plásmidos y/o proteínas dirigidos a subtipos de VFA de zonas particulares del mundo, por ejemplo, Asia, Europa y sub-África. La vacuna puede proporcionarse para inducir una respuesta inmunitaria
- 65 terapéutica o profiláctica.

En la presente memoria se dan a conocer composiciones farmacéuticas según la presente invención que comprenden aproximadamente 1 nanogramo a aproximadamente 10 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas según la presente exposición comprenden: 1) por lo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nanogramos, o por lo menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 o 1000 microgramos, o por lo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 mg o más, y 2) hasta e incluyendo 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nanogramos, o hasta e incluyendo 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995, o 1000 microgramos, o hasta, e incluyendo, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 mg. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas según la presente exposición comprenden entre aproximadamente 5 nanogramos y aproximadamente 10 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas según la presente exposición comprenden entre aproximadamente 25 nanogramos y aproximadamente 5 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 50 nanogramos y aproximadamente 1 mg de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 1 y aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 5 y aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 15 y aproximadamente 150 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 25 y aproximadamente 75 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 35 y aproximadamente 40 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden entre aproximadamente 10 microgramos y aproximadamente 100 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden entre aproximadamente 20 microgramos y aproximadamente 80 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden entre aproximadamente 25 microgramos y aproximadamente 60 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden entre aproximadamente 30 nanogramos y aproximadamente 50 microgramos de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden entre aproximadamente 35 nanogramos y aproximadamente 45 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferentes, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferentes, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 1 y aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferentes, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 25 y aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferentes, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 microgramos de ADN.

Las composiciones farmacéuticas según la presente exposición se formulan según el modo de administración que debe utilizarse. En los casos en que las composiciones farmacéuticas son composiciones farmacéuticas inyectables, son estériles, libres de pirógenos y libres de partículas. Preferentemente se utiliza una formulación isotónica. Generalmente, entre los aditivos para la isotonicidad pueden incluirse cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, resultan preferentes soluciones isotónicas, tales como solución salina tamponada con fosfato. Entre los estabilizadores se incluyen gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se añade un agente de vasoconstricción a la formulación.

Preferentemente, la composición farmacéutica es una vacuna, y más preferentemente una vacuna de ADN.

La vacuna puede ser una vacuna de ADN. La vacuna de ADN puede comprender una pluralidad de los mismos

plásmidos o plásmidos diferentes que comprenden secuencias codificantes de ácidos nucleicos de uno o más antígenos prostáticos de consenso. La vacuna de ADN puede comprender una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno o más antígenos prostáticos de consenso. En el caso de que la vacuna de ADN comprenda secuencias codificantes de más de un antígeno prostático de consenso, la totalidad de dichas secuencias puede encontrarse presente en un único plásmido, o cada una de dichas secuencias puede encontrarse presente en plásmidos diferentes.

En algunas realizaciones, las vacunas pueden comprender secuencia de ácidos nucleicos que codifican uno o más antígenos prostáticos de consenso en combinación con uno o más antígenos prostáticos de consenso.

Se dan a conocer vacunas de ADN en las patentes US nº 5.593.972, nº 5.739.118, nº 5.817.637, nº 5.830.876, nº 5.962.428, nº 5.981.505, nº 5.580.859, nº 5.703.055 y nº 5.676.594. La vacuna de ADN puede comprender además elementos o reactivos que inhiben la integración de la misma en el cromosoma. La vacuna puede ser un ARN del antígeno prostático. La vacuna de ARN puede introducirse en la célula.

La vacuna puede ser una vacuna recombinante que comprende el constructo genético o antígeno indicado anteriormente. La vacuna puede comprender además uno o más antígenos prostáticos de consenso en forma de una o más subunidades de proteína, o una o más partículas víricas atenuadas que comprenden uno o más antígenos de consenso. La vacuna atenuada puede ser una vacuna viva atenuada, vacunas muertas y vacunas que utilizan vectores recombinantes para administrar genes foráneos que codifican uno o más antígenos prostáticos de consenso, y también vacunas de subunidades y proteínas. Los ejemplos de vacunas vivas atenuadas, las que utilizan vectores recombinantes para administrar antígenos prostáticos, vacunas de subunidad y vacunas de glucoproteína se describen en las patentes US nº

nº 4.510.245, nº 4.797.368, nº 4.722.848, nº 4.790.987, nº 4.920.209, nº 5.017.487, nº 5.077.044, nº 5.110.587, nº 5.112.749, nº 5.174.993, nº 5.223.424, nº 5.225.336, nº 5.240.703, nº 5.242.829, nº 5.294.441, nº 5.294.548, nº 5.310.668, nº 5.387.744, nº 5.389.368, nº 5.424.065, nº 5.451.499, nº 5.453.364, nº 5.462.734, nº 5.470.734, nº 5.474.935, nº 5.482.713, nº 5.591.439, nº 5.643.579, nº 5.650.309, nº 5.698.202, nº 5.955.088, nº 6.034.298, nº 6.042.836, nº 6.156.319 y nº 6.589.529.

Las vacunas pueden comprender plásmidos en combinación con otros componentes de vacuna, tales como proteínas de VFA o vectores de expresión codificantes de proteínas.

La vacuna proporcionada puede utilizarse para inducir respuestas inmunitarias, incluyendo respuestas inmunitarias terapéuticas o profilácticas. Pueden generarse anticuerpos y/o células T asesinas que estén dirigidas contra el antígeno prostático de consenso. Pueden aislarse dichos anticuerpos y células.

La vacuna puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente farmacéuticamente aceptable pueden ser moléculas funcionales, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un agente facilitador de la transfección, que puede incluir agentes activos en superficie, tales como complejos inmunoestimulantes (ISCom), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS, incluyendo monofosforil-lípido A, péptidos muramilo, análogos de quinona, vesículas tales como escualeno y escualano, ácido hialurónico, lípidos, liposomas, iones de calcio, proteínas víricas, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes facilitadores de la transfección conocidos.

El agente facilitador de la transfección es un polianión, polication, incluyendo poli-L-glutamato (LGS) o lípido. El agente facilitador de la transfección es poli-L-glutamato, y más preferentemente, el poli-L-glutamato se encuentra presente en la vacuna a una concentración inferior a 6 mg/ml. El agente facilitador de la transfección puede incluir además agentes activos en superficie, tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOM) adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS, incluyendo monofosforil-lípido A, péptidos muramilo, análogos de quinona y vesículas, tales como escualeno y escualano, y ácido hialurónico, que también pueden utilizarse administrados junto con el constructo genético. En algunas realizaciones, las vacunas de plásmido de ADN pueden incluir además un agente facilitador de la transfección, tal como lípidos, liposomas, incluyendo liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos de la técnica, tales como una mezcla de ADN-liposomas (ver, por ejemplo, el documento nº WO93/24640), iones de calcio, proteínas víricas, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes facilitadores de la transfección conocidos. Preferentemente, el agente facilitador de la transfección es un polianión, polication, incluyendo poli-L-glutamato (LGS), o lípido. La concentración del agente de transfección en la vacuna es inferior a 4 mg/ml, inferior a 2 mg/ml, inferior a 2 mg/ml, inferior a 0,750 mg/ml, inferior a 0,500 mg/ml, inferior a 0,250 mg/ml, inferior a 0,100 mg/ml, inferior a 0,050 mg/ml o inferior a 0,010 mg/ml.

El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un adyuvante. El adyuvante puede ser otros genes que se expresan en un plásmido alternativo o que se administren en forma de proteínas en combinación con el plásmido anteriormente indicado en la vacuna. El adyuvante puede seleccionarse del grupo que consiste en: interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), interferón γ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), quimioquina atractora de células T (CTACK), quimioquina epitelial expresada por el timo (TECK), quimioquina epitelial asociada a mucosas (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86 incluyendo IL-15, que presenta delección de secuencia de señal e incluyendo opcionalmente el péptido de señal de IgE. El adyuvante puede ser IL-12, IL-15, CTACK, TECK, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF,

factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, o una combinación de los mismos.

Entre otros genes que pueden ser adyuvantes útiles se incluyen los codificantes de: MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, selectina I, selectina P, selectina E, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento fibroblástico, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, Ikb, NIK inactivo, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta a interferón, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, ligando RANK, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y fragmentos funcionales de los mismos.

La vacuna puede comprender además un agente facilitador de vacuna genético tal como se indica en la patente US nº de serie 021.579, presentada el 1 de abril de 1994.

La vacuna puede formularse según el modo de administración que deba utilizarse. Una composición farmacéutica de vacuna inyectable puede ser estéril, libre de pirógenos y libre de partículas. Puede utilizarse una formulación o solución isotónica. Entre los aditivos para la isotonicidad pueden incluirse cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. La vacuna puede comprender un agente de vasoconstricción. Entre las soluciones isotónicas pueden incluir solución salina tamponada con fosfato. La vacuna puede comprender además estabilizadores, incluyendo gelatina y albúmina. La estabilización puede permitir que la formulación sea estable a temperatura de laboratorio o ambiente durante periodos de tiempo prolongados, tal como LGS o policationes o polianiones añadidos a la formulación de vacuna.

5. Métodos de administración de la vacuna

En la presente memoria se da a conocer un método de administración de la vacuna para proporcionar constructos genéticos y proteínas del antígeno del VFA que comprenden epítomos que los convierte en particularmente eficaces contra inmunógenos del VFA contra el que puede inducirse una respuesta inmunitaria. El método de administración de la vacunas o vacunación puede proporcionarse para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica y profiláctica. El procedimiento de vacunación puede generar en el mamífero una respuesta inmunitaria contra una pluralidad de subtipos de VFA. La vacuna puede administrarse en el individuo para modular la actividad del sistema inmunitario del mamífero y potenciar la respuesta inmunitaria. La administración de la vacuna puede ser la transfección del antígeno de VFA en forma de molécula de ácidos nucleicos que se expresa en la célula y se administra en la superficie de la célula, de manera que el sistema inmunitario la reconoce e induce una respuesta celular, humoral o celular y humoral. La administración de la vacuna puede utilizarse para inducir o estimular una respuesta inmunitaria en mamíferos contra una pluralidad de virus de VFA mediante la administración de la vacuna en el mamífero tal como se ha comentado anteriormente.

Tras la administración de la vacuna y el plásmido en las células del mamífero, las células transfectadas expresan y secretan cápsides de consenso para cada uno de los plásmidos inyectados con la vacuna. Dichas proteínas de cápside secretadas resultan reconocidas como foráneas por el sistema inmunitario y se producen anticuerpos contra ellas. Dichos anticuerpos son mantenidos por el sistema inmunitario y permiten una rápida eliminación de posteriores retos de VFA.

La vacuna puede administrarse en el mamífero para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, primate, primate no humano, vaca, res, oveja, cabra, antílope, bisonte, búfalo acuático, bisonte, bóvidos, ciervo, erizos, elefantes, llama, alpaca, ratones, ratas y pollos.

a. Tratamientos de combinación

La vacuna puede administrarse en combinación con otras proteínas o genes codificantes de interferón α , interferón γ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), quimioquina atractora de células T cutánea (CTACK), quimioquina epitelial expresada en el timo (TECK), quimioquina epitelial asociada mucosas (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, incluyendo IL-15 en la que se ha delecionado la secuencia de señal y que incluye opcionalmente el péptido de señal de IgE, IL-12, IL-15, CTACK, TECK, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, selectina L, selectina P, selectina E, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento fibroblástico, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, Ikb, Inactive NIK, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta a interferón, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, ligando de Ox40, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y fragmentos funcionales de los mismos o combinaciones de los mismos. La vacuna puede administrarse además en combinación con proteína CTACK, proteína TECK, proteína MEC o fragmentos funcionales de las mismas.

La vacuna puede administrarse por diferentes vías, incluyendo oral, parenteral, sublingual, transdérmica, rectal, transmucosal, tópica, mediante inhalación, mediante administración bucal, intrapleural, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intranasal, intratecal e intraarticular, o combinaciones de las mismas. Para la utilización veterinaria, la composición puede administrarse en forma de una formulación convenientemente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal. El veterinario podrá determinar fácilmente el régimen de administración y la vía de administración que resulte más apropiada para el animal particular. La vacuna puede administrarse mediante jeringas tradicionales, dispositivos de inyección sin aguja, "pistolas génicas de bombardeo de microproyectiles" u otros métodos físicos, tales como la electroporación ("EP"), el "método hidrodinámico", o los ultrasonidos.

El plásmido de la vacuna puede administrarse en el mamífero mediante varias tecnologías bien conocidas, incluyendo la inyección de ADN (también denominada vacunación de ADN) con y sin electroporación *in vivo*, mediada por liposomas, facilitada por nanopartículas, vectores recombinantes, tales como adenovirus recombinantes, virus asociados a adenovirus recombinante y Vaccinia recombinante. El antígeno del VFA puede administrarse mediante inyección de DAN y junto con la electroporación *in vivo*.

b. Electroporación

La administración de la vacuna mediante electroporación de los plásmidos de la vacuna puede llevarse a cabo utilizando dispositivos de electroporación que pueden configurarse para la administración en un tejido deseado de un mamífero de un pulso de energía productor de una corriente constante similar a una entrada de corriente prefijada por un usuario. El dispositivo de electroporación puede comprender un componente de electroporación y un conjunto de electrodos o conjunto de mandos. El componente de electroporación puede incluir e incorporar uno o más de los diversos elementos de los dispositivos de electroporación, incluyendo: controlador, generador de forma de onda de corriente, probador de impedancia, registrador de forma de onda, elemento de entrada, elemento notificador de estado, puerto de comunicación, componente de memoria, fuente de alimentación y conmutador de alimentación. La electroporación puede llevarse a cabo utilizando el sistema VGXP Collectra™ para facilitar la transfección de células con el plásmido.

El componente de electroporación puede funcionar como un elemento de los dispositivos de electroporación y los demás elementos son elementos (o componentes) separados en comunicación con el componente de electroporación. El componente de electroporación puede funcionar como más de un elemento de los dispositivos de electroporación, que pueden encontrarse en comunicación con todavía otros elementos de los dispositivos de electroporación separados del componente de electroporación. Los elementos de los dispositivos de electroporación existentes como partes de un dispositivo electromecánico o mecánico pueden no encontrarse limitados, ya que los elementos pueden funcionar como un dispositivo o como elementos separados en comunicación mutua. El componente de electroporación puede ser capaz de administrar el pulso energético que produce la corriente constante en el tejido deseado, e incluye un mecanismo de retroalimentación. El conjunto de electrodos puede incluir una matriz de electrodos con una pluralidad de electrodos en una disposición espacial, en el que el conjunto de electrodos recibe el pulso energético procedente del componente de electroporación y lo administra en el tejido deseado mediante los electrodos. Por lo menos uno de la pluralidad de electrodos es neutro durante la administración del pulso energético y mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al componente de electroporación. El mecanismo de retroalimentación puede recibir la impedancia mediada y puede ajustar el pulso energético administrado por el componente de electroporación para mantener la corriente constante.

Una pluralidad de electrodos puede administrar el pulso energético en un patrón descentralizado. La pluralidad de electrodos puede administrar el pulso energético en el patrón descentralizado mediante el control de los electrodos bajo una secuencia programada, y la secuencia programada puede ser introducida por un usuario en el componente de electroporación. La secuencia programada puede comprender una pluralidad de pulsos administrada en secuencia, en la que cada pulso de la pluralidad de pulsos es administrado mediante por lo menos dos electrodos activos con un electrodo neutro que mide la impedancia, y en el que un pulso posterior de la pluralidad de pulsos es administrado por un electrodo diferente de entre por lo menos dos electrodos activos, con un electrodo neutro que mide la impedancia.

El mecanismo de retroalimentación puede llevarse a cabo con hardware o software. El mecanismo de retroalimentación puede llevarse a cabo mediante un circuito de bucle cerrado analógico. La retroalimentación se produce cada 50 μ s, 20 μ s, 10 μ s o 1 μ s, aunque es preferentemente una retroalimentación en tiempo real o instantánea (es decir, sustancialmente instantánea según se determina mediante las técnicas disponibles para determinar el tiempo de respuesta). El electrodo neutro puede medir la impedancia en el tejido deseado y comunicarla al mecanismo de retroalimentación, y el mecanismo de retroalimentación responde a la impedancia y ajusta el pulso energético para mantener la corriente constante en un valor similar a la corriente prefijada. El mecanismo de retroalimentación puede mantener la corriente constante continua e instantáneamente durante la administración del pulso energético.

Entre los ejemplos de dispositivos de electroporación y métodos de electroporación que pueden facilitar la administración de las vacunas de ADN de la presente invención se incluyen los indicados en la patente US nº

7.245.963, de Draghia-Akli et al., publicación de patente US nº 2005/0052630, presentada por Smith, et al. Otros dispositivos de electroporación y métodos de electroporación que pueden utilizarse para facilitar la administración de las vacunas de ADN se incluyen los proporcionados en las publicaciones copendientes y copropietarias de las publicaciones de patente US nº US 2008-0091135, presentada el 17 de octubre de 2007, que reivindica el beneficio bajo 35 USC 119(e) a solicitudes provisionales de patente US nº de serie 60/852,149, presentada el 17 de octubre de 2006 y nº 60/978,982, presentada el 10 de octubre de 2007.

La patente US nº 7.245.963, de Draghia-Akli et al., describe sistemas modulares de electrodos y su utilización para facilitar la introducción de una molécula biológica en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Los sistemas modulares de electrodos pueden comprender una pluralidad de electrodos de agua: una aguja hipodérmica, un conector eléctrico que proporciona un enlace conductor de un controlador programable de pulso de corriente constante con la pluralidad de electrodos de aguja y una fuente de alimentación. Un operador puede coger la pluralidad de electrodos de aguja que están montados en una estructura de soporte e insertarlos firmemente en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. A continuación, las biomoléculas se administran mediante la aguja hipodérmica en el tejido seleccionado. El controlador programable de pulso de corriente constante se activa y el pulso eléctrico de corriente constante se aplica en la pluralidad de electrodos de aguja. El pulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción de la molécula biológica en la célula entre la pluralidad de electrodos.

La publicación de patente US nº 2005/0052630, presentada por Smith, et al. describe un dispositivo de electroporación que puede utilizarse para facilitar eficazmente la introducción de una molécula biológica en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un dispositivo electrocinético ("dispositivo EKD") cuyo funcionamiento es especificado por el software o firmware. El dispositivo EKD produce una serie de patrones programables de pulsos de corriente constante entre electrodos en una matriz basada en el control y entrada por el usuario de los parámetros del pulso, y permite el almacenamiento y adquisición de datos de forma de onda de corriente. El dispositivo de electroporación comprende además un disco de electrodos sustituible con una matriz de electrodos de aguja, un canal de inyección central para una aguja de inyección y un disco guía extraíble.

Las matrices de electrodos y métodos indicados en la patente US nº 7.245.963 y en la publicación de patente US nº 2005/0052630 pueden adaptarse para la penetración profunda en no sólo tejidos tales como el músculo, sino también otros tejidos u órganos. Debido a la configuración de la matriz de electrodos, la aguja de inyección (para administrar la molécula biológica seleccionada) también se inserta por completo en el órgano diana, y la inyección se administra perpendicularmente al tejido diana, en la zona que se predelimita con los electrodos. Los electrodos indicados en la patente US nº 7.245.963 y en la publicación de patente US nº 2005/005263 preferentemente son de 20 mm de longitud y de calibre 21.

Adicionalmente, se encuentra contemplado en algunas realizaciones que incorporan dispositivos de electroporación y usos de los mismos, dispositivos de electroporación que son los indicados en las patentes a continuación: patente US nº 5.273.525, publicada el 28 de diciembre de 1993, las patentes US nº 6.110.161, publicada el 29 de agosto de 2000, nº 6.261.281, publicada el 17 de julio de 2001, y nº 6.958.060, publicada el 25 de octubre de 2005 y la patente US nº 6.939.862, publicada el 6 de septiembre de 2005. Además, las patentes que cubren la materia proporcionadas en la patente US nº 6.697.669, publicada el 24 de febrero de 2004, que se refiere a la administración de ADN utilizando cualquiera de entre una diversidad de dispositivos y la patente US nº 7.328.064, publicada el 5 de febrero de 2008, referida a un método de inyección de ADN, se encuentran contempladas en la presente memoria.

c. Método de preparación de vacuna

En la presente memoria se proporcionan métodos para preparar la vacuna. En algunas realizaciones, los métodos son métodos de preparación de las vacunas que comprenden plásmidos de ADN. Los plásmidos de ADN, tras la etapa final de subclonación en el plásmido de expresión de mamífero, pueden utilizarse para inocular un cultivo celular en un tanque de fermentación a gran escala utilizando métodos conocidos de la técnica. El plásmido se transforma en una célula huésped compatible y se cultiva y se mantiene bajo condiciones en las que tiene lugar la expresión del antígeno del VFA. El antígeno del VFA puede recuperarse a partir del cultivo mediante lisado de las células o a partir del medio de cultivo y aislarse. Las proteínas de consenso VP1-4 aisladas pueden utilizarse en la vacuna como una fuente natural de anticuerpos. El antígeno de VFA puede producirse mediante técnicas recombinantes utilizando sintetizadores automáticos, que también pueden utilizarse para producir antígeno de VFA esencialmente puro aislado. Dichas técnicas pueden resultar útiles para introducir variantes del antígeno de VFA para subtipos particulares de VFA.

Los plásmidos de ADN para la utilización con los dispositivos de EP de la presente invención pueden formularse o prepararse utilizando una combinación de dispositivos y técnicas conocidos, aunque preferentemente se preparan utilizando una técnica de preparación de plásmidos optimizada que está descrita en una solicitud provisional de patente US copendiente objeto de licencia nº de serie 60/939.792, que fue presentada el 23 de mayo de 2007. En algunos ejemplos, los plásmidos de ADN utilizados en dichos estudios pueden formularse a concentraciones superiores o iguales a 10 mg/ml. Entre las técnicas de preparación se incluyen o se incorporan además diversos dispositivos y protocolos que son comúnmente conocidos por el experto ordinario en la materia, además de los indicados en el documento de patente US nº de serie 60/939792, incluyendo los indicados en una patente objeto de licencia; patente

US nº 7.238.522, publicada el 3 de julio de 2007. La solicitud y patente anteriormente indicadas, nº de serie US 60/939.792 y patente US nº 7.238.522, respectivamente, se indican en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo 1

Tal como se indica en las figuras 1 a 17, se prepararon y sometieron a ensayo constructos de algunas realizaciones. Dichas figuras muestran que las vacunas se prepararon y se generaron datos a partir de su utilización.

La figura 17 muestra una representación esquemática de un constructo genérico de vacuna de ADN del VFA, indicando que el inserto se clona en los sitios BamHI y Xho-1. Un mapa plasmídico de la vacuna genérica de VFA se basa en el plásmido pVAX. Pueden ser ejemplos de los insertos de VFA la forma larga, que se muestra en la figura 17 como inserto de forma larga, o la forma corta, que se muestra en la figura 7 como inserto de forma corta. El líder de IgE mostrado en cada forma se indica que es opcional o puede sustituirse con un líder diferente. La secuencia de 2A se indica como opcional y el sitio de corte de furina (rgrkrss - SEC ID nº 27) se indica como sustituible.

La figura 1 es una versión VFA-As1-Shamir-89 de la vacuna de ADN genérica de VFA mostrada en la figura 17. La figura 3 es una versión de ADN de VFA-A24cruzeiro de la vacuna genérica de ADN de VFA mostrada en la figura 17. La figura 5 es una versión de ADN de VFA-SAT2 de la vacuna genérica de ADN de VFA mostrada en la figura 17. La figura 1 muestra una representación esquemática de los constructos de vacuna de VFA-As1-Shamir-89 para el serotipo Asia 1, que indican que se clona un inserto de As1 Shamir89 en los sitios BamHI y Xho-1. El constructo de vacuna de ADN de VFA-A24cruzeiro mostrado en la figura 3 se clonó en los sitios BamHI y Xho-1. El constructo de vacuna de ADN de VFA-SAT2 mostrado en la figura 5 se clonó en los sitios BamHI y Xho-1. En cada una de las figuras 1, 3 y 5, el mapa plasmídico se basa en el plásmido pVAX. Pueden ser ejemplos del inserto de VFA-As1-Shamir, la forma larga, que se muestra en la figura 1, como pVFA-As1 Shamir-89-L, o la forma corta, que se muestra en la figura 1, como pVFA-As1 Shamir-89-S. Pueden ser ejemplos del inserto de VFA-A24cruzeiro, la forma larga, que se muestra en la figura 3 como pVFA-A24cruzeiro-L o la forma corta, que se muestra en la figura 3 como pVFA-A24cruzeiro-S. Pueden ser ejemplos del inserto de VFA-SAT2, la forma larga, que se muestra en la figura 5 como pVFA-As1 SAT2 forma larga, o la forma corta, que se muestra en la figura 5 como pVFA-SAT2 forma corta.

La figura 2 muestra una pareja de geles teñidos que muestra la clonación de As1-Shamir89-S (izquierda, SEC ID nº 7) y As1-Shamir89-L (derecha, SEC ID nº 5); la figura 4 muestra una pareja de geles teñidos que muestra la clonación de A24-cruzeiro-S (izquierda, SEC ID nº 3) y A24cruzeiro-L (derecha, SEC ID nº 1). La figura 6 muestra una pareja de geles teñidos que muestra la clonación de SAT2-S (izquierda, SEC ID nº 11) y SAT2-L (derecha, SEC ID nº 9). Estos datos muestran que los insertos se han incorporado correctamente en los plásmidos respectivos. La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos para VFA-As1-Shamir89-L forma larga. La figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos para VFA-A24cruzeiro-L forma larga. La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos para VFA-SAT2 forma larga. En cada forma larga, la secuencia incluía la secuencia líder de IgE en el extremo N-terminal sombreada, los sitios de corte proteolítico en minúscula y las secuencias de VP4 en negrita entre el líder de IgE y el primer sitio de corte proteolítico. Entre el primer sitio de corte proteolítico y el segundo sitio de corte proteolítico se encuentra la secuencia codificante de VP2. Entre el segundo sitio de corte proteolítico y el tercer sitio de corte proteolítico se encuentra la secuencia codificante de VP3. Entre el tercer sitio de corte proteolítico y el cuarto sitio de corte proteolítico se encuentra la secuencia codificante de VP1. La secuencia de 2A entre el último (cuarto) sitio de corte proteolítico y la parada.

La figura 7 muestra los resultados experimentales de expresión de proteínas. Transferencias Western de proteínas en geles de SDS de comparación de la expresión de proteínas procedentes de muestras producidas por VFA-A24cruzeiro-S forma corta, VFA-A24cruzeiro-L forma larga, pVAX, VFA-As1-Shamir89-S forma corta y VFA-As1-Shamir89-L forma larga. La transferencia se sondeó con antisueros anti-A24.

La figura 8 muestra un protocolo experimental de experimentos de inmunización utilizando la electroporación para evaluar las respuestas inmunitarias tras la administración de: 1) pVAX, 2) VFA-A24cruzeiro-L, 3) VFA-A24cruzeiro-S, 4) VFA-Shamir89-L, 5) VFA-Shamir89-S, VFA-Sat2-L, VFA-Sat2-S frente a la no exposición.

La figura 9 muestra datos de las respuestas inmunitarias celulares inducidas por las vacunas de VFA-A24cruzeiro-L y VFA-A24cruzeiro-S. La figura 10 muestra datos de respuestas inmunitarias celulares inducidas por vacunas de VFA-As1-Shamir89-L y VFA-As1-Shamir89-S. La figura 11 muestra datos de las respuestas inmunitarias celulares inducidas por las vacunas de VFA-Sat2-L y VFA-Sat2-S. La figura 12 muestra un protocolo experimental de transfección de ADN y preparación de lisados celulares para el análisis de ELISA. La figura 13 muestra datos de la inducción de anticuerpos en ratones inducidos con vacunas de VFA-A24cruzeiro-L y VFA-A24cruzeiro-S y con vacunas de VFA-As1-Shamir89-L y VFA-As1-Shamir89-S. La figura 14 muestra datos del análisis de ELISA de la unión de proteínas utilizando lisados de proteínas preparados a partir de células transfectadas por VFA-A24cruzeiro-L y células transfectadas por VFA-As1-Shamir89-L. La vacuna de VFA era inmunogénica en los ratones. Se observó seroconversión en todos los animales inmunizados. Las formas largas de las vacunas eran más potentes que las formas cortas. Las respuestas humorales aparentemente son más potentes contra la vacuna Shamir que contra la vacuna Cruzeiro; sin embargo, ambas vacunas eran potentes. Las respuestas celulares presentaban mayor

reactividad cruzada con la vacuna Shamir que con la vacuna Cruzeiro. La comparación con los sueros seropositivos bovinos muestra que las vacunas indujeron niveles razonables de reactividad inmunitaria.

La figura 15 muestra comparaciones de secuencias de aminoácidos entre las secuencias Shamir y Cruzeiro. Las secuencias de VP4 Shamir (SEC ID nº 17) se muestran en comparación con las secuencias de VP4 Cruzeiro (SEC ID nº 18); se muestran las secuencias de VP2 Shamir (SEC ID nº 19) en comparación con secuencias de VP2 Cruzeiro (SEC ID nº 20) y secuencias 2A Shamir (SEC ID nº 21) en comparación con 2A Cruzeiro (SEC ID nº 22).

La figura 16 muestra comparaciones de secuencias de aminoácidos entre las secuencias Shamir y Cruzeiro. Se muestran las secuencias de VP3 Shamir (SEC ID nº 23) en comparación con secuencias de VP3 Cruzeiro (SEC ID nº 24) y se muestran secuencias de VP1 Shamir (SEC ID nº 25) en comparación con secuencias de VP1 Cruzeiro (SEC ID nº 26).

Ejemplo 2

Se diseñaron catorce constructos para la preparación de una vacuna de VFA. Se utilizaron secuencias de siete virus de la fiebre aftosa, subtipos A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 y SAT4. Pueden utilizarse dos diseños de constructo: una versión larga y una versión corta. De acuerdo con lo anterior, hay formas largas y cortas de constructos para cada uno de los subtipos, A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 y SAT4, rindiendo 14 constructos. Las vacunas pueden producirse utilizando tan solo 4 constructos, y típicamente 7.

Se muestra una forma larga genérica en la figura 17. Las secuencias codificantes de inmunógeno están dispuestas en el orden VP4, VP2, VP3 y VP1. Secuencias codificantes de sitios de corte de proteasa separan cada una de las cuatro proteínas víricas. Puede proporcionarse la secuencia codificante para cualesquiera secuencias de líder de IgE opcionales. De manera similar, se proporciona una cola de péptido 2A de VFA en el extremo incluyendo un sitio de corte de proteasa.

En la figura 17 también se muestra una forma corta genérica. Las secuencias codificantes de inmunógeno están dispuestas en el orden VP2, VP3 y VP1. Secuencias codificantes de sitios de corte de proteasa separan cada una de las cuatro proteínas víricas. Puede proporcionarse la secuencia codificante para cualesquiera secuencias de líder de IgE opcionales. De manera similar, se proporciona una cola 2A de 16 aminoácidos en el extremo incluyendo un sitio de corte de proteasa.

Se insertan constructos en los vectores de expresión plasmídicos, resultando en 14 plásmidos.

En algunas realizaciones, las vacunas comprenden A - forma larga, Asia 1-larga, C-forma larga, O-forma larga, SAT1-forma larga, SAT2-forma larga, SAT3-forma larga y SAT4-forma larga.

En algunas realizaciones, las vacunas comprenden A-forma corta, Asia 1-corta, C-forma corta, O-forma corta, SAT1-forma corta, SAT2-forma corta, SAT3-forma corta y SAT4-forma corta.

En algunas realizaciones, las vacunas comprenden A-forma larga, Asia1-larga, C-forma larga y O-forma larga.

En algunas realizaciones, las vacunas comprenden A-forma corta, Asia 1-corta, C-forma corta y O-forma corta.

El extremo N-terminal puede ser una secuencia líder, tal como IgE o IgE, o no presentar líder.

Las proteínas víricas individuales deben encontrarse separadas entre sí por una proteasa, que se encuentra comúnmente presente en las células en las que se desea la expresión.

El documento nº WO 2011/054011 da a conocer vacunas de VFA. En la exposición se incluyen secuencias de aminoácidos y secuencias codificantes para las 28 secuencias que pueden incluirse en diversas realizaciones. Las catorce secuencias víricas son: VP1, VP2, VP3 y VP4, para cada uno de los subtipos de VFA: A, Asia 1, O, C, SAT, SAT2 y SAT3. Las secuencias dadas a conocer pueden utilizarse para generar constructos que pueden incluirse en vacunas.

Los constructos incluyen una forma larga y una forma corta. La figura 1 muestra una forma parcialmente genérica de cada uno. Tal como se muestra en la figura 17, en la presente invención, los constructos proporcionan las proteínas víricas VP1, VP2, VP3 y VP4 en un orden específico. VP4 - VP2 - VP3 - VP1. Se proporciona además una cola opcional, 2A. Los constructos presentan una secuencia líder de IgE opcional. Al expresarse, se proporciona un sitio de corte proteolítico "SC" entre cada una de VP4, VP2, VP3 y VP1 y en caso de presencia de 2A. La proteasa que puede procesar el sitio puede ser la furina en algunas realizaciones. Pueden utilizarse otros sitios de proteasa. El sitio debe ser reconocido por una proteasa observada comúnmente en células en la que se expresa la vacuna.

En un aspecto de la presente exposición, hay proteínas de fusión que comprenden las proteínas de VFA de consenso VP1, VP2, VP3, VP4 y/o 3C y, en un aspecto de la presente invención, según las reivindicaciones adjuntas, se

proporcionan secuencias de ácidos nucleicos codificantes de dichas proteínas, que pueden generarse y utilizarse en una vacuna para proporcionar protección a los mamíferos frente a la enfermedad de la fiebre aftosa en uno o más subtipos de VFA, incluyendo A, Asia 1, O, C, SAT1, SAT2 y SAT3.

5 En otro aspecto de la presente exposición, hay proteínas de fusión que comprenden proteínas VP1 de VFA de consenso y, en un aspecto de la presente invención según las reivindicaciones adjuntas, se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos codificantes de dichas proteínas, de dos subtipos diferentes que pueden generarse y utilizarse en una vacuna para proporcionar protección de mamíferos frente a la enfermedad de la fiebre aftosa en uno o más subtipos de VFA, incluyendo A, Asia 1, O, C, SAT1, SAT2 y SAT3.

10 En otro aspecto de la presente exposición, hay proteínas VP1 de VFA de consenso y, en un aspecto de la presente invención según las reivindicaciones adjuntas, se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos codificantes de las mismas, que pueden generarse y utilizarse en una vacuna para proporcionar protección de mamíferos frente a la enfermedad de la fiebre aftosa en uno o más subtipos de VFA, incluyendo A, Asia 1, O, C, SAT1, SAT2 y SAT3.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania
Inovio Pharmaceuticals, Inc.
20 Weiner, David B.
Yan, Jian
Sardesai, Niranjana
Muthumani, Karupiah

25 <120> PROTEÍNAS DE CONSENSO DE VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA (vfa), SECUENCIAS CODIFICANTES DE LAS MISMAS Y VACUNAS PREPARADAS A PARTIR DE LAS MISMAS

<130> 133172.3302

30 <150> US 61/802,225
<151> 2013-03-15

<150> US 61/794,197
35 <151> 2013-03-15

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.5

40 <210> 1
<211> 2421
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> VFA-A24cruzeiro-Ácido nucleico largo

ES 2 817 903 T3

<400> 1
ggatccgcca ccatggattg gacatggatt ctgttcctgg tggctgctgc tactagagtg 60
cattcagggg ccggacagtc ttcacccgca accggatcac agaaccagag tggaaatacc 120
gggagcatca ttaacaatta ctatatgcag cagtaccaga acagcatgga cacacagctg 180
ggggataacg ccatcagcgg cggcagcaat gagggctcca cagataccac atctactcac 240
actaccaata ccagaacaa tgactggttc tctaaactgg caagctccgc cttcaccggc 300
ctctttggag ctctgctcgc aaggggaaga aagaggagaa gcgataagaa aacagaggaa 360
accaccctgc tggaggacag aatcctgacc acaagaaacg ggcacactac cagcacaact 420
cagtcttcag tgggctgcac acacggatac tcaactgagg aagaccatgt ggccggggcca 480
aataccagtg gcctggagac acgagtggtc caggctgaaa ggttctacaa gaaatatctg 540
tttgactgga ccacagataa ggccttcggc cacctggaga aactggaact cccctcagac 600
caccacggcg tgttcggcca tctggtcgat agctacgcct atatgagaaa cggatgggac 660
gtggaggtct ccgctgtggg caaccagttc aatggcggat gcctgctcgt ggctatggtg 720
cccgagtgga aggaatttga taccaggga aaataccagc tgacactctt cccacaccag 780
tttatctctc ctagaactaa catgaccgcc catattaccg tgccttatct gggcgtcaat 840
cggtagcacc agtataagaa acacaaacct tggaccctgg tggcatggt ggtcagtc 900

ES 2 817 903 T3

```

ctcacagtga acaataactag cgccgctcag atcaaggtct acgccaacat tgctccaacc      960
tatgtgcacg tcgcaggaga gctgccttcc aaggaacggg gacgcaaacg gcgctctggg      1020
atcttcccag tggcatgtgc tgacggatac ggagggctgg tctactaccg ccctaagacc      1080
gcagatcccg cctacggaaa agtgtataac ccacccagga ctaattacco agggcggttc      1140
accaacctgc tcgatgtggc agaggcctgc cccaccttcc tgtgctttga cgatggcaag      1200
ccatacgtga caactcggac agacgatact cgcctgctcg ccaagtttga cctgagcctc      1260
gcagccaaac acatgtcaaa cacctacctg agtggaatcg ccagtacta tactcagtat      1320
tccgggacca ttaatctgca ttcatgttt accggctcta cagactcaaa ggctcgctac      1380
atggtggcat atatccctcc cggcgtcgag accccacctg atacacctga aagggtgca      1440
cactgcatcc atgccgagtg ggacacagga ctgaacagca agttcacttt ttccattccc      1500
tacgtgtctg ccgctgacta cgcttatacc gcatccgata ctgccgaaac cattaacgtg      1560
cagggatggg tctgtatcta ccagattact caccggaaag ccgagaatga caccctggtg      1620
gtctccgtgt ctgctggcaa ggacttcgaa ctgcgcctcc ctatcgatcc ccgacagcag      1680
cgaggcagga agcgaaggag caccacagcc accggagagt ccgctgacct tgtgactacc      1740
acagtcgaga actacggcgg agaaacacag attcagagac ggcaccatac tgacatcgga      1800
ttcattatgg atagatttgt gaagatccag tcaactgagtc ccaccacgt gattgatctc      1860
atgcagacac accagcatgg actggtgggg gccctgctcc gagcagcaac ctactacttc      1920
agcgacctgg agatcgtggt ccgccatgaa ggcaacctga catgggtgcc aaatggagcc      1980
cctgagtcag ctctgctcaa cactagtaat cccaccgcat acaacaaagc ccccttcacc      2040
cggttgccac tcccctatac agccccacac cggctgctgg ccacagtcta caatggcact      2100
tctaagtatg ctgtgggcgg cagcggcagg aggggcgaca tggggtccct cgctgcacgg      2160
gtggtcaagc agctgccagc ttctttcaac tacggagcaa tcaaagctga cgcaattcac      2220
gagctgctcg tgcgcatgaa gcgagcagaa ctgtattgcc ccaggccact gctcgctatc      2280
gaggtgagta gccaggacag acataagcag aaaatcattg ccccgctaa gcagctgctc      2340
agaggccgga agagacgatc taattttgac ctgctcaagc tcgccggaga cgtggaatct      2400
aatcctggat gataactcga g

```

- 5 <210> 2
 <211> 799
 <212> PRT
 <213> Sequencia artificial
- 10 <220>
 <223> A24cruzeiro-Aminoácido largo

ES 2 817 903 T3

<400> 2

```

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1          5          10          15

His Ser Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln
          20          25          30

Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr
          35          40          45

Gln Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly
          50          55          60

Ser Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr
65          70          75          80

Gln Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Thr Gly
          85          90          95

Leu Phe Gly Ala Leu Leu Ala Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Asp Lys
          100          105          110

Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg
          115          120          125

Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser Val Gly Val Thr His
          130          135          140

Gly Tyr Ser Thr Glu Glu Asp His Val Ala Gly Pro Asn Thr Ser Gly
145          150          155          160

Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala Glu Arg Phe Tyr Lys Lys Tyr Leu
          165          170          175

Phe Asp Trp Thr Thr Asp Lys Ala Phe Gly His Leu Glu Lys Leu Glu
          180          185          190

Leu Pro Ser Asp His His Gly Val Phe Gly His Leu Val Asp Ser Tyr
          195          200          205

Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp Val Glu Val Ser Ala Val Gly Asn
          210          215          220

Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu Val Ala Met Val Pro Glu Trp Lys
225          230          235          240

Glu Phe Asp Thr Arg Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln
          245          250          255

```

ES 2 817 903 T3

Phe Ile Ser Pro Arg Thr Asn Met Thr Ala His Ile Thr Val Pro Tyr
 260 265 270
 Leu Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Lys His Lys Pro Trp Thr
 275 280 285
 Leu Val Val Met Val Val Ser Pro Leu Thr Val Asn Asn Thr Ser Ala
 290 295 300
 Ala Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn Ile Ala Pro Thr Tyr Val His Val
 305 310 315 320
 Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly
 325 330 335
 Ile Phe Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Gly Leu Val Thr Thr
 340 345 350
 Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ala Tyr Gly Lys Val Tyr Asn Pro Pro
 355 360 365
 Arg Thr Asn Tyr Pro Gly Arg Phe Thr Asn Leu Leu Asp Val Ala Glu
 370 375 380
 Ala Cys Pro Thr Phe Leu Cys Phe Asp Asp Gly Lys Pro Tyr Val Thr
 385 390 395 400
 Thr Arg Thr Asp Asp Thr Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Leu Ser Leu
 405 410 415
 Ala Ala Lys His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ser Gly Ile Ala Gln Tyr
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Ile Asn Leu His Phe Met Phe Thr Gly
 435 440 445
 Ser Thr Asp Ser Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Ile Pro Pro Gly
 450 455 460
 Val Glu Thr Pro Pro Asp Thr Pro Glu Arg Ala Ala His Cys Ile His
 465 470 475 480
 Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile Pro
 485 490 495
 Tyr Val Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Thr Ala Glu
 500 505 510

ES 2 817 903 T3

Thr Ile Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His Gly
 515 520 525
 Lys Ala Glu Asn Asp Thr Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys Asp
 530 535 540
 Phe Glu Leu Arg Leu Pro Ile Asp Pro Arg Gln Gln Arg Gly Arg Lys
 545 550 555 560
 Arg Arg Ser Thr Thr Ala Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr
 565 570 575
 Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Ile Gln Arg Arg His His
 580 585 590
 Thr Asp Ile Gly Phe Ile Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln Ser Leu
 595 600 605
 Ser Pro Thr His Val Ile Asp Leu Met Gln Thr His Gln His Gly Leu
 610 615 620
 Val Gly Ala Leu Leu Arg Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu
 625 630 635 640
 Ile Val Val Arg His Glu Gly Asn Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala
 645 650 655
 Pro Glu Ser Ala Leu Leu Asn Thr Ser Asn Pro Thr Ala Tyr Asn Lys
 660 665 670
 Ala Pro Phe Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val
 675 680 685
 Leu Ala Thr Val Tyr Asn Gly Thr Ser Lys Tyr Ala Val Gly Gly Ser
 690 695 700
 Gly Arg Arg Gly Asp Met Gly Ser Leu Ala Ala Arg Val Val Lys Gln
 705 710 715 720
 Leu Pro Ala Ser Phe Asn Tyr Gly Ala Ile Lys Ala Asp Ala Ile His
 725 730 735
 Glu Leu Leu Val Arg Met Lys Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro Arg Pro
 740 745 750
 Leu Leu Ala Ile Glu Val Ser Ser Gln Asp Arg His Lys Gln Lys Ile
 755 760 765
 Ile Ala Pro Ala Lys Gln Leu Leu Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Asn
 770 775 780
 Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
 785 790 795

ES 2 817 903 T3

<210> 3
<211> 2145
<212> ADN
<213> Sequencia artificial

5

<220>
<223> A24cruzeiro-Ácido nucleico corto

<400> 3
ggatccgccca ccattggactg gacctggatt ctgttcctcg tcgccgcgcg aacacgggtg 60
cattcagaca aaaagaccga agagactaca ctcttgagg atagaatcct gaccacacgg 120
aacggccaca ctacctccac aactcagagc tccgtggcg tcacacacgg atacagcact 180
gaggaagacc atgtggccgg gccaaatacc tccggcctgg agacaagggt ggtccaggct 240
gaaagattct acaagaagta tctcttcgac tggaccacag ataaggcctt cggacacctg 300
gagaaactgg aactcccctc tgaccaccac ggcgtgttcg gccatctggt cgattcatac 360
gcctatatga ggaacggatg ggacgtggag gtctccgctg tgggcaacca gttcaatggc 420
ggatgcctgc tcgtggctat ggtgcccag tggaaggaat ttgataccag ggaaaaatac 480
cagctgacac tcttcccaca ccagtttatc tctcctagaa ctaacatgac cgcccatatt 540
acagtgcctt atctggcgt caatcggtac gaccagtata agaaacacaa accttgacc 600
ctggtggtca tgggtgtgag cccctgaca gtgaacaata cttctgccgc tcagatcaag 660
gtctacgcaa acattgcccc aacctatgtg cagctcgccg gcgagctgcc ttcaaaggaa 720
cgcgagacgaa aaaggagaag tgggatcttc ccagtggcat gtgctgacgg atacggcgga 780
ctggtcacta ccgaccctaa gaccgctgat cccgcatacg ggaaagtgt taaccacccc 840
aggactaatt acccaggccg cttcaccaat ctgctcgatg tggcagaggc ctgccccacc 900
ttcctgtgct ttgacgatgg caagccatac gtgacaactc gcacagacga tactcgactg 960
ctcgccaagt ttgacctgag cctcgagcc aaacacatga gcaacaccta cctgtccgga 1020
atcgcccagt actatactca gtatagcggg accattaatc tgcatttcat gtttaccggc 1080
tcaacagaca gtaaagcccg ctacatggtg gcttatatcc ctcccggagt cgagacccca 1140
cctgatacac ctgaaagggc tgcaactgc atccatgccg agtgggacac agggctgaac 1200
tctaagttca ctttttcaat tccctacgtg agtgccgctg actacgccta taccgccagc 1260
gatactgccg agaccatcaa cgtgcaggga tgggtctgta tctaccagat tactcacggg 1320

10

ES 2 817 903 T3

```

aaagccgaga atgacaccct ggtggtgagc gtgagcgccg gaaaggactt cgaactgcga      1380
ctccctatcg atccaaggca gcagaggggc agaaagcggc gctctaccac agcaaccgga      1440
gagtcagccg accctgtgac taccacagtc gagaactacg gaggggaaac acagattcag      1500
cgaaggcacc ataccgacat cgggttcatt atggatagat ttgtgaagat ccagtccctg      1560
tctcccacac acgtgattga tctcatgcag acccaccagc atggactggt gggggccctg      1620
ctccgagcag caacatacta cttcagcgac ctggagatcg tgggccgcca tgaaggcaac      1680
ctgacctggg tgccaaatgg agcacctgag agcgccctgc tcaacacttc caatcccacc      1740
gcttacaaca aagcaccctt caccagactg gctctccctt atacagcacc acaccgggtg      1800
ctggcaacag tctacaatgg gactagtaag tatgcagtgg gcggaagcgg cagacgggga      1860
gatatggggg ccctcgctgc acgggtgggtc aagcagctgc cagcctcttt caactacggc      1920
gctatcaaag ctgacgcaat tcacgagctg ctcgctcgaa tgaagagggc tgaactgtat      1980
tgcccccgcc cactgctcgc aatcgaggtg tcttcacagg accgacataa gcagaaaatc      2040
attgcccccg ctaagcagct gctcaggggc aggaaaagac gcagtaattt cgacctctc      2100
aagctcgcag gcgacgtgga atctaacccc ggctgataac tcgag                        2145

```

5
 <210> 4
 <211> 707
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> A24cruzeiro-Aminoácido corto

```

<400> 4
Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1              5              10              15

His Ser Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg Ile
                20              25              30

Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser Val
              35              40              45

Gly Val Thr His Gly Tyr Ser Thr Glu Glu Asp His Val Ala Gly Pro
50              55              60

Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala Glu Arg Phe Tyr
65              70              75              80

Lys Lys Tyr Leu Phe Asp Trp Thr Thr Asp Lys Ala Phe Gly His Leu
85              90              95

```

ES 2 817 903 T3

Glu Lys Leu Glu Leu Pro Ser Asp His His Gly Val Phe Gly His Leu
 100 105 110

Val Asp Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp Val Glu Val Ser
 115 120 125

Ala Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu Val Ala Met Val
 130 135 140

Pro Glu Trp Lys Glu Phe Asp Thr Arg Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Leu
 145 150 155 160

Phe Pro His Gln Phe Ile Ser Pro Arg Thr Asn Met Thr Ala His Ile
 165 170 175

Thr Val Pro Tyr Leu Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Lys His
 180 185 190

Lys Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ser Pro Leu Thr Val Asn
 195 200 205

Asn Thr Ser Ala Ala Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn Ile Ala Pro Thr
 210 215 220

Tyr Val His Val Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu Arg Gly Arg Lys
 225 230 235 240

Arg Arg Ser Gly Ile Phe Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Gly
 245 250 255

Leu Val Thr Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ala Tyr Gly Lys Val
 260 265 270

Tyr Asn Pro Pro Arg Thr Asn Tyr Pro Gly Arg Phe Thr Asn Leu Leu
 275 280 285

Asp Val Ala Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Cys Phe Asp Asp Gly Lys
 290 295 300

Pro Tyr Val Thr Thr Arg Thr Asp Asp Thr Arg Leu Leu Ala Lys Phe
 305 310 315 320

Asp Leu Ser Leu Ala Ala Lys His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ser Gly
 325 330 335

Ile Ala Gln Tyr Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Ile Asn Leu His Phe
 340 345 350

ES 2 817 903 T3

Met Phe Thr Gly Ser Thr Asp Ser Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr
355 360 365

Ile Pro Pro Gly Val Glu Thr Pro Pro Asp Thr Pro Glu Arg Ala Ala
370 375 380

His Cys Ile His Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr
385 390 395 400

Phe Ser Ile Pro Tyr Val Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser
405 410 415

Asp Thr Ala Glu Thr Ile Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln
420 425 430

Ile Thr His Gly Lys Ala Glu Asn Asp Thr Leu Val Val Ser Val Ser
435 440 445

Ala Gly Lys Asp Phe Glu Leu Arg Leu Pro Ile Asp Pro Arg Gln Gln
450 455 460

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Thr Thr Ala Thr Gly Glu Ser Ala Asp
465 470 475 480

Pro Val Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Ile Gln
485 490 495

Arg Arg His His Thr Asp Ile Gly Phe Ile Met Asp Arg Phe Val Lys
500 505 510

Ile Gln Ser Leu Ser Pro Thr His Val Ile Asp Leu Met Gln Thr His
515 520 525

Gln His Gly Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe
530 535 540

Ser Asp Leu Glu Ile Val Val Arg His Glu Gly Asn Leu Thr Trp Val
545 550 555 560

Pro Asn Gly Ala Pro Glu Ser Ala Leu Leu Asn Thr Ser Asn Pro Thr
565 570 575

Ala Tyr Asn Lys Ala Pro Phe Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr Ala
580 585 590

Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn Gly Thr Ser Lys Tyr Ala

ES 2 817 903 T3

595

600

605

Val Gly Gly Ser Gly Arg Arg Gly Asp Met Gly Ser Leu Ala Ala Arg
610 615 620

Val Val Lys Gln Leu Pro Ala Ser Phe Asn Tyr Gly Ala Ile Lys Ala
625 630 635 640

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

Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Ile Glu Val Ser Ser Gln Asp Arg His
660 665 670

Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln Leu Leu Arg Gly Arg Lys
675 680 685

Arg Arg Ser Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
690 695 700

Asn Pro Gly
705

<210> 5
<211> 2409
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Asl-Shamir-89-Ácido nucleico largo

<400> 5
ggatccgccca ccatggattg gacatggatt ctgttcctgg tcgccgccgc aacacgggtg 60
cattctgggg ccggacagtc ttcacctgct actgggagcc agaaccagag cggaaatata 120
gggtccatca ttaacaatta ctatatgcag cagtaccaga acagcatgga caccagctg 180
ggcgataacg ccatctccgg cggatctaata gagggatcta ctgacaccac atcaacacac 240
actaacaata ccagaacaa tgattgggtc agtagactcg ccagctccgc tttctctgga 300
ctgtttggag cactgctcgc ccggggccgc aagaggagat ccgacaagaa aaccgaggaa 360
accaccctgc tggaggatcg aatcctgaca actaggaacg gacataccac aagcactacc 420
cagtcttcag tgggagtcac ctacgggtat gctgtcgcag aagacgccgt gagtgggccc 480
aacacaagcg gcctggagac tagagtgcag caggctgaac ggttctttaa gaaacacctc 540
ttcgattgga cacctaatact ggcctttggc cattgctact atctggagct cccacccgaa 600
cacaaggggg tgtacggctc actgatgggg agttacgcat atatcgga cggatgggac 660
atcgaggtga ccgcagtcgg aaaccagttc aatggcggat gtctgctcgt ggctctggtc 720

ES 2 817 903 T3

```

cctgagctga aggaactcga tacaaggcag aaataccagc tgactctctt ccctcatcag      780
tttattaacc ccagaacaaa tatgactgcc cacatcaacg tgccttacgt cggcattaat      840
cggtagcacc agtatgccct ccataagcct tggaccctgg tggcatggt ggtcgctccc      900
ctgaccgtga agacaggagg gtccgagcag atcaaagtgt acatgaacgc cgctccaacc      960
tatgtgcacg tcgccggcga gctgccttca aaggaacgag gcaggaaacg gcgctctgga     1020
attgtgccag tcgcatgcgc tgacggatac ggaaacatgg tgacaactga cccaagacc      1080
gccgatccag tctatggaaa agtgttcaac ccaccagga ccaatctccc tgggcgattc      1140
acaaactttc tggatgtggc agaggcctgt ccacattcc tgcggtttgg ggaagtgcc      1200
ttcgtcaaga ccgtgaacag cggcgaccga ctgctcgcca aatttgacgt gagcctggcc      1260
gccggccaca tgagtaacac ctacctggct ggactcgcac agtactatac ccagtatagc      1320
gggacaatga atgtgcactt catgtttact ggcccaaccg acgctaaggc aagatacatg      1380
gtcgctatg tgcctcccg gatgacacca cctactgacc ctgagcacgc tgcacattgc      1440
atccacagcg aatgggatac tggcctcaac tccaaattca cttttctat tccctacctg      1500
tcagccgctg actacgccta tacagccagc gatgtggccg agaccacatc cgtccaggga      1560
tgggtgtgca tctaccagat taccacggc aaggctgagg gagacgcact ggtggtgagc      1620
gtgagcgccg ggaaagactt cgaatttcgg ctgcccgtgg atgcacgcca gcagagagga      1680
cgggaagcga ggtctactac cacaactggg gaatcagccg acccagtcac cacaactgtg      1740
gagaactacg gcggagaaac ccagacagca agacggctgc acaccgacgt ggccttcac      1800
ctcgatcgct ttgtgaagct gacagcccc aaaaatatcc agactctgga cctcatgcag      1860
attocatccc atactcgtt gggcgactg ctccaggatg ccacttacta tttcagcgac      1920
ctggaggtcg ctctcgtgca cactggacca gtcacctggg tgcctaacgg agcaccaaag      1980
gatgctctga acaatcagac caatccaaca gcctaccaga aacagcctat caccaggctg      2040
gctctcccat atacagcacc tcacagagtc ctggctaccg tgtacaacgg aaagaccgcc      2100
tacggcgaga ccacaagccg ccgaggcgac atggcagccc tggcccagcg gctctccgct      2160
cgctgcca catctttcaa ttacggagca gtgaaggccg atactatcac cgagctgctc      2220
attagatga aaagagccga aacctattgc ccagggccac tgctcgctct ggacactacc      2280
caggatagga gaaagcagga gatcattgcc ccagaaaaac aggtgctgcg cgccgaaaa      2340
agacggagta atttcgacct gctcaagctc gctggcgatg tggaaagtaa tcccgatga      2400
taactcgag                                     2409

```

5

<210> 6
 <211> 795
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Asl-Shamir-89-Aminoácido largo

ES 2 817 903 T3

<400> 6

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr
35 40 45

Gln Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly
50 55 60

Ser Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Asn Asn Thr
65 70 75 80

Gln Asn Asn Asp Trp Phe Ser Arg Leu Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly
85 90 95

Leu Phe Gly Ala Leu Leu Ala Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Asp Lys
100 105 110

Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg
115 120 125

Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser Val Gly Val Thr Tyr
130 135 140

Gly Tyr Ala Val Ala Glu Asp Ala Val Ser Gly Pro Asn Thr Ser Gly
145 150 155 160

Leu Glu Thr Arg Val Gln Gln Ala Glu Arg Phe Phe Lys Lys His Leu
165 170 175

Phe Asp Trp Thr Pro Asn Leu Ala Phe Gly His Cys Tyr Tyr Leu Glu
180 185 190

Leu Pro Thr Glu His Lys Gly Val Tyr Gly Ser Leu Met Gly Ser Tyr
195 200 205

Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp Ile Glu Val Thr Ala Val Gly Asn
210 215 220

ES 2 817 903 T3

Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu Val Ala Leu Val Pro Glu Leu Lys
 225 230 235 240
 Glu Leu Asp Thr Arg Gln Lys Tyr Gln Leu Thr Leu Phe Pro His Gln
 245 250 255
 Phe Ile Asn Pro Arg Thr Asn Met Thr Ala His Ile Asn Val Pro Tyr
 260 265 270
 Val Gly Ile Asn Arg Tyr Asp Gln Tyr Ala Leu His Lys Pro Trp Thr
 275 280 285
 Leu Val Val Met Val Val Ala Pro Leu Thr Val Lys Thr Gly Gly Ser
 290 295 300
 Glu Gln Ile Lys Val Tyr Met Asn Ala Ala Pro Thr Tyr Val His Val
 305 310 315 320
 Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Gly
 325 330 335
 Ile Val Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Asn Met Val Thr Thr
 340 345 350
 Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Val Tyr Gly Lys Val Phe Asn Pro Pro
 355 360 365
 Arg Thr Asn Leu Pro Gly Arg Phe Thr Asn Phe Leu Asp Val Ala Glu
 370 375 380
 Ala Cys Pro Thr Phe Leu Arg Phe Gly Glu Val Pro Phe Val Lys Thr
 385 390 395 400
 Val Asn Ser Gly Asp Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Val Ser Leu Ala
 405 410 415
 Ala Gly His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ala Gly Leu Ala Gln Tyr Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Met Asn Val His Phe Met Phe Thr Gly Pro
 435 440 445
 Thr Asp Ala Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Val Pro Pro Gly Met
 450 455 460
 Thr Pro Pro Thr Asp Pro Glu His Ala Ala His Cys Ile His Ser Glu
 465 470 475 480

ES 2 817 903 T3

Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile Pro Tyr Leu
 485 490 495
 Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Val Ala Glu Thr Thr
 500 505 510
 Ser Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His Gly Lys Ala
 515 520 525
 Glu Gly Asp Ala Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys Asp Phe Glu
 530 535 540
 Phe Arg Leu Pro Val Asp Ala Arg Gln Gln Arg Gly Arg Lys Arg Arg
 545 550 555 560
 Ser Thr Thr Thr Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val
 565 570 575
 Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Thr Ala Arg Arg Leu His Thr Asp
 580 585 590
 Val Ala Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Leu Thr Ala Pro Lys Asn
 595 600 605
 Ile Gln Thr Leu Asp Leu Met Gln Ile Pro Ser His Thr Leu Val Gly
 610 615 620
 Ala Leu Leu Arg Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Val Ala
 625 630 635 640
 Leu Val His Thr Gly Pro Val Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Lys
 645 650 655
 Asp Ala Leu Asn Asn Gln Thr Asn Pro Thr Ala Tyr Gln Lys Gln Pro
 660 665 670
 Ile Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala
 675 680 685
 Thr Val Tyr Asn Gly Lys Thr Ala Tyr Gly Glu Thr Thr Ser Arg Arg
 690 695 700
 Gly Asp Met Ala Ala Leu Ala Gln Arg Leu Ser Ala Arg Leu Pro Thr
 705 710 715 720
 Ser Phe Asn Tyr Gly Ala Val Lys Ala Asp Thr Ile Thr Glu Leu Leu
 725 730 735

ES 2 817 903 T3

Ile Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala
740 745 750

Leu Asp Thr Thr Gln Asp Arg Arg Lys Gln Glu Ile Ile Ala Pro Glu
755 760 765

Lys Gln Val Leu Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Asn Phe Asp Leu Leu
770 775 780

Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
785 790 795

<210> 7

<211> 2133

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Asl-Shamir-89-Ácido nucleico corto

<400> 7

ggatccgccca ccatggactg gacctggatt ctgttccttg tggccgccgc aactcgcgtg	60
cattcagata aaaagaccga agagactaca ctcttggaag acagaatcct gaccacaaga	120
aacggccata ctaccagcac aactcagagc tccgtgggag tcacctacgg gtatgctgtc	180
gcagaggacg ccgtgtccgg accaaacaca tctggccttg agactcgggt gcagcaggct	240
gaacgcttct ttaagaaaca cctcttcgat tggacaccta atctggcctt tggacattgc	300
tactatcttg agctccccac cgaacacaag ggggtgtacg gcagtctgat ggggagctac	360
gcttatatga gaaacggctg ggacatcgag gtgaccgcag tcgggaacca gttcaatggc	420
ggatgtctgc tcgtggctct ggtccctgag ctgaaggaa tcgatacaag gcagaaatac	480
cagctgactc tcttccctca tcagtttatt aacccagaa caaatatgac tgcccacatc	540
aacgtgccct acgtcggcat taatcggtag gaccagtag cactccataa gccttggaca	600
ctggtggtca tgggtggtgc tcccctgacc gtgaagacag ggggctccga gcagatcaaa	660
gtgtacatga acgccgtcc aacctatgtg cagctcgcgg gagagctgcc ttccaaggaa	720
aggggcagaa aaaggaggag cggaattgtg ccagtcgcct gcgctgacgg ctacggaaac	780
atggtgacca cagaccccaa gaccgccgat ccagtctatg ggaaagtgtt caaccaccc	840
aggaccaatc tccctggcag gttcacaac tttctggatg tggcagaggc ctgtcccaca	900
ttctgcggt ttggcgaagt gccattcgtc aagaccgtga acagcggaga ccgctgctc	960
gccaattttg atgtgagcct ggcagccggc cacatgtcca acacctacct ggccggactc	1020
gctcagtact ataccagta tagcgggaca atgaatgtgc acttcatgtt tactggccca	1080

ES 2 817 903 T3

```

accgacgcta aggcacggta catggtcgcc tatgtgcctc ccggcatgac accacctact 1140
gaccctgagc acgctgcaca ttgcatccac agcgaatggg atactggact caactcaaaa 1200
ttcaccttta gtattcccta cctgagcgcc gctgactacg catatacagc ctctgatgtg 1260
gccgagacta cctcagtcca ggggtgggtg tgcactctacc agattacca cggcaaggca 1320
gagggagacg ctctcgtggt gagcgtgagc gccggcaaag acttcgagtt caggctgcca 1380
gtggatgctc gacagcagcg gggacgcaag cggcgagta caactaccac aggggaaagc 1440
gccgatccag tcactaccac agtggagaac tacggagggg aaaccagac agctcgaag 1500
ctgcacaccg acgtggcatt catcctcgat cgctttgtga agctgacagc ccccaaaaat 1560
atccagactc tggacctcat gcagattcca tccatactc tgggtggcgc tctgctcagg 1620
tccgcaacct actatttctc tgacctggag gtcgctctcg tgcacactgg accagtcacc 1680
tgggtgccta acggagcacc aaaggatgcc ctgaacaatc agaccaatcc aacagcctac 1740
cagaaacagc ctatcacccg cctggccctc ccatatacag ctctcaccg agtcctggcc 1800
accgtgtaca acggaaagac cgcttatggg gagaccacca gcaggagggg cgacatggca 1860
gccctggcac agcgccctc agcccgactg cccacaagtt tcaattacgg ggctgtgaag 1920
gcagatacta tcaccgagct gctcattaga atgaaacggg cagaaacctt ttgcccag 1980
ccactgctcg ccctggacac aactcaggat cggcgaaagc aggagatcat tgcccagaa 2040
aaacaggtgc tgcgaggcag gaaaagacgc agtaatttcg acctcctcaa gctcgaggc 2100
gacgtggaat ctaatcccg atgataactc gag 2133

```

5
 <210> 8
 <211> 703
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Asl-Shamir-89-Aminoácido corto

```

<400> 8
Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1           5           10           15

His Ser Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg Ile
20           25           30

Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser Val
35           40           45

Gly Val Thr Tyr Gly Tyr Ala Val Ala Glu Asp Ala Val Ser Gly Pro
50           55           60

```

ES 2 817 903 T3

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

ES 2 817 903 T3

Val Ser Leu Ala Ala Gly His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ala Gly Leu
 325 330 335
 Ala Gln Tyr Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Met Asn Val His Phe Met
 340 345 350
 Phe Thr Gly Pro Thr Asp Ala Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Val
 355 360 365
 Pro Pro Gly Met Thr Pro Pro Thr Asp Pro Glu His Ala Ala His Cys
 370 375 380
 Ile His Ser Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser
 385 390 395 400
 Ile Pro Tyr Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Val
 405 410 415
 Ala Glu Thr Thr Ser Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr
 420 425 430
 His Gly Lys Ala Glu Gly Asp Ala Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly
 435 440 445
 Lys Asp Phe Glu Phe Arg Leu Pro Val Asp Ala Arg Gln Gln Arg Gly
 450 455 460
 Arg Lys Arg Arg Ser Thr Thr Thr Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val
 465 470 475 480
 Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Thr Ala Arg Arg
 485 490 495
 Leu His Thr Asp Val Ala Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Leu Thr
 500 505 510
 Ala Pro Lys Asn Ile Gln Thr Leu Asp Leu Met Gln Ile Pro Ser His
 515 520 525
 Thr Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp
 530 535 540
 Leu Glu Val Ala Leu Val His Thr Gly Pro Val Thr Trp Val Pro Asn
 545 550 555 560
 Gly Ala Pro Lys Asp Ala Leu Asn Asn Gln Thr Asn Pro Thr Ala Tyr
 565 570 575

ES 2 817 903 T3

Gln Lys Gln Pro Ile Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His
580 585 590

Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asn Gly Lys Thr Ala Tyr Gly Glu Thr
595 600 605

Thr Ser Arg Arg Gly Asp Met Ala Ala Leu Ala Gln Arg Leu Ser Ala
610 615 620

Arg Leu Pro Thr Ser Phe Asn Tyr Gly Ala Val Lys Ala Asp Thr Ile
625 630 635 640

Thr Glu Leu Leu Ile Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro Arg
645 650 655

Pro Leu Leu Ala Leu Asp Thr Thr Gln Asp Arg Arg Lys Gln Glu Ile
660 665 670

Ile Ala Pro Glu Lys Gln Val Leu Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Asn
675 680 685

Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
690 695 700

<210> 9
<211> 2421
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sat2-Ácido nucleico largo

<400> 9
ggatccgccca ccatggattg gacatggatt ctctttcttg tgcgcccgcc aacacgggtg 60
cactcagggg ctggacagtc ttcacctgct acaggctctc agaaccagag tggaaatacc 120
gggagcatca ttaacaatta ctatatgcag cagtaccaga actccatgga caccagctg 180
ggggataacg ccattctcagg cggaagtaat gaaggctcca ctgataccac atctacacac 240
actaacaata ccagaacaa tgactgggtc agtaaactgg ctgagagcgc attttccgga 300
ctcgtgggag cactgctcgc taggggaaga aagaggagat cagataagaa aacogaggaa 360
actaccctgc tggaggacag gatcgtgaca actagacatg gcaccacaac ttctaccaca 420
cagagctccg tcggaattac ctacgggtat gccgacgctg atagcttcag acctggcccc 480
aacacatccg gactggaaac tcgggtggag caggccgaac gcttctttaa gaaaaagctg 540
ttcgactgga cttctgataa gccttttgga accctccacg tgctggagct ccccaaagac 600

ES 2 817 903 T3

cagaagggga tctacggctc actgattgat gcatacgctc ataccgaaa cggatgggac 660
gtccagggtga cggccacatc aactcagttc aatgggggca gtctgctcgt cgctatgggtg 720
cccgagctgt cttcactcaa ggaaagagag gaattccagc tgacactcta tccacaccag 780
tttatcaacc ctcggaacca tactaccgcc catattcagg tcccttacct gggagtgaac 840
cgacacgacc aggggaagcg gcatcaggcc tggtcactgg tggtcatggg gctgaccccc 900
ctcacaactg aggtcagat gaatagtgga acagtccaag tgtacgcaa catcgcccca 960
accaatgtct tcgtggcagg agagatgcct gcaaacagc gaggacgaaa gcgacgaagc 1020
ggaatcattc cagtggcttg cgcagacggc tacggagggt ttcagaacac cgaccctaag 1080
acagccgata ccatctacgg atatgtgtac aaccctagtc gcaatgattg ccacgggagg 1140
tatagcaacc tgctcgacgt ggccgaggct tgctccacac tgctcaattt cgatggaaag 1200
ccatacgtgg tcacaaaaaa caatggggac aaggtcatgg cttgtttcga tgtggccttc 1260
accacaaaag tccataagaa cacttttctg gctggccccg cagactacta taccagtagc 1320
cagggcagcc tgaactatca cttcatgtac acagggccaa ctcaccataa agccaagttt 1380
atggtggctt atatcccccc aggggtcgag accgacaaac tgcccaagac accagaagat 1440
gccgctcact gctaccattc tgagtgggac accggcctga actcacagtt cacatttgct 1500
gtcccatatg tcagtccaag cgacttcagc tacaccaca cagatactcc tgcaatggcc 1560
accacaaatg gctggatcgc tgtctaccag gtgaccgaca cacattccgc agaagcagca 1620
gtggtcgtgt ccgtgtctgc tggaccagac ctggagttca gatttcctat tgatcccgtg 1680
cgacagaggg gcagaaagcg aaggtctact acctcagccg ggggaaggcg tgacgtcgtg 1740
acaactgata catctacaca cggcggagtg gagaaaagac ggatgcatac cgacgtcgcc 1800
ttcgtgctgg atcgctttac tcacgtgcat accaacaaga ccacattcaa tgtcgacctg 1860
atggatacaa aaaaggccct ggtgggagca ctgctcaggg ctagcaccta ctatttctgc 1920
gatctggaga tcgcctgtgt gggagaacac aagagagtct tttggcagcc aaacggagca 1980
cctcgaacta ccagctggg cgacaacccc atggtcttca gccacaatgt gactcgcttt 2040
gcaatcccct ataccgcccc acataggctg ctctccaccg tgtataacgg cgagtgtaaa 2100
tacacagtgg ccattagagg agaccgggct gtccctggctg caaagtacgc cactcacacc 2160
ctccctagca cattcaactt tggccatgtg actgccgaca aaccctcgca tgtgtactat 2220
cgcatgaagc gagctgaact gtattgcca aggcctctgc tcccagcata ccaccgagac 2280
cgcttcgatg cccaatcgg cgtggagaaa cagctgtgta actttgacct gctcaaacctc 2340
cgaggaagga agcgcgata caacttcgac ctgctcaagc tggccggcga tgtggagtct 2400
aatcccgat gataaactga g 2421

5 <210> 10
<211> 799
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sat2-Aminoácido largo

ES 2 817 903 T3

<400> 10

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr
35 40 45

Gln Asn Ser Met Asp Thr Gln Leu Gly Asp Asn Ala Ile Ser Gly Gly
50 55 60

Ser Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Asn Asn Thr
65 70 75 80

Gln Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Gln Ser Ala Phe Ser Gly
85 90 95

Leu Val Gly Ala Leu Leu Ala Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Asp Lys
100 105 110

Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg Ile Val Thr Thr Arg
115 120 125

His Gly Thr Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser Val Gly Ile Thr Tyr
130 135 140

Gly Tyr Ala Asp Ala Asp Ser Phe Arg Pro Gly Pro Asn Thr Ser Gly
145 150 155 160

Leu Glu Thr Arg Val Glu Gln Ala Glu Arg Phe Phe Lys Lys Lys Leu
165 170 175

Phe Asp Trp Thr Ser Asp Lys Pro Phe Gly Thr Leu His Val Leu Glu
180 185 190

Leu Pro Lys Asp Gln Lys Gly Ile Tyr Gly Ser Leu Ile Asp Ala Tyr
195 200 205

Ala Tyr Thr Arg Asn Gly Trp Asp Val Gln Val Thr Ala Thr Ser Thr

ES 2 817 903 T3

210	215	220
Gln Phe Asn Gly Gly Ser Leu Leu Val Ala Met Val Pro Glu Leu Ser 225 230 235 240		
Ser Leu Lys Glu Arg Glu Glu Phe Gln Leu Thr Leu Tyr Pro His Gln 245 250 255		
Phe Ile Asn Pro Arg Thr Asn Thr Thr Ala His Ile Gln Val Pro Tyr 260 265 270		
Leu Gly Val Asn Arg His Asp Gln Gly Lys Arg His Gln Ala Trp Ser 275 280 285		
Leu Val Val Met Val Leu Thr Pro Leu Thr Thr Glu Ala Gln Met Asn 290 295 300		
Ser Gly Thr Val Glu Val Tyr Ala Asn Ile Ala Pro Thr Asn Val Phe 305 310 315 320		
Val Ala Gly Glu Met Pro Ala Lys Gln Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser 325 330 335		
Gly Ile Ile Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Gly Phe Gln Asn 340 345 350		
Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ile Tyr Gly Tyr Val Tyr Asn Pro 355 360 365		
Ser Arg Asn Asp Cys His Gly Arg Tyr Ser Asn Leu Leu Asp Val Ala 370 375 380		
Glu Ala Cys Pro Thr Leu Leu Asn Phe Asp Gly Lys Pro Tyr Val Val 385 390 395 400		
Thr Lys Asn Asn Gly Asp Lys Val Met Ala Cys Phe Asp Val Ala Phe 405 410 415		
Thr His Lys Val His Lys Asn Thr Phe Leu Ala Gly Pro Ala Asp Tyr 420 425 430		
Tyr Thr Gln Tyr Gln Gly Ser Leu Asn Tyr His Phe Met Tyr Thr Gly 435 440 445		
Pro Thr His His Lys Ala Lys Phe Met Val Ala Tyr Ile Pro Pro Gly 450 455 460		

ES 2 817 903 T3

Val	Glu	Thr	Asp	Lys	Leu	Pro	Lys	Thr	Pro	Glu	Asp	Ala	Ala	His	Cys	
465					470					475					480	
Tyr	His	Ser	Glu	Trp	Asp	Thr	Gly	Leu	Asn	Ser	Gln	Phe	Thr	Phe	Ala	
				485					490					495		
Val	Pro	Tyr	Val	Ser	Ala	Ser	Asp	Phe	Ser	Tyr	Thr	His	Thr	Asp	Thr	
			500					505						510		
Pro	Ala	Met	Ala	Thr	Thr	Asn	Gly	Trp	Ile	Ala	Val	Tyr	Gln	Val	Thr	
		515					520						525			
Asp	Thr	His	Ser	Ala	Glu	Ala	Ala	Val	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ala	Gly	
	530					535						540				
Pro	Asp	Leu	Glu	Phe	Arg	Phe	Pro	Ile	Asp	Pro	Val	Arg	Gln	Arg	Gly	
545					550					555					560	
Arg	Lys	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Gly	Glu	Gly	Ala	Asp	Val	Val	
				565					570					575		
Thr	Thr	Asp	Pro	Ser	Thr	His	Gly	Gly	Val	Glu	Lys	Arg	Arg	Met	His	
			580					585						590		
Thr	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Leu	Asp	Arg	Phe	Thr	His	Val	His	Thr	Asn	
		595					600					605				
Lys	Thr	Thr	Phe	Asn	Val	Asp	Leu	Met	Asp	Thr	Lys	Lys	Ala	Leu	Val	
	610					615					620					
Gly	Ala	Leu	Leu	Arg	Ala	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Cys	Asp	Leu	Glu	Ile	
625					630					635					640	
Ala	Cys	Val	Gly	Glu	His	Lys	Arg	Val	Phe	Trp	Gln	Pro	Asn	Gly	Ala	
				645					650					655		
Pro	Arg	Thr	Thr	Gln	Leu	Gly	Asp	Asn	Pro	Met	Val	Phe	Ser	His	Asn	
			660					665					670			
Val	Thr	Arg	Phe	Ala	Ile	Pro	Tyr	Thr	Ala	Pro	His	Arg	Leu	Leu	Ser	
		675					680					685				
Thr	Val	Tyr	Asn	Gly	Glu	Cys	Lys	Tyr	Thr	Val	Ala	Ile	Arg	Gly	Asp	
	690					695					700					
Arg	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Lys	Tyr	Ala	Thr	His	Thr	Leu	Pro	Ser	Thr	
705					710					715					720	

ES 2 817 903 T3

Phe Asn Phe Gly His Val Thr Ala Asp Lys Pro Val Asp Val Tyr Tyr
725 730 735

Arg Met Lys Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Pro Ala
740 745 750

Tyr His Arg Asp Arg Phe Asp Ala Pro Ile Gly Val Glu Lys Gln Leu
755 760 765

Cys Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Asn
770 775 780

Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
785 790 795

<210> 11

<211> 2145

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sat2-Ácido nucleico corto

<400> 11

ggatccgccca ccatggactg gacttggatt ctgttcctgg tggctgccgc aacacgggtg	60
catagcgaca aaaagaccga agagactaca ctgctggagg acagaatcgt gaccacacgg	120
cacggcacta ccacaagcac taccagagc tccgtgggaa ttacctacgg gtatgccgac	180
gctgattctt tcagacctgg cccaacaca tcaggactgg aaactcgcgt ggagcaggcc	240
gaacgattct ttaagaaaaa gctgttcgac tggactagt ataagccttt tgggaccctc	300
cacgtgctgg agctcccaa agaccagaag gggatctacg gctccctgat tgatgcatac	360
gcctataccc gaaacggatg ggacgtccag gtgaccgcca caagcactca gttcaatgga	420
ggcagcctgc tcgtcgctat ggtgccagag ctgtcttcac tcaaagaaag agaggaattc	480
cagctgacac tctatccaca ccagtttatc aacctcggga ccaatacaac tgcccatatt	540
cagggtccctt acctgggagt gaacaggcac gaccaggga agagacatca ggctggagc	600
ctggtggtca tgggtgtgac cccctcacc acagaggctc agatgaattc cgggacagtc	660
gaagtgtacg ctaacatcgc accaaccaat gtcttcgtgg ctggcgagat gcctgcaaaa	720
cagcgcgggc gaaagaggag aagcggcatc attccagtgg cttgcgcaga cggatacggg	780
ggctttcaga acaccgaccc taagacagcc gatcccatct acggctatgt gtacaaccct	840
tcccggaatg attgccacgg ccgctattct aacctgctcg acgtggccga ggcttgtccc	900
acactgctca atttcgatgg aaagccatac gtggtcacca aaaacaatgg ggacaaggtc	960
atggcctgtt tcgatgtggc ttttacacac aaagtccata agaacacttt tctggccggc	1020

ES 2 817 903 T3

```

cccgtgact actataccca gtaccagggc agcctgaact atcacttcat gtacacaggg 1080
ccaactcacc ataaagcaaa gtttatgggt gcctatatcc cccagggcgt cgagaccgac 1140
aaactgccc aagacaccaga agatgccgct cactgctacc atagtgagtg ggataaccgga 1200
ctgaacagcc agttcacatt tgcggtccca tatgtcagtg ctacgactt ctcttacacc 1260
cacacagata ctctgcaat ggccactacc aatggctgga tcgccgtcta ccaggtgacc 1320
gacacacatt cagctgaagc agcagtggtc gtgtccgtgt ctgcaggacc agacctggag 1380
ttcaggtttc ctattgatcc cgtgaggcag agaggacgaa agcgacgac aacaactagt 1440
gcaggcgaag gagccgacgt cgtgaccaca gatccatcca cacacggagg ggtggagaaa 1500
cgaaggatgc ataccgacgt cgccttcgtg ctggatcgct ttactcacgt gcataccaac 1560
aagactacct tcaatgtcga cctgatggat accaaaaagg ctctcgtggg agcactgctc 1620
agggcctcta cctactatct ctgcgatctg gagatcgct gtgtggggga acacaagcga 1680
gtcttttggc agccaaacgg agcacctcga acaactcagc tgggcgacaa ccccatggtc 1740
ttctctcaca atgtgactcg ctttgctatc ccctataccg caccacatag gctgctctca 1800
acagtgtata acggcgagtg taaatacacc gtggcaattc gaggagaccg agcagtcctg 1860
gctgcaaagt acgccactca caccctccct tccacattca actttggcca tgtgactgcc 1920
gacaaacccg tcgatgtgta ctatcgaatg aagagggctg aactgtattg cccaagacct 1980
ctgctccccg cttaccaccg cgaccgattc gatgcacaa tcggagtgga gaaacagctg 2040
tgtaactttg acctgctcaa actcaggggg agaaagagac ggtcaaactt cgacctgctc 2100
aagctggccg gcgatgtgga gagtaatccc ggatgataac tcgag 2145

```

<210> 12

<211> 707

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sat2-Aminoácido corto

<400> 12

```

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1          5          10          15

```

```

His Ser Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg Ile
          20          25          30

```

```

Val Thr Thr Arg His Gly Thr Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser Val
          35          40          45

```

```

Gly Ile Thr Tyr Gly Tyr Ala Asp Ala Asp Ser Phe Arg Pro Gly Pro

```

ES 2 817 903 T3

50		55		60
Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Glu Gln Ala Glu Arg Phe Phe				
65		70		75
Lys Lys Lys Leu Phe Asp Trp Thr Ser Asp Lys Pro Phe Gly Thr Leu				
	85		90	95
His Val Leu Glu Leu Pro Lys Asp Gln Lys Gly Ile Tyr Gly Ser Leu				
	100		105	110
Ile Asp Ala Tyr Ala Tyr Thr Arg Asn Gly Trp Asp Val Gln Val Thr				
	115		120	125
Ala Thr Ser Thr Gln Phe Asn Gly Gly Ser Leu Leu Val Ala Met Val				
	130		135	140
Pro Glu Leu Ser Ser Leu Lys Glu Arg Glu Glu Phe Gln Leu Thr Leu				
145		150		155
Tyr Pro His Gln Phe Ile Asn Pro Arg Thr Asn Thr Thr Ala His Ile				
	165		170	175
Gln Val Pro Tyr Leu Gly Val Asn Arg His Asp Gln Gly Lys Arg His				
	180		185	190
Gln Ala Trp Ser Leu Val Val Met Val Leu Thr Pro Leu Thr Thr Glu				
	195		200	205
Ala Gln Met Asn Ser Gly Thr Val Glu Val Tyr Ala Asn Ile Ala Pro				
	210		215	220
Thr Asn Val Phe Val Ala Gly Glu Met Pro Ala Lys Gln Arg Gly Arg				
225		230		235
Lys Arg Arg Ser Gly Ile Ile Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly				
	245		250	255
Gly Phe Gln Asn Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ile Tyr Gly Tyr				
	260		265	270
Val Tyr Asn Pro Ser Arg Asn Asp Cys His Gly Arg Tyr Ser Asn Leu				
	275		280	285
Leu Asp Val Ala Glu Ala Cys Pro Thr Leu Leu Asn Phe Asp Gly Lys				
	290		295	300

ES 2 817 903 T3

Pro Tyr Val Val Thr Lys Asn Asn Gly Asp Lys Val Met Ala Cys Phe
 305 310 315 320
 Asp Val Ala Phe Thr His Lys Val His Lys Asn Thr Phe Leu Ala Gly
 325 330 335
 Pro Ala Asp Tyr Tyr Thr Gln Tyr Gln Gly Ser Leu Asn Tyr His Phe
 340 345 350
 Met Tyr Thr Gly Pro Thr His His Lys Ala Lys Phe Met Val Ala Tyr
 355 360 365
 Ile Pro Pro Gly Val Glu Thr Asp Lys Leu Pro Lys Thr Pro Glu Asp
 370 375 380
 Ala Ala His Cys Tyr His Ser Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Gln
 385 390 395 400
 Phe Thr Phe Ala Val Pro Tyr Val Ser Ala Ser Asp Phe Ser Tyr Thr
 405 410 415
 His Thr Asp Thr Pro Ala Met Ala Thr Thr Asn Gly Trp Ile Ala Val
 420 425 430
 Tyr Gln Val Thr Asp Thr His Ser Ala Glu Ala Ala Val Val Val Ser
 435 440 445
 Val Ser Ala Gly Pro Asp Leu Glu Phe Arg Phe Pro Ile Asp Pro Val
 450 455 460
 Arg Gln Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Thr Thr Ser Ala Gly Glu Gly
 465 470 475 480
 Ala Asp Val Val Thr Thr Asp Pro Ser Thr His Gly Gly Val Glu Lys
 485 490 495
 Arg Arg Met His Thr Asp Val Ala Phe Val Leu Asp Arg Phe Thr His
 500 505 510
 Val His Thr Asn Lys Thr Thr Phe Asn Val Asp Leu Met Asp Thr Lys
 515 520 525
 Lys Ala Leu Val Gly Ala Leu Leu Arg Ala Ser Thr Tyr Tyr Phe Cys
 530 535 540
 Asp Leu Glu Ile Ala Cys Val Gly Glu His Lys Arg Val Phe Trp Gln
 545 550 555 560

ES 2 817 903 T3

Pro Asn Gly Ala Pro Arg Thr Thr Gln Leu Gly Asp Asn Pro Met Val
565 570 575

Phe Ser His Asn Val Thr Arg Phe Ala Ile Pro Tyr Thr Ala Pro His
580 585 590

Arg Leu Leu Ser Thr Val Tyr Asn Gly Glu Cys Lys Tyr Thr Val Ala
595 600 605

Ile Arg Gly Asp Arg Ala Val Leu Ala Ala Lys Tyr Ala Thr His Thr
610 615 620

Leu Pro Ser Thr Phe Asn Phe Gly His Val Thr Ala Asp Lys Pro Val
625 630 635 640

Asp Val Tyr Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro Arg Pro
645 650 655

Leu Leu Pro Ala Tyr His Arg Asp Arg Phe Asp Ala Pro Ile Gly Val
660 665 670

Glu Lys Gln Leu Cys Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Arg Gly Arg Lys
675 680 685

Arg Arg Ser Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
690 695 700

Asn Pro Gly
705

<210> 13

<211> 5357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> A24cruzeiro-Largo en ácido nucleico de pVAX

<400> 13

gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta 60

atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 120

acttacggta aatggccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 180

aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 240

gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 300

ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcttgccat tatgcccagt acatgacctt 360

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 420

ES 2 817 903 T3

gcgggttttg cagtacatca atgggcgtgg atagcgggtt gactcacggg gatattccaag	480
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc	540
aaaatgtcgt aacaactccg ccccatcgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga	600
ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacct actgcttact ggcttatcga	660
aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttggg	720
accgagctcg gatccgccac catggattgg acatggattc tgttcctggt ggctgctgct	780
actagagtgc attcaggggc cggacagtct tcacccgcaa ccggatcaca gaaccagagt	840
ggaaataccg ggagcatcat taacaattac tatatgcagc agtaccagaa cagcatggac	900
acacagctgg gggataacgc catcagcggc ggagcaatg agggctccac agataccaca	960
tctactcaca ctaccaatac ccagaacaat gactgggttct ctaaactggc aagctccgcc	1020
ttcaccggcc tctttggagc tctgctcgca aggggaagaa agaggagaag cgataagaaa	1080
acagaggaaa ccaccctgct ggaggacaga atcctgacca caagaaacgg gcacactacc	1140
agcacaactc agtcttcagt gggcgtcaca cacggatact caactgagga agaccatgtg	1200
gccgggccaa ataccagtgg cctggagaca cgagtgggtc aggctgaaag gttctacaag	1260
aaatatctgt ttgactggac cacagataag gccttcggcc acctggagaa actggaactc	1320
ccctcagacc accacggcgt gttcggccat ctggtcgata gctacgccta tatgagaaac	1380
ggatgggacg tggaggtctc cgctgtgggc aaccagttca atggcggatg cctgctcgtg	1440
gctatggtgc ccgagtggaa ggaatttgat accagggaaa aataccagct gacactcttc	1500
ccacaccagt ttatctctcc tagaactaac atgaccgccc atattaccgt gccttatctg	1560
ggcgtcaatc ggtacgacca gtataagaaa cacaaacctt ggaccctggt ggtcatggtg	1620
gtcagtcccc tcacagtga caatactagc gccgctcaga tcaaggtcta cgccaacatt	1680
gctccaacct atgtgcacgt cgcaggagag ctgccttcca aggaacgggg acgcaaacgg	1740
cgctctggga tcttcccagt ggcattgtgct gacggatacg gagggctggt cactaccgac	1800
cctaagaccg cagatccgc ctacggaaaa gtgtataacc caccaggac taattacca	1860
gggcggttca ccaacctgct cgatgtggca gaggcctgcc ccacctcct gtgctttgac	1920
gatggcaagc catacgtgac aactcggaca gacgatactc gcctgctcgc caagtttgac	1980
ctgagcctcg cagccaaaca catgtcaaac acctacctga gtggaatcgc ccagtactat	2040
actcagtatt ccgggacat taatctgcat ttcatgttta ccggctctac agactcaaag	2100
gctcgctaca tgggtggcata taccctccc ggcgtcgaga cccacctga tacacctgaa	2160
agggctgcac actgcatcca tgccgagtgg gacacaggac tgaacagcaa gttcactttt	2220
tccattccct acgtgtctgc cgctgactac gcttataacc catccgatac tgccgaaacc	2280

ES 2 817 903 T3

attaacgtgc agggatgggt ctgtatctac cagattactc acgggaaagc cgagaatgac	2340
accctggtgg tctccgtgtc tgctggcaag gacttcgaac tgccctccc tatcgatccc	2400
cgacagcagc gaggcaggaa gcgaaggagc accacagcca ccggagagtc cgtgaccct	2460
gtgactacca cagtcgagaa ctacggcgga gaaacacaga ttcagagacg gcaccatact	2520
gacatcggat tcattatgga tagatttgtg aagatccagt cactgagtcc caccacgtg	2580
attgatctca tgcagacaca ccagcatgga ctggtggggg ccctgctccg agcagcaacc	2640
tactacttca gcgacctgga gatcgtggtc cgcctgaag gcaacctgac atgggtgcc	2700
aatggagccc ctgagtcagc tctgctcaac actagtaatc ccaccgata caacaaagcc	2760
cccttcccc ggctggcact cccctatata gcccacacc gcgtgctggc cacagtctac	2820
aatggcactt ctaagtatgc tgtgggcggc agcggcagga ggggcgacat ggggtccctc	2880
gctgcacggg tggtaagca gctgccagct tctttcaact acggagcaat caaagctgac	2940
gcaattcacg agctgctcgt gcgcatgaag cgagcagaac tgtattgcc caggccactg	3000
ctcgctatcg aggtgagtag ccaggacaga cataagcaga aaatcattgc ccccgctaag	3060
cagctgctca gaggccgaa gagacgatct aattttgacc tgctcaagct cgcggagac	3120
gtggaatcta atcctggatg ataactcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca	3180
gcctcgactg tgcccttag ttgccagcca tctgtgttt gccctccc cgtgccttcc	3240
ttgacctgg aaggtgccac tccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg	3300
cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggtgggg tggggcagga cagcaagggg	3360
gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctact	3420
gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc tctggttaagg	3480
ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc gccaaagatc tgatggcgca	3540
ggggatcaag ctctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg	3600
gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggcac	3660
aacagacaat cggctgctct gatgcgcgcg tgtccggct gtcagcgag gggcgcccg	3720
ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga actgcaagac gaggcagcgc	3780
ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg	3840
aagcgggaag ggactggctg ctattggcg aagtgcggg gcaggatctc ctgtcatctc	3900
acottgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcg ctgcatacgc	3960
ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta	4020
ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg	4080
cgcagccga actgttcgcc aggtcaagg cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg	4140
tgacctatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatgggtgga aaatggcgc tttctggat	4200

ES 2 817 903 T3

tcacgcgactg	tggccggctg	ggtgtggcgg	accgctatca	ggacatagcg	ttggctaccc	4260
gtgatattgc	tgaagagctt	ggcggcgaat	gggctgaccg	cttcctcgtg	ctttacggta	4320
tgcgcgctcc	cgattcgcag	cgcacgcct	tctatgcct	tcttgacgag	ttcttctgaa	4380
ttattaacgc	ttacaatttc	ctgatcggt	atcttctcct	tacgcacgtg	tgcggtatct	4440
cacaccgcat	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaacccctat	ttgtttatct	4500
ttctaaatac	attcaaatac	gtatccgctc	atgagacaat	aaccctgata	aatgcttcaa	4560
taatagcacg	tgctaaaact	tcatttttaa	tttaaaagga	tctaggtgaa	gatccttttt	4620
gataatctca	tgacaaaaat	cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	gtcagacccc	4680
gtagaaaaga	tcaaaggatc	ttcttgagat	cctttttttc	tgccggtaat	ctgctgcttg	4740
caaacaaaaa	aaccaccgct	accagcgggt	gtttgtttgc	cggatcaaga	gctaccaact	4800
ctttttccga	aggtaactgg	cttcagcaga	gcgcagatac	caaatactgt	tcttctagt	4860
tagccgtagt	taggccacca	cttcaagaac	tctgtagcac	cgcctacata	cctcgcctct	4920
ctaactcgt	taccagtggc	tgctgccagt	ggcgataagt	cgtgtcttac	cgggttgga	4980
tcaagacgat	agttaccgga	taaggcgcag	cggtcgggct	gaacgggggg	ttcgtgcaca	5040
cagcccagct	tggagcgaac	gacctacacc	gaactgagat	acctacagcg	tgagctatga	5100
gaaagcgcca	cgtctcccca	aggagaaaag	gcggacaggt	atccggtaag	cggcagggtc	5160
ggaacaggag	agcgcacgag	ggagcttcca	gggggaaacg	cctggtatct	ttatagtcct	5220
gtcgggtttc	gccacctctg	acttgagcgt	cgttttttgt	gatgctcgtc	agggggggcg	5280
agcctatgga	aaaacgccag	caacgcggcc	tttttacggt	tcctggcctt	ttgctggcct	5340
tttgctcaca	tgcttctt					5357

<210> 14
 <211> 5081
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> A24cruzeiro-Corto en ácido nucleico de pVAX

<400> 14						
gactcttcgc	gatgtacggg	ccagatatac	gcgttgacat	tgattattga	ctagttatta	60
atagtaatca	attacggggt	cattagttca	tagcccatat	atggagttcc	gcgttacata	120
acttacggta	aatggcccg	ctggctgacc	gccaacgac	ccccgcccat	tgacgtcaat	180
aatgacgtat	gttcccatag	taacgccaat	agggactttc	cattgacgtc	aatgggtgga	240
gtatttacgg	taaaactgcc	acttggcagt	acatcaagt	tatcatatgc	caagtacgcc	300
ccctattgac	gtcaatgacg	gtaaatggcc	cgcctggcat	tatgcccagt	acatgacctt	360

ES 2 817 903 T3

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat	420
gcgggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag	480
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc	540
aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga	600
ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacct actgcttact ggcttatcga	660
aattaatacg actcactata gggagacca agctggctag cgtttaaact taagcttggc	720
accgagctcg gatccgccac catggactgg acctggattc tgttcctcgt cgcgcgcga	780
acacgggtgc attcagacaa aaagaccgaa gagactacac tcctggagga tagaatcctg	840
accacacgga acggccacac tacctccaca actcagagct ccgtgggcgt cacacacgga	900
tacagcaactg aggaagacca tgtggccggg ccaaatacct ccggcctgga gacaagggtg	960
gtccaggctg aaagattcta caagaagtat ctcttcgact ggaccacaga taaggccttc	1020
ggacacctgg agaaactgga actcccctct gaccaccacg gcgtgttcgg ccctctggtc	1080
gattcatacg cctatatgag gaacggatgg gacgtggagg tctccgctgt gggcaaccag	1140
ttcaatggcg gatgcctgct cgtggctatg gtgcccgagt ggaaggaatt tgataccagg	1200
gaaaaatacc agctgacact ctccacacac cagtttatct ctctagaac taacatgacc	1260
gcccataatta cagtgcctta tctgggcgtc aatcggtacg accagtataa gaaacacaaa	1320
ccttggaacc ttggtggtcat ggtggtgagc ccctgacag tgaacaatac ttctgccgt	1380
cagatcaagg tctacgcaaa cattgcccc aacctatgtc acgtcgccgg cgagctgcct	1440
tcaaaggaac gcggacgaaa aaggagaagt gggatcttcc cagtggcatg tgctgacgga	1500
tacggcggac tggctactac cgaccctaag accgctgac ccgcatacgg gaaagtgtat	1560
aaccacccca ggactaatta ccaggccgc ttaccaatc tgctcgatgt ggcagaggcc	1620
tgccccacct tcctgtgctt tgacgatggc aagccatacg tgacaactcg cacagacgat	1680
actcgactgc tcgccaaagt tgacctgagc ctgcagcca aacacatgag caacacctac	1740
ctgtccggaa tcgccagta ctatactcag tatagcggga ccattaatct gcatttcatg	1800
tttaccggct caacagacag taaagccgc tacatggtgg cttatatccc tcccggagtc	1860
gagacccac ctgatacacc tgaaagggtc gcacactgca tccatgccga gtgggacaca	1920
gggctgaact ctaagttcac tttttcaatt ccctacgtga gtgccgctga ctacgcctat	1980
accgccagcg atactgccga gaccatcaac gtgcagggat gggctctgtat ctaccagatt	2040
actcacggga aagccgagaa tgacacctg gtggtgagcg tgagcgccgg aaaggacttc	2100
gaactgcgac tcctatcga tccaaggcag cagaggggca gaaagcggcg ctctaccaca	2160
gcaaccggag agtcagccga ccctgtgact accacagtcg agaactacgg aggggaaaca	2220
cagattcagc gaaggcacca taccgacatc gggttcatta tggatagatt tgtgaagatc	2280

ES 2 817 903 T3

cagtcacctgt cccccacaca cgtgattgat ctcatgcaga cccaccagca tggactgggtg	2340
ggggccctgc tccgagcagc aacatactac ttcagcgacc tggagatcgt ggtccgccat	2400
gaaggcaacc tgacctgggt gccaaatgga gcacctgaga gcgccctgct caacacttcc	2460
aatcccaccg cttacaacaa agcacccttc accagactgg ctctccccta tacagcacca	2520
caccgggtgc tggcaacagt ctacaatggg actagtaagt atgcagtggg cggaagcggc	2580
agacggggag atatggggtc cctcgctgca cgggtgggtca agcagctgcc agcctcttcc	2640
aactacggcg ctatcaaagc tgacgcaatt cacgagctgc tcgtgcgaat gaagagggtc	2700
gaactgtatt gcccccgccc actgctcgca atcgaggtgt cttcacagga ccgacataag	2760
cagaaaatca ttgccccgcg taagcagctg ctccggggca ggaaaagacg cagtaatttc	2820
gacctctca agctcgagc cgacgtggaa tctaaccctg gctgataact cgagtctaga	2880
gggcccgttt aaaccgctg atcagcctcg actgtgcctt ctagtggcca gccatctgtt	2940
gtttgcccct ccccgctgcc ttccttgacc ctggaagggt ccactccac tgcctttcc	3000
taataaaatg aggaaattgc atcgcatgtt ctgagtaggt gtcattctat tctgggggt	3060
ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat	3120
gcggtgggct ctatggcttc tactgggcgg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc	3180
cagctggggc gccctctggt aagggtggga agcctcgca agtaaaactg atggctttct	3240
tgccgccaag gatctgatgg cgcaggggat caagctctga tcaagagaca ggatgaggat	3300
cgtttcgcat gattgaacaa gatggattgc acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga	3360
ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggtg ctctgatgcc gccgtgttcc	3420
ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga	3480
atgaactgca agacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg	3540
cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc	3600
cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg	3660
atgcaatgcg gcggtgcat acgcttgatc cggtacctg ccattcgac caccaagcga	3720
aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaaagccg tcttgctgat caggatgatc	3780
tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgagca	3840
tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg	3900
tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct	3960
atcaggacat agcgttggct acccgatgata ttgctgaaga gcttgccggc gaatgggctg	4020
accgcttcct cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc	4080
gccttcttga cgagttcttc tgaattatta acgcttataa tttcctgatg cggtatcttc	4140

ES 2 817 903 T3

tcccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg	4200
cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga	4260
caataaccct gataaatgct tcaataatag cacgtgctaa aacttcattt ttaatttaaa	4320
aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt	4380
tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt	4440
tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt	4500
ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag	4560
ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta	4620
gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat	4680
aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg	4740
ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgacctt caccgaactg	4800
agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac	4860
aggatccgg taagcggcag ggtcgggaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga	4920
aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt	4980
ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta	5040
cggttctctg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct t	5081

<210> 15
 <211> 5345
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Asl-Shamir-89-Largo en ácido nucleico de pVAX

<400> 15	
gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta	60
atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata	120
acttacggta aatggcccg cttggctgacc gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat	180
aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga	240
gtattttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc	300
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt	360
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatgggtgat	420
gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag	480
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc	540
aaaatgtcgt aacaactccg ccccatgac gcaaattggc ggtaggcgtg tacgggtgga	600
ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga	660

ES 2 817 903 T3

aattaatacgc	actcactata	gggagaccca	agctggctag	cgttttaaact	taagcttggt	720
accgagctcg	gatccgccac	catggattgg	acatggattc	tgttcctggg	cgccgccgca	780
acacgggtgc	attcttgggc	cggacagtct	tcacctgcta	ctgggagcca	gaaccagagc	840
ggaaatacag	ggtccatcat	taacaattac	tatatgcagc	agtaccagaa	cagcatggac	900
accagctgg	gcgataacgc	catctccggc	ggatctaata	agggatctac	tgacaccaca	960
tcaacacaca	ctaacaatac	ccagaacaat	gattgggttc	gtagactcgc	cagctccgct	1020
ttctctggac	tgtttgagc	actgctcgcc	cggggccgca	agaggagatc	cgacaagaaa	1080
accgaggaaa	ccaccctgct	ggaggatcga	atcctgacaa	ctaggaacgg	acataccaca	1140
agcactaccc	agtcttcagt	gggagtcacc	tacgggtatg	ctgtcgcaga	agacgccgtg	1200
agtgggcccc	acacaagcgg	cctggagact	agagtgcagc	aggctgaacg	gttctttaag	1260
aaacacctct	tcgattggac	acctaactct	gcctttggcc	attgctacta	tctggagctc	1320
cccaccgaac	acaagggggg	gtacggctca	ctgatgggga	gttacgcata	tatgcggaac	1380
ggatgggaca	tcgaggtgac	cgcagtcgga	aaccagttca	atggcggatg	tctgctcgtg	1440
gctctggtcc	ctgagctgaa	ggaactcgat	acaaggcaga	aataccagct	gactctcttc	1500
cctcatcagt	ttattaaccc	cagaacaaat	atgactgccc	acatcaacgt	gcctacgtc	1560
ggcattaatc	ggtacgacca	gtatgccctc	cataagcctt	ggaccctggg	ggtcatggtg	1620
gtcgctcccc	tgaccgtgaa	gacaggaggg	tcggagcaga	tcaaagtgtg	catgaacgcc	1680
gctccaacct	atgtgcacgt	cgcggcgag	ctgccttcaa	aggaacgagg	caggaaacgg	1740
cgtcttgga	ttgtgccagt	cgcattgcgt	gacggatacg	gaaacatggt	gacaactgac	1800
cccaagaccg	ccgatccagt	ctatggaaaa	gtgttcaacc	caccagggac	caatctccct	1860
gggcgattca	caaactttct	ggatgtggca	gaggcctgtc	ccacattcct	gcggtttggg	1920
gaagtgccat	tcgtcaagac	cgtgaacagc	ggcgaccgac	tgctcgccaa	atttgacgtg	1980
agcctggccg	ccggccacat	gagtaacacc	tacctggctg	gactcgca	gtactatacc	2040
cagtatagcg	ggacaatgaa	tgtgcacttc	atgtttactg	gccaaccca	cgctaaggca	2100
agatacatgg	tcgcctatgt	gcctcccggg	atgacaccac	ctactgaccc	tgagcacgct	2160
gcacattgca	tccacagcga	atgggatact	ggcctcaact	ccaaattcac	cttttctatt	2220
ccctacctgt	cagccgctga	ctacgcctat	acagccagcg	atgtggccga	gaccacatcc	2280
gtccagggat	gggtgtgcat	ctaccagatt	acccacggca	aggctgaggg	agacgcactg	2340
gtggtgagcg	tgagcgccgg	gaaagacttc	gaatttcggc	tgcccggtga	tgcaagccag	2400
cagagaggac	ggaagcgaag	gtctactacc	acaactgggg	aatcagccga	cccagtcacc	2460
acaactgtgg	agaactacgg	cggagaaaacc	cagacagcaa	gacggctgca	caccgacgtg	2520

ES 2 817 903 T3

gccttcaccc tcgacgcctt tgtgaagctg acagccccc aaatatcca gactctggac 2580
ctcatgcaga ttccatccca tacactggtg ggcgcactgc tcaggagtgc cacttactat 2640
ttcagcgacc tggaggtcgc tctcgtgcac actggaccag tcacctgggt gcctaacgga 2700
gcaccaaagg atgctctgaa caatcagacc aatccaacag cctaccagaa acagcctatc 2760
accaggctgg ctctcccata tacagcacct cacagagtcc tggctaccgt gtacaacgga 2820
aagaccgcct acggcgagac cacaagccgc cgaggcgaca tggcagccct ggcccagcgg 2880
ctctccgctc gcctgccacc atctttcaat tacggagcag tgaaggccga tactatcacc 2940
gagctgctca ttaggatgaa aagagccgaa acctattgcc ccaggccact gctcgtctctg 3000
gacactaccc aggataggag aaagcaggag atcattgccc cagaaaaaca ggtgctgcgc 3060
ggccgaaaaa gacggagtaa ttccgacctg ctcaagctcg ctggcgatgt ggaaagtaat 3120
cccgatgat aactcgagtc tagagggccg gtttaaaccg gctgatcagc ctcgactgtg 3180
ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc cctcccccg tgccttcctt gacctggaa 3240
ggtgccactc ccaactgtcct ttctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt 3300
agggtgcatt ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa 3360
gacaatagca ggcattgctg ggatgcggtg ggctctatgg cttctactgg gcggttttat 3420
ggacagcaag cgaaccgga ttgccagctg gggcgccctc tggtaagggt gggaagccct 3480
gcaaagtaaa ctggatggct ttcttgccgc caaggatctg atggcgcagg ggatcaagct 3540
ctgatcaaga gacaggatga ggatcgtttc gcatgattga acaagatgga ttgcacgcag 3600
gttctccggc cgcttggtg gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa cagacaatcg 3660
gctgctctga tgcgcgctg ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccgtt ctttttgtca 3720
agaccgacct gtccggtgcc ctgaatgaac tgcaagacga ggcagcgcg ctatcgtggc 3780
tggccacgac gggcgctcct tgcgcagctg tgctcgacgt tgtcactgaa gcgggaaggg 3840
actggctgct attgggcgaa gtgccggggc aggatctcct gtcactcac cttgctcctg 3900
ccgagaaaat atccatcatg gctgatgcaa tgcggcggtt gcatacgctt gatccggcta 3960
cctgccatt cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact cggatggaag 4020
ccggtcttgt cgatcaggat gatctggacg aagagcatca ggggctcgcg ccagccgaac 4080
tgttcgccag gctcaaggcg agcatgccg acggcgagga tctcgtcgtg acccatggcg 4140
atgcctgctt gcgaatata atggtggaaa atggccgctt ttctggattc atcgactgtg 4200
gccggctggg tgtggcgagc cgtatcagg acatagcgtt ggctaccgt gatattgctg 4260
aagagcttgg cggcgaatgg gctgaccgct tcctcgtgct ttacggtatc gccgctcccg 4320
attcgagcg catcgcttc tatcgcttc ttgacgagtt cttctgaatt attaacgctt 4380
acaatttct gatgcggtat ttctcctta cgcactctgt cggatattca caccgcatca 4440

ES 2 817 903 T3

```

ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat 4500
tcaaataatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atagcacgtg 4560
ctaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg 4620
acaaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc 4680
aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa 4740
ccaccgctac cagcgggtgtt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttcggaag 4800
gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta 4860
ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta 4920
ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc tgtcttaccg gggtggactc aagacgatag 4980
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg 5040
gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg 5100
cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggttaagcg gcagggtcgg aacaggagag 5160
cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc 5220
cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 5280
aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg 5340
ttctt 5345

```

<210> 16

<211> 5069

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Asl-Shamir-89-Corto en ácido nucleico de pVAX

<400> 16

```

gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta 60
atagtaatca attacgggggt cattagttca tagcccatat atggagtacc gcgttacata 120
acttacggta aatggcccgcc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 180
aatgacgtat gttcccatag taacgcgaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 240
gtattttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 300
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt 360
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgtatta ccatggtgat 420
gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 480
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc 540
aaaatgtcgt aacaactccg ccccatgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 600

```

ES 2 817 903 T3

ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga	660
aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttggt	720
accgagctcg gatccgccac catggactgg acctggattc tgttcctggg ggcgcgcga	780
actcgctgc attcagataa aaagaccgaa gagactacac tcctggaaga cagaatcctg	840
accacaagaa acggccatac taccagcaca actcagagct ccgtgggagt cacctacggg	900
tatgctgtcg cagaggacgc cgtgtccgga ccaaacacat ctggcctgga gactcgggtg	960
cagcagctg aacgcttctt taagaaacac ctcttcgatt ggacacctaa tctggccttt	1020
ggacattgct actatctgga gctccccacc gaacacaagg ggggtgtacgg cagtctgatg	1080
gggagctacg cttatatgag aaacggctgg gacatcgagg tgaccgcagt cgggaaccag	1140
ttcaatggcg gatgtctgct cgtggctctg gtccctgagc tgaaggaaact cgatacaagg	1200
cagaaatacc agctgactct ctccctcat cagtttatta accccagaac aaatatgact	1260
gccacatca acgtgcccta cgtcggcatt aatcggtacg accagtatgc actccataag	1320
ccttggaacac tgggtggcat ggtggctcgt ccctgaccg tgaagacagg gggctccgag	1380
cagatcaaag tgtacatgaa cgcgcctcca acctatgtgc acgtcgccgg agagctgcct	1440
tccaaggaaa ggggcagaaa aaggaggagc ggaattgtgc cagtgcctg cgctgacggc	1500
taaggaaaca tggtgaccac agacccaag accgccgac cagtctatgg gaaagtgttc	1560
aaccaccca ggaccaatct ccctggcagg ttacaaaact ttctggatgt ggcagaggcc	1620
tgtcccatc tctgcggtt tggcgaagtg ccattcgtca agaccgtgaa cagcggagac	1680
cgctgctcg ccaaatttga tgtgagcctg gcagccggcc acatgtccaa cacctacctg	1740
gcgggactcg ctccagtaata taccagtat agcgggacaa tgaatgtgca cttcatgttt	1800
actggcccaa ccgacgctaa ggcacggtag atggctgcct atgtgcctcc cggcatgaca	1860
ccacctactg accctgagca cgctgcacat tgcattccca gcgaatggga tactggactc	1920
aactcaaaat tcaccttag tattccctac ctgagcgccg ctgactacgc atatacagcc	1980
tctgatgtgg ccgagactac ctccagtcag ggggtgggtg gcattctacca gattaccac	2040
ggcaaggcag agggagacgc tctcgtggtg agcgtgagcg ccggcaaaga cttcgagttc	2100
aggctgccag tggatgctcg acagcagcg ggcgcaagc ggcgcagtac aactaccaca	2160
ggggaaagcg ccgatccagt cactaccaca gtggagaact acggagggga aaccagaca	2220
gctcgaaggc tgcacaccca cgtggcattc atcctcgatc gctttgtgaa gctgacagcc	2280
ccaaaaata tccagactct ggacctcatg cagattccat ccataactct ggtgggcgct	2340
ctgctcaggt ccgcaacctc ctatttctct gacctggagg tcgctctcgt gcacactgga	2400
ccagtcacct gggcgcccta cggagacca aaggatgcc tgaacaatca gaccaatcca	2460
acagcctacc agaaacagcc tatcaccgc ctggccctcc catatacagc tcctcaccga	2520

gtcctggcca ccgtgtacaa cggaaagacc gcttatgggg agaccaccag caggaggggc	2580
gacatggcag ccttggcaca ggcctctca gcccgactgc ccacaagttt caattacggg	2640
gctgtgaagg cagatactat caccgagctg ctcatagaa tgaaacgggc agaaacctat	2700
tgccccaggc cactgctcgc cctggacaca actcaggatc gccgaaagca ggagatcatt	2760
gccccagaaa aacagggtgct gcgaggcagg aaaagacgca gtaatttcga cctcctcaag	2820
ctgcgaggcg acgtggaatc taatcccgga tgataactcg agtctagagg gcccgtttaa	2880
acccgctgat cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgccctcc	2940
cccgctcctt ccttgacctt ggaagggtgc actcccactg tcctttccta ataaaatgag	3000
gaaattgcat cgcattgtct gagtagtgt cattctattc tggggggtgg ggtggggcag	3060
gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct	3120
atggcttcta ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcc a gctggggcgc	3180
cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga	3240
tctgatggcg caggggatca agctctgatc aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga	3300
ttgaacaaga tgattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct	3360
atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc	3420
aggggcccgg ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcaag	3480
acgaggcagc gcgcgtatcg tggctggcca cgacgggctg tccttgccga gctgtgctcg	3540
acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc	3600
tcctgtcatc tcacctgtct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc	3660
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcga aa catcgcatcg	3720
agcgagcacg tactcggtat gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc	3780
atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgagcatg cccgacggcg	3840
aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc	3900
gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag	3960
cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg	4020
tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg	4080
agttcttctg aattattaac gcttacaatt tcctgatgcg gtattttctc cttacgcac	4140
tgtgcggtat ttcacaccgc atcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccct	4200
atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga	4260
taaatgcttc aataatagca cgtgctaaaa cttcattttt aattttaaag gatctaggtg	4320
aagatccttt ttgataatct catgacaaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga	4380

ES 2 817 903 T3

gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga ttttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 4440
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa 4500
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 4560
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 4620
tacctcgtc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcc gtggcgataa gtcgtgtctt 4680
accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 4740
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 4800
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggtg 4860
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat 4920
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 4980
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 5040
ttttgctggc cttttgctca catgttctt 5069

<210> 17

<211> 86

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Aminoácidos de Asl-ShamirVP4

<400> 17

Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser
1 5 10 15

Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln
20 25 30

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

Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Asn Asn Thr Gln
50 55 60

Asn Asn Asp Trp Phe Ser Arg Leu Ala Ser Ser Ala Phe Ser Gly Leu
65 70 75 80

Phe Gly Ala Leu Leu Ala
85

<210> 18

<211> 86

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Aminoácidos de As1- cruzeiroVP4

ES 2 817 903 T3

<400> 18

Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser
1 5 10 15

Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln
20 25 30

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

Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln
50 55 60

Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Thr Gly Leu
65 70 75 80

Phe Gly Ala Leu Leu Ala
85

<210> 19

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Aminoácidos de VFA-Asl- shamirVP2

<400> 19

Met Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg Ile Leu
1 5 10 15

Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser Val Gly
20 25 30

Val Thr Tyr Gly Tyr Ala Val Ala Glu Asp Ala Val Ser Gly Pro Asn
35 40 45

Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Gln Gln Ala Glu Arg Phe Phe Lys
50 55 60

Lys His Leu Phe Asp Trp Thr Pro Asn Leu Ala Phe Gly His Cys Tyr
65 70 75 80

Tyr Leu Glu Leu Pro Thr Glu His Lys Gly Val Tyr Gly Ser Leu Met
85 90 95

ES 2 817 903 T3

Gly Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp Ile Glu Val Thr Ala
100 105 110

Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu Val Ala Leu Val Pro
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Leu Asp Thr Arg Gln Lys Tyr Gln Leu Thr Leu Phe
130 135 140

Pro His Gln Phe Ile Asn Pro Arg Thr Asn Met Thr Ala His Ile Asn
145 150 155 160

Val Pro Tyr Val Gly Ile Asn Arg Tyr Gly Gln Tyr Ala Leu His Lys
165 170 175

Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ala Pro Leu Thr Val Lys Thr
180 185 190

Gly Gly Ser Glu Gln Ile Lys Val Tyr Met Asn Ala Ala Pro Thr Tyr
195 200 205

Val His Val Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu
210 215

<210> 20

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Aminoácidos de As1- cruzeiroVP2

<400> 20

Met Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg Ile Leu
1 5 10 15

Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser Val Gly
20 25 30

Val Thr His Gly Tyr Ser Thr Glu Glu Asp His Val Ala Gly Pro Asn
35 40 45

Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala Glu Arg Phe Tyr Lys
50 55 60

Lys Tyr Leu Phe Asp Trp Thr Thr Asp Lys Ala Phe Gly His Leu Glu
65 70 75 80

ES 2 817 903 T3

Lys Leu Glu Leu Pro Ser Asp His His Gly Val Phe Gly His Leu Val
85 90 95

Asp Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp Val Glu Val Ser Ala
100 105 110

Val Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu Val Ala Met Val Pro
115 120 125

Glu Trp Lys Glu Phe Asp Thr Arg Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Leu Phe
130 135 140

Pro His Gln Phe Ile Ser Pro Arg Thr Asn Met Thr Ala His Ile Thr
145 150 155 160

Val Pro Tyr Leu Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Lys His Lys
165 170 175

Pro Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ser Pro Leu Thr Val Asn Asn
180 185 190

Thr Ser Ala Ala Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn Ile Ala Pro Thr Tyr
195 200 205

Val His Val Ala Gly Glu Leu Pro Ser Lys Glu
210 215

5 <210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Aminoácidos de As1- shamir2A

<400> 21
Met Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro
1 5 10 15

Gly

15 <210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Aminoácidos de As1- cruzeiro2A

<400> 22
Met Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro
1 5 10 15

Gly

25 <210> 23
<211> 220

ES 2 817 903 T3

<212> PRT

<213> Sequencia artificial

<220>

5 <223> aminoácidos de As1- shamirVP3

<400> 23

Met Gly Ile Val Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Asn Met Val
1 5 10 15

Thr Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Val Tyr Gly Lys Val Phe Asn
20 25 30

Pro Pro Arg Thr Asn Leu Pro Gly Arg Phe Thr Asn Phe Leu Asp Val
35 40 45

Ala Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Arg Phe Gly Glu Val Pro Phe Val
50 55 60

Lys Thr Val Asn Ser Gly Asp Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Val Ser
65 70 75 80

Leu Ala Ala Gly His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ala Gly Leu Ala Gln
85 90 95

Tyr Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Met Asn Val His Phe Met Phe Thr
100 105 110

Gly Pro Thr Asp Ala Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Val Pro Pro
115 120 125

Gly Met Thr Pro Pro Thr Asp Pro Glu His Ala Ala His Cys Ile His
130 135 140

Ser Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile Pro
145 150 155 160

Tyr Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Val Ala Glu
165 170 175

Thr Thr Ser Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr His Gly
180 185 190

Lys Ala Glu Gly Asp Ala Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly Lys Asp
195 200 205

Phe Glu Phe Arg Leu Pro Val Asp Ala Arg Gln Gln
210 215 220

10

<210> 24

<211> 222

<212> PRT

15 <213> Sequencia artificial

<220>

<223> Aminoácidos de As1- cruzeiroVP3

ES 2 817 903 T3

<400> 24

Met Gly Ile Phe Pro Val Ala Cys Ala Asp Gly Tyr Gly Gly Leu Val
1 5 10 15

Thr Thr Asp Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ala Tyr Gly Lys Val Tyr Asn
20 25 30

Pro Pro Arg Thr Asn Tyr Pro Gly Arg Phe Thr Asn Leu Leu Asp Val
35 40 45

Ala Glu Ala Cys Pro Thr Phe Leu Cys Phe Asp Asp Gly Lys Pro Tyr
50 55 60

Val Thr Thr Arg Thr Asp Asp Thr Arg Leu Leu Ala Lys Phe Asp Leu
65 70 75 80

Ser Leu Ala Ala Lys His Met Ser Asn Thr Tyr Leu Ser Gly Ile Ala
85 90 95

Gln Tyr Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Ile Asn Leu His Phe Met Phe
100 105 110

Thr Gly Ser Thr Asp Ser Lys Ala Arg Tyr Met Val Ala Tyr Ile Pro
115 120 125

Pro Gly Val Glu Thr Pro Pro Asp Thr Pro Glu Arg Ala Ala His Cys
130 135 140

Ile His Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser
145 150 155 160

Ile Pro Tyr Val Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Thr
165 170 175

Ala Glu Thr Ile Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Ile Tyr Gln Ile Thr
180 185 190

His Gly Lys Ala Glu Asn Asp Thr Leu Val Val Ser Val Ser Ala Gly
195 200 205

Lys Asp Phe Glu Leu Arg Leu Pro Ile Asp Pro Arg Gln Gln
210 215 220

<210> 25

<211> 212

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Aminoácidos de As1- shamirVP1

ES 2 817 903 T3

<400> 25

Met Thr Thr Thr Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Thr Ala Arg Arg Leu His Thr Asp
20 25 30

Val Ala Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Leu Thr Ala Pro Lys Asn
35 40 45

Ile Gln Thr Leu Asp Leu Met Gln Ile Pro Ser His Thr Leu Val Gly
50 55 60

Ala Leu Leu Arg Ser Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Val Ala
65 70 75 80

Leu Val His Thr Gly Pro Val Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Lys
85 90 95

Asp Ala Leu Asn Asn Gln Thr Asn Pro Thr Ala Tyr Gln Lys Gln Pro
100 105 110

Ile Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala
115 120 125

Thr Val Tyr Asn Gly Lys Thr Ala Tyr Gly Glu Thr Thr Ser Arg Arg
130 135 140

Gly Asp Met Ala Ala Leu Ala Gln Arg Leu Ser Ala Arg Leu Pro Thr
145 150 155 160

Ser Phe Asn Tyr Gly Ala Val Lys Ala Asp Thr Ile Thr Glu Leu Leu
165 170 175

Ile Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala
180 185 190

Leu Asp Thr Thr Gln Asp Arg Arg Lys Gln Glu Ile Ile Ala Pro Glu
195 200 205

Lys Gln Val Leu
210

<210> 26

<211> 214

<212> PRT

<213> Sequencia artificial

<220>

<223> Aminoácidos de As1- cruzeiroVP1

ES 2 817 903 T3

<400> 26

Met Thr Thr Ala Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Ile Gln Arg Arg His His Thr Asp
20 25 30

Ile Gly Phe Ile Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln Ser Leu Ser Pro
35 40 45

Thr His Val Ile Asp Leu Met Gln Thr His Gln His Gly Leu Val Gly
50 55 60

Ala Leu Leu Arg Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Ile Val
65 70 75 80

Val Arg His Glu Gly Asn Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Glu
85 90 95

Ser Ala Leu Leu Asn Thr Ser Asn Pro Thr Ala Tyr Asn Lys Ala Pro
100 105 110

Phe Thr Arg Leu Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala
115 120 125

Thr Val Tyr Asn Gly Thr Ser Lys Tyr Ala Val Gly Gly Ser Gly Arg
130 135 140

Arg Gly Asp Met Gly Ser Leu Ala Ala Arg Val Val Lys Gln Leu Pro
145 150 155 160

Ala Ser Phe Asn Tyr Gly Ala Ile Lys Ala Asp Ala Ile His Glu Leu
165 170 175

Leu Val Arg Met Lys Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu
180 185 190

Ala Ile Glu Val Ser Ser Gln Asp Arg His Lys Gln Lys Ile Ile Ala
195 200 205

Pro Ala Lys Gln Leu Leu
210

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sitio de corte proteolítico

<400> 27

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
1 5

<210> 28

<211> 756

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Ácido nucleico de proteasa C3 de consenso

<400> 28

tactgcgtga	agaagcccg	ggccctgaag	gtgaaggcca	agaacaccct	gatcgtgacc	60
gagagcggcg	cccccccccac	cgacctgcag	aagatggtga	tgggcaaacac	caagcccg	120
gagctgatcc	tggacggcaa	gacctggcc	atctgctgcg	ccaccggcgt	gttcggcacc	180
gcctacctgg	tgccccgccca	cctgttcgcc	gagaagtacg	acaagatcat	gctggacggc	240
cgcgccatga	ccgacagcga	ctaccgcgtg	ttcgagtctg	agatcaaggt	gaagggccag	300
gacatgctga	gcgaccggc	cctgatggtg	ctgcaccgcg	gcaaccgcgt	gcgcgacatc	360
accaagcact	tccgcgacac	cgcccgcatg	aagaaggcca	cccccggtgt	ggcggtgatc	420
aacaacgccg	acgtggggccg	cctgatcttc	agcggcgagg	ccctgacctc	caaggacatc	480
gtggtgtgca	tggacggcga	caccatgccc	ggcctgttcg	cctacaaggc	cgccaccaag	540
gccggctact	gcggcgggcg	cgtgctggcc	aaggacggcg	ccgacacctt	catcgtgggc	600
accacagcg	ccggcgggccg	caacggcggtg	ggctactgca	gctgcgtgag	ccgcagcatg	660
ctgctgaaga	tgaaggccca	catcgacccc	gagccccacc	acgagggcct	gatcgtggac	720
acccgcgacg	tggaggagcg	cgtgcacgtg	atgtga			756

<210> 29

<211> 251

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de proteasa C3 de consenso

ES 2 817 903 T3

<400> 29

Tyr Cys Val Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Thr
1 5 10 15

Leu Ile Val Thr Glu Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met
20 25 30

Val Met Gly Asn Thr Lys Pro Val Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr
35 40 45

Val Ala Ile Cys Cys Ala Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val
50 55 60

Pro Arg His Leu Phe Ala Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly
65 70 75 80

Arg Ala Met Thr Asp Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys
85 90 95

Val Lys Gly Gln Asp Met Leu Ser Asp Ala Ala Leu Met Val Leu His
100 105 110

Arg Gly Asn Arg Val Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala
115 120 125

Arg Met Lys Lys Gly Thr Pro Val Val Gly Val Ile Asn Asn Ala Asp
130 135 140

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

Val Val Cys Met Asp Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys
165 170 175

Ala Ala Thr Lys Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys Asp
180 185 190

Gly Ala Asp Thr Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly Arg Asn
195 200 205

Gly Val Gly Tyr Cys Ser Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu Lys Met
210 215 220

Lys Ala His Ile Asp Pro Glu Pro His His Glu Gly Leu Ile Val Asp
225 230 235 240

Thr Arg Asp Val Glu Glu Arg Val His Val Met
245 250

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID nº 1, SEC ID nº 3, SEC ID nº 5, SEC ID nº 7, SEC ID nº 9 y SEC ID nº 11.
2. Plásmido que comprende una molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 1.
3. Vacuna que comprende uno o más plásmidos según la reivindicación 2.
4. Vacuna según la reivindicación 3 para la utilización en un método de generación de una respuesta inmunitaria contra el VFA en un individuo.
5. Vacuna según la reivindicación 3 para la utilización en un método de prevención de la infección por VFA en un individuo.
6. Vacuna según la reivindicación 3 para la utilización en un método de tratamiento de un individuo que ha sido infectado por el VFA.
7. Vacuna para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la vacuna induce una respuesta inmunitaria de reactividad cruzada en un sujeto vacunado contra múltiples subtipos de VFA.
8. Vacuna para la utilización según la reivindicación 7, en la que se seleccionan múltiples subtipos de VFA del grupo que consiste en A, Asia 1, C, O, SAT1, SAT2, SAT3 y SAT4.

Representación esquemática de constructos de vacuna de ADN de VFA-As1-Shamir89
(Serotipo: Asia 1)

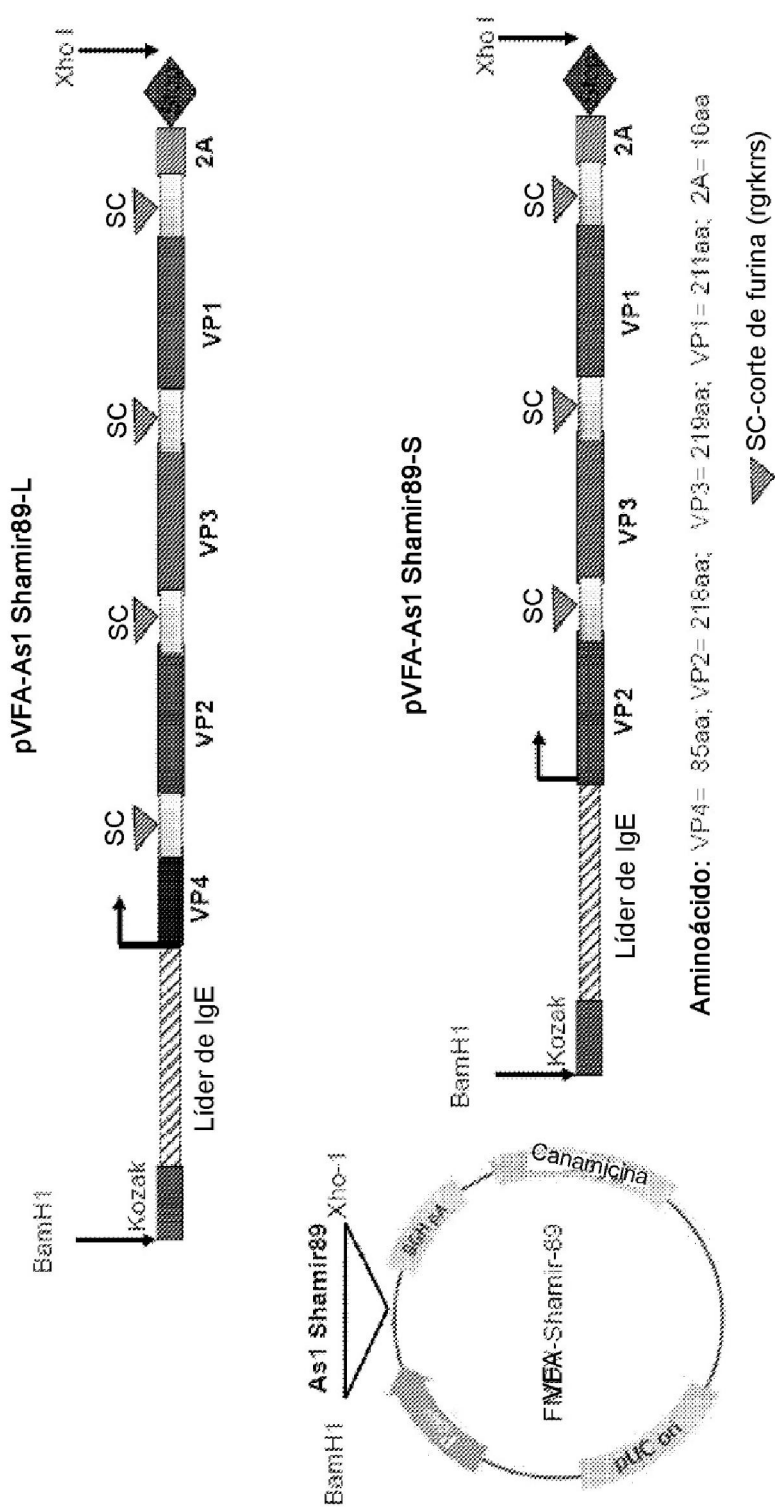


FIG. 1

VFA-As1-Shamir89

Análisis en gel de ADN y secuencia de aminoácidos

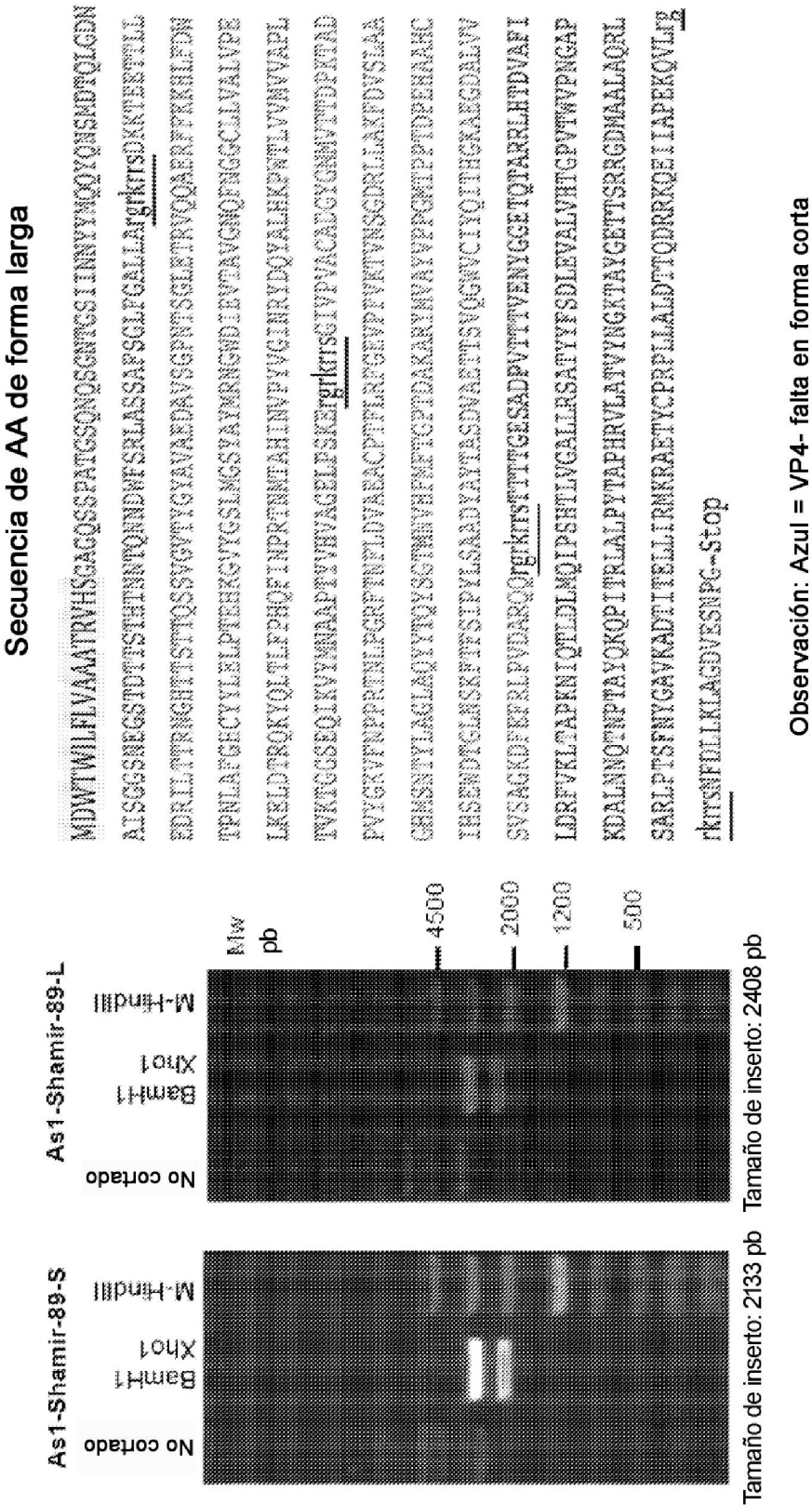


FIG. 2

Representación esquemática de constructos de VFA-A24cruzeiro

VFA-A24cruzeiro

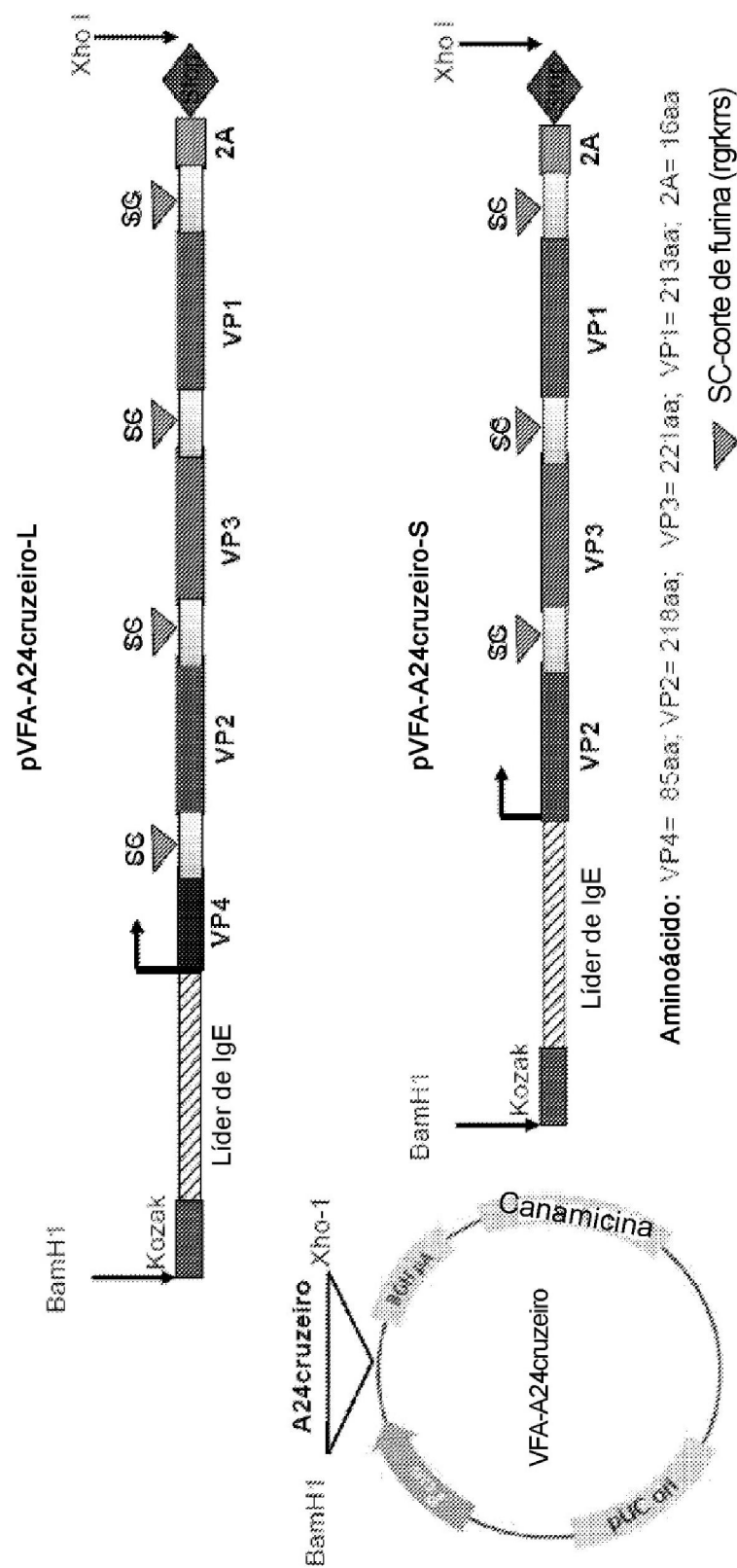
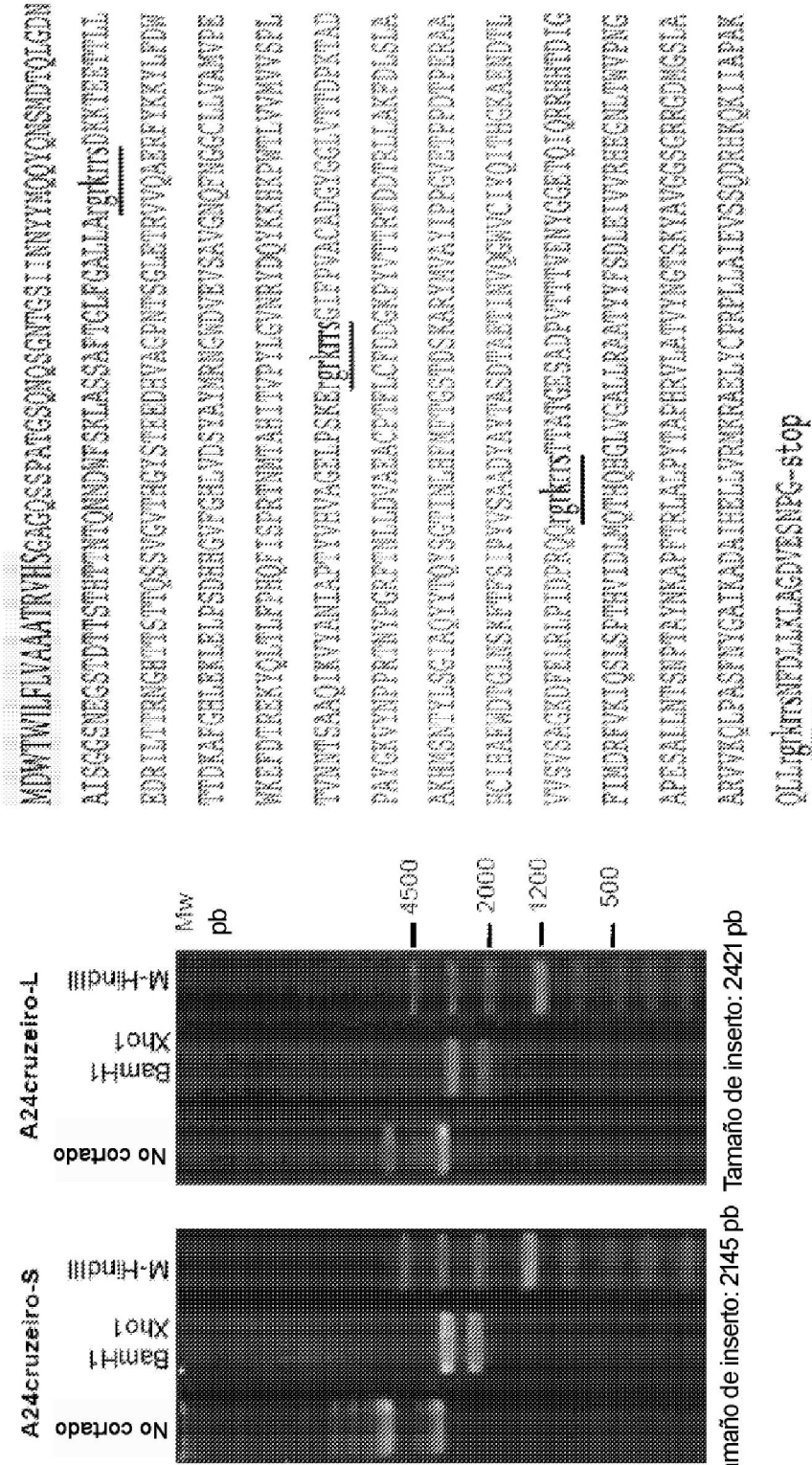


FIG. 3

VFA-A24cruzeiro

Análisis en gel de ADN y secuencia de aminoácidos

Secuencia de AA de forma larga



Observación: Azul=VP4- falta en forma corta

FIG. 4

Tamaño de inserto: 2145 pb Tamaño de inserto: 2421 pb

Representación esquemática de constructos de vacuna de vacuna de ADN de VFA-Sat2

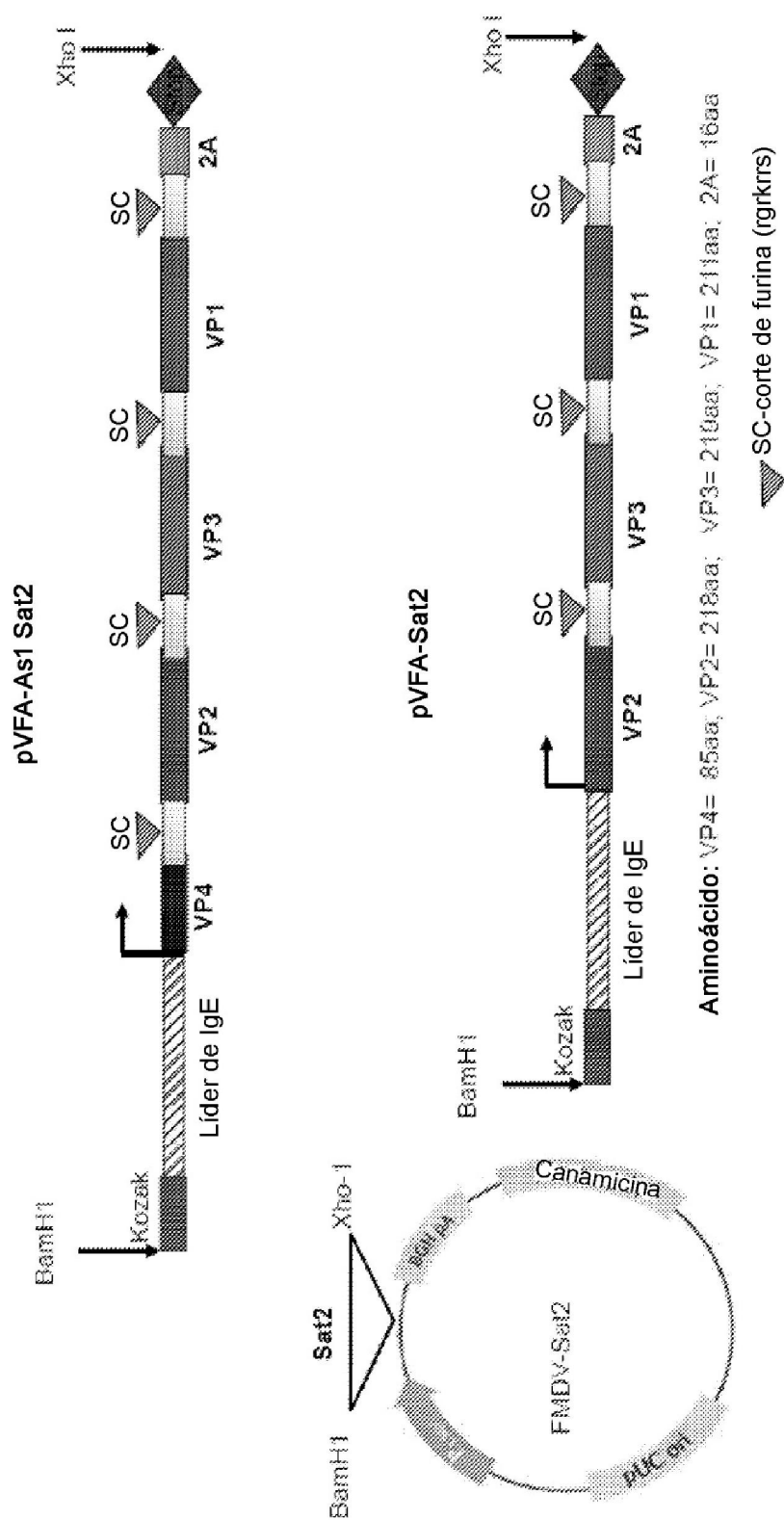
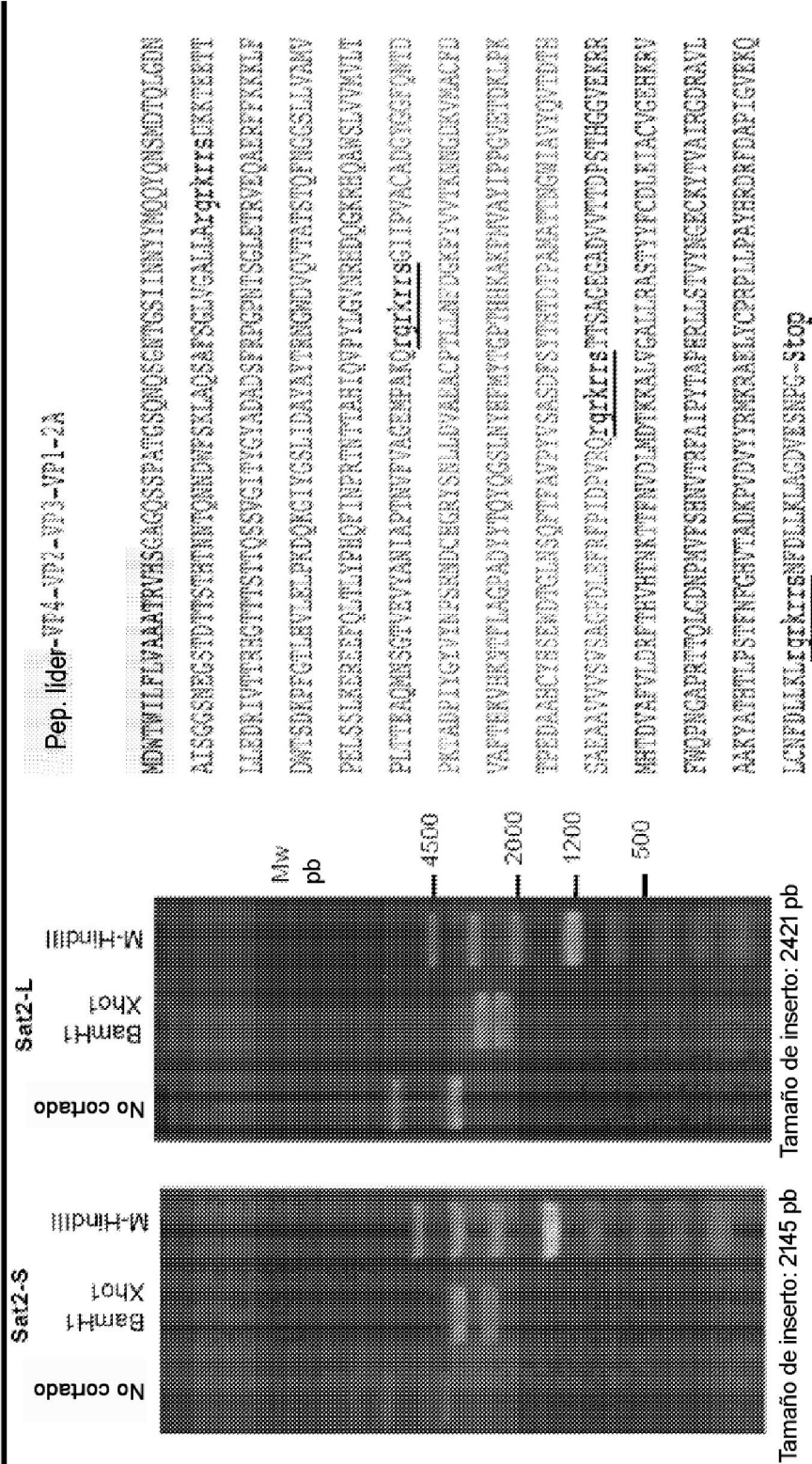


FIG. 5

VFA-Sat2

Análisis de ADN en gel y secuencia de aminoácidos



Observación: Azul=VP4 - falta en forma corta

FIG. 6

Expresión de proteínas (sueros de VFA-A24)

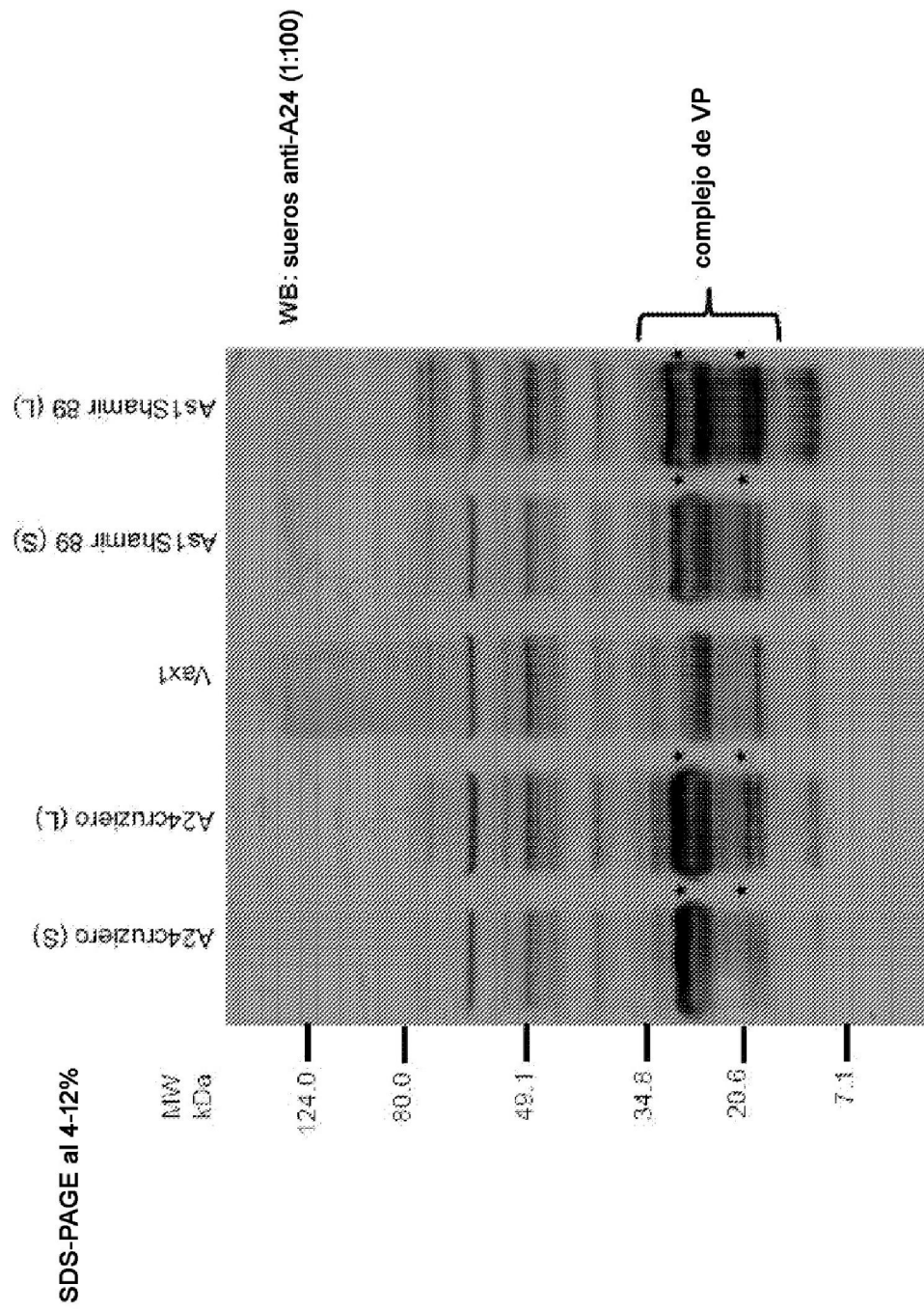


FIG. 7

Programa de inmunización

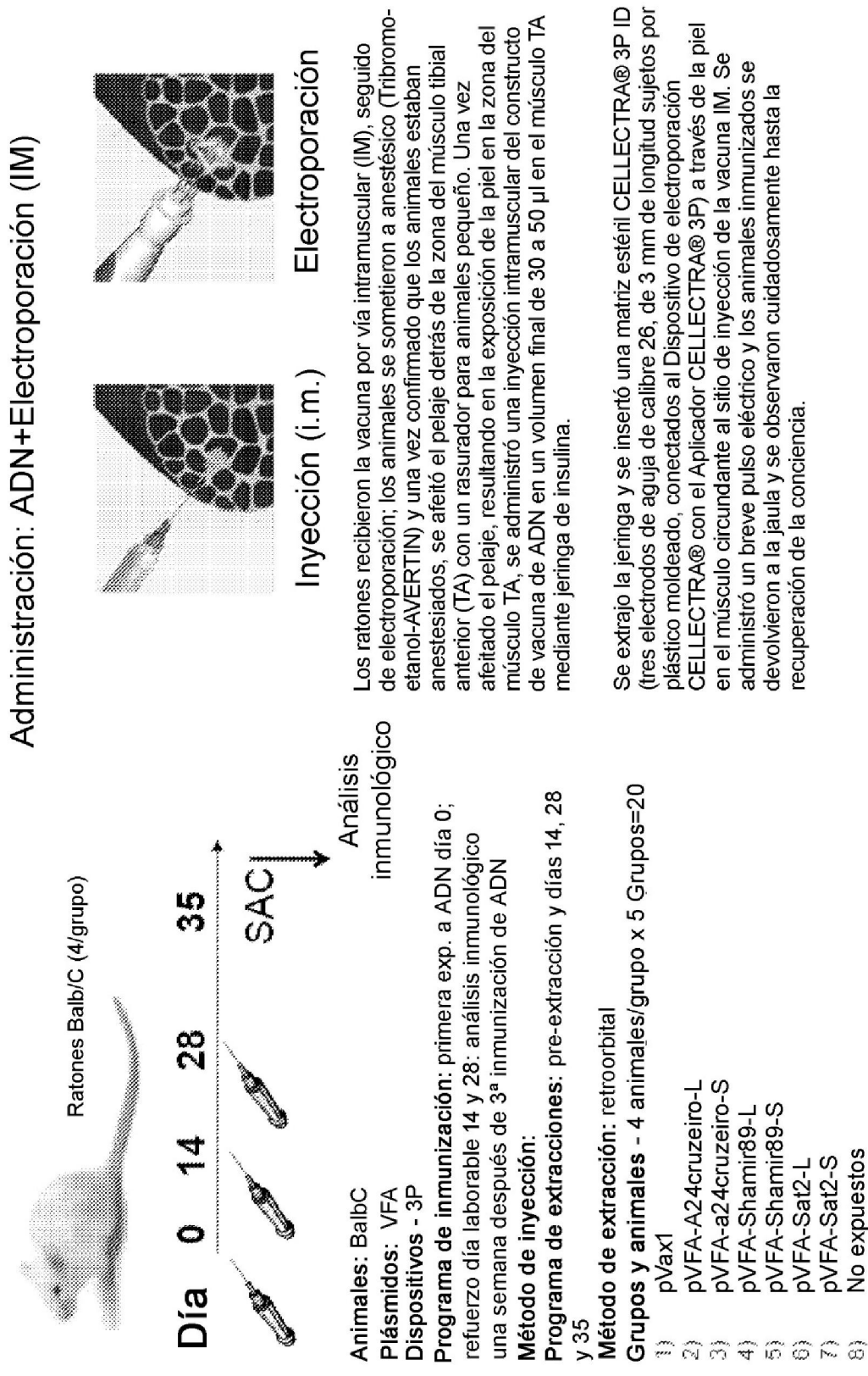
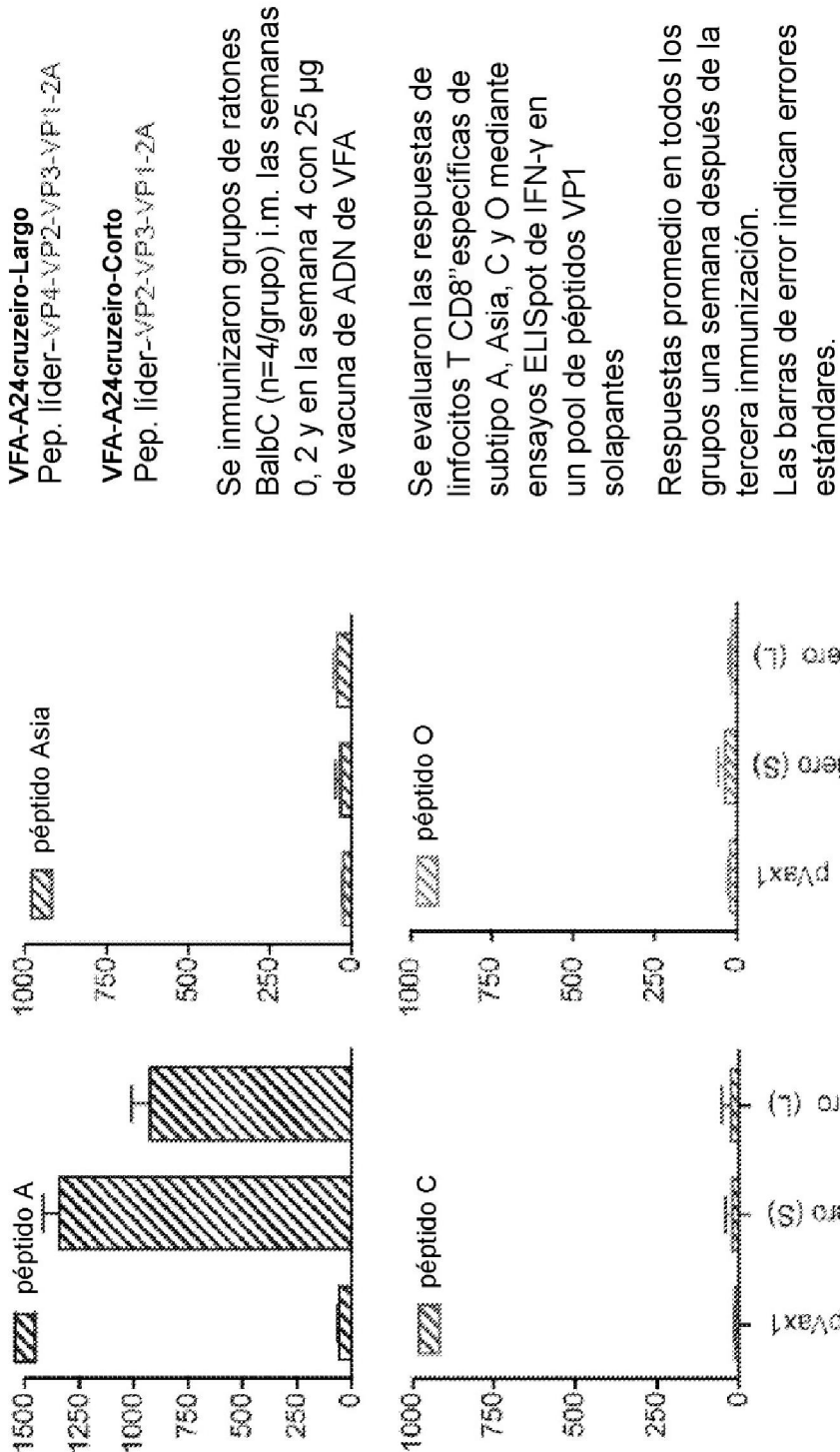


FIG. 8

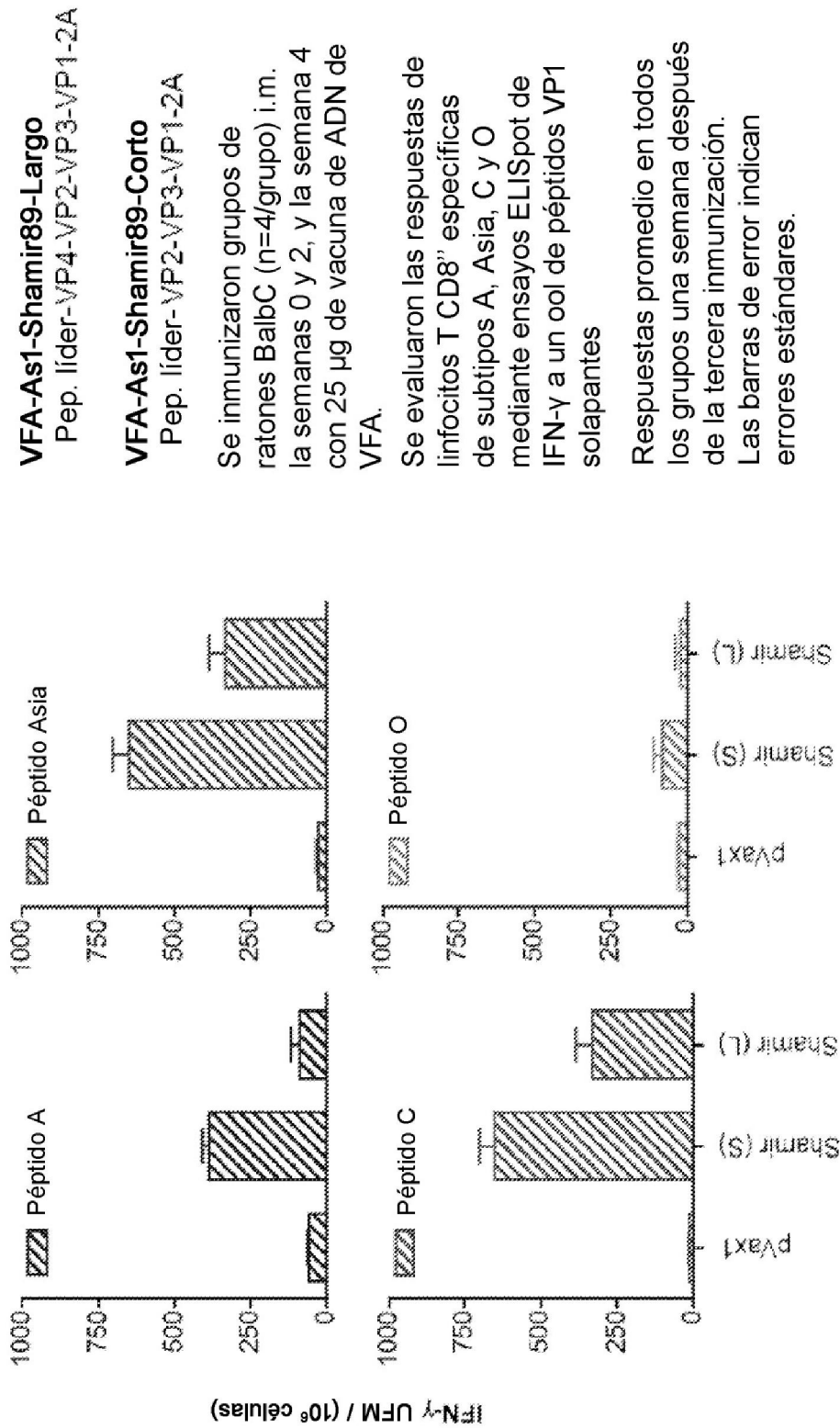
Respuestas inmunitarias celulares inducidas por vacunas de VFA-A24cruzeiro



Esquema de inmunización combinado de VFA-A24cruzeiro-VP: indujo diferencias significativas en las respuestas inmunitarias celulares y reaccionó fuertemente con péptidos de subtipo A

FIG. 9

Respuestas inmunitarias celulares inducidas por vacunas de VFA-As1-Shamir89



La inmunización combinada de VFA-As1-Shamir 89-VP indujo diferencias significativas en las respuestas inmunitarias celulares y una fuerte reacción con los péptidos de subtipos A, Asia y C

FIG. 10

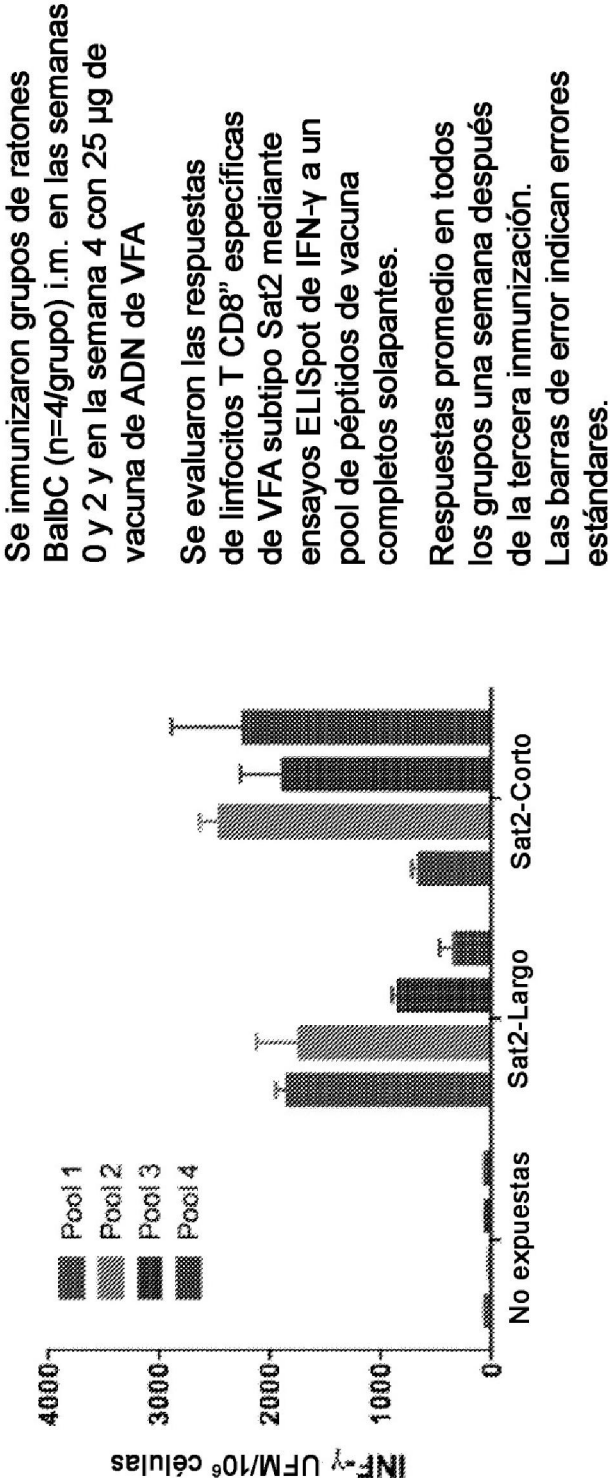
Respuestas inmunitarias celulares inducidas por vacunas de VFA-Sat2

VFA-As1-Sat2-Largo

Pep. líder-VP4-VP2-VP3-VP1-2A

VFA-As1-Sat2-Corto

Pep. líder-VP2-VP3-VP1-2A



La inmunización combinada de VFA-Sat2-VP indujo diferencias significativas en las respuestas inmunitarias celulares y una fuerte reacción con péptidos de subtipo Sat-2

FIG. 11

Transfección de ADN y preparación de lisado celular para el análisis de ELISA

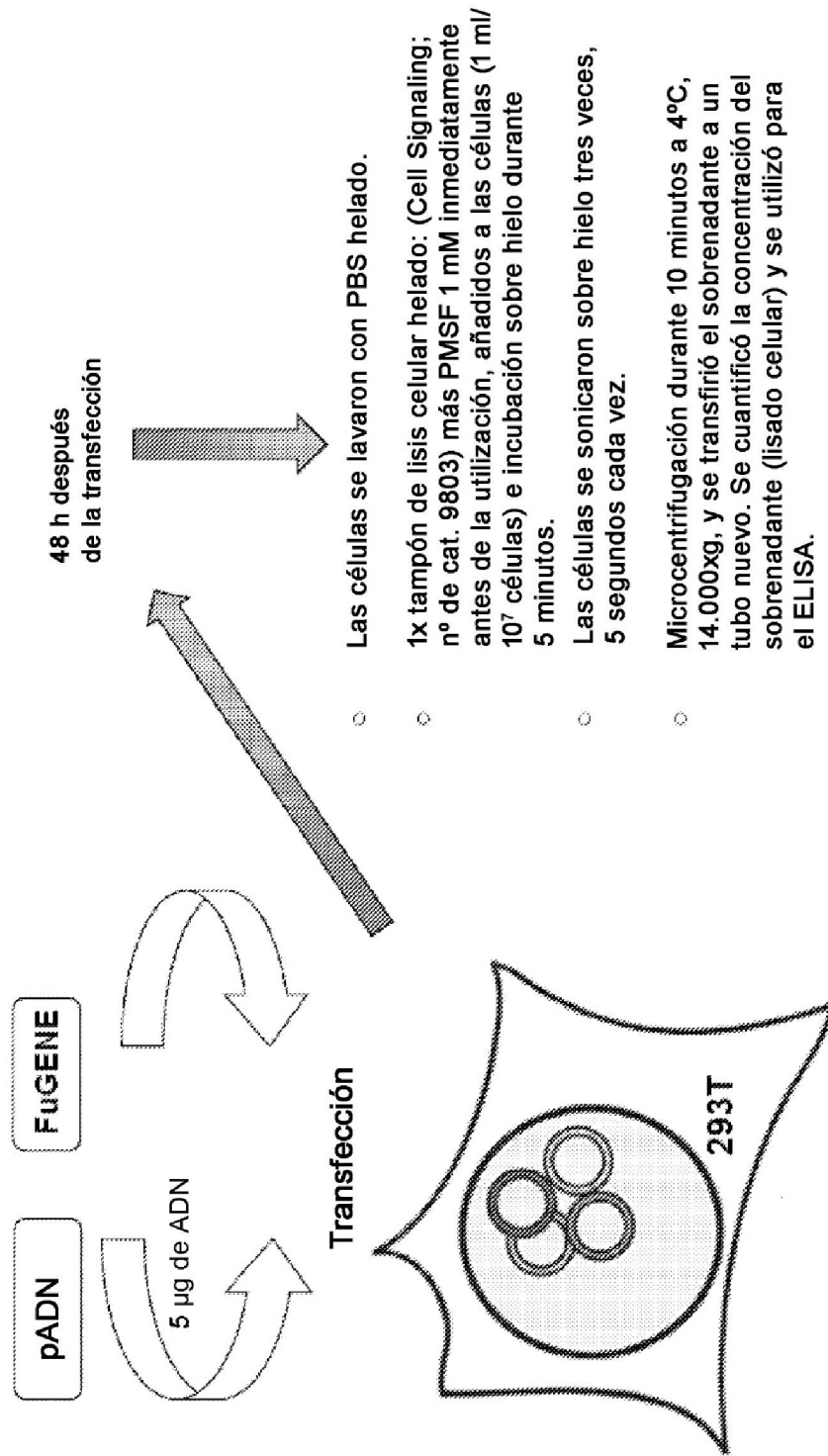
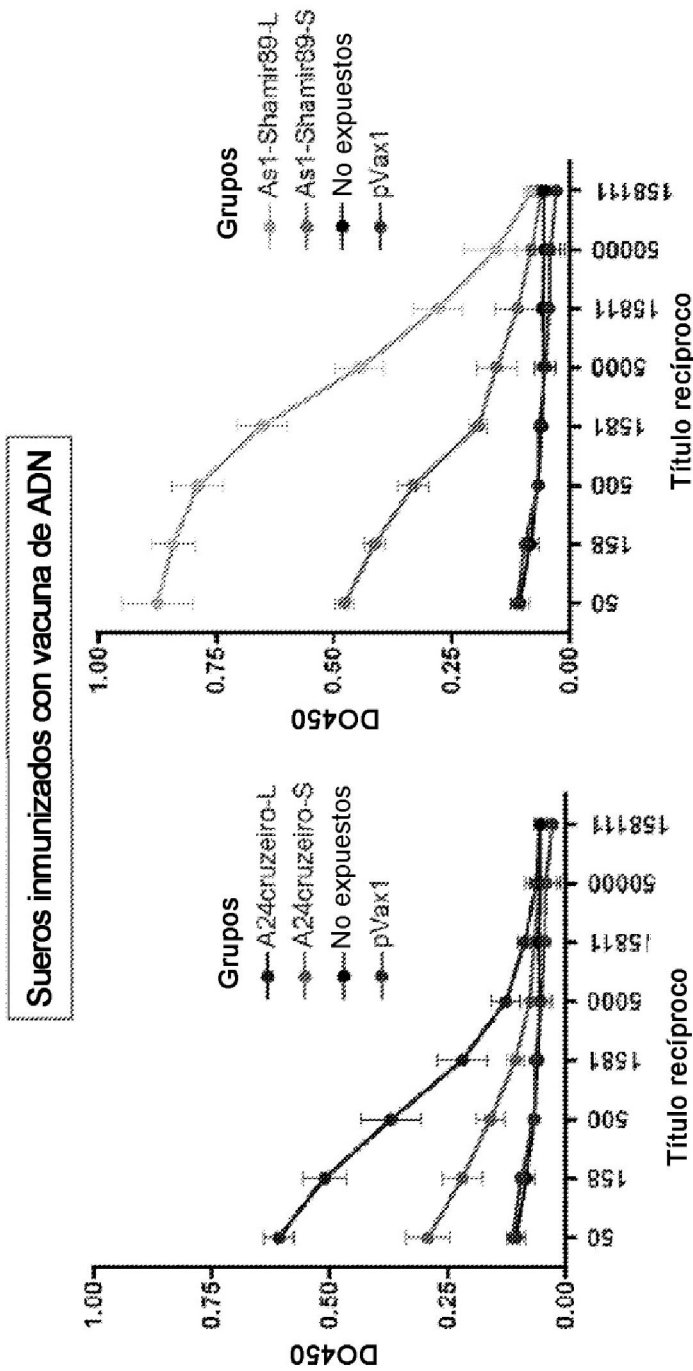


FIG.12

Inducción de anticuerpos en ratones



Niveles sistémicos de IgG anti-VFA tras la inmunización con ADN.

Se inmunizó cada grupo de ratones Balb/C (n=4) con el constructo de vacuna indicado.

Se extrajo sangre de los ratones 1 semana después de la tercera inmunización, y los sueros (n=4) se diluyeron tal como se indica.

Las placas de ELISA se recubrieron con el lisado celular procedente de las células transfectadas con ADN respectivas.

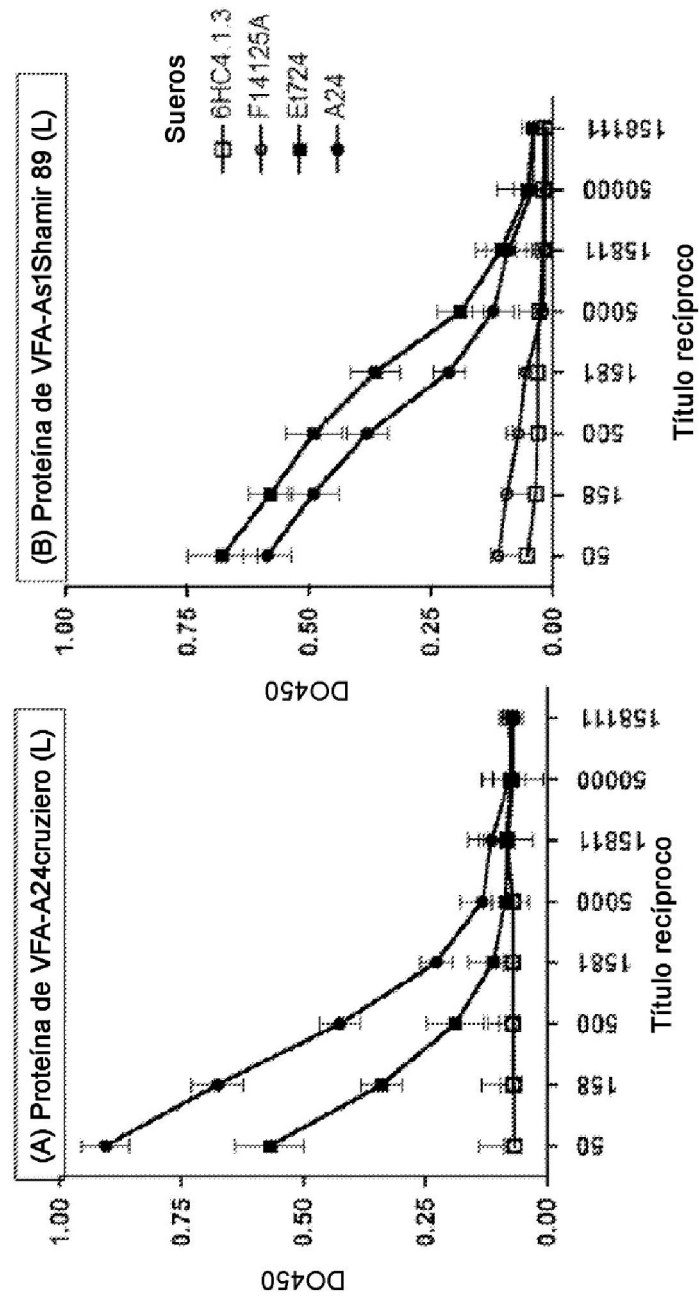
Cada punto de datos es la absorbancia promedio de tres pocillos.

Vacunación y electroporación de ratones con inmunógenos de VFA-VP induce una considerable respuesta de anticuerpos que reaccionan con el antígeno del VFA

FIG. 13

Unión de anticuerpos (IgG totales)

VFA - Estudio de reactivos inmunitarios



Unión de anticuerpos mediante análisis de ELISA. Se prepararon lisados de proteínas a partir de células transfectadas con (A) VFA-A24cruziero (L); (B) VFA-As1Shamir89 (L). Se utilizaron 100 µg de lisado de proteínas para recubrir la placa. Los pocillos se sondearon con anticuerpos/sueros específicos a la dilución indicada y se determinaron los niveles de unión mediante ELISA. Cada punto de datos es la absorbancia media de pocillos por triplicado.

FIG.14

```

shamirVP4
cruzeiroVP4
          NCACQSSPATCSQNSCNTGSIINNNYMQYQNSMDTQLGDNAISGSGNECSTDITSTHT
          *****
shamirVP4
cruzeiroVP4
          NNTQNDWFESRLASSAFSGLEFALLA
          95.4%
          TNTQNDWFESKLASSAFTQLEFALLA
          .*****;*****;*****
shamirVP2
cruzeiroVP2
          MDKKTETETLLEDRILITRNCHTSTTQSSVGVYCYAVAEDAVSCPNTSCLETRVQOAE
          MDKKTETETLLEDRILITRNCHTSTTQSSVGVTHGYSTEEDHVACPNTSCLETRVQOAE
          *****;*****;*****;*****;*****;*****;*****
shamirVP2
cruzeiroVP2
          RFFKXHLFDWTPNLAFGNCHYILELPTENKGVYCSLMGSAYMNRNGNDIEVTAVGNQFNCG
          RFYKKYLFDWTTDKAFGNLEKLELPSDNHGVFGLVDSYAYMRNGWDVEVSAGVGNQFNCG
          *****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****
shamirVP2
cruzeiroVP2
          CLLVALVPELXELDTROKYQLTLFPHQFINPRTNNTAHINVPYVCINRYDQYALHKPWTLL
          CLLVAMVPEWKEFDREKYQLTLFPHQFISPTNNTAHITVPYLCVNRIDQYKXHKPWTLL
          *****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****
shamirVP2
cruzeiroVP2
          VVMVVAPLTVKTCGSEQIKVYMNNAPTYVHVHAGELPSKE
          VVMVVSPLTVNNTSAAQIKVYANIPPTYVHVHAGELPSKE
          *****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****
          75.2%
shamir2A
cruzeiro2A
          MNFDLLKLACDVESNPC
          MNFDLLKLACDVESNPC
          100%
          *****

```

FIG. 15

FIG. 16

VFA- Genérico

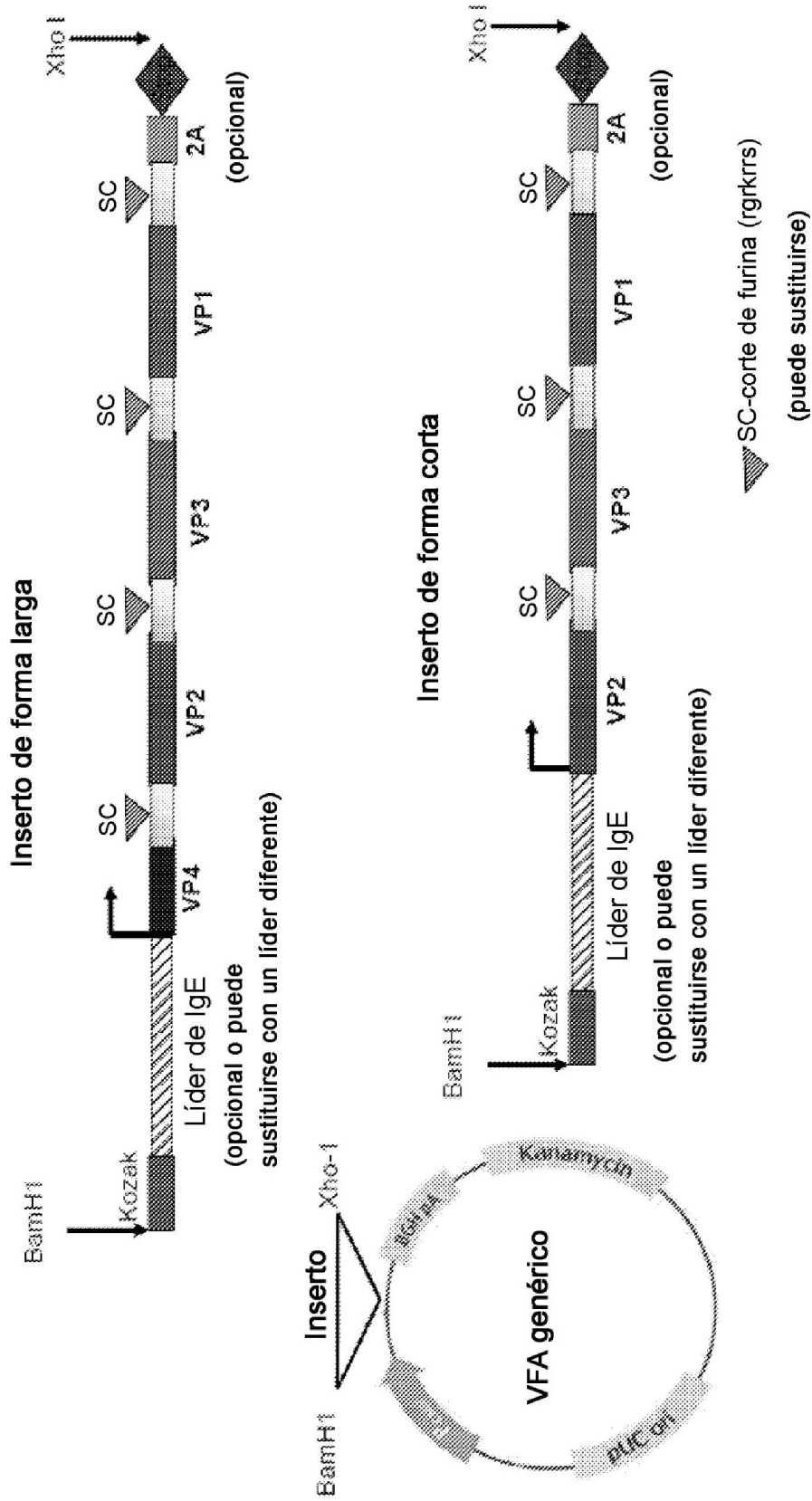


FIG. 17