

COMPOSICIÓN INMUNÓGENA ÚTIL PARA LA VACUNACIÓN CONTRA EL ROTAVIRUS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a composiciones inmunógenas que comprenden polipéptidos contruidos de forma recombinante útiles para reducir uno o más signos clínicos causados por una infección por rotavirus. Más particularmente, la presente invención se refiere a un composición inmunógena que contiene (i) una proteína de fusión que comprende en dirección del terminal N al C (A) un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus y (B) un fragmento Fc de inmunoglobulina tal como, por ejemplo, un fragmento Fc de IgG, y (ii) una sustancia inmunógena, diferente de dicha proteína de fusión, en donde dicha composición inmunógena se puede utilizar en un método para reducir uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por rotavirus en cerdos.

INFORMACIÓN DE ANTECEDENTES

Los rotavirus son virus de ARN bicatenario que comprenden un género dentro de la familia *Reoviridae*. Se sabe que la infección por rotavirus causa enfermedades gastrointestinales y se considera la causa más común de gastroenteritis en los bebés. El rotavirus se transmite por vía fecal-oral e infecta las células que recubren el intestino delgado. Las células infectadas producen una enterotoxina, que induce gastroenteritis, lo que conduce a diarrea grave y, a veces, la muerte por deshidratación.

Los rotavirus poseen un genoma compuesto por 11 segmentos de ARN bicatenario (dsARN) y actualmente se clasifican en ocho grupos (A-H) en función de las propiedades antigénicas y la clasificación basada en la secuencia de la proteína 6 de la cápside viral (VP6) interna, según la definición del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) y el resumen de Matthijnssens *et al.* (Arch Virol 157:1177–1182 (2012)), en donde esta y las siguientes publicaciones a las que se hace referencia en la presente se incorporan por referencia en su totalidad.

El genoma del rotavirus codifica seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6), en donde cada uno de los segmentos del genoma 1-10 codifica una proteína de rotavirus y el segmento del genoma 11 codifica dos proteínas (NSP5 y NSP6).

En el contexto del rotavirus A, las diferentes cepas pueden clasificarse como genotipos (definidos mediante análisis comparativo de secuencias y/o datos de hibridación de ácidos nucleicos) o serotipos (definidos mediante ensayos serológicos) en función de las proteínas estructurales VP7 y VP4. VP7 y VP4 son componentes de la capa de proteína más externa (cápside externa) y ambas portan epítomos neutralizantes. VP7 es una glucoproteína (por ende denominada "G") que forma la capa exterior o superficie del virión. VP7 determina el tipo G de la cepa, y las designaciones para los serotipos G y los genotipos G son idénticas. VP4 es sensible a la proteasa (por ende denominada "P") y determina el tipo P del virus. A diferencia de los tipos G, los números asignados para los serotipos y genotipos P son diferentes (Santos N. et Hoshino Y., 2005, *Reviews in Medical Virology*, 15, 29-56). Por lo tanto, el serotipo P se designa como P seguido de un número asignado, y el genotipo P se designa con una P seguida de un número asignado entre corchetes (por ejemplo, "P[7]" o "P[13]"). Las cepas que pertenecen al mismo genotipo tienen una identidad de secuencia de aminoácidos superior a 89 % (Estes y Kapikian. *Rotaviruses*. En: Knipe, D.M.; Howley, P.M. *Fields Virology*, 5.^a ed.; Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Filadelfia, PA, EE. UU. (2007); Gorziglia *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(18):7155-9 (1990)).

En particular, los rotavirus son también una de las principales causas de gastroenteritis en cerdos con anticuerpos contra los rotavirus de los grupos A y C presentes en casi 100 % de los cerdos (Vlasova *et al.* *Viruses*. 9(3): 48 (2017)). Actualmente, solo se encuentran disponibles vacunas vivas o inactivadas modificadas contra el rotavirus A. La incapacidad de cultivar el rotavirus C en el laboratorio ha obstaculizado el desarrollo de una vacuna contra este grupo, lo que se suma al atractivo de una vacuna recombinante.

La generación de una vacuna recombinante contra el rotavirus se ve obstaculizada por la complejidad de la cápside del rotavirus, que está compuesta por cuatro proteínas dispuestas en tres capas. La capa más interna está compuesta por 60 dímeros de VP2 con simetría T=1. La capa VP2 es necesaria para el correcto ordenamiento de la capa intermedia que está formada por 260 trímeros de VP6 con simetría T=13. El desajuste de simetría resultante entre VP2 y VP6 produce cinco posiciones de trímero de VP6 distintas y tres tipos de poros distintos. En ausencia de VP2, VP6 forma fácilmente microtúbulos ordenados de alto peso molecular y esféricos de una manera dependiente de la sal y el pH que pueden representar subproductos del ensamblaje viral. En la cápside, la capa de VP6 está cubierta por

260 trímeros de VP7 dependientes de Ca^{2+} que actúan como una abrazadera que mantiene la espiga de VP4 en su lugar. VP7 es el antígeno glucosilado o de tipo G y contiene epítomos neutralizantes. La mayoría de los anticuerpos neutralizantes reconocen solo la VP7 trimérica y se cree que actúan al evitar la disociación del trímero de VP7 que, a su vez, bloquea la liberación de la espiga. Las espigas de rotavirus están presentes como 60 trímeros de VP4 que se insertan en la capa de VP6 solo en el poro tipo II. VP4 contiene epítomos neutralizantes y es el antígeno tipo P, escindido por la tripsina en la base de la espiga VP5* y la cabeza de interacción celular VP8*, que permanece asociada con VP5* después de la escisión. La tripsinización prepara la espiga para la entrada celular, durante la cual la espiga se somete a una profunda reorganización estructural para exponer los sitios activos para la unión al receptor en las células huésped. Al ignorar las complejidades del proceso de ensamblaje anterior, es difícil lograr la expresión estequiométrica de las proteínas de la cápside del rotavirus con condiciones ambientales para promover el ensamblaje adecuado.

A la luz de la dificultad en el ensamblaje de la cápside del rotavirus, hubo interés en un enfoque de vacunas de subunidades. VP7 y VP4 son las dos proteínas que contienen epítomos neutralizantes; sin embargo, el uso de VP7 sería complicado por su glucosilación y trimerización dependiente del calcio. El uso de VP4 es complicado por su trimerización, tripsinización y rango de estados conformacionales posibles. La proteína VP8, también denominada dominio VP8 o VP8*, que se produce por la tripsinización de VP4 contiene epítomos neutralizantes, es monomérica, se ha determinado su estructura a alta resolución (Dormitzer *et al.* EMBO J. 21(5): 885- 897 (2002)) y se describe como altamente estable.

Además, dentro de la proteína VP8, se considera que el dominio similar a la lectina (aa65–224) interactúa con el receptor del huésped y está implicado en la unión del virus a la célula huésped (Rodriguez *et al.*, PloS Pathog. 10(5):e1004157 (2014)).

Se describieron enfoques para desarrollar vacunas de subunidades de rotavirus para niños, en donde se produjo una proteína VP8 truncada (residuos de aminoácidos 64 (o 65)-223 de VP8*) ligada mediante el terminal N al epítomo universal de linfocitos T CD4⁺ del toxoide tetánico (aa830-844) P2 en *Escherichia coli* (Wen *et al.* Vaccine. 32(35): 4420-7 (2014)), y se probó en bebés y niños pequeños (Groome *et al.* Lancet Infect Dis.17(8):843-853 (2017)). Sin embargo, como este uso de una vacuna de subunidades monovalente (basada en la proteína VP8 truncada del genotipo P[8] del rotavirus) provocó una respuesta deficiente contra las cepas

heterotípicas del rotavirus, también se evaluó recientemente una formulación de vacuna trivalente (que comprende tres proteínas para combinar antígenos de genotipos P[4], P[6], P[8] (Groome *et al.* Lancet Infect Dis. S1473-3099(20)30001 (2020)).

En otro enfoque, una proteína VP8 truncada de terminal N, "VP8-1" (aa26-241), se fusionó en el terminal N o el terminal C con la subunidad B no tóxica pentamerizante de la toxina del cólera (CTB). De las proteínas de fusión pentaméricas resultantes (CTB-VP8-1, VP8-1-CTB), solo CTB-VP8-1 (es decir, VP8-1 fusionada en el terminal N con CTB) se consideró como un candidato viable para un mayor desarrollo. En comparación con VP8-1-CTB, mostró una mayor actividad de unión a GM1 o a anticuerpos monoclonales neutralizantes sensibles a la conformación específicos contra VP8*, generó títulos más elevados de anticuerpos neutralizantes y confirió una mayor eficacia protectora en un modelo de ratón (Xue *et al.* Hum Vaccin Immunother. 12(11) 2959-2968 (2016)).

Sin embargo, a la luz de la dificultad en el ensamblaje de la cápside del rotavirus, existe un interés en enfoques alternativos de vacunas de subunidades, en particular porque las vacunas de subunidades generalmente se consideran muy seguras. Además, es muy deseable una expresión recombinante de antígenos de subunidades de rotavirus efectivos que permita la producción simple de antígenos de vacunas de dichos rotavirus que son difíciles de cultivar. Además, dado que los rotavirus son una de las principales causas de gastroenteritis en cerdos, existe una gran necesidad en particular de contar con vacunas de subunidades para cerdos que incluyan antígenos que permitan una eficacia comparable o incluso mayor eficacia que las vacunas MLV contra el rotavirus actualmente disponibles en el mercado para cerdos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La solución a los problemas técnicos anteriores se logra mediante la descripción y las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

Por lo tanto, la invención en sus diferentes aspectos se implementa de acuerdo con las reivindicaciones.

La invención se basa en el hallazgo sorprendente de que la administración de un polipéptido que comprende un fragmento de una proteína VP8 de rotavirus, es decir, un dominio similar a la lectina con el terminal N extendido, ligado en el terminal C a un fragmento Fc de IgG, a las cerdas redujo significativamente, mediante la transmisión pasiva de anticuerpos neutralizantes, la diarrea y la excreción fecal en sus

crías después de la exposición al rotavirus, incluso cuando dicho polipéptido se mezcló, antes de la administración, con sustancias inmunógenas adicionales.

En un primer aspecto, la invención se refiere, por ende, a una composición inmunógena que comprende

(i) un polipéptido que comprende

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
- un fragmento Fc de inmunoglobulina,

y

(ii) al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido,

en donde dicha composición inmunógena también se denomina "la composición inmunógena de la presente invención" de aquí en adelante.

Por lo tanto, la composición inmunógena de la presente invención es en particular una composición que comprende dos componentes **(i; ii)**, a saber,

(i) un polipéptido que comprende

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
- un fragmento Fc de inmunoglobulina,

en donde dicho polipéptido de aquí en adelante también se denomina "componente **(i)** de la composición inmunógena de la presente invención" o "componente **(i)**", respectivamente, y

(ii) al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido,

en donde dicha al menos una sustancia inmunógena de aquí en adelante también se denomina "componente **(ii)** de la composición inmunógena de la presente invención" o "componente **(ii)**", respectivamente.

El polipéptido que comprende

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
- un fragmento Fc de inmunoglobulina, un fragmento inmunógeno de una

proteína VP8 de rotavirus,

que se describe en la presente en el contexto de la presente invención y también se denomina "el polipéptido de la presente divulgación" de aquí en adelante.

Por lo tanto, el componente **(i)** de la composición inmunógena de la presente invención es un polipéptido de la presente divulgación.

Preferentemente, el componente **(ii)** consiste en dos, tres o más sustancias inmunógenas, en donde todas esas sustancias inmunógenas son

diferentes del componente **(i)** y

diferentes entre sí.

En el contexto de la presente invención, también se descubrió inesperadamente que tal composición inmunógena se puede simplemente producir, como el polipéptido de la presente divulgación, cuando se produce en células, se libera de las células, y luego puede recuperarse del sobrenadante que rodea a las células en lugar de las propias células. Posteriormente, el polipéptido recuperado se puede mezclar fácilmente con los componentes adicionales, incluso la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, para producir la composición inmunógena de la presente invención.

Una ventaja adicional del polipéptido de la presente divulgación es que, si se desea, puede prepararse como un polipéptido que comprende/presenta dos fragmentos inmunógenos de diferentes rotavirus, por lo que no es necesario preparar dos polipéptidos monovalentes diferentes por separado que luego deben combinarse para el mismo propósito.

Preferentemente, el fragmento Fc de inmunoglobulina, como se describe en la presente, está ligado a

- el terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, o
- el terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.

En particular, dicho fragmento Fc de inmunoglobulina preferentemente está ligado a

- el terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de una porción ligadora, o
- el terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de una porción ligadora.

En otro aspecto preferido, el fragmento Fc de inmunoglobulina, como se describe en la presente, está ligado a

- el terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de un enlace peptídico entre el residuo de aminoácidos del terminal N de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina y el residuo de aminoácidos del terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, o
- el terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de un enlace peptídico entre el residuo de aminoácido terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina y el residuo de aminoácido del terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.

Con máxima preferencia, el fragmento Fc de inmunoglobulina, como se describe en la presente, está ligado al terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.

Por lo tanto, el polipéptido de la presente divulgación es en particular un polipéptido que comprende

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
- un fragmento Fc de inmunoglobulina,

en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.

El término "polipéptido", como se usa en la presente, se refiere en particular a cualquier cadena de residuos de aminoácidos ligados entre sí por enlaces peptídicos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por ejemplo, "polipéptido" puede referirse a una cadena larga de residuos de aminoácidos, por ejemplo, una que tiene de 150 a 600 residuos de aminoácidos de largo o más. El término "polipéptido" incluye polipéptidos que tienen una o más modificaciones posteriores a la traducción, donde las modificaciones posteriores a la traducción incluyen, por ejemplo, glucosilación, fosforilación, lipidación (por ejemplo, miristoilación, etc.), acetilación, ubiquitilación, sulfatación, ribosilación de ADP, hidroxilación, oxidación de Cys/Met, carboxilación, metilación, etc. Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el contexto de la presente invención.

Se entiende en particular que la expresión "fragmento inmunógeno" se refiere a un fragmento de una proteína, que conserva al menos parcialmente la inmunogenicidad de la proteína de la que deriva. Por lo tanto, se entiende particularmente que un "fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus" se refiere a un fragmento de una proteína VP8 de rotavirus, que conserva al menos parcialmente la inmunogenicidad de la proteína VP8 de longitud completa.

Una "sustancia inmunógena" se refiere a cualquier sustancia capaz de provocar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, en particular a una molécula tal como un péptido o polipéptido capaz de provocar, producir o generar una respuesta inmunitaria en un animal.

La expresión "proteína VP8", como se describe en la presente, se entiende que es en particular equivalente a "dominio VP8", "VP8*" o "fragmento VP8 de VP4", como se usa frecuentemente en el contexto del rotavirus.

La expresión "fragmento Fc de inmunoglobulina", como se usa en la presente, se refiere a una proteína que contiene la región constante de la cadena pesada 2

(CH2) y la región constante de la cadena pesada 3 (CH3) de una inmunoglobulina y, más particularmente, que no contiene las regiones variables de las cadenas pesada y liviana, y la región constante 1 de la cadena liviana (CL1) de la inmunoglobulina. Puede incluir además la región bisagra, o una porción de la región bisagra, de la inmunoglobulina (es decir, la región bisagra en la región constante de la cadena pesada). Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede contener una parte o la totalidad de la región constante de la cadena pesada 1 (CH1).

Se entiende que la expresión "fragmento Fc de inmunoglobulina", como se usa en la presente, es equivalente a "dominio Fc de inmunoglobulina".

La expresión "ligado a" usada en la presente se refiere en particular a cualquier medio para conectar, dentro de un polipéptido, un fragmento Fc de inmunoglobulina al terminal C o terminal N de un fragmento inmunógeno de una proteína VP de rotavirus. Los ejemplos de medios ligadores incluyen (1.) enlace indirecto del fragmento Fc de inmunoglobulina al terminal C de un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus mediante una porción intermedia que está ligada directamente al terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y que también se une a dicho fragmento Fc de inmunoglobulina, y (2.) enlace directo del fragmento Fc de inmunoglobulina al terminal C de un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus mediante enlace covalente. Las expresiones "ligado a" y "ligado con" se usan indistintamente en el contexto de la presente invención.

En particular, se entiende que la expresión "polipéptido que comprende

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
- un fragmento Fc de inmunoglobulina,

en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus",

como se usa en la presente, es en particular equivalente a la expresión

"un polipéptido que comprende, en dirección al terminal N a C,

- la secuencia de aminoácidos de un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
- la secuencia de aminoácidos de un fragmento Fc de inmunoglobulina",

o a la expresión

"un polipéptido que comprende

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
- un fragmento Fc de inmunoglobulina ligado al terminal C de dicho un fragmento inmunógeno".

De acuerdo con un aspecto de máxima preferencia, el fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de dicho un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de una porción ligadora.

La porción ligadora, como se describe en la presente en el contexto de la presente invención, es preferentemente un ligador peptídico.

La expresión "ligador peptídico", como se usa en la presente, se refiere a un péptido que comprende uno o más residuos de aminoácidos. Más particularmente, la expresión "ligador peptídico", como se usa en la presente, se refiere a un péptido capaz de conectar dos proteínas y/o dominios variables, por ejemplo, un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus y un fragmento Fc de inmunoglobulina.

En un aspecto particularmente preferido, el fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de una porción ligadora, en donde

- el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus está ligado a la porción ligadora a través de un enlace peptídico entre el residuo de aminoácidos del terminal N de la porción ligadora y el residuo de aminoácidos del terminal C del fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
- la porción ligadora está ligada al fragmento Fc de inmunoglobina a través de un enlace peptídico entre el residuo de aminoácidos del terminal N del fragmento Fc de inmunoglobulina y el residuo de aminoácidos del terminal C de la porción ligadora.

Además, se puede preferir que el fragmento Fc de inmunoglobulina esté ligado al fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de un enlace peptídico entre el residuo de aminoácidos del terminal N del fragmento Fc de inmunoglobulina y el residuo de aminoácidos del terminal C del fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.

Se entenderá que el polipéptido de la presente divulgación es en particular una proteína de fusión.

Como se usa en la presente, la expresión "proteína de fusión" significa una proteína formada por fusión (es decir, unión) total o parcial de dos o más polipéptidos que no son iguales. Por lo general, las proteínas de fusión se elaboran mediante el uso de técnicas de ADN recombinante, mediante la unión de un extremo a otro de polinucleótidos que codifican los dos o más polipéptidos. Más particularmente, la expresión "proteína de fusión" se refiere por lo tanto a una proteína traducida a partir de un transcrito de ácido nucleico generado mediante la combinación de una primera

secuencia de ácidos nucleicos que codifica un primer polipéptido y al menos un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, donde la proteína de fusión no es una proteína natural. El constructo de ácido nucleico puede codificar dos o más polipéptidos que se unen en la proteína de fusión.

En otro aspecto preferido, el polipéptido de la presente divulgación es una proteína de fusión de la fórmula x-y-z, en donde

x consiste en o comprende un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus;

y es una porción ligadora; y

z es un fragmento Fc de inmunoglobulina.

En particular, la fórmula x-y-z debe entenderse como que el residuo de aminoácidos del terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus está ligado a dicha porción ligadora, preferentemente a través de un enlace peptídico con el residuo de aminoácidos del terminal N de dicha porción ligadora, y que el residuo de aminoácidos del terminal N de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado a dicha porción ligadora, preferentemente a través de un enlace peptídico con el residuo de aminoácidos del terminal C de dicha porción ligadora.

La expresión "x consiste en un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus", como se describe en la presente, se entiende en particular como equivalente a "x es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus".

En un aspecto preferido, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, como se menciona en la presente, preferentemente es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra el rotavirus en un sujeto al que se le administró dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.

En otro aspecto preferido, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus es un polipéptido que tiene una longitud de 50 a 200, preferentemente, de 140 a 190 residuos de aminoácidos.

El rotavirus mencionado en la presente se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en rotavirus A y rotavirus C. Por lo tanto, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, como se menciona en la presente, se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus A y un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C.

Las expresiones "rotavirus A" y "rotavirus C", respectivamente, como se mencionan en la presente, se relacionan con el rotavirus A y el rotavirus C,

respectivamente, según los define el ICTV (resumido por Matthijnssens *et al.* Arch Virol 157:1177–1182 (2012)).

De acuerdo con otro aspecto preferido, el rotavirus mencionado en la presente es un rotavirus porcino.

En un aspecto particularmente preferido, el rotavirus mencionado en la presente es el rotavirus A. Por lo tanto, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, como se describe en la presente, es preferentemente un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus A.

En un aspecto preferido adicional, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus comprende el dominio similar a la lectina de una proteína VP8 de rotavirus. El "dominio similar a la lectina de una proteína VP8 de rotavirus", como se menciona en la presente, se entiende que es, preferentemente, un dominio similar a la lectina de un rotavirus de una proteína VP8 de rotavirus A.

La expresión "dominio similar a la lectina de una proteína VP8 de rotavirus" se refiere en particular a los residuos 65-224 de una proteína VP8 de rotavirus o, respectivamente, corresponde a la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 65-224 de una proteína VP8 de rotavirus, y en donde dichos residuos de aminoácidos 65-224 de una proteína VP8 de rotavirus, preferentemente, son los residuos de aminoácidos 65-224 de una proteína VP8 de rotavirus A.

Por lo tanto, el "dominio similar a la lectina de una proteína VP8 de rotavirus", preferentemente, consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 65-224 de una proteína VP8 de rotavirus, en particular, de una proteína VP8 de rotavirus A.

Preferentemente, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus es un dominio similar a la lectina de una proteína VP8 de rotavirus con el terminal N extendido, en donde la extensión del terminal N es de 1 a 20 residuos de aminoácidos, en particular, de 5 a 15 residuos de aminoácidos de longitud. Con máxima preferencia, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus es un dominio similar a la lectina de una proteína VP8 de rotavirus con el terminal N extendido, en donde la extensión del terminal N es de ocho residuos de aminoácidos de longitud.

La secuencia de aminoácidos de dicha extensión del terminal N, preferentemente, es la secuencia de aminoácidos de la longitud respectiva que flanquea el residuo de aminoácidos del terminal N del dominio similar a la lectina en la secuencia de aminoácidos de la proteína VP8 de rotavirus.

Por lo tanto, en un aspecto particular, el fragmento inmunógeno de una

proteína VP8 de rotavirus, como se menciona en la presente, preferentemente consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 60-224, los residuos de aminoácidos 59-224, los residuos de aminoácidos 58-224, los residuos de aminoácidos 57-224, los residuos de aminoácidos 56-224, los residuos de aminoácidos 55-224, los residuos de aminoácidos 54-224, los residuos de aminoácidos 53-224, los residuos de aminoácidos 52-224, los residuos de aminoácidos 51-224, los residuos de aminoácidos 50-224 o los residuos de aminoácidos 49-224 de una proteína VP8 de rotavirus, en particular de una proteína A de rotavirus.

Con máxima preferencia, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, como se menciona en la presente, consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 57-224 de una proteína VP8 de rotavirus, en particular, de una proteína de rotavirus A.

La numeración anterior de residuos de aminoácidos (por ejemplo, "65-224" o "57-224"), preferentemente, es con referencia a la secuencia de aminoácidos de una proteína VP8 de rotavirus de tipo silvestre, en particular de una proteína VP8 de rotavirus A de tipo silvestre. Dicha proteína VP8 de rotavirus de tipo silvestre, preferentemente, es la proteína establecida en SEQ ID NO: 1.

De acuerdo con un aspecto preferido particular, el rotavirus mencionado en la presente es un rotavirus, en particular un rotavirus A, seleccionado del grupo que consiste en el rotavirus de genotipo P[6], rotavirus de genotipo P[7] y rotavirus de genotipo P[13]. Por lo tanto, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, como se menciona en la presente, se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[6], un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[7] y un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[13], y se selecciona en particular del grupo que consiste en un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus A de genotipo P[6], un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus A de genotipo P[7] y un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus A de genotipo P[13].

Las expresiones "rotavirus de genotipo P[6]", "rotavirus de genotipo P[7]", "rotavirus de genotipo P[13]" y "rotavirus de genotipo P[23]", como se usan en la presente, se refieren en particular a la clasificación de genotipo VP4 (P) de los rotavirus establecida (por ejemplo, P[6], P[7], P[13] o P[23]) que se describe en: Estes y Kapikian. Rotaviruses. En: Knipe, D.M.; Howley, P.M. Fields Virology, 5.^a ed.; Wolters

Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Filadelfia, PA, EE. UU. (2007); Gorziglia *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 87(18):7155-9 (1990).

Con máxima preferencia, el rotavirus mencionado en la presente es un rotavirus de genotipo P[7]. Por lo tanto, un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, como se menciona en la presente, es con máxima preferencia un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[7], en particular un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus A de genotipo P[7].

Con máxima preferencia, la proteína VP8 de rotavirus mencionada en la presente comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1.

El dominio similar a la lectina de la proteína VP8 de rotavirus, como se menciona en la presente, preferentemente comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 2.

En un ejemplo, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus preferentemente consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto preferido, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus consiste en o es una secuencia de consenso de una porción de una proteína VP8 de rotavirus, en particular de una porción de una proteína VP8 de rotavirus A.

Como se usa en la presente, la expresión "secuencia de consenso" se refiere en particular a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) más frecuentes en una familia de secuencias relacionadas (ver, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987)). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia de consenso está ocupada por el aminoácido que se encuentra con mayor frecuencia en esa posición en la familia. Por lo tanto, la expresión "secuencia de consenso" representa una secuencia de aminoácidos (o una secuencia de nucleótidos) deducida. La secuencia de consenso representa una pluralidad de secuencias similares. Cada posición en la secuencia de

consenso corresponde al residuo de aminoácido (o base de nucleótido) que aparece con mayor frecuencia en esa posición que se determina al alinear tres o más secuencias.

Preferentemente, se puede obtener una secuencia de consenso de una porción de una proteína VP8 de rotavirus, como se menciona en la presente, a través de un método que comprende las etapas de:

- traducir una pluralidad de secuencias de nucleótidos que codifican una porción de una proteína VP8 de rotavirus en secuencias de aminoácidos,
- alinear dichas secuencias de aminoácidos con las proteínas VP8 de rotavirus conocidas, preferentemente, mediante el *software* de alineación de secuencias MUSCLE, con parámetros de penalización por brecha y agrupación UPGMB predeterminados.
- someter dichas secuencias alineadas a un análisis filogenético y generar una reconstrucción de filogenia de unión de vecinos (*neighbor joining*) en función de la secuencia de la proteína VP8 de rotavirus, en particular, importar dichas secuencias de aminoácidos alineadas al *software* MEGA7 para su análisis filogenético y generar una reconstrucción de filogenia de unión de vecinos en función de la secuencia de la proteína VP8 de rotavirus.
- calcular el contenido óptimo mediante el uso del método de corrección Poisson con una prueba de filogenia de arranque (n=100),
- dibujar el contenido óptimo a escala con longitudes de ramificación iguales a las distancias evolutivas en unidades de sustituciones de aminoácidos por sitio en 170 posiciones totales,
- considerar significativos los nodos donde la asociación de cúmulos de arranque es mayor de 70 %,
- designar como grupos los nodos con una distancia aproximada de 10 % y las asociaciones de cúmulos de arranque superiores a 70 %, y
- seleccionar un grupo y generar las secuencias de consenso mediante la identificación de la mayor frecuencia por posición alineada dentro del grupo,
- y opcionalmente, en los casos donde se observan proporciones equivalentes de aminoácidos en una posición alineada, seleccionar el residuo de aminoácido en función de los datos epidemiológicos

informados junto con un perfil de protección del producto predefinido.

Por ejemplo, en este contexto, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus preferentemente consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

En un aspecto preferido adicional, el rotavirus mencionado en la presente es el rotavirus C. De acuerdo con este aspecto, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, preferentemente, es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C.

En el contexto de este aspecto, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus preferentemente consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 6.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, preferentemente, es o consiste en

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus A, en particular cualquiera de los fragmentos inmunógenos descritos en la presente de una proteína VP8 de rotavirus A, o
- una secuencia de consenso de una porción de una proteína VP8 de rotavirus, tal como una porción de una proteína VP8 de rotavirus A, preferentemente cualquiera de los fragmentos inmunógenos de una proteína VP8 de rotavirus descritos en la presente en el contexto de una secuencia de consenso, o
- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C, en particular cualquiera de los fragmentos inmunógenos descritos en la presente de una proteína VP8 de rotavirus C.

En un aspecto particular preferido, el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus es un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

El fragmento Fc de inmunoglobulina descrito en la presente, preferentemente, es de al menos 220 residuos de aminoácidos de longitud, y, con máxima preferencia,

de 220 a 250 residuos de aminoácidos de longitud.

De acuerdo con otro aspecto preferido particular, el fragmento Fc de inmunoglobulina descrito en la presente no está glucosilado. La expresión "no glucosilado", como se usa en la presente, significa en particular que el fragmento Fc de inmunoglobulina no tiene moléculas de oligosacáridos unidas a este.

Preferentemente, el fragmento Fc de inmunoglobulina, como se menciona en la presente, comprende o consiste en

- la región constante de la cadena pesada 2 (CH₂), y
- la región constante de la cadena pesada 3 (CH₃),
- y, opcionalmente, la región bisagra o una porción de la región bisagra, de una inmunoglobulina.

De acuerdo con otro aspecto preferido, la inmunoglobulina mencionada en la presente se selecciona del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. Por lo tanto, el fragmento Fc de inmunoglobulina preferentemente se selecciona del grupo que consiste en el fragmento Fc de IgG, fragmento Fc de IgA, fragmento Fc de IgD, fragmento Fc de IgE y fragmento Fc de IgM.

De acuerdo con un aspecto de máxima preferencia, el fragmento Fc de inmunoglobulina descrito en la presente es un fragmento Fc de IgG.

La IgG, como se menciona en la presente, se selecciona preferentemente del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5 e IgG6. Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto preferido, el fragmento Fc de inmunoglobulina mencionado en la presente se selecciona del grupo que consiste en el fragmento Fc de IgG1, fragmento Fc de IgG2, fragmento Fc de IgG3, fragmento Fc de IgG4, fragmento Fc de IgG5 y fragmento Fc de IgG6.

Con máxima preferencia, el fragmento Fc de inmunoglobulina es una proteína codificada por el genoma de una especie cuyas células intestinales son susceptibles a una infección por el rotavirus del que se deriva el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, como se menciona en la presente. Si, por ejemplo, el fragmento de una proteína VP8 de rotavirus es el fragmento de una proteína VP8 de rotavirus porcino, entonces el fragmento Fc de inmunoglobulina es preferentemente un fragmento Fc de inmunoglobulina codificado por un genoma porcino. De acuerdo con otro ejemplo, si el fragmento de una proteína VP8 de rotavirus es el fragmento de una proteína VP8 de rotavirus de pollo, entonces el fragmento Fc de inmunoglobulina es preferentemente un fragmento Fc de inmunoglobulina codificado por un genoma de pollo.

Más particularmente, el fragmento Fc de inmunoglobulina es preferentemente un fragmento Fc de IgG porcina.

En un aspecto preferido adicional, el fragmento Fc de inmunoglobulina comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

La porción ligadora, o el ligador peptídico, respectivamente, mencionados en la presente es preferentemente una secuencia de aminoácidos de 1 a 50 residuos de aminoácidos de longitud, en particular de 3 a 20 residuos de aminoácidos de longitud. Por ejemplo, la porción ligadora puede ser un ligador peptídico de 3, 8 o 10 residuos de aminoácidos de longitud.

Según el propósito, puede ser conveniente un ligador corto para disminuir el riesgo de proteólisis entre los componentes de la proteína de fusión. Por lo tanto, el ligador peptídico descrito en el contexto de la presente invención preferentemente tiene, o consiste en, una longitud, respectivamente, de 1-5 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia, 2-4 residuos de aminoácidos y, con máxima preferencia, tres residuos de aminoácidos.

De acuerdo con un aspecto preferido, la porción ligadora comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 66 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.

Como se menciona en la presente, "SEQ ID NO: 9" se refiere a la secuencia de aminoácidos (en código de una sola letra para residuos de aminoácidos): GGS, que en código convencional de tres letras es Gly-Gly-Ser.

Por lo tanto, "SEQ ID NO: 9", en el contexto de la presente invención, representa la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Ser o, respectivamente, "Gly Gly Ser" como se establece para la secuencia de SEQ ID NO: 9, en el listado de secuencias que figura más adelante.

Preferentemente, el polipéptido de la presente divulgación tiene un residuo de metionina del terminal N que flanquea el residuo de aminoácidos del terminal N del fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.

De acuerdo con otro aspecto preferido, el polipéptido de la presente divulgación comprende un fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus ligado al terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina.

Dicho fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus preferentemente es o consiste en

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus A, en particular cualquiera de los fragmentos inmunógenos descritos en la presente de una proteína VP8 de rotavirus A, o
- una secuencia de consenso de una porción de una proteína VP8 de rotavirus, tal como una porción de una proteína VP8 de rotavirus A, preferentemente cualquiera de los fragmentos inmunógenos de una proteína VP8 de rotavirus descritos en la presente en el contexto de una secuencia de consenso, o
- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C, en particular cualquiera de los fragmentos inmunógenos descritos en la presente de una proteína VP8 de rotavirus C.

En particular, dicho fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus preferentemente comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 6.

En un aspecto preferido particular, dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus adicional es diferente del fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus cuyo terminal C está ligado a dicho fragmento Fc de inmunoglobulina.

Dicho fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus preferentemente está ligado al terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina a través de una porción ligadora, en particular, a través de cualquiera de las porciones ligadoras descritas en la presente. Preferentemente, dicho fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus está ligado a la porción ligadora a través de un enlace peptídico entre el residuo de aminoácidos del terminal N de dicho fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus y el residuo de aminoácidos del terminal C de la porción ligadora.

Alternativamente, puede ser preferible que dicho fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus esté ligado al terminal C de dicho

fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un enlace peptídico entre el residuo de aminoácidos del terminal N de dicho fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus y el residuo de aminoácidos del terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina.

En un aspecto particular preferido, el polipéptido de la presente divulgación es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.

Preferentemente, el polipéptido de la presente divulgación es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.

Se entiende además que la expresión "que consiste en una secuencia de aminoácidos" o "consiste en una secuencia de aminoácidos", respectivamente, como se usa en la presente, en particular también se refiere a cualquier modificación o modificaciones cotraduccionales y/o posteriores a la traducción de la secuencia amino afectada por la célula en la que se expresa la proteína o el dominio de proteína. Por lo tanto, la expresión "que consiste en una secuencia de aminoácidos" o "consiste en una secuencia de aminoácidos", respectivamente, como se describe en la presente, también se refiere, a menos que se indique expresamente lo contrario, a la secuencia de aminoácidos que tiene una o más modificaciones efectuadas por la célula en la que se expresa la proteína o el dominio de proteína, en particular modificaciones de residuos de aminoácidos efectuadas en la biosíntesis de proteínas y/o el procesamiento de proteínas, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en glucosilaciones, fosforilaciones y acetilaciones.

Con respecto a la expresión "al menos 90 %", como se menciona en el contexto de la presente invención, se entiende que dicha expresión se refiere, preferentemente, a "al menos 91 %", con mayor preferencia, a "al menos 92 %", incluso con mayor preferencia, a "al menos 93 %" o en particular a "al menos 94 %".

Con respecto a la expresión "al menos 95 %", como se menciona en el contexto de la presente invención, se entiende que dicha expresión se refiere, preferentemente, a "al menos 96 %", con mayor preferencia, a "al menos 97 %", incluso con mayor preferencia, a "al menos 98 %" o en particular a "al menos 99 %".

Con respecto a la expresión "al menos 99 %", como se menciona en el contexto de la presente invención, se entiende que dicha expresión se refiere, preferentemente, a "al menos 99,2 %", con mayor preferencia, a "al menos 99,4 %", incluso con mayor preferencia, a "al menos 99,6 %" o en particular a "al menos 99,8 %".

Más particularmente, la expresión "al menos 99 % de identidad de secuencia" se refiere a 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de identidad de secuencia.

Se entiende que la expresión "que tiene una identidad de secuencia del 100 %", como se usa en la presente, es equivalente a la expresión "que es idéntico/a".

El porcentaje de identidad de secuencia tiene un significado reconocido en la técnica y existen varios métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polipéptidos o polinucleótidos. Ver, por ejemplo, Lesk, Ed., *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, Nueva York, (1988); Smith, Ed., *Biocomputing: Informatics And Genome Projects*, Academic Press, Nueva York, (1993); Griffin y Griffin, Eds., *Computer Analysis Of Sequence Data, Part I*, Humana Press, Nueva Jersey, (1994); von Heinje, *Sequence Analysis In Molecular Biology*, Academic Press, (1987); y Gribskov y Devereux, Eds., *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, Nueva York, (1991). Los métodos para alinear polinucleótidos o polipéptidos están codificados en programas informáticos, incluso el paquete de programas GCG (Devereux *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul *et al.*, *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990)) y programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) que usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Adv. App. Math.*, 2:482-489 (1981)). Por ejemplo, se puede usar el programa informático ALIGN que emplea el algoritmo FASTA, con una búsqueda de espacios afines con una penalización de apertura de espacio de -12 y una penalización de extensión de espacio de -2. A los fines de la presente invención, las secuencia de nucleótidos se alinean mediante el uso del método Clustal W en el *software* MegAlign versión 11.1.0 (59), 419 de DNASTAR Inc., mediante el uso de los parámetros de alineación múltiple predeterminados establecidos en el programa (penalización de espacio =15,0, penalización de longitud de espacio =6,66, retraso de secuencia divergente (%)= 30 %, peso de ADN de transición =0,50 y matriz de peso del ADN =IUB) y, respectivamente, las secuencias de proteínas/aminoácidos se alinean mediante el uso del método Clustal W en el

software MegAlign versión 11.1.0 (59), 419 de DNASTAR Inc. mediante el uso de los parámetros de alineación múltiple predeterminados establecidos en el programa (matriz de peso de proteínas de la serie Gonnet con penalización de espacio =10,0, penalización de longitud de espacio =0,2, y retraso de secuencia divergente (%) = 30 %).

Como se usa en la presente, se entiende en particular que la expresión "identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: X" es equivalente a la expresión "identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: X a lo largo de SEQ ID NO: X" o a la expresión "identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: X en toda la longitud de SEQ ID NO: X", respectivamente. En este contexto, "X" es cualquier número entero seleccionado entre 1 y 25 de modo que "SEQ ID NO: X" represente cualquiera de los SEQ ID NO mencionados en la presente.

La expresión "grupo que consiste en SEQ ID NO: [...], ...y SEQ ID NO: [...]", como se usa en la presente, es intercambiable por "grupo que consiste en: la secuencia de SEQ ID NO: [...], ...y la secuencia de SEQ ID NO: [...]". "[...]" en este contexto es un marcador de posición para el número de la secuencia. Por ejemplo, la expresión "grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6" es intercambiable por "grupo que consiste en: la secuencia de SEQ ID NO: 3, la secuencia de SEQ ID NO: 4, la secuencia de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de SEQ ID NO: 6".

De acuerdo con otro aspecto preferido particular, el polipéptido de la presente divulgación consiste en:

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, en particular cualquiera de los fragmentos inmunógenos descritos en la presente de una proteína VP8 de rotavirus,
- un residuo de metionina del terminal N que flanquea el residuo de aminoácido del terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
- un fragmento Fc de inmunoglobulina, en particular cualquiera de los fragmentos Fc de inmunoglobulina descritos en la presente, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de dicho un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, en particular a través de una porción ligadora, en donde dicha porción ligadora es preferentemente cualquiera de las porciones ligadoras descritas en la presente,
- y opcionalmente, un fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de

rotavirus ligado al terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina, en particular, a través de una porción ligadora, en donde dicho fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus es preferentemente cualquiera de los fragmentos inmunógenos adicionales de una proteína VP8 de rotavirus descritos en la presente, y en donde dicha porción ligadora es preferentemente cualquiera de las porciones ligadoras descritas en la presente.

En aun otro aspecto preferido, el polipéptido de la presente divulgación forma un dímero con un polipéptido adicional de la presente divulgación. Con máxima preferencia, el polipéptido de la presente divulgación forma un homodímero con un polipéptido idéntico adicional.

Por lo tanto, se entiende particularmente que la expresión "polipéptido de la presente divulgación" abarca además cualquier dímero compuesto por dos polipéptidos de la presente divulgación y, en particular, abarca cualquier homodímero compuesto por dos polipéptidos idénticos de la presente divulgación.

De acuerdo con otro aspecto particular preferido, la presente divulgación proporciona un multímero que comprende o está compuesto por una pluralidad del polipéptido de la presente divulgación, y en donde dicho multímero también se denomina de aquí en adelante "el multímero de la presente divulgación".

Preferentemente, el multímero de la presente divulgación es un homodímero formado por un polipéptido de la presente invención con un polipéptido idéntico adicional de la presente divulgación.

Se entiende particularmente que el término "multímero de la presente divulgación" abarca además cualquier mezcla de diferentes multímeros de la presente divulgación, por ejemplo, una mezcla de

- un homodímero formado por un polipéptido de la presente invención con un polipéptido idéntico adicional de la presente divulgación, y
- uno o más multímeros formados por más de dos de los mismos polipéptidos de la presente divulgación.

Por lo tanto, en un ejemplo preferido en particular, el componente (i) de la composición inmunógena de la presente invención está presente

- en un monómero que consiste en un polipéptido de la presente divulgación, y/o
- un homodímero que consiste en dos polipéptidos idénticos de la presente divulgación,
- y/u opcionalmente un homotrímero que consiste en tres polipéptidos idénticos de la presente divulgación,

en donde preferentemente

- cada uno de dichos dos polipéptidos idénticos de la presente divulgación,
 - y opcionalmente cada uno de dichos tres polipéptidos idénticos de la presente divulgación,
- comprende o consiste en la misma secuencia de aminoácidos que dicho polipéptido de la presente divulgación.

O, más generalmente, la presente invención también abarca una composición inmunógena que comprende

(i) un polipéptido que comprende

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
 - un fragmento Fc de inmunoglobulina,
- en donde opcionalmente dicho polipéptido se incluye en un multímero que comprende o está compuesto por una pluralidad de dicho polipéptido,

y

(ii) al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido.

En la presente, se describe al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, que preferentemente consiste en dos o más sustancias inmunógenas, en donde todas esas sustancias inmunógenas son

diferentes de dicho polipéptido y
diferentes entre sí.

Por lo tanto, el componente (ii) de la composición inmunógena de la presente invención preferentemente consiste en dos o más sustancias inmunógenas, en donde cada una de dichas sustancias inmunógenas es diferente del componente (i) de la composición inmunógena de la presente invención, y en donde todas esas sustancias inmunógenas son diferentes entre sí.

Preferentemente, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, es al menos una sustancia inmunógena que comprende o consiste en un antígeno de reovirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno. Por lo tanto, el componente (ii) es preferentemente al menos una sustancia inmunógena que comprende o consiste en un antígeno de reovirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno del componente (i).

Como se usa en la presente, la expresión "antígeno de reovirus" se refiere en particular a un péptido o una proteína, o una parte de estos, que comprende un epítipo que es reconocido por un anticuerpo específico para un virus que pertenece a

la familia *Reoviridae*.

En un aspecto preferido, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, consiste en dos o más sustancias inmunógenas, en donde cada una de dichas sustancias comprende o consiste en un antígeno de reovirus, y en donde la totalidad de dichos antígenos son diferentes de dicho fragmento inmunógeno y diferentes entre sí. Por lo tanto, el componente **(ii)** preferentemente consiste en dos o más sustancias inmunógenas, en donde cada una de dicha sustancia comprende o consiste en un antígeno de reovirus, y en donde la totalidad de dichos antígenos son diferentes de dicho fragmento inmunógeno del componente **(i)** y son diferentes entre sí.

En otro aspecto preferido, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, es al menos una proteína que comprende o consiste en un antígeno de reovirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno. Por lo tanto, el componente **(ii)** es preferentemente al menos una proteína que comprende o consiste en un antígeno de reovirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno del componente **(i)**.

En aun un aspecto preferido adicional, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, consiste en dos o más proteínas, en donde cada una de dichas proteínas comprende o consiste en un antígeno de reovirus, y en donde la totalidad de dichos antígenos de reovirus son diferentes de dicho fragmento inmunógeno y diferentes entre sí. Por lo tanto, el componente **(ii)** preferentemente consiste en dos o más proteínas, en donde cada una de dichas proteínas comprende o consiste en un antígeno de reovirus, y en donde la totalidad de dichos antígenos son diferentes de dicho fragmento inmunógeno del componente **(i)** y son diferentes entre sí.

Preferentemente, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, es al menos una sustancia inmunógena que comprende un antígeno de rotavirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno. Por lo tanto, el componente **(ii)** es preferentemente al menos una sustancia inmunógena que comprende un antígeno de rotavirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno del componente **(i)**.

La expresión "antígeno de rotavirus", como se usa en la presente, en particular se refiere a un péptido o proteína, o una parte de estos, que comprende un epítipo que es reconocido por un anticuerpo específico para un virus que pertenece al género *Rotavirus*.

En un aspecto preferido, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, consiste en dos o más sustancias inmunógenas, en donde cada una

de dichas sustancias comprende o consiste en un antígeno de rotavirus, y en donde la totalidad de dichos antígenos son diferentes de dicho fragmento inmunógeno y diferentes entre sí. Por lo tanto, el componente **(ii)** preferentemente consiste en dos o más sustancias inmunógenas, en donde cada una de dichas sustancias comprende o consiste en un antígeno de rotavirus, y en donde la totalidad de dichos antígenos son diferentes de dicho fragmento inmunógeno del componente **(i)** y son diferentes entre sí.

En otro aspecto preferido, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, es al menos una proteína que comprende o consiste en un antígeno de rotavirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno. Por lo tanto, el componente **(ii)** es preferentemente al menos una proteína que comprende o consiste en un antígeno de rotavirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno del componente **(i)**.

En aun un aspecto preferido adicional, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, consiste en dos o más proteínas, en donde cada una de dichas proteínas comprende o consiste en un antígeno de rotavirus, y en donde la totalidad de dichos antígenos de rotavirus son diferentes de dicho fragmento inmunógeno y diferentes entre sí. Por lo tanto, el componente **(ii)** preferentemente consiste en dos o más proteínas, en donde cada una de dichas proteínas comprende o consiste en un antígeno de rotavirus, y en donde la totalidad de dichos antígenos son diferentes de dicho fragmento inmunógeno del componente **(i)** y son diferentes entre sí.

En un aspecto preferido en particular, la composición inmunógena de la presente invención es preferentemente una composición inmunógena, en donde

- (i)** dicho polipéptido es un primer polipéptido;
- y
- (ii)** la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, es al menos un polipéptido adicional, diferente de dicho primer polipéptido.

Preferentemente, dicha al menos una sustancia inmunógena comprende o es

- un segundo polipéptido que comprende o consiste en un antígeno de reovirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno,

y opcionalmente comprende un tercer polipéptido, diferente de dicho primer y segundo polipéptido,

y opcionalmente comprende un cuarto polipéptido, diferente de la totalidad de dicho primer a tercer polipéptido.

Preferentemente, dicho tercer polipéptido comprende un antígeno de reovirus, diferente tanto de dicho fragmento inmunógeno como del antígeno de reovirus del segundo polipéptido.

Dicho cuarto polipéptido preferentemente comprende un antígeno de reovirus, diferente de la totalidad de

- dicho fragmento inmunógeno,
- antígeno de reovirus del segundo polipéptido y
- antígeno de reovirus del tercer polipéptido.

En otro aspecto preferido en particular, el componente **(i)** de la composición inmunógena de la presente invención es un primer polipéptido

y el componente **(ii)** de la composición inmunógena de la presente invención es al menos un polipéptido adicional, diferente de dicho primer polipéptido,

y en donde preferentemente el componente **(ii)**

- comprende o es un segundo polipéptido que comprende un antígeno de rotavirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno del componente **(i)**, y
- preferentemente comprende un tercer polipéptido, diferente de dicho primer y segundo polipéptido, y
- opcionalmente comprende un cuarto polipéptido, diferente de la totalidad de dicho primer a tercer polipéptido.

Preferentemente, dicho tercer polipéptido comprende un antígeno de rotavirus, diferente tanto de dicho fragmento inmunógeno del componente **(i)** como del antígeno de rotavirus del segundo polipéptido.

De acuerdo con un aspecto preferido, dicho segundo polipéptido es cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación, como se describe en la presente, siempre que dicho segundo polipéptido sea diferente de dicho primer polipéptido, y preferentemente dicho tercer polipéptido es cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación, como se describe en la presente, siempre que dicho tercer polipéptido sea diferente de dicho primer y segundo polipéptido, y opcionalmente dicho cuarto polipéptido es cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación, como se describe en la presente, siempre que dicho cuarto polipéptido sea diferente de la totalidad del primer al tercer polipéptido.

En otro aspecto preferido, la composición inmunógena de la presente invención es preferentemente una composición inmunógena, en donde

- (i) dicho polipéptido es un primer polipéptido que comprende
- un primer fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
 - un fragmento Fc de inmunoglobulina;
- y
- (ii) la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o consiste en
- un segundo polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, en donde dicho segundo fragmento inmunógeno es diferente de dicho primer fragmento inmunógeno,
 - y preferentemente un tercer polipéptido que comprende un tercer fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, en donde dicho tercer fragmento inmunógeno es diferente de dicho primer y segundo fragmento inmunógeno,
 - y opcionalmente un cuarto polipéptido que comprende un cuarto fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, en donde dicho cuarto fragmento inmunógeno es diferente de la totalidad de dicho primer al tercer fragmento inmunógeno.

Preferentemente, cada uno de dicho segundo al cuarto fragmento inmunógeno se selecciona individualmente del grupo que consiste en

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus A, en particular cualquiera de los fragmentos inmunógenos descritos en la presente de una proteína VP8 de rotavirus A,
- una secuencia de consenso de una porción de una proteína VP8 de rotavirus, tal como una porción de una proteína VP8 de rotavirus A, preferentemente cualquiera de los fragmentos inmunógenos de una proteína VP8 de rotavirus descritos en la presente en el contexto de una secuencia de consenso, y
- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C, en particular cualquiera de los fragmentos inmunógenos descritos en la presente de una proteína VP8 de rotavirus C,

en particular siempre que la totalidad de dicho segundo al cuarto fragmento inmunógeno sea diferente de dicho primer fragmento inmunógeno y diferentes entre sí.

Más específicamente,

dicho primer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7**, **X13**, **X6** y **XC**, y/o

dicho segundo fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7**, **X13**, **X6** y **XC**, y/o

dicho tercer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7**, **X13**, **X6** y **XC**, y/o

dicho cuarto fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7**, **X13**, **X6** y **XC**;

en donde

X7 representa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[7],

X13 representa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[13],

X6 representa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[6] y

XC representa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C, en particular siempre que la totalidad de dicho segundo al cuarto fragmento inmunógeno sea diferente de dicho primer fragmento inmunógeno y diferentes entre sí.

Por lo tanto, como se denomina en la presente,

"**X7**" significa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[7],

"**X13**" significa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[13],

"**X6**" significa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[6] y

"**XC**" significa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C.

X7, como se denomina en la presente, preferentemente consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3.

X13, como se denomina en la presente, preferentemente consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 5.

X6, como se denomina en la presente, preferentemente consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos

99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 4.

XC, como se denomina en la presente, preferentemente consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 6.

En particular, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o consiste en un segundo polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y cada uno de dicho primer y segundo fragmento inmunógeno se selecciona individualmente del grupo que consiste en **X7**, **X13**, **X6** y **XC**, siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X7**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X13**, **X6** y **XC**, siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X6**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7**, **X13** y **XC**, siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X13**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7**, **X6** y **XC**, y siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **XC**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7**, **X13** y **X6**.

Más particularmente, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o consiste en un segundo polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y un tercer polipéptido que comprende un tercer fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y cada uno de dicho primer al tercer fragmento inmunógeno se selecciona individualmente del grupo que consiste en **X7**, **X13**, **X6** y **XC**, siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X7**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X13** y dicho tercer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X6** y **XC**, siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X6**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7** y dicho tercer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X13** y **XC**,

siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X13**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7** y dicho tercer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X6** y **XC**,

y siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **XC**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7** y dicho tercer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X13** y **X6**.

Aun más particularmente, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o consiste en

un segundo polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y

un tercer polipéptido que comprende un tercer fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y

un cuarto polipéptido que comprende un cuarto fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus,

en donde cada uno de dicho primer al cuarto fragmento inmunógeno se selecciona individualmente del grupo que consiste en **X7**, **X6**, **X13** y **XC**,

siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X7**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X13**, dicho tercer fragmento inmunógeno es **X6** y dicho cuarto fragmento inmunógeno es **XC**,

siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X6**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7**, dicho tercer fragmento inmunógeno es **X13** y dicho cuarto fragmento inmunógeno es **XC**,

siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X13**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7**, dicho tercer fragmento inmunógeno es **X6** y dicho cuarto fragmento inmunógeno es **XC**,

y siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **XC**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7**, dicho tercer fragmento inmunógeno es **X13** y dicho cuarto fragmento inmunógeno es **X6**.

Preferentemente,

dicho primer fragmento inmunógeno mencionado en la presente es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[7] (**X7**), y/o

dicho segundo fragmento inmunógeno mencionado en la presente es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[13] (**X13**), y/o

dicho tercer fragmento inmunógeno mencionado en la presente es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[6] (**X6**), y/o

dicho cuarto fragmento inmunógeno mencionado en la presente es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C (**XC**).

Con máxima preferencia, dicho primer fragmento inmunógeno es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[7] (**X7**), y dicho segundo fragmento inmunógeno es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[13] (**X13**), y dicho tercer fragmento inmunógeno es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[6] (**X6**), y opcionalmente dicho cuarto fragmento inmunógeno es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C (**XC**).

Preferentemente, dicho primer fragmento inmunógeno consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3, y dicho segundo fragmento inmunógeno consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 5, y dicho tercer fragmento inmunógeno consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 4, y opcionalmente dicho cuarto fragmento inmunógeno consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto preferido, dicho primer polipéptido, como se menciona en la presente, se selecciona del grupo que consiste en **R7, R13, R6 y RC**, y/o dicho segundo polipéptido, como se menciona en la presente, se selecciona del grupo que consiste en **R7, R13, R6 y RC**, y/o dicho tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7, R13, R6 y RC**, y/o dicho cuarto polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7, R13, R6 y RC**; en donde

R7 es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12,

R13 es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14,

R6 es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, y

RC es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15,

en particular siempre que la totalidad de dicho segundo al cuarto polipéptido sea diferente de dicho primer polipéptido y diferentes entre sí.

Preferentemente, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho primer polipéptido, comprende o consiste en un segundo polipéptido de una proteína VP8 de rotavirus, y

cada uno de dicho primer y segundo polipéptido se selecciona individualmente del grupo que consiste en **R7**, **R13**, **R6** y **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R7**, entonces dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R13**, **R6** y **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R6**, entonces dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7**, **R13** y **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R13**, entonces dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7**, **R6** y **RC**,

y siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **RC**, entonces dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7**, **R13** y **R6**.

Particularmente, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho primer polipéptido, comprende o consiste en

un segundo polipéptido y

un tercer polipéptido,

y cada uno de dicho primer al tercer polipéptido se selecciona individualmente del grupo que consiste en **R7**, **R13**, **R6** y **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R7**, entonces dicho segundo polipéptido es **R13** y dicho tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R6** y **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R6**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7** y dicho tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R13** y **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R13**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7** y dicho tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R6** y **RC**,

y siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **RC**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7** y dicho tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R13** y **R6**.

Más particularmente, la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o consiste en

un segundo polipéptido y

un tercer polipéptido, y

un cuarto polipéptido,

en donde cada uno de dicho primer al cuarto polipéptido se selecciona individualmente del grupo que consiste en **R7**, **R6**, **R13** y **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R7**, entonces dicho segundo polipéptido es **R13**, dicho tercer polipéptido es **R6** y dicho cuarto polipéptido es **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R6**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7**, dicho tercer polipéptido es **R13** y dicho cuarto polipéptido es **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R13**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7**, dicho tercer polipéptido es **R6** y dicho cuarto polipéptido es **RC**,

y siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **RC**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7**, dicho tercer polipéptido es **R13** y dicho cuarto polipéptido es **R6**.

De acuerdo con un aspecto preferido,

dicho primer polipéptido mencionado en la presente es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, aun con mayor preferencia al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 12, y

dicho segundo polipéptido mencionado en la presente es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15, y

preferentemente, dicho tercer polipéptido mencionado en la presente es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15,

y opcionalmente dicho cuarto polipéptido mencionado en la presente es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15,

Particularmente, se prefiere una composición inmunógena de la presente invención que comprende

- (i) una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, aun con mayor preferencia al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 12, y
- (ii) una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15.

Más particularmente, se prefiere una composición inmunógena de la presente

invención que comprende

- (i) una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, y
- (ii) una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, y
una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13,
y opcionalmente una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15.

La composición inmunógena de la presente invención comprende preferentemente cada uno del componente (i) y de las sustancias del componente (ii) en una concentración de al menos 100 nM, preferentemente, de al menos 250 nM, con mayor preferencia, de al menos 500 nM y, con máxima preferencia, de al menos 1 μ M.

De acuerdo con otro aspecto preferido, la composición inmunógena de la presente invención contiene cada uno del componente (i) y de las sustancias del componente (ii) en una concentración de 100 nM a 50 μ M, preferentemente, de 250 nM a 25 μ M, y, con máxima preferencia, de 1-10 μ M.

En particular, se administra 1 ml o, según sea el caso, 2 ml de la composición inmunógena de la presente invención a un sujeto. Por lo tanto, una dosis de la composición inmunógena de la presente invención que se ha de administrar a un sujeto tiene preferentemente un volumen de 1 ml o 2 ml.

Preferentemente, se administran una dosis o dos dosis de la composición inmunógena a un sujeto.

La composición inmunógena de la presente invención se administra preferentemente de manera sistémica o tópica. Las vías de administración adecuadas usadas convencionalmente son la administración parenteral u oral, tal como intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intranasal, así como también la inhalación. Sin embargo, en función de la naturaleza y el modo de acción de un compuesto, la composición inmunógena también puede administrarse por otras vías. Se prefiere mayormente que la composición inmunógena se administre por vía intramuscular. La composición inmunógena de la presente invención preferentemente comprende además un portador o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.

Como se usa en la presente, "un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario" incluye cualquier solvente, medio de dispersión, recubrimiento, agente estabilizador, diluyente, conservante, agente antibacteriano y antifúngico, agente isotónico, agente retardador de la adsorción y similares. En algunas formas de realización preferidas, y especialmente en aquellas que incluyen composiciones inmunógenas liofilizadas, los agentes estabilizadores para su uso en la presente invención incluyen estabilizadores para liofilización.

En algunas formas de realización, la composición inmunógena de la presente invención contiene un adyuvante.

Como se usa en la presente, el término "adyuvante" puede incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, por ejemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua y emulsiones de agua en aceite en agua. En particular, la emulsión puede ser a base de aceite de parafina líquida suave (de tipo Farmacopea europea); aceite de isoprenoide tal como aceite de escualano o escualeno, aceite generado de la oligomerización de alcanos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más particularmente aceites vegetales, oleato de etilo, di-(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos o alcoholes ramificados, en particular ésteres de ácido isosteárico. El aceite se usa en combinación con emulgentes para formar la emulsión. Preferentemente, los emulgentes son tensioactivos no iónicos, en particular, ésteres de sorbitán, de manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isosterárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, que opcionalmente son etoxilados, y bloques de copolímeros de

polioxipropileno-polioxietileno, en particular, los productos de Pluronic, en especial, L121. Ver Hunter *et al.*, The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd *et al.*, Vaccine 15:564-570 (1997). Un adyuvante de ejemplo es la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" editado por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995, o la emulsión MF59 descrita en la página 183 del mismo libro.

Otro ejemplo de un adyuvante es un compuesto seleccionado de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivados de alquenilo. Los compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que se reticulan, en especial, con éteres de polialquenilo de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen con el término carbómero (Phameuropa vol. 8, N.º 2, junio de 1996). Las personas del oficio de nivel medio también pueden remitirse a la patente estadounidense N.º 2.909.462, que describe dichos polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferentemente, no más de 8, donde los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos se reemplazan por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos insaturados etilénicamente. Los radicales insaturados mismos pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Son particularmente adecuados los productos comercializados con el nombre CARBOPOL®; (BF Goodrich, Ohio, EE. UU.). Se reticulan con una sacarosa de alilo o con pentaeritritol de alilo. Entre ellos, se pueden mencionar Carbopol 974P, 934P y 971P. Es de máxima preferencia el uso de CARBOPOL® 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivados de alquenilo, se encuentran los copolímeros EMA (Monsanto), que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua genera una solución ácida que se neutraliza, preferentemente, a un pH fisiológico, a fin de obtener la solución adyuvante en la que se incorporará la composición inmunógena, inmunitaria o de vacuna.

Otros adyuvantes adecuados, de los que se puede elegir el adyuvante, incluyen, entre otros, el sistema de adyuvantes RIBI (Ribi Inc.), copolímero en bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil lípido A, adyuvante de lípido-amina Avridine, enterotoxina termolábil de E. coli (recombinante u otra), toxina del cólera, IMS 1314 o dipéptido de muramilo, o citocinas naturales o recombinantes, o análogos de estas, o estimulantes de liberación de citocina

endógena, entre muchos otros.

Se espera que se pueda agregar un adyuvante en una cantidad de alrededor de 100 µg a alrededor de 10 mg por dosis, preferentemente en una cantidad de alrededor de 100 µg a alrededor de 10 mg por dosis, con mayor preferencia en una cantidad de alrededor de 500 µg a alrededor de 5 mg por dosis, aun con mayor preferencia en una cantidad de alrededor de 750 µg a alrededor de 2,5 mg por dosis, y con máxima preferencia en una cantidad de alrededor de 1 mg por dosis. Alternativamente, el adyuvante puede estar a una concentración de alrededor de 0,01 a 50 %, preferentemente a una concentración de alrededor de 2 % a 30 %, con mayor preferencia a una concentración de alrededor de 5 % a 25 %, aun con mayor preferencia a una concentración de alrededor de 7 % a 22 %, y con máxima preferencia a una concentración de 10 % a 20 % en volumen del producto final.

Los "diluyentes" pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizadores incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiaminotetraacético, entre otros.

De acuerdo con un aspecto preferido particular, la invención también proporciona una composición inmunógena, en particular la composición inmunógena de la presente invención, en donde la composición inmunógena comprende o consiste en

- el componente (i),
- el componente (ii),
- un portador o excipiente aceptable desde el punto de vista veterinario o farmacéutico,
- y opcionalmente un adyuvante.

El adyuvante en el contexto de la presente invención se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un adyuvante de aceite en agua emulsionado y un carbómero.

La expresión "composición inmunógena" se refiere a una composición que comprende al menos un antígeno, que provoca una respuesta inmunitaria en el huésped al que se le administra la composición inmunógena. Tal respuesta inmunológica puede ser una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos a la composición inmunógena, de acuerdo con la invención. El huésped también se describe como "sujeto". Preferentemente, cualquiera de los huéspedes o sujetos descritos o mencionados en la presente es un animal.

El término "animal", como se usa en la presente, se refiere en particular a un mamífero, preferentemente a cerdos, con mayor preferencia a un cerdo, con máxima preferencia a un lechón.

En general, una "respuesta inmunitaria" incluye, por ejemplo, uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T colaboradores, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos T gamma-delta, dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición inmunógena de la presente invención. Preferentemente, el huésped presentará una respuesta inmunitaria protectora o una respuesta terapéutica.

Una "respuesta inmunitaria protectora" se manifestará mediante una reducción o ausencia de uno o más signos clínicos que generalmente exhibe un huésped infectado, un tiempo de recuperación más corto y/o una menor duración de la infectividad o un menor título de patógeno en los tejidos, fluidos corporales o excreciones del huésped infectado.

El "patógeno" o "patógeno particular", como se menciona en la presente, se refiere en particular al rotavirus del que deriva un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus. Por ejemplo, el patógeno, como se menciona en la presente, es un rotavirus A o un rotavirus C.

Cuando el huésped muestra una respuesta inmunitaria protectora tal que se mejora la resistencia a una nueva infección y/o se reduce la gravedad clínica de la enfermedad, la composición inmunógena se describe como una "vacuna".

Como se describe en la presente, un "antígeno" se refiere, entre otros, a componentes que provocan una respuesta inmunitaria en un huésped, a una composición inmunógena o vacuna de interés que comprende el antígeno o un componente de este inmunitariamente activo. En particular, el término "antígeno", como se usa en la presente, se refiere a una proteína o un dominio de proteína que, si se administra a un huésped, puede provocar una respuesta inmunológica en el huésped.

La expresión "tratamiento y/o profilaxis" se refiere a la disminución de la incidencia de la infección por patógeno particular en un rebaño o la reducción en la gravedad de uno o más signos clínicos causados por o asociados con la infección por patógeno particular. Por lo tanto, la expresión "tratamiento y/o profilaxis" también se refiere a la reducción de la cantidad de animales en un rebaño que son infectados por el patógeno particular (= disminución de la incidencia de la infección por patógeno particular) o a la reducción de la gravedad de uno o más signos clínicos normalmente

asociados con o causados por una infección con el patógeno en un grupo de animales que recibió una cantidad eficaz de la composición inmunógena como se proporciona en la presente en comparación con un grupo de animales que no recibió dicha composición inmunógena.

En general, "tratamiento y/o profilaxis" implica la administración de una cantidad eficaz de la composición inmunógena de la presente invención a un sujeto o rebaño de sujetos que necesitan o que podrían beneficiarse de dicho tratamiento/profilaxis. El término "tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad eficaz de la composición inmunógena una vez que el sujeto o al menos algunos animales del rebaño ya están infectados con dicho patógeno, y en donde estos animales ya muestran algunos signos clínicos causados por o asociados a la infección por dicho patógeno. El término "profilaxis" se refiere a la administración a un sujeto antes de cualquier infección de tal sujeto con un patógeno o al menos cuando dicho animal o ninguno de los animales en un grupo de animales muestra uno o más signos clínicos causados por o asociados con la infección por tal patógeno.

El término "cantidad eficaz", como se usa en la presente, significa, entre otros, una cantidad de antígeno, en particular de los polipéptidos de la presente divulgación, que provoca o puede provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Dicha cantidad eficaz puede disminuir la incidencia de la infección por patógeno particular en un rebaño o reducir la gravedad de uno o más signos clínicos de la infección por patógeno particular. Preferentemente, uno o más de los signos clínicos se reducen respecto de su incidencia o gravedad en al menos 10 %, con mayor preferencia, en al menos 20 %, incluso con mayor preferencia, en al menos 30 %, incluso con mayor preferencia, en al menos 40 %, incluso con mayor preferencia, en al menos 50 %, incluso con mayor preferencia, en al menos 60 %, incluso con mayor preferencia, en al menos 70 %, incluso con mayor preferencia, en al menos 80 %, incluso con mayor preferencia, en al menos 90 %, y, con máxima preferencia, en al menos 95 % en comparación con los sujetos no tratados o tratados con una composición inmunógena que estaba disponible antes de la presente invención pero que posteriormente se infectaron con el patógeno particular.

La expresión "signos clínicos" como se usa en la presente se refiere a los signos de infección de un sujeto del patógeno particular. Los signos clínicos de infección dependen del patógeno seleccionado. Los ejemplos de tales signos clínicos incluyen, entre otros, diarrea, vómitos, fiebre, dolor abdominal y deshidratación.

La reducción de la incidencia o la reducción de la gravedad de uno o más

signos clínicos provocados o asociados con la infección por patógeno particular en un sujeto puede lograrse mediante la administración de una o más dosis de la composición inmunógena de la presente invención a un sujeto.

La expresión "reducción de la excreción fecal" significa, entre otros, la reducción de la cantidad de copias de ARN de un virus patógeno, tal como el de un rotavirus, por ml de heces o la cantidad de colonias que forman placa por decilitro de heces se reduce en las heces de los sujetos que reciben la composición de la presente invención en al menos un 50 % en comparación con los sujetos que no reciben la composición y pueden infectarse. Con mayor preferencia, los niveles de excreción fecal se reducen en sujetos que reciben la composición de la presente invención en al menos 90 %, preferentemente, en al menos 99,9 %, con mayor preferencia, en al menos 99,99 % e, incluso con mayor preferencia, en al menos 99,999 %.

La expresión "excreción fecal", tal como se usa en la presente, se usa de acuerdo con su significado común y corriente en medicina y virología y se refiere a la producción y liberación de virus desde una célula de un sujeto al medio ambiente desde un sujeto infectado a través de las heces del sujeto.

El polipéptido de la presente divulgación, preferentemente, es una proteína recombinante, en particular una proteína expresada en baculovirus recombinante.

La expresión "proteína recombinante", como se usa en la presente, en particular se refiere a una proteína que se produce mediante técnicas de ADN recombinante, en donde, en general, ADN que codifica la proteína expresada se inserta en un vector de expresión adecuado que a su vez se utiliza para transformar o, en el caso de un vector de virus, para infectar una célula huésped para producir la proteína heteróloga. Por lo tanto, la expresión "proteína recombinante", como se usa en la presente, se refiere en particular a una molécula de proteína que se expresa a partir de una molécula de ADN recombinante. "Molécula de ADN recombinante", como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ADN que está formada por segmentos de ADN unidos por medio de técnicas biológicas moleculares. Los sistemas adecuados para sistemas para producción de proteínas recombinantes incluyen, entre otros, células de insectos (por ejemplo, baculovirus), sistemas procarióticos (por ejemplo, *Escherichia coli*), hongos (por ejemplo, *Myceliophthora thermophila*, *Aspergillus oryzae*, *Ustilago maydis*), levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), células de mamífero (por ejemplo, ovario de hámster chino, HEK293), plantas (por ejemplo, cártamo), algas, células aviares, células de anfibios, células de peces, y sistemas libres de células (por ejemplo, lisado

de reticulocito de conejo).

De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la presente divulgación, en donde dicho polinucleótido, que también se denomina "el polinucleótido de acuerdo con la presente divulgación" en adelante, preferentemente, es un polinucleótido aislado.

Preferentemente, el polinucleótido de acuerdo con la presente divulgación comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

La producción de los polinucleótidos descritos en la presente está dentro del oficio de nivel medio y se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas recombinantes descritas, entre otros lugares, en Sam brook *et al.*, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Amusable, *et al.*, 2003, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Innis *et al.* (eds), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; and Erlich (ed), 1994, PCR Technology, Oxford University Press, New York, todos los cuales se incorporan en la presente por referencia.

En aun un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un vector que contiene un polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente divulgación.

"Vector", así como también "vector que contiene un polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente divulgación", a los fines de la presente invención, se refiere a un vector de expresión adecuado, preferentemente un vector de expresión de baculovirus, que a su vez se usa para transfectar, o en el caso de un vector de expresión de baculovirus, para infectar una célula huésped para producir la proteína o el polipéptido codificado por el ADN. Los vectores y métodos para elaborar y/o usar vectores (o recombinantes) para la expresión se pueden llevar a cabo mediante, o de manera análoga a, los métodos divulgados en: Patentes estadounidenses N.º 4.603.112, 4.769.330, 5.174.993, 5.505.941, 5.338.683, 5.494.807, 4.722.848, 5.942.235, 5.364.773, 5.762.938, 5.770.212, 5.942.235, 382.425, publicaciones PCT WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update, "PNAS USA 93: 11349-11353, octubre de 1996;

Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety", PNAS USA 93: 11341-11348, octubre de 1996; Smith *et al.*, patente estadounidense N.º 4.745.051 (baculovirus recombinante); Richardson, C. D. (editor), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith *et al.*, "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, diciembre, 1983, Vol. 3, N.º 12, páginas 2156-2165; Pennock *et al.*, "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector, "Molecular and Cellular Biology", marzo de 1984, Vol. 4, N.º 3, página 406; EPA0 370 573; solicitud de patente estadounidense N.º 920.197, presentada el 16 de octubre de 1986; publicación de patente EP N.º 265785; patente estadounidense N.º 4.769.331 (herpesvirus recombinante); Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93:11307-11312, octubre de 1996; Andreansky *et al.*, "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, octubre de 1996; Robertson *et al.*, "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334-11340, octubre de 1996; Frolov *et al.*, "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, octubre de 1996; Kitson *et al.*, J. Virol. 65, 3068-3075, 1991; patente estadounidense N.º 5.591.439, 5.552.143; WO 98/00166; solicitud estadounidense permitida N.º de serie 08/675.556 y 08/675.566 ambas presentadas el 3 de julio de 1996 (adenovirus recombinante); Grunhaus *et al.*, 1992, "Adenovirus as cloning vectors," Seminars in Virology (Vol. 3) páginas 237-52, 1993; Ballay *et al.* EMBO Journal, vol. 4, páginas 3861-65, Graham, Tibtech 8, 85-87, abril de 1990; Prevec *et al.*, J. Gen Virol. 70, 42434; PCT WO 91/11525; Felgner *et al.* (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561, Science, 259: 1745-49, 1993; y McClements *et al.*, "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, octubre de 1996; y patente estadounidense N.º 5.591.639, 5.589.466, y 5.580.859, así como también WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; Tang *et al.*, Nature, y Furth *et al.*, Analytical Biochemistry, relacionados con vectores de expresión de ADN, entre otros. Ver también WO 98/33510; Ju *et al.*, Diabetologia, 41: 736-739, 1998 (sistema de expresión lentiviral); Sanford *et al.*, patente estadounidense N.º 4.945.050; Fischbach *et al.* (Intracel); WO 90/01543; Robinson *et al.*, Seminars in

Immunology vol. 9, páginas 271-283 (1997), (sistemas de vectores de ADN); Szoka *et al.*, patente estadounidense N.º 4.394.448 (método para insertar ADN en células vivas); McCormick *et al.*, patente estadounidense N.º 5.677.178 (uso de virus citopáticos); y patente estadounidense N.º 5.928.913 (vectores para administración de genes); así como también otros documentos citados en la presente.

Los vectores virales preferidos incluyen baculovirus, tal como BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), en particular siempre que las células de producción sean células de insectos. Aunque se prefiere el sistema de expresión de baculovirus, las personas del oficio de nivel medio entienden que otros sistemas de expresión, que incluyen aquellos descritos anteriormente, funcionarán para los fines de la presente invención, a saber, la expresión de proteína recombinante.

Por lo tanto, la divulgación también proporciona un baculovirus que contiene un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la presente divulgación. Dicho baculovirus, que también se denomina "el baculovirus de acuerdo con la presente divulgación" de aquí en adelante, preferentemente, es un baculovirus aislado.

Además, la divulgación por lo tanto también proporciona un plásmido, preferentemente, un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la presente divulgación. Dicho plásmido, que también se denomina "el plásmido de acuerdo con la presente divulgación" en lo sucesivo, es en particular un plásmido aislado.

La divulgación además proporciona una célula infectada por y/o que contiene un baculovirus que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la presente divulgación, o un plásmido, preferentemente, un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de la presente divulgación. Dicha célula, que también se denomina "la célula de acuerdo con la presente divulgación" en lo sucesivo, es preferentemente una célula aislada.

El término "aislado", cuando se utiliza en el contexto de una célula aislada, es una célula que, por intervención humana, existe separada de su ambiente nativo y, por lo tanto, no es un producto de la naturaleza.

En aun otro aspecto, la invención también se refiere al uso de la composición inmunógena de la presente invención para la preparación de un medicamento, preferentemente, una vacuna.

En este contexto, la invención también proporciona un método para producir la

composición inmunógena de la presente invención, en donde dicho método comprende la etapa de infectar una célula, preferentemente, una célula de insecto, con el baculovirus de acuerdo con la presente invención.

Además, la divulgación también proporciona un método para producir el polipéptido de la presente divulgación, en donde dicho método comprende la etapa de transfectar una célula con el plásmido de acuerdo con la presente divulgación.

El polipéptido de la presente divulgación, preferentemente, se expresa en altas cantidades suficientes para el autoensamblaje estable de las partículas similares a virus, que luego se pueden utilizar para vacunación.

El término "vacunación" o "vacunar", como se usa en la presente, significa, entre otros, un proceso que incluye la administración de un antígeno, tal como un antígeno incluido en una composición inmunógena, a un sujeto, en donde dicho antígeno, por ejemplo, el polipéptido de la presente divulgación, cuando se administra a dicho sujeto, genera o es capaz de generar una respuesta inmunológica protectora en dicho sujeto.

La presente invención también proporciona la composición inmunógena de la presente invención para su uso como un medicamento, preferentemente, como una vacuna.

En particular, la composición inmunógena de la presente invención se proporciona para su uso en un método para reducir o prevenir uno o más signos clínicos o enfermedad causados por una infección por rotavirus, en donde el rotavirus, preferentemente, es un rotavirus del grupo que tiene un genoma que codifica el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus. La composición inmunógena de la presente invención en particular se proporciona para su uso en un método para reducir o prevenir la excreción fecal causada por una infección por rotavirus, preferentemente, en donde el virus es un rotavirus del grupo que tiene un genoma que codifica el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus. Por lo tanto, en un ejemplo particular, si el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, como se menciona en la presente, está codificado por el genoma de un rotavirus A, entonces la composición inmunógena de la presente invención es para su uso en un método para reducir o prevenir uno o más signos clínicos, mortalidad, excreción fecal o enfermedad causados por una infección por rotavirus A.

Más en particular, la composición inmunógena de la presente invención se proporciona para su uso en un método para reducir o prevenir uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por rotavirus en un

sujeto o para su uso en un método para tratar o prevenir una infección por rotavirus en un sujeto.

Una infección por rotavirus, como se menciona en la presente, en particular se refiere a una infección con un rotavirus A o rotavirus C.

Además, la composición inmunógena de la presente invención se proporciona para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra rotavirus en un sujeto.

El sujeto, como se menciona en la presente, preferentemente, es un mamífero, tal como un porcino o un bovino, o un pájaro, tal como un pollo. En particular, el sujeto es un cerdo, y en donde el cerdo, preferentemente, es un lechón o una cerda, tal como una cerda preñada. Con máxima preferencia, en el contexto de inducir una respuesta inmunitaria contra rotavirus en un sujeto, dicho sujeto es una cerda preñada. En el contexto de reducir o prevenir uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por rotavirus en un sujeto, o tratar o prevenir una infección por rotavirus en un sujeto, dicho sujeto, con máxima preferencia, es un lechón.

De acuerdo con un aspecto preferido, la composición inmunógena de la presente invención es para su uso en un método para reducir o prevenir uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por rotavirus en un lechón, en donde el lechón ha de ser amamantado por una cerda a la que se administró la composición inmunógena. Dicha cerda a la que se administró la composición inmunógena, preferentemente, es una cerda a la que se administró la composición inmunógena mientras dicha cerda estaba preñada, en particular con dicho lechón.

Además, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o la prevención de una infección por rotavirus, la reducción, prevención o tratamiento de uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por rotavirus, o la prevención o tratamiento de una enfermedad causada por una infección por rotavirus, que comprende administrar la composición inmunógena de la presente invención a un sujeto.

Además, se proporciona un método para inducir la producción de anticuerpos específicos para rotavirus, preferentemente, en una cerda preñada, en donde dicho método comprende administrar la composición inmunógena de la presente invención a dicha cerda.

Además, la presente invención proporciona un método para reducir o prevenir uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por

rotavirus en un lechón, en donde dicho método comprende

- administrar la composición inmunógena de acuerdo con la presente invención a una cerda, y
- permitir que dicho lechón sea amamantado por dicha cerda, y en donde dicha cerda, preferentemente, es una cerda que está preñada, en particular, con dicho lechón.

Preferentemente, dichos dos métodos anteriores comprenden las etapas de

- administrar la composición inmunógena de la presente invención a una cerda que está preñada con dicho lechón,
- permitir que dicha cerda dé a luz dicho lechón, y
- permitir que dicho lechón sea amamantado por dicha cerda.

Además, se proporciona un método para reducir uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por rotavirus en un lechón, en donde el lechón ha de ser amamantado por una cerda a la que se administró la composición inmunógena de la presente invención.

El uno o más signos clínicos, como se mencionan en la presente, se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en

- diarrea,
- colonización por rotavirus, en particular colonización por rotavirus del intestino,
- lesiones, en particular lesiones macroscópicas, y
- disminución de la ganancia de peso diaria promedio.

De acuerdo con un ejemplo, el uno o más signos clínicos mencionados en la presente son una colonización por rotavirus del intestino, en particular del intestino delgado. De acuerdo con otro ejemplo, el uno o más signos clínicos mencionados en la presente son lesiones entéricas, en particular lesiones entéricas macroscópicas.

De acuerdo con otro aspecto particular preferido, la composición inmunógena de la presente invención es para su uso en cualquiera de los métodos descritos anteriormente, en donde

- dicha infección por rotavirus es una infección por rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7],
- dicha infección con un rotavirus es una infección con genotipo P[23] del rotavirus y/o genotipo P[7] del rotavirus,
- dicha respuesta inmunitaria contra el rotavirus es una respuesta inmunitaria contra el rotavirus de genotipo P[23] y/o el rotavirus de genotipo P[7], o
- dichos anticuerpos específicos para rotavirus son anticuerpos específicos para

rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7], y en donde, preferentemente, dicha composición inmunógena de la presente invención comprende cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación descritos en la presente que comprenden un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus P[7], en particular que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o aun con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto particular, una "infección por rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7]", como se menciona en la presente, es una infección por rotavirus de genotipo P[23].

En otro aspecto preferido, una "infección por rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7]", como se menciona en la presente, es una infección por rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7].

En un aspecto particular, una "respuesta inmunitaria contra rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7]", como se menciona en la presente, es una respuesta inmunitaria contra rotavirus de genotipo P[23].

En otro aspecto particular, una "respuesta inmunitaria contra rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7]", como se menciona en la presente, es una respuesta inmunitaria contra rotavirus de genotipo P[23] y rotavirus de genotipo P[7].

En un aspecto particular, los "anticuerpos específicos para rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7]", como se mencionan en la presente, son anticuerpos específicos para rotavirus de genotipo P[23].

En otro aspecto preferido, los "anticuerpos específicos para rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7]", como se mencionan en la presente, comprenden o son anticuerpos específicos para rotavirus de genotipo P[23] y anticuerpos específicos para rotavirus de genotipo P[7].

En un aspecto adicional, la composición inmunógena de la presente invención se administra para inducir la producción de anticuerpos específicos para rotavirus C, en un animal, preferentemente, en una cerda preñada. Preferentemente en este aspecto adicional, dicha composición inmunógena de la presente invención comprende, respectivamente, cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación descritos en la presente que comprenden un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C, en particular que consiste en una secuencia de aminoácidos que

tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 15.

La invención proporciona además un método para producir la composición inmunógena de la presente invención, en donde dicho método comprende transfectar una célula con el plásmido de la presente invención.

Además, se proporciona un método para producir la composición inmunógena de la presente invención, en donde dicho método comprende infectar una célula, preferentemente, una célula de insecto, con el baculovirus de la presente divulgación.

Además, la presente invención se refiere a un método para producir la composición inmunógena de la presente invención, en donde el método comprende las etapas de:

- (a) permitir la infección de una célula susceptible en cultivo con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de la presente divulgación, en donde dicho polipéptido se expresa mediante dicho vector;
 - (b) a partir de esto, recuperar dicho polipéptido, en particular en el sobrenadante de dicha célula cultivada, en donde, preferentemente, los residuos celulares se separan de dicho polipéptido mediante una etapa de separación, preferentemente, que incluye una microfiltración a través de al menos un filtro, preferentemente, dos filtros, en donde el al menos un filtro, preferentemente, tiene un tamaño de poro de alrededor de 1 a alrededor de 20 μm y/o de alrededor de 0,1 μm a alrededor de 4 μm ;
 - (c) inactivar el vector mediante la adición de etilenimina binaria (BEI) a la mezcla de la etapa (b);
 - (d) neutralizar el BEI mediante la adición de tiosulfato de sodio a la mezcla resultante de la etapa (c); y
 - (e) concentrar el polipéptido en la mezcla resultante de la etapa (d) mediante la eliminación de una porción del líquido de la mezcla mediante una etapa de filtración mediante el uso de un filtro con una membrana de filtro que tiene un recorte de peso molecular de entre alrededor de 5 kDa y alrededor de 100 kDa, preferentemente, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 50 kDa;
- y en donde dicho método comprende las etapas de:
- (f) mezclar la mezcla restante después de la etapa (e) con al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido;
 - (g) y, opcionalmente, mezclar la mezcla restante después de la etapa (f) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en portadores,

adyuvantes, diluyentes y excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico, y combinaciones de estos,

o en donde dicho método comprende las etapas de:

- (f) mezclar la mezcla restante después de la etapa (e) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en portadores, adyuvantes, diluyentes y excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico, y combinaciones de estos, y
- (g) mezclar la mezcla restante después de la etapa (f) con al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido.

Para dicha mezcla con al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, en particular, cualquiera de las descritas en la presente, al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, o componente (ii), respectivamente, son usadas.

En la etapa (a) de dicho método, dichas células, preferentemente, son células de insecto y dicho vector, preferentemente, es el baculovirus de la presente divulgación.

En la etapa (b) de dicho método, dicho polipéptido, con máxima preferencia, se recupera en el sobrenadante de dichas células cultivadas, en lugar de dentro de las células.

Además, la presente invención proporciona la composición inmunógena de la presente invención y el uso de dicha composición inmunógena en cualquiera de los métodos descritos en la presente, en donde dicha composición inmunógena se puede obtener mediante el método mencionado anteriormente para producir la composición inmunógena de la presente invención.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos solo tienen como fin ilustrar la presente divulgación. En ningún caso limitan el alcance de las reivindicaciones.

EJEMPLO 1

Diseño, producción y evaluación de proteínas de fusión:

Diseño de constructo:

La secuencia VP4 de rotavirus A se obtuvo originalmente de una muestra fecal porcina que se asemejaba cercanamente a la secuencia de GenBank JX971567.1 y se

clasificó como un genotipo P[7]. Se utilizaron los aminoácidos de VP4 57-224 (SEQ ID NO: 3), también denominados "AVP8" de aquí en adelante, y corresponden al dominio similar a la lectina de la proteína VP8, pero con un terminal N extendido por ocho residuos de aminoácidos. La porción ligadora es Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 9). La secuencia de Fc de IgG porcina (SEQ ID NO: 7) coincide con los aminoácidos 242-470 del precursor constante de la cadena pesada de IgG (secuencia GenBank BAM75568.1). Se recibió un Gblock IDT que codifica AVP8, el ligador Gly-Gly-Ser, y la secuencia de Fc de IgG porcina, todos los codones optimizados para células de insecto (SEQ ID NO: 17), y se denominó Fc de IgG-AVP8 de aquí en adelante. La proteína (SEQ ID NO: 12) codificada por Fc de IgG-AVP8 también se denomina "proteína Fc de IgG-AVP8" en la presente.

Clonación, expresión y purificación:

El Fc de IgG-AVP8 se clonó mediante TOPO y posteriormente se insertó en el plásmido de transferencia de baculovirus pVL1393 mediante el uso de los sitios de restricción BamHI y NotI. Luego, se cotransfectó en células Sf9 con BaculoGold para generar baculovirus recombinantes. La producción de proteína de Fc de IgG-AVP8 se realizó de la siguiente manera: Un litro de células Sf+ en un matraz giratorio de 3 l se infectó a 0,2 MOI con 4DPI con medio agotado recolectado, se centrifugó 20 minutos a 15.000 g y se filtró a través de 0,2 µm. Se agregó 1 ml de suspensión de resina MabSelect SuRE LX (GE Healthcare, N.º de catálogo 17-5474-01) y se incubó durante la noche a 4 °C con agitación moderada. La resina se volvió a capturar mediante filtraciones, se lavó con 4x10 ml de amortiguador de unión suave (Pierce, N.º de catálogo 21012) y se eluyó en 7x5 ml volúmenes de amortiguador de elución suave (Pierce, N.º de catálogo 21027). Las fracciones se combinaron y se dializaron a 4 °C contra 3,5 l de TBS con un cambio de amortiguador. Se realizó un ensayo BCA (Thermo Scientific, N.º de catálogo 23227) para determinar la concentración (80 µg/ml).

Estudio de serología:

La proteína Fc de IgG-AVP8 purificada mediante proteína A se formuló con Emulsigen D con 87,5 % de antígeno y 12,5 % de adyuvante. Los lechones de aproximadamente siete semanas de vida recibieron una dosis de 2 ml IM al costado del cuello, con un refuerzo 21 días después. Se recolectaron muestras de suero semanalmente durante siete semanas. El suero de los lechones vacunados con

proteína Fc de IgG-AVP8 se evaluó mediante ELISA (**Figura 1**), como se describe a continuación ("Protocolo para ELISA"), y ensayo de neutralización de virus (**Figura 2**), como se describe a continuación ("Protocolo para ensayo de neutralización de virus"). En comparación con un control de vacuna no relevante, los resultados de ELISA de IgG de los cerdos vacunados con proteína de Fc de IgG-AVP8 mostraron un aumento en la relación SP con el punto más alto el día 14 y que se elevó nuevamente después del refuerzo el día 21. De manera similar, los títulos de neutralización de virus mostraron un aumento en los días 7 y 14, seguido de un segundo pico el día 28 después del refuerzo el día 21.

Protocolo para ELISA

Para ELISA de IgA, placas medianas de ELISA de unión a proteína de 96 cavidades se recubrieron con antígeno de rotavirus completo diluido en 1x PBS 1:16. Las placas se incubaron a una temperatura de 4 °C durante la noche. Después de la incubación, las placas se lavaron con 1x PBST y, luego, se bloquearon con solución bloqueadora de caseína durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, 100 µl de anticuerpos primarios diluidos hasta una dilución final de 1:40 en amortiguador de bloqueo se agregaron a las placas y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, las cavidades se recubrieron con 100 µl de una dilución 1:3200 de anticuerpo anti-IgA de cerdo en cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incubaron durante una hora a 37 °C. Después del lavado, la placa se desarrolló con 3,5,3',5'-tetrametilbencidina durante 15 minutos a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con HCl 1 N antes de la medición de la densidad óptica (OD) a 450 nm. Las muestras, que incluían un control positivo y negativo, se ejecutaron en cavidades duplicadas y los resultados se informaron como el promedio de la relación (muestra – control negativo) con respecto a (control positivo – negativo) (S-N)/(P-N).

Para ELISA de IgG, placas medianas de ELISA de unión a proteína de 96 cavidades se recubrieron con antígeno de rotavirus completo diluido en 1x PBS 1:8. Las placas se incubaron a una temperatura de 4 °C durante la noche. Después de la incubación, las placas se lavaron con 1x PBST y, luego, se bloquearon con solución bloqueadora grado Blotting durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, 100 µl de anticuerpos primarios diluidos hasta una dilución final de 1:625 en amortiguador de bloqueo se agregaron a las placas y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, las cavidades se recubrieron con 100 µl de una dilución 1:8000 de anticuerpo anti-IgG de cerdo en cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se

incubaron durante una hora a 37 °C. Después del lavado, la placa se desarrolló con 3,5,3',5'-tetrametilbencidina durante 10 minutos a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con HCl 1 N antes de la medición de la densidad óptica (OD) a 450 nm. Las muestras, que incluían un control positivo y negativo, se ejecutaron en cavidades duplicadas y los resultados se informaron como el promedio de la relación (muestra – control negativo) con respecto a (control positivo – negativo) (S-N)/(P-N).

Protocolo para ensayo de neutralización de virus

Todas las muestras de suero y leche se calentaron hasta inactivarse a 56 °C durante 30 minutos. Las muestras se diluyeron en serie de 1:40 a 1:2.560 en medio de cultivo de rotavirus (MEM + 2,5 % de HEPES + 0,3 % de caldo de fosfato de triptosa + 0,02 % de levadura + 10 µg/ml de tripsina). La cepa aislada de rotavirus A (título 7,0 log TCID₅₀/ml) se diluyó 1:25.000 en medio de cultivo de rotavirus. Un total de 200 µl del suero diluido se agregó a 200 µl del virus diluido; la mezcla se incubó a 37 °C ± 5 % de CO₂ durante una hora. El medio de cultivo se retiró asépticamente de placas de 96 cavidades de tres-cuatro días plantadas con células MA104. Después de la incubación, 200 µl de la mezcla de virus-suero se transfirieron a las placas de cultivo de células. Las células se incubaron a 37 °C ± 5 % de CO₂ durante 72 horas. Los virus de reserva y diluido se titularon el día de su uso para confirmar la dilución usada en el ensayo. Después de la incubación, el sobrenadante se descartó y las placas se lavaron una vez con 200 µl/cavidad de 1X PBS. Para la fijación, se agregaron 100 µl/cavidad de 50 %/50 % de acetona/metanol. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, se secaron al aire y, luego, se volvieron a hidratar con 100 µl/cavidad de 1X PBS. El anticuerpo primario (suero policlonal de conejo antirotavirus A, generado internamente) se diluyó 1:1000 en 1X PBS. Se agregaron 100 µl/cavidad de anticuerpo primario diluido y las placas se incubaron a 37 °C ± 5 % de CO₂ durante una hora. Después de la incubación, las placas se lavaron dos veces con 100 µl/cavidad de 1X PBS. El anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo en cabra etiquetado con FITC de Jackson ImmunoResearch, N.º de catálogo 111-095-003) se diluyó 1:100 en 1X PBS. Se agregaron 100 µl/cavidad del anticuerpo secundario diluido y las placas se incubaron a 37 °C ± 5 % de CO₂ durante una hora. Después de la incubación, las placas se lavaron dos veces con 100 µl/cavidad de 1X PBS. Las placas se leyeron para determinar la presencia de fluorescencia mediante el uso de un microscopio ultravioleta. El ensayo se consideró válido si se descubrió que el título (generado mediante el método de Reed-Muench) del virus diluido era 2,8 ± 0,5 log

TCID₅₀/ml. Además, se incluyeron muestras positivas y negativas conocidas en cada ensayo como un control. Los títulos de suero se informaron como la dilución más alta en la que no se observaba tinción.

EJEMPLO 2

Estudios de exposición:

El objetivo principal de este estudio era evaluar si la administración de una vacuna prototipo, también denominada en la presente "IgG:AVP8", que incluye la proteína Fc de IgG-AVP8 (SEQ ID NO: 12) y una vacuna de control no relevante, denominada en la presente "placebo", a cerdas convencionales confería protección pasiva a cerdos contra una exposición virulenta al rotavirus A. Además, a los fines comparativos, se utilizó en el estudio una vacuna contra rotavirus MLV disponible en el comercio (ProSystem® Rota, Merck Animal Health), también denominada "producto comercial" o "vacuna comercial" en la presente. La vacuna prototipo se produjo de manera similar a la producción descrita anteriormente en el Ejemplo 1, pero se utilizaron volúmenes diferentes para la infección y un período de incubación más largo, como se describe a continuación en la sección "*Producción de IgG:AVP8*". El producto comercial se utilizó de acuerdo con las instrucciones del prospecto (dosis e indicaciones, así como también el método recomendado para la vacunación oral de cerdos) proporcionado por el fabricante para la vacuna TGE/Rota de ProSystem®.

Un total de 16 cerdas se incluyeron en el estudio. Las cerdas se aleatorizaron en tres grupos de tratamiento y un grupo de control estricto como se describe en la Tabla 1 a continuación. Las cerdas en T02 y T04 se mezclaron entre tres salas. Las cerdas en T06 y T07 se alojaron en dos salas separadas. Todas las cerdas se vacunaron con el material adecuado mediante la vía adecuada como se indica en la Tabla 1. Las cerdas en T07 no fueron vacunadas (control estricto). El suero se recolectó de las cerdas periódicamente durante el período de vacunación y se analizó para detectar evidencia de seroconversión. Se recolectaron muestras fecales antes del parto y se analizaron mediante RT-qPCR para confirmar que las madres no estaban eliminando activamente el rotavirus antes del parto. Se registraron diariamente las observaciones de salud general de cada cerda. Se dejó que el parto se produjera de forma natural hasta que la cerda alcanzó el día 114 de gestación. A partir de ese momento, se indujo el parto. Los lechones se incluyeron en el ensayo en el momento del parto. Solo los lechones sanos al nacer se etiquetaron, se procesaron de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de la instalación y se incluyeron en el

ensayo. Cuando los lechones tenían entre cero y cinco días de vida, se les extrajo sangre, se recolectó un hisopado fecal y se los expuso (sin incluir T07). Al momento de la exposición, se administró a los lechones una dosis intragástrica de 5 ml de bicarbonato sódico y, a continuación, una dosis intragástrica de 5 ml del material de exposición. A lo largo del período de exposición, se monitoreó diariamente a todos los animales para detectar la presencia de enfermedades entéricas (diarrea y cambios de comportamiento). Las muestras fecales se recolectaron periódicamente durante el período de exposición. Dos días después de la exposición (DPC 2), aproximadamente un tercio de los cerdos de cada camada se sometió a eutanasia. Después de la eutanasia, se realizó una necropsia y los cerdos se evaluaron para determinar la presencia de lesiones macroscópicas. Se recolectaron secciones intestinales para su evaluación microscópica e inmunohistológica. Se recolectó un hisopado intestinal para la evaluación por RT-qPCR. En DPC 21, todos los cerdos restantes se pesaron, y se les extrajo sangre y se les realizó un hisopado fecal. Después de la recolección de las muestras, los cerdos se sometieron a eutanasia. Los cerdos se evaluaron para determinar la presencia de lesiones macroscópicas y se recolectó un hisopado intestinal.

Tabla 1: Diseño del estudio

Grupo	N (cerdas)	N (lechones)	Sala	Vacunación de las cerdas (6 y 2 semanas antes del parto)		Exposición de los lechones (DPC0; 0-5 días de vida)	Necropsia
				Descripción	Vía/dosis*		
T02	6	57	Mezclados entre las salas 115, 116, y 117	Placebo	2 ml IM + 2 ml IN	Homogenei- zado de tejido en dilución 1:2 de 1 ml de dosis intragástrica	1/3 cerdos se sometie- ron a necrop- sia en DPC2; los cerdos restan- tes en DPC21
T04	5	46		IgG:AVP8	2 ml IM		
T06	2	22	118	Vacuna comer- cial	2 ml por vía oral 5 y 2 semanas antes del parto + 2 ml IM 1 semana antes del parto		
T07	3	27	114	Control estricto	No aplicable	Ninguna	No aplicable

*IM = intramuscular, IN = intranasal

A lo largo del estudio, los títulos séricos de VN en las cerdas de T07 (control estricto) permanecieron constantes o disminuyeron, lo que indicó la falta de exposición

y un estudio válido (se evaluó la neutralización de virus como se describió anteriormente en el Ejemplo 1 ("*Protocolo para ensayo de neutralización de virus*"), los resultados se muestran en la **Figura 3**). Durante la fase de vacunación, los títulos promedio más altos de VN en suero se observaron en cerdas vacunadas con la vacuna prototipo IgG:AVP8 (T04). En este grupo, una dosis administrada seis semanas antes del parto dio como resultado un aumento de cuatro veces o más en el título en 3/5 animales en T04 (IgG:AVP8) el D14. Antes del momento de la exposición de los cerdos, 5/5 animales en T04 (IgG:AVP8) tenían un aumento de cuatro veces o más en el título. Las cerdas en el grupo de placebo (T02) no tenían un aumento significativo (<2 veces) en el título de VN en suero durante la fase de vacunación. Las cerdas en T06 (vacuna comercial), no tenían un aumento significativo (<2 veces) en el título de VN en suero hasta D35. Antes del momento de la exposición de los cerdos, ambas cerdas en T06 (vacuna comercial) tenían un aumento de cuatro veces en el título. Después de la exposición etiquetada al material de exposición, los títulos de VN en suero en las cerdas en T02 (placebo) y T06 (vacuna comercial) aumentaron. Por el contrario, los títulos de VN en suero en T04 (IgG:AVP8) permanecieron constantes o disminuyeron en 4/5 cerdas. Con respecto a los títulos de VN en calostro y leche, en el grupo T04 (IgG:AVP8), los títulos de VN fueron los más altos en el parto, disminuyeron en la muestra antes de la exposición y disminuyeron adicionalmente en la muestra posterior a la exposición. En el grupo de placebo (T02), los títulos de VN fueron bajos en el parto y antes de la exposición, pero aumentaron después de la exposición lateral al material de exposición.

Los títulos de VN en suero de los cerdos antes de la exposición fueron altos (>1280) en la mayoría de los cerdos en T04 (IgG:AVP8), lo que indica una transferencia pasiva de inmunidad desde las cerdas a los cerdos. Por el contrario, la mayoría de los títulos de los cerdos en T02 (placebo) y T06 (vacuna comercial) fueron bajos (<1280).

Durante la fase de exposición, la mayor cantidad de mortalidades se observaron en T02 (placebo), en donde 8/57 (14,0 %) de los cerdos murieron. Por el contrario, solo 1/46 (2,2 %) cerdos murieron en T04 (IgG:AVP8), 1/22 (4,5 %) cerdos murieron en T06 (vacuna comercial) y 1/27 (3,7 %) cerdos murieron en T07 (control estricto). No se observaron signos clínicos de diarrea en cerdos en T07 (control estricto) a lo largo del estudio. Los signos de clínicos de diarrea en los cerdos en T02 (placebo) comenzaron los días posteriores a la exposición (DPC)1 o 2 y desaparecieron en la mayoría de los animales al DPC10. En general, se observaron

signos clínicos de diarrea en 44/57 (77,2 %) de los animales en T02 (placebo) al menos una vez durante el estudio. De estos 44 animales, la diarrea se consideró aguda en 29 (65,9 %) de los animales. En contraste, los signos clínicos de diarrea se redujeron en los cerdos en T04 (IgG:AVP8). Ver la Tabla 2 a continuación para obtener un resumen de los resultados de diarrea clínica por grupo.

Tabla 2: Porcentaje de animales con diarrea anormal (alguna vez) por grupo

Grupo	Anormal alguna vez*	Aguda alguna vez**
T02- Placebo	44/57 (77,2 %)	29/44 (65,9 %)
T04- IgG:AVP8	15/46 (32,6 %)	8/15 (53,3 %)
T06- Vacuna comercial	13/22 (59,1 %)	10/13 (76,9 %)
T07- Control estricto	0/27 (0,0 %)	No aplicable

*Incluye los cerdos con un puntaje de 1 o 2 al menos una vez durante el estudio divididos por la cantidad total de cerdos por grupo

**Incluye los cerdos con un puntaje de 2 al menos una vez durante el estudio divididos por la cantidad total de cerdos que fueron anormales alguna vez

Antes de la exposición, no se detectó ARN de rotavirus A mediante RT-qPCR, lo que indica un estudio válido. Adicionalmente, no se detectó ARN de rotavirus A mediante RT-qPCR en cerdas o cerdos de T07 (controles estrictos) durante el estudio. En los cerdos después de la exposición, la excreción era más predominante en T02 (placebo). En la mayoría de los cerdos, la excreción comenzó en DPC1-3 y continuó hasta DPC14. De mayor interés fue la reducción en excreción observada en T04 (IgG:AVP8) en comparación con T02 (placebo) y T06 (vacuna comercial). Tanto el porcentaje de excreción como la mediana de cantidades de ARN detectado se redujeron (ver la **Figura 4** para conocer la mediana logarítmica de copias genómicas (gc)/ml de ARN de rotavirus A del grupo en heces por día de estudio); la evaluación se llevó a cabo como se describe a continuación ("*Protocolo para qRT-PCR de Rota A*").

Un subconjunto de cerdos seleccionados aleatoriamente de cada grupo se sometió a eutanasia y necropsia en DPC2. Los cerdos se evaluaron para determinar la presencia de lesiones entéricas macroscópicas (intestino delgado distendido por gas, paredes delgadas, contenido de líquido puro, etc.), lesiones microscópicas (enteritis atrófica) y tinción específica de rotavirus A mediante inmunohistoquímica (IHC). La Tabla 3 a continuación presenta la cantidad de cerdos con lesiones entéricas al momento de la necropsia por grupo. La exposición se consideró exitosa ya que 84,2 % (16/19) de los cerdos en el grupo de placebo (T02) tenían lesiones macroscópicas y de estos, 63,2 % (12/19) tenían tinción. De mayor interés fue la ausencia de tinción de rotavirus A en animales, en solo 1/15 cerdos en T04 (IgG:AVP8). Además, en T04

(IgG:AVP8) hubo una reducción en el porcentaje de cerdos con lesiones macroscópicas en comparación con T02 (placebo) y el producto comercial (T06).

Tabla 3. Porcentaje de animales con lesiones entéricas y tinción de IHC al momento de la necropsia por grupo.

Grupo	Lesiones entéricas en DPC2*	Tinción de IHC en DPC2**			
		% pos.	Puntuación N.º 1	Puntuación N.º 2	Puntuación N.º 3
T02- Placebo	16/19 (84,2 %)	12/19 (63,2 %)	2/12 (16,7 %)	2/12 (16,7 %)	8/12 (66,6 %)
T04- IgG:AVP8	4/15 (26,7 %)	1/15 (6,7 %)	0/1 (0,0 %)	0/1 (0,0 %)	1/1 (100,0 %)
T06- Vacuna comercial	4/8 (50,0 %)	4/8 (50,0 %)	3/4 (75,0 %)	1/4 (25,0 %)	0/4 (0,0 %)
T07- Control estricto	No aplicable [§]	No aplicable [§]			

*Representa la cantidad de cerdos con lesiones entéricas en DPC2 dividida por la cantidad total de cerdos sometidos a necropsia en DPC2

**En donde la puntuación 1 = <10 % de vellosidades que contienen antígeno, puntuación 2 = de 10 % a 50 % de vellosidades que contienen antígeno, puntuación 3 = >50 % de vellosidades que contienen antígeno

[§]No aplicable ya que los cerdos de T07 no se sometieron a necropsia

La ganancia de peso diaria promedio se calculó para cerdos sobrevivientes (en kg) y se presenta en la Tabla 4 a continuación. Los beneficios numéricos más altos en ADWG se observaron en cerdos de T04 (IgG:AVP8). El aumento en ADWG después de la vacunación fue significativamente diferente en comparación con T02 (placebo).

Tabla 4. Ganancia de peso diaria promedio media en kg (desviación estándar) por grupo.

Grupo	ADWG en kg Media (desviación estándar)
T02- Placebo	0,15 (0,13)
T04- IgG:AVP8	0,25 (0,08)
T06- Vacuna comercial	0,22 (0,11)
T07- Control estricto	0,23 (0,07)

En conclusión, la vacunación de cerdas convencionales seis y dos semanas antes del parto con la vacuna prototipo IgG:AVP8 (que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 12) dio como resultado títulos de anticuerpos neutralizantes altos en suero y calostro de cerdas. Estos anticuerpos neutralizantes se transmitieron pasivamente a los cerdos después del nacimiento, como se demuestra mediante la detección de títulos altos (>1280) en el suero de cerdos de cerdas vacunadas. La presencia de títulos elevados de anticuerpos neutralizantes en los cerdos condujo a una protección clínica. Específicamente, los cerdos nacidos de cerdas vacunadas

tenían excreción fecal de ARN de rotavirus A reducida, mortalidad reducida, signos clínicos de diarrea reducidos, colonización reducida de rotavirus A en DPC2, lesiones macroscópicas reducidas en DPC2 y ADWG aumentada en comparación con cerdos nacidos de cerdas de controles con placebo y vacuna disponible en el comercio.

Protocolo para qRT-PCR de Rota A

A fin de determinar la presencia de ARN de rotavirus A en las muestras fecales, se utilizó el kit de RT-PCR de una etapa cuantitativa (kit de RT-PCR de una etapa universal iTaq; BioRad, N.º de catálogo 1725140) para el ensayo. Ver la Tabla 5 a continuación para obtener la información de cebador y sonda.

Tabla 5: Información de cebador (F/R) y sonda (Pr1/Pr2)

Nombre	Secuencia	Tamaño	Posición
RVA F	5'-GCT AGG GAY AAA ATT GTT GAA GGT A-3' (SEQ ID NO: 22)	25	40..64
RVA R	5'-ATT GGC AAA TTT CCT ATT CCT CC-3' (SEQ ID NO: 23)	23	145..167
RVA Pr1	5'-FAM-ATG AAT GGA AAT GAY TTT CAA AC-MGB-3' (SEQ ID NO: 24)	23	121..143
RVA Pr2	5'-FAM-ATG AAT GGA AAT AAT TTT CAA AC-MGB-3' (SEQ ID NO: 25)	23	121..143

Se llevó a cabo RT-PCR en tiempo real en una reacción de 20 µl que contenía 5 µl de ácido nucleico total extraído, 1 µl de cada sonda (5 µM), 1 µl de cada cebador (10 µM), 10 µl de mezcla 2X RT-PCR, 0,5 µl de transcriptasa inversa iScript y 0,5 µl de agua tratada con DEPC. La reacción tuvo lugar mediante el uso de un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (BioRad) con las siguientes condiciones: transcripción inversa inicial a 50 °C durante 10 min, seguida de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s y templado y extensión a 60 °C durante 45 s. Para generar datos cuantitativos relativos, se incluyeron diluciones seriales de dos bloques g de rotavirus A en cada ejecución. Se incluyeron cantidades iguales de cada uno de los bloques g en la ejecución mediante el uso de $5,0 \times 10^7$ copias genómicas/µl como la concentración inicial. Los datos ópticos se analizaron mediante el uso de *software* CFX Manager. Para cada determinación, las líneas de umbral se calcularon automáticamente mediante el uso de configuración de regresión para el modo de determinación de umbral de ciclo (Ct). La sustracción inicial se realizó automáticamente mediante el uso del modo de sustracción inicial. Las curvas con valores finales iniciales de menos de 10 se corrigieron manualmente.

Producción de IgG:AVP8

Dos litros de células Sf+ (*Spodoptera frugiperda*) a una concentración aproximada de 1×10^6 células/ml en un matraz de agitación de 5 l se infectaron con 1,7 ml de una reserva de baculovirus recombinante que contenía la proteína de fusión Fc de IgG porcina de núcleo VP8 de rotavirus A (BaculoGold (BG)/pVL1393-AVP8-IgG; $1,18 \times 10^8$ TCID₅₀/ml). El matraz de agitación se incubó a $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación constante a 90 rpm durante cinco días. Las células y el medio se transfirieron asépticamente a botellas centrifugadoras 3 x 1 l y las células se peletizaron a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C . El sobrenadante resultante se pasó a través de un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ (Thermo Scientific, N.º de catálogo 567-0020) y, luego, se incubó con 2,5 ml de resina de proteína A MabSelect SuRe LX (GE Healthcare N.º de catálogo 17-5474-01) durante la noche a 4°C con agitación moderada. La resina se recuperó mediante filtración de $0,2 \mu\text{m}$ (Thermo Scientific, N.º de catálogo 567-0020) y, luego, se lavó con 12 x 10 ml volúmenes de amortiguador de unión Ag/Ab suave (Thermo Scientific, N.º de catálogo 21012). AVP8-IgG se eluyó de la resina mediante el uso de 7 x 10 ml volúmenes de amortiguador de elución de Ag/Ab suave (Thermo Scientific, N.º de catálogo 21027). AVP8-IgG se dializó contra 3,5 l de Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM con un cambio de amortiguador. El baculovirus residual se inactivó con BEI 5 mM durante 24 horas a 37°C . El material resultante se diluyó hasta una concentración diana de $70 \mu\text{g/ml}$ en 1x PBS (Gibco N.º de catálogo 10010-023). El material diluido se formuló con 12,5 % de Emulsigen D.

EJEMPLO 3

Estudio de serología:

El objetivo principal de este estudio era evaluar si la administración de una vacuna prototipo que incluía la proteína Fc de IgG-AVP8 (SEQ ID NO:12) y una vacuna de control, denominada en la presente "placebo", a cerdas convencionales generaba una respuesta serológica contra el rotavirus A. La vacuna prototipo (que comprendía Emulsigen D o Carbopol como un adyuvante, ver las Tablas 7 A y 7 B a continuación), también denominada "IgG-AVP8" en la presente, se produjo de manera similar a la producción descrita anteriormente en los Ejemplos 1 y 2, pero se utilizaron volúmenes diferentes para la infección y un período de incubación más prolongado, como se describe a continuación en la sección "*Producción de vacuna: IgG-AVP8*".

Un total de 20 cerdas se incluyeron en el estudio. Las cerdas se aleatorizaron

en cuatro grupos de tratamiento como se describe en la Tabla 6 a continuación. Las cerdas se mezclaron durante el estudio. Todas las cerdas se vacunaron con el material adecuado por vía intramuscular en D0 y D21 como se indica en la Tabla 4. El suero se recolectó de las cerdas periódicamente durante el estudio y se analizó para detectar evidencia de seroconversión mediante ensayo de neutralización de virus. Se registraron diariamente las observaciones de salud general de cada cerda. El estudio finalizó en D42.

Tabla 6: Diseño del estudio

Grupo	N	Material utilizado para vacunación IM* en D0 y D21	Fechas de recolección de sangre	Finalización del estudio
T02	8	IgG-AVP8 / Emulsigen D	D0, 7, 14, 21, 28, 35, 42	D42
T03	8	IgG-AVP8 / Carbopol		
T06	2	Placebo / Emulsigen D		
T07	2	Placebo / Carbopol		

*IM = intramuscular

A lo largo del estudio, los títulos de VN en suero en cerdas de T06 y T07 (grupos placebo) permanecieron constantes o disminuyeron, lo que indicó la falta de exposición y un estudio válido (se evaluó la neutralización de virus como se describió anteriormente en el Ejemplo 1 ("*Protocolo para ensayo de neutralización de virus*")), pero las diluciones aumentadas se evaluaron (de 1:40 a 1:40.960)). Durante la fase de vacunación, las cerdas vacunadas con las vacunas prototipo de IgG-AVP8/Emulsigen D (T02) y IgG-AVP8/Carbopol (T03) presentaron aumentos significativos en el título (>4 veces). Para ambos grupos (T02 y T03), la media de títulos de los grupos fue superior a 640 después de una vacunación y se mantuvo por encima de 640 durante el período del estudio. En contraste, las cerdas en los grupos de placebo (T06 y T07) no tuvieron un aumento significativo (<2 veces) en el título de VN en suero durante el estudio.

En conclusión, la vacunación de cerdas convencionales seis y dos semanas antes del parto con la vacuna prototipo IgG-AVP8 (que comprende el polipéptido de SEQ ID NO:12) dio como resultado títulos de anticuerpos neutralizantes altos en suero de cerdas.

Producción de vacuna: IgG-AVP8

Ocho litros de células Sf+ a $1,00 \times 10^6$ células/ml en un recipiente revestido con vidrio Sartorius Biostat B de 10 l se infectaron con 15 ml de BG/pVL1393-AVP8-IgG, $1,19 \times 10^8$ TCID₅₀/ml, para una MOI de 0,22. El biorreactor funcionó a 27 °C con

agitación a 100 rpm y pulverización de oxígeno a 0,3 slpm. El recipiente se recolectó a 6 DPI, se centrifugó a 10.000 g y 4 °C durante 20 minutos, y el sobrenadante se filtró a 0,8/0,2 µm (GE Healthcare, N.º de catálogo 6715-7582). 2750 ml de sobrenadante clarificado se inactivaron con BEI 5 mM durante cinco días a 27 °C. Después de la neutralización de BEI residual con tiosulfato de sodio, 2750 ml se concentraron aproximadamente 12x mediante el uso de un filtro de fibra hueco de 10 kDa (GE, N.º de catálogo UFP-10-C-4MA) hasta 225 ml. La concentración se determinó como 255 µg/ml.

Tabla 7 A. Formulación de vacuna

Componente	Fin	Volumen	Concentración
Proteína de AVP8-IgG	Antígeno	16,5 ml	27,5 %
PBS	Diluyente	31,5 ml	52,5 %
Carbopol	Adyuvante	12 ml	20 %

Tabla 7 B. Formulación de vacuna

Componente	Fin	Volumen	Concentración
Proteína de AVP8-IgG	Antígeno	16,5 ml	27,5 %
PBS	Diluyente	36 ml	60 %
Emulsigen D	Adyuvante	7,5 ml	12,5 %

EJEMPLO 4

El objetivo principal de este estudio fue evaluar si los animales vacunados con IgG-AVP8 (que incluía proteína Fc de IgG-AVP8 (SEQ ID NO: 12)) serían capaces de neutralizar de manera cruzada diversos serotipos/genotipos de rotavirus A de diversos tipos G y P que no eran P[7], a partir de los cuales se diseñó la proteína de Fc de IgG-AVP8. Esto indicaría la capacidad de la proteína de Fc de IgG-AVP8 (SEQ ID NO: 12) de proteger contra otras cepas aisladas.

Brevemente, suero inactivado por calor de cerdos vacunados con IgG-AVP8 se diluyó 2 veces a partir de 1:200 en MEM en un bloque de dilución de fila A a fila G. La fila H no contenía suero. En un bloque de dilución separado, rotavirus A de diversos tipos G y P se diluyó 1,5 veces en una placa de dilución a partir de 6,0 Log₁₀TCID₅₀/ml desde la columna 1 hasta la columna 11. La columna 12 no contenía virus. 250 µl de virus y 250 µl de suero de las cavidades correspondientes se combinaron y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de 1 hora de incubación, 100 µl de mezcla de virus-suero se superpusieron sobre una monocapa de células MA104, se incubaron a 37 °C durante 72 horas, se tiñeron mediante IFA y se leyeron para determinar la

presencia de virus. La presencia de virus se registró como '+' en la placa y la ausencia de virus se registró como '0'. Estos resultados se transfirieron a la Tabla 8.

Las siguientes seis cepas aisladas de rotavirus A se compararon con este ensayo; G9P[7], G9P[23], G4P[23], G3P[7], G5P[7] y G4P[7]. Los resultados en la Tabla 1 indican que P tipo P[23] neutraliza de manera cruzada P[7]. Todos los tipos G que incluían P[7] o P[23] también eran neutralizantes, lo que indicó que, en este ensayo, el tipo G no era significativo en la neutralización de virus.

Tabla 8: Diseño del estudio y resultados

G9P[7]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Suero a 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:400 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:800 C	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:1600 D	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:3200 E	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:6400 F	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:12800 G	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0
Sin suero H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
Dilución de virus	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	Sin virus
G9P[23]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Suero a 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:400 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:800 C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:1600 D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:3200 E	+	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
Suero a 1:6400 F	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
Suero a 1:12800 G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Sin suero H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Dilución de virus	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	Sin virus
G4P[23]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Suero a 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:400 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:800 C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:1600 D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:3200 E	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:6400 F	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:12800 G	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
Sin suero H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0
Dilución de virus	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	Sin virus
G3P[7]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Suero a 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:400 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:800 C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:1600 D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:3200 E	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:6400 F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:12800 G	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
Sin suero H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
Dilución de virus	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	Sin virus
G5P[7]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Suero a 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:400 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:800 C	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:1600 D	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:3200 E	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
Suero a 1:6400 F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
Suero a 1:12800 G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
Sin suero H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Dilución de virus	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	Sin virus
G4P[7]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Suero a 1:200 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:400 B	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Suero a 1:800 C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:1600 D	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:3200 E	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:6400 F	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suero a 1:12800 G	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
Sin suero H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Dilución de virus	100	150	225	338	506	759	1139	1709	2563	3844	5767	Sin virus

En conclusión, los animales vacunados con IgG-AVP8 (que incluía proteína de Fc de IgG-AVP8 (SEQ ID NO: 12)) neutralizarán de manera cruzada los genotipos de rotavirus P[7] y P[23]. El tipo G no tenía una función significativa en la neutralización de virus.

EJEMPLO 5

Experimento de prueba de concepto en cerdos:

Se utilizan un total de 40 animales en este estudio. Los cerdos se aleatorizan en cuatro grupos de tratamiento con 10 cerdos por grupo. Los cerdos se mezclan entre sí durante todo el estudio. Se registran observaciones generales de salud, muestras de suero precibado y muestras fecales precibadas antes del tratamiento para confirmar la salud de los animales, determinar la respuesta serológica inicial a rotavirus A, y confirmar que no existe infección por rotavirus A activa antes o en el momento de la vacunación. El día cero (D0), los animales se vacunan por vía intramuscular con los siguientes materiales: T01: Vacuna IgG-P[7]AVP8 (que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 12), T02: Vacuna IgG-P[13]AVP8 (que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 14), T03: Vacuna P[7]AVP8-IgG-P[13]AVP8 (que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 16), T04: placebo. Las muestras de suero se toman los días 0, 7, 14, 21, 28, 36, 42 y 49 del estudio. Todos los animales son sometidos a eutanasia humanitaria en el día D49 del estudio en la necropsia. Las muestras de suero se analizan mediante un ensayo de neutralización de virus para determinar la respuesta serológica a prototipos de vacuna a lo largo del tiempo. Los animales vacunados con T01 tienen anticuerpos que neutralizan rotavirus de genotipos P[7] y P[23], los animales vacunados con T02 tienen anticuerpos que neutralizan rotavirus de genotipo P[13] y los animales vacunados con T03 tiene anticuerpos que neutralizan rotavirus de genotipos P[7], P[13] y P[23].

EJEMPLO 6

SDS PAGE:

SDS-PAGE del producto de proteína de Fc de IgG-AVP8 purificada con proteína A (SEQ ID NO: 12) con y sin DTT (**Figura 5 A**): Brevemente, el método para

generar las muestras para la imagen de SDS-PAGE fue el siguiente: se inactivó el sobrenadante de recolección de baculovirus con BEI 10 mM a 37 °C durante 36 horas y luego se neutralizó. La muestra se purificó luego mediante el uso de resina de proteína A. Luego, todas las muestras se desnaturalizaron mediante el uso de amortiguador de muestra NuPAGE 4x LDS (Invitrogen N.º de catálogo NP0007) con DTT 25 mM (final) o igual volumen de agua, y se calentaron a 95 °C durante 10 minutos. Las muestras se procesaron en 4-12 % de gel SDS-PAGE (Invitrogen N.º de catálogo NP0335BOX) a 180 V durante 45 minutos y se tiñeron (eStain L1, GenScript N.º de catálogo M00548-1; destinción N.º de catálogo M00549-1).

Como resultado, se descubrió que en la vía procesada con la muestra reducida (+DTT (ditiotreitól)), se observó principalmente una banda (proteína Fc de IgG-AVP8 monomérica, que se consideró en conjunto con los resultados de la transferencia Western descrita a continuación). En la vía procesada con la muestra no reducida (-DTT), se observaron bandas adicionales. Las bandas adicionales estaban en rangos de peso molecular donde cada uno era un múltiplo del monómero.

Transferencia Western:

Transferencia Western de fragmento anti-Fc de IgG porcina (**Figura 5 B**): El producto de proteína Fc de IgG-AVP8 (SEQ ID NO: 12) que se produjo en un biorreactor se recolectó con una muestra de 1 ml antes de la adición de BEI. La muestra se centrifugó a 20.000 g y 4 °C durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó en un tubo limpio y tanto el pélet como el sobrenadante se almacenaron a -70 °C. El pélet y el sobrenadante se descongelaron, el pélet se volvió a suspender en 1 ml de urea 8 M, luego se procesaron cantidades iguales de pélet y sobrenadante en SDS-PAGE en condiciones reductoras (+DTT), y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se realizó la prueba de Transferencia Western en una dilución 1:1000 de anticuerpo anticierdo de cabra conjugado con HRP para detectar fragmentos Fc de IgG porcina.

Como resultado, inesperadamente no se observó proteína Fc de IgG-AVP8 en la muestra de pélet. Por el contrario, se observó satisfactoriamente toda la proteína Fc de IgG-AVP8 (SEQ ID NO: 12) en la muestra del sobrenadante.

EJEMPLO 7

Generación de secuencias de consenso:

Se generaron las secuencias de consenso de SEQ ID NO: 4 (basada en el genotipo P[6] de la proteína VP8 de rotavirus) y SEQ ID NO: 5 (basada en el genotipo

P[13] de la proteína VP8 de rotavirus), como se describe a continuación:

Las secuencias se recopilaron a partir de secuencias de nucleótidos de la proteína VP4 de rotavirus porcino disponibles públicamente en la base de datos de variantes de virus del NCBI y de secuencias de cepas aisladas de rotavirus obtenidas internamente. También se compilaron metadatos adicionales para las secuencias, incluso los metadatos para: el nombre de la cepa aislada, tipo P de la cepa aislada, origen geográfico y fecha de aislamiento si estaban disponibles. Las secuencias de nucleótidos se tradujeron en secuencias de proteínas y se alinearon con las proteínas VP8 conocidas mediante el *software* de alineación de secuencias MUSCLE, con parámetros de penalización por brecha y agrupación UPGMB predeterminados. Los aminoácidos VP5 no alineados se recortaron y descartaron. Las secuencias de proteína VP8 alineadas se importaron al *software* MEGA7 para su análisis filogenético y se generó una reconstrucción de filogenia de unión de vecinos (*neighbor joining*) en función de la secuencia de proteína VP8. El árbol óptimo se calculó mediante el método de corrección Poisson con una prueba de filogenia de arranque ($n = 100$) y se dibujó a escala con longitudes de ramificación iguales a las distancias evolutivas en unidades de sustituciones de aminoácidos por sitio en 170 posiciones totales. Se consideraron significativos los nodos donde la asociación de cúmulos de arranque fue mayor de 70 %. Se designaron como cúmulos los nodos con una distancia aproximada del 10 % y las asociaciones de cúmulos de arranque superiores al 70 %. Las secuencias atípicas que no se ajustaban a los cúmulos grandes se evaluaron individualmente para determinar la calidad de la secuencia y el origen de los tipos P. Las secuencias sospechosas de baja calidad se eliminaron del análisis, mientras que se conservaron las secuencias de los tipos P raramente observados en el rotavirus porcino. Los cúmulos usados para generar secuencias de consenso se seleccionaron en función del perfil de protección del producto deseado, así como de los estudios de neutralización cruzada del suero *in vitro*. Las secuencias de consenso se generaron mediante la mayor frecuencia por posición alineada; en los casos donde se observaron proporciones equivalentes de aminoácidos en una posición alineada, se seleccionó el residuo de aminoácidos en función de los datos epidemiológicos informados junto con el perfil de protección del producto.

EJEMPLO 8

Estudios de exposición:

El objetivo principal de este estudio fue evaluar si la administración de una

vacuna prototipo, también denominada en la presente "IgG#AVP8", que incluye la proteína Fc de IgG-AVP8 (SEQ ID NO: 12) y una vacuna de control no relevante, denominada en la presente "placebo", a hembras convencionales confirió protección pasiva a los cerdos contra una exposición virulenta al rotavirus A. La vacuna prototipo se produjo de manera similar a la producción descrita en el Ejemplo 1 anterior, pero con diferentes volúmenes usados para la infección y un método de purificación diferente, como se describe más adelante en la sección "*Producción de IgG#AVP8*".

Se incluyeron un total de 20 hembras en el estudio. Las hembras se aleatorizaron en dos grupos de tratamiento y un grupo de control estricto, como se describe en la Tabla 9 a continuación. Las hembras en T01 y T03 se mezclaron en tres salas. Las hembras en T07 se alojaron en una sala separada. Todas las hembras se vacunaron con el material adecuado mediante la vía apropiada, como se indica en la Tabla 9. Las hembras en T07 no se vacunaron (control estricto). Se recolectó suero de las hembras periódicamente durante el período de vacunación y se lo analizó para detectar evidencia de seroconversión. Se recolectaron muestras fecales antes del parto y se analizaron mediante RT-qPCR para confirmar que las madres no estaban eliminando activamente el rotavirus antes del parto. Se registraron diariamente las observaciones de salud general de cada cerda. Se dejó que el parto se produjera de forma natural hasta que la cerda alcanzó el día 114 de gestación. A partir de ese momento, se indujo el parto. Los lechones se incluyeron en el ensayo en el momento del parto. Solo los lechones sanos al nacer se etiquetaron, se procesaron de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de la instalación y se incluyeron en el ensayo. Cuando los lechones tenían entre uno y cinco días de vida, se les extrajo sangre, se recolectó un hisopo fecal y se los expuso (sin incluir el T07). Al momento de la exposición, se les administró a los lechones una dosis intragástrica de 5 ml de bicarbonato sódico y, a continuación, una dosis intragástrica de 1 ml del material de exposición. A lo largo del período de exposición, se monitoreó diariamente a todos los animales para detectar la presencia de enfermedades entéricas (diarrea y cambios de comportamiento). Se recolectaron muestras fecales un día después de la exposición (DPC1). En DPC2, todos los lechones en T01 y T03 se sometieron a eutanasia. Se recolectaron secciones intestinales para su evaluación microscópica e inmunohistológica.

Tabla 9: Diseño del estudio

Grupo	N (hembras)	N (lechones)	Sala	Vacunación de las cerdas (6 y 2 semanas antes del parto)		Exposición de los lechones (DPC0; 1-5 días de vida)	Necropsia
				Descripción	Vía/dosis*		

T01	8	67	Mezclados entre las habitaciones CC1, CC2, CC3.	Placebo	2 ml IM	Rotavirus A P[7] homogeneizado de tejido en dilución 1:2 Dosis de 1 ml por vía intragástrica	DPC2
T03	8	72		IgG#AVP8	2 ml IM		
T07	4	35	CB8	Control estricto	No aplicable	Ninguna	No aplicable

*IM = intramuscular

A lo largo del estudio, los títulos de VN en suero en las hembras de T07 (control estricto) aumentaron menos de 4 veces, lo que indica la falta de exposición y un estudio válido (la neutralización del virus se evaluó como se describe más arriba en el Ejemplo 1 ("Protocolo para ensayo de neutralización de virus"); los resultados se muestran en la Tabla 10 y en la **Figura 6**). Durante la fase de vacunación, la media más alta de títulos de VN en suero se observó en las hembras vacunadas con la vacuna prototipo IgG#AVP8 (grupo T03). En este grupo, una dosis administrada seis semanas antes del parto dio como resultado un aumento de cuatro veces o más en el título en 6/8 animales en T03 (IgG#AVP8) al D14. Ninguna de las hembras del grupo T01 (placebo) presentó un aumento significativo (<2 veces) en el título de VN en suero durante la fase de vacunación. Títulos de VN en el calostro de las hembras: las hembras del grupo T03 (IgG#AVP8) presentaron una media de título de VN más alta que la de las hembras del grupo T01 (placebo).

Tabla 10: Resultados de VN

Grupo	Hembra	Suero					Calostro
		D0	D14	D21	D28	DPC0	DOF*
T01	887	160	320	320	453	320	160
	7768	320	160	320	320	320	1280
	7777	320	320	640	640	640	226
	7785	320	640	905	905	1810	640
	7795	160	80	640	640	640	1280
	7802	320	113	453	320	640	1280
	7813	320	640	640	905	453	905
	7821	160	320	320	160	113	320
T03	1051	320	1280	320	1280	320	640
	7767	160	640	1280	905	1280	2560
	7772	160	1280	1280	1280	2560	2560
	7774	160	1280	1280	1280	2560	1280
	7781	320	640	905	640	640	453
	7783	160	640	1280	905	2560	2560
	7798	113	226	640	640	1280	453
	7807	160	1280	1280	453	1280	2560
T07	886	226	80	160	1280	320	320
	889	160	320	320	320	453	1280
	7770	226	113	320	226	320	1280

	7778	226	453	320	320	640	80
--	------	-----	-----	-----	-----	-----	----

*DOF = día del parto

Los títulos de VN en el suero de los cerdos previo a la exposición fueron altos (>1280) en la mayoría de los cerdos del grupo T03 (IgG#AVP8), lo que indica una transferencia pasiva de inmunidad de las hembras a los cerdos. Por el contrario, la mayoría de los títulos de los cerdos en T02 (placebo) fueron bajos (<1280).

En los grupos T01 (placebo) y T03 (IgG#AVP8), se definió a un cerdo como afectado si se detectaba un antígeno de rotavirus mediante inmunohistoquímica (IHC) en al menos una sección intestinal y el animal presentaba una puntuación fecal anormal durante al menos un día después de la exposición. Las distribuciones de frecuencia se enumeran en la Tabla 11. En función del uso de esta definición de caso, la vacunación de las hembras 6 y 2 semanas antes del parto con la vacuna prototipo IgG#AVP8 (grupo T03) previno la enfermedad asociada al rotavirus en los cerdos después de la exposición con material de exposición del rotavirus A P[7] heterólogo; fracción preventiva de 0,926; intervalo de confianza de 95 % 0,734, 0,979.

Tabla 11. Distribución de frecuencias de la definición de caso

Grupo	Total	Definición de caso*			
		0		1	
		N	%	N	%
T01	67	42	62,7	25	37,3
T03	72	70	97,2	2	2,8

*Definición de caso: Se consideró que un cerdo estaba afectado si una o más de las muestras de tejido del íleon o del yeyuno dan positivas en rotavirus A en IHC (puntuación >0) y presentan al menos una puntuación fecal anormal en cualquier día posterior a la exposición. Puntuación 0 = no afectado; 1 = afectado

En conclusión, la vacunación de las hembras convencionales con la vacuna prototipo IgG#AVP8 (que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 12) seis y dos semanas antes del parto generó títulos elevados de anticuerpos neutralizantes en el suero y el calostro de las cerdas. Estos anticuerpos neutralizantes se transmitieron pasivamente a los cerdos después del nacimiento, como lo demuestra la detección de títulos elevados (>1280) en el suero de los cerdos de las madres vacunadas. La presencia de títulos elevados de anticuerpos neutralizantes en los cerdos condujo a una protección clínica. Específicamente, se consideraron afectados menos cerdos nacidos de madres vacunadas en comparación con los cerdos nacidos de controles de placebo.

Producción de IgG#AVP8

Se sembraron en dos recipientes revestidos con vidrio Sartorius Biostat B de 10 l con 3 l de células Sf+ a $1,00 \times 10^6$ células/ml. Tres días después del sembrado, cada recipiente se infectó a una MOI de 0,1 y el volumen de cada recipiente se ajustó a 8 l mediante el uso del medio Ex-cell 420 libre de suero (SAFC N°. de catálogo 14420C-1000 ml). El biorreactor funcionó a 27 °C con agitación de 100 rpm, con el oxígeno disuelto ajustado a o por encima de 40 %, y una superposición de CCA a 1,3 slpm. El recipiente se recolectó a los 7 días después de la inoculación; los fluidos se centrifugaron a 10.000 g a 4 °C durante 20 minutos y el sobrenadante se filtró a 0,8/0,2 µm (GE Healthcare, N.º de catálogo 6715-7582). El sobrenadante clarificado (8 l/recipiente) se inactivó con BEI 5 mM durante tres días a 37 °C en recipientes revestidos con vidrio Sartorius Biostat B. Tras la inactivación, el BEI residual se neutralizó con tiosulfato de sodio. Después de la neutralización, se concentraron 7000 ml aproximadamente 10 veces mediante el uso de un filtro de fibra hueca de 10 kDa (GE, N.º de catálogo UFP-10-C-5A) hasta 700 ml. El material concentrado se diafiltró con 5 volúmenes (3500 ml) de 1x PBS. La vacuna se formuló con 12,5 % de Emulsigen D, 28 % de material concentrado y 59,5 % de 1x PBS (volumen:volumen).

EJEMPLO 9

Experimento de prueba de concepto en cerdos:

En este estudio se utiliza un total de 20 animales. Los cerdos se aleatorizan en dos grupos de tratamiento con 10 cerdos por grupo. Los cerdos se mezclan entre sí durante todo el estudio. Se registran observaciones generales de salud, muestras de suero precibado y muestras fecales precibado antes del tratamiento para confirmar la salud de los animales, determinar la respuesta serológica inicial al rotavirus C y confirmar que no existe infección por rotavirus C activa antes o en el momento de la vacunación. El día cero (D0) y el día 28 del estudio, los animales se vacunan por vía intramuscular con los siguientes materiales: T01: Vacuna IgG-CVP8 (que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 15); T02: placebo. Se toman muestras de suero los días 0, 7, 14, 21, 28, 36 y 42 del estudio. Todos los animales son sometidos a eutanasia humanitaria en el día D42 del estudio en la necropsia. Las muestras de suero se analizan mediante un ELISA para determinar la respuesta serológica a los prototipos de vacuna a lo largo del tiempo. Los animales vacunados con T01 presentan un nivel promedio más alto de anticuerpos contra el rotavirus C que los animales vacunados con T02, que no tienen un aumento del título.

EJEMPLO 10

Experimento de prueba de concepto en cerdos:

El objetivo principal de este estudio fue evaluar si la administración de una vacuna prototipo, también denominada en la presente "IgG:AVP8 P[6,7,13]", que incluía tres proteínas Fc de IgG-AVP8 (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14) y una vacuna de control no relevante, denominada en la presente "placebo", a hembras convencionales confirió protección pasiva a los cerdos contra una exposición virulenta al rotavirus A. Los componentes de la vacuna prototipo se produjeron de manera similar a la producción descrita anteriormente en el Ejemplo 1 y se mezclaron posteriormente, como se describe a continuación en la sección "*Producción de IgG:AVP8 P[6,7,13]*".

Se incluyeron un total de 32 hembras en el estudio. Las hembras se aleatorizaron en dos grupos de tratamiento y un grupo de control estricto, como se describe en la Tabla 12 a continuación. Las hembras en T01 y T03 se mezclaron en siete salas. Las hembras en T04 se alojaron en una sala separada. Todas las hembras se vacunaron con el material adecuado mediante la vía apropiada, como se indica en la Tabla 12. Las hembras en T04 no se vacunaron (control estricto). Se recolectó suero de las hembras periódicamente durante el período de vacunación y se lo analizó para detectar evidencia de seroconversión mediante neutralización de virus (VN) y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Se recolectaron muestras fecales antes del parto y se analizaron mediante RT-qPCR para confirmar que las madres no estaban eliminando activamente el rotavirus antes del parto. Dentro de este estudio, se llevó a cabo RT-qPCR como se describe anteriormente en el Ejemplo 2 ("*Protocolo para qRT-PCR de Rota A*"). Se registraron diariamente las observaciones de salud general de cada cerda. Se dejó que el parto se produjera de forma natural hasta que la cerda alcanzó el día 115 de gestación. A partir de ese momento, se indujo el parto. Los lechones se incluyeron en el ensayo en el momento del parto. Solo los lechones sanos al nacer se etiquetaron, se procesaron de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de la instalación y se incluyeron en el ensayo. Cuando los lechones tenían entre dos y cinco días de vida, se les extrajo sangre, se recolectó un hisopo fecal y se los expuso (sin incluir el T04). Al momento de la exposición, se les administró a los lechones una dosis intragástrica de 5 ml de bicarbonato sódico y, a continuación, una dosis intragástrica de 1 ml del material de exposición. A lo largo del período de exposición, se monitoreó diariamente a todos los

animales para detectar la presencia de enfermedades entéricas (diarrea y cambios de comportamiento). Se recolectaron muestras fecales un día después de la exposición (DPC1) y DPC3. En DPC3, todos los lechones en T01 y T03 se sometieron a eutanasia. Se recolectaron secciones intestinales para su evaluación microscópica e inmunohistológica.

Tabla 12: Diseño del estudio

Grupo	N (hembras)	Vacunación de las hembras (6 y 2 semanas antes del parto)		Exposición de los lechones (DPC0; 2-5 días de vida)	Necropsia
		Descripción	Vía/dosis*		
T01	14	Placebo	2 ml IM	Rotavirus A P[7] homogeneizado de tejido en dilución 1:2 Dosis de 1 ml por vía intragástrica	DPC3
T03	14	IgG:AVP8 P[6,7,13]	2 ml IM		
T04	4	Control estricto	No aplicable	Ninguna	No aplicable

*IM = intramuscular

A lo largo del estudio, los títulos de VN en suero en las hembras de T04 (control estricto) aumentaron 4 veces o menos, lo que indica la falta de exposición y un estudio válido (la neutralización del virus se evaluó como se describe a continuación ("*Protocolo para ensayo de neutralización de virus*"); los resultados se muestran en la Tabla 13 y en la **Figura 7**). Ninguna de las hembras del grupo T01 (placebo) presentó un aumento significativo (≤ 2 veces) en el título de VN en suero durante la fase de vacunación. Los títulos de VN en suero de las hembras vacunadas con la vacuna prototipo IgG:AVP8 P[6,7,13] (grupo T03) fueron significativamente mayores ($p < 0,01$) que las hembras vacunadas con un placebo (grupo T01) en D14, D21, D27 y D47. Los títulos de VN en el calostro promedio de las hembras en el grupo T03 (IgG:AVP8 P[6,7,13]) también fueron significativamente mayores en comparación con las hembras del grupo T01 (placebo).

Tabla 13: Resultados de VN

Grupo	Hembra	Suero					Calostro
		D0	D14	D21	D28	D47	DOF*
T01	1054	226	320	226	226	160	320
	1154	80	80	160	160	113	320
	1155	113	113	160	226	160	320
	1160	113	453	226	226	80	226
	1162	226	320	640	320	320	640
	1163	160	226	226	160	320	1280
	8093	80	80	160	130	160	453
	8101	320	160	320	320	320	320
	8105	320	1280	453	905	453	640
	8107	160	320	320	320	226	40
	8120	226	320	226	320	320	640
	8121	226	320	160	640	226	320
	8127	160	160	320	226	160	160
	8131	320	320	453	453	640	640
T03	1045	1280	1280	1280	1280	2560	640
	1053	320	2560	1280	1280	1280	2560
	1055	320	905	1280	1280	640	3620
	1158	320	453	905	1280	640	2560
	1159	160	320	905	640	1810	5120
	1161	320	320	640	320	1280	1280
	8100	226	2560	1810	622	10240	14482
	8102	320	640	905	640	5120	3620
	8103	320	1280	640	453	1280	1810
	8108	320	1810	1280	640	1280	2560
	8117	453	320	640	905	640	2560
	8118	320	905	1280	640	1280	905
	8122	160	320	640	320	1280	640
	8130	113	640	640	905	1280	10240
T04	1046	320	640	640	640	1280	453
	1164	320	320	226	320	320	1280
	8123	640	640	1280	640	905	640
	8126	226	320	640	320	640	2560

Los títulos de VN en el suero de los cerdos previo a la exposición fueron altos (>1280) en la mayoría de los cerdos del grupo T03 (IgG:AVP8 P[6,7,13]), lo que indica una transferencia pasiva de inmunidad de las hembras a los cerdos. Por el contrario, ninguno de los títulos de VN en los cerdos en T01 (placebo) fueron altos (>1280).

De forma similar a los datos de VN, un aumento en la cantidad de anticuerpos antirotavirus AVP8 P[6] y antirotavirus AVP8 P[13] se detectó en hembras vacunadas con el prototipo IgG:AVP8 P[6,7,13] (grupo T03) al D47, pero no en las hembras vacunadas con un placebo (grupo T01). Estos ensayos se realizaron como se describe a continuación ("*Protocolo para ELISA de IgG:AVP8 P[13]*" y "*Protocolo para ELISA de IgG:AVP8 P[6]*", respectivamente). Los resultados se muestran en la **Figura 8** y **Figura 9**.

En los grupos T01 (placebo) y T03 (IgG:AVP8 P[6,7,13]), se definió a un cerdo

como afectado si se detectaba un antígeno de rotavirus mediante inmunohistoquímica (IHC) en al menos una sección intestinal y el animal presentaba una puntuación fecal anormal durante al menos un día después de la exposición. Las distribuciones de frecuencias se enumeran en la Tabla 14 a continuación. En función del uso de esta definición de caso, la vacunación de las hembras 6 y 2 semanas antes del parto con la vacuna prototipo IgG:AVP8 P[6,7,13] (grupo T03) previno la enfermedad asociada al rotavirus en los cerdos después de la exposición con material de exposición del rotavirus A P[7] heterólogo; fracción preventiva de 0,567; intervalo de confianza de 95 % -0,086, 0,827.

Tabla 14. Distribución de frecuencias de la definición de caso

Grupo	Definición de caso*				Total
	0		1		
	N	%	N	%	
T01	78	60,9	50	39,1	128
T03	113	83.1	23	16.9	136

*Definición de caso: Se consideró que un cerdo estaba afectado si una o más de las muestras de tejido del íleon o del yeyuno dan positivas en rotavirus A en IHC (puntuación >0) y presentan al menos una puntuación fecal anormal en cualquier día posterior a la exposición. Puntuación 0 = no afectado; 1 = afectado

En conclusión, la vacunación de las hembras convencionales con la vacuna prototipo IgG:AVP8 P[6,7,13] (que comprende los polipéptidos de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14) seis y dos semanas antes del parto generó títulos elevados de anticuerpos neutralizantes en el suero y el calostro de las cerdas. Estos anticuerpos neutralizantes se transmitieron pasivamente a los cerdos después del nacimiento, como lo demuestra la detección de títulos elevados (>1280) en el suero de los cerdos de las madres vacunadas. La presencia de títulos elevados de anticuerpos neutralizantes en los cerdos condujo a una protección clínica. Específicamente, se consideraron afectados menos cerdos nacidos de madres vacunadas en comparación con los cerdos nacidos de controles de placebo.

Producción de IgG:AVP8 P[6,7,13]

La vacuna prototipo contenía tres fracciones. La producción de cada fracción se realizó por separado y se describe a continuación. La vacuna se formuló con 12,0 % de Emulsigen D, 7 % de fracción de IgG:AVP8 P[7], 4,4 % de fracción de IgG:AVP8 P[6], 1,8 % de fracción de IgG:AVP8 P[13] y 47,8 % de 1x PBS (volumen:volumen).

Fracción de IgG:AVP8 P[7]: Se sembró un recipiente revestido con vidrio Sartorius Biostat B de 10 l con 3 l de células Sf+ a $0,75 \times 10^6$ células/ml. Dos días

después del sembrado, el recipiente se infectó a una MOI de 0,1 y el volumen del recipiente se ajustó a 8 l mediante el uso del medio Ex-cell 420 libre de suero (SAFC N°. de catálogo 14420C-1000 ml). El biorreactor funcionó a 27 °C con agitación de 100 rpm, con el oxígeno disuelto ajustado a o por encima de 40 %, y una superposición de CCA a 1,3 slpm. El recipiente se recolectó a los 7 días después de la inoculación; los fluidos se centrifugaron a 10.000 g a 4 °C durante 20 minutos y el sobrenadante se filtró a 0,8/0,2 µm (GE Healthcare, N.º de catálogo 6715-7582). El sobrenadante clarificado (8 l/recipiente) se inactivó con BEI 5 mM durante tres días a 37 °C en recipientes revestidos con vidrio Sartorius Biostat B. Tras la inactivación, la BEI residual se neutralizó con tiosulfato de sodio. Después de la neutralización, se concentraron aproximadamente 7000 ml aproximadamente 10 veces mediante el uso de un filtro de fibra hueca de 10 kDa (GE, N.º de catálogo UFP-10-C-5A) hasta 700 ml. El material concentrado se diafiltró con 5 volúmenes (3500 ml) de 1x PBS.

Fracción de IgG:AVP8 P[6]: Se sembró un recipiente revestido con vidrio Sartorius Biostat B de 10 l con 3 l de células Sf+ a $0,75 \times 10^6$ células/ml. Dos días después del sembrado, el recipiente se infectó a una MOI de 0,1 y el volumen del recipiente se ajustó a 8 l mediante el uso del medio Ex-cell 420 libre de suero (SAFC N°. de catálogo 14420C-1000 ml). El biorreactor funcionó a 27 °C con agitación de 100 rpm, con el oxígeno disuelto ajustado a o por encima de 40 %, y una superposición de CCA a 1,3 slpm. El recipiente se recolectó a los 8 días después de la inoculación; los fluidos se centrifugaron a 10.000 g a 4 °C durante 20 minutos y el sobrenadante se filtró a 0,8/0,2 µm (GE Healthcare, N.º de catálogo 6715-7582). El sobrenadante clarificado (8 l/recipiente) se inactivó con BEI 10 mM durante 24 h a 37 °C en recipientes revestidos con vidrio Sartorius Biostat B. Tras la inactivación, el BEI residual se neutralizó con tiosulfato de sodio. Después de la neutralización, se concentraron aproximadamente 7000 ml aproximadamente 10 veces mediante el uso de un filtro de fibra hueca de 10 kDa (GE, N.º de catálogo UFP-10-C-5A) hasta 600 ml. El material concentrado se diafiltró con 5 volúmenes (3500 ml) de 1x PBS.

Fracción de IgG:AVP8 P[13]: Se sembró un recipiente revestido con vidrio Sartorius Biostat B de 10 l con 3 l de células Sf+ a $0,75 \times 10^6$ células/ml. Dos días después del sembrado, el recipiente se infectó a una MOI de 0,1 y el volumen del recipiente se ajustó a 8 l mediante el uso del medio Ex-cell 420 libre de suero (SAFC N°. de catálogo 14420C-1000 ml). El biorreactor funcionó a 27 °C con agitación de 100 rpm, con el oxígeno disuelto ajustado a o por encima de 40 %, y una superposición de CCA a 1,3 slpm. El recipiente se recolectó a los 7 días después de la inoculación; los

fluidos se centrifugaron a 10.000 g a 4 °C durante 20 minutos y el sobrenadante se filtró a 0,8/0,2 µm (GE Healthcare, N.º de catálogo 6715-7582). El sobrenadante clarificado (8 l/recipientes) se inactivó con BEI 10 mM durante 24 h a 37 °C en recipientes revestidos con vidrio Sartorius Biostat B. Tras la inactivación, el BEI residual se neutralizó con tiosulfato de sodio. Después de la neutralización, se concentraron aproximadamente 7000 ml aproximadamente 10 veces mediante el uso de un filtro de fibra hueca de 10 kDa (GE, N.º de catálogo UFP-10-C-5A) hasta 750 ml. El material concentrado se diafiltró con 5 volúmenes (3500 ml) de 1x PBS.

Protocolo para ELISA de IgG:AVP8 P[13]:

Se recubrieron placas de ELISA Nuc MaxiSorb de 96 cavidades (Thermo) con proteína purificada de rotavirus A VP8 P[13] diluida en 1x PBS 1:10. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se lavaron con 1x PBST y luego se bloquearon con 3 % de BSA en PBST durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, 100 µl de sueros de prueba diluidos hasta una dilución final de 1:512 en 1x PBS se agregaron a las placas y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, las cavidades se recubrieron con 100 µl de una dilución 1:25.000 de anticuerpo anti-IgG de cerdo en cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch) y se incubaron durante una hora a 37 °C. Después del lavado, la placa se desarrolló con 3,5,3',5'-tetrametilbencidina (Ultra TMB-ELISA de 1 etapa, Thermo) durante 10 minutos a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con solución de detención (Sigma) antes de la medición de la densidad óptica (OD) a 450 nm. Las muestras, que incluían un control positivo y negativo, se ejecutaron en cavidades duplicadas y los resultados se informaron como el promedio de la relación (muestra – control negativo) con respecto a (control positivo – negativo) (S-N)/(P-N).

Protocolo para ELISA de IgG:AVP8 P[6]:

Se recubrieron placas de ELISA Nuc MaxiSorb de 96 cavidades (Thermo) con proteína purificada de Rotavirus A VP8 P[6] diluida en 1x PBS 1:10. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se lavaron con 1x PBST y luego se bloquearon con 3 % de BSA en PBST durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, 100 µl de sueros de prueba diluidos hasta una dilución final de 1:512 en 1x PBS se agregaron a las placas y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, las cavidades se recubrieron con 100 µl de una dilución 1:25.000 de anticuerpo anti-IgG de cerdo en cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch) y se incubaron durante una hora a 37 °C. Después del lavado, la placa se desarrolló con 3,5,3',5'-tetrametilbencidina (Ultra TMB-ELISA de

1 etapa, Thermo) durante 10 minutos a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con solución de detención (Sigma) antes de la medición de la densidad óptica (OD) a 450 nm. Las muestras, que incluían un control positivo y negativo, se ejecutaron en cavidades duplicadas y los resultados se informaron como el promedio de la relación (muestra – control negativo) con respecto a (control positivo – negativo) (S-N)/(P-N).

Protocolo para ensayo de neutralización de virus

Todas las muestras de suero y leche se calentaron hasta inactivarse a 56 °C durante 30 minutos. Las muestras se diluyeron en serie de 1:40 a 1:40.960 en medio de cultivo de rotavirus (MEM + 2,5 % de HEPES + 0,3 % de caldo de fosfato de triptosa + 0,02 % de levadura + 10 µg/ml de tripsina). Se agregaron antibióticos a los medios para las pruebas de las muestras de leche. La cepa aislada de rotavirus A (título de aproximadamente 6,5 log TCID₅₀/ml) se diluyó 1:78.000 en medio de cultivo de rotavirus. Un total de 250 µl de la muestra diluida se agregó a 250 µl del virus diluido; la mezcla se incubó a 37 °C ± 5 % de CO₂ durante una hora. El medio de cultivo se retiró asépticamente de placas de 96 cavidades de tres-cuatro días de plantadas con células MA104. Después de la incubación, 200 µl de la mezcla de virus-suero se transfirieron a las placas de cultivo celular. Las células se incubaron a 37 °C ± 5 % de CO₂ durante 3-4 días. El virus de reserva y diluido se tituló el día del uso para confirmar la dilución usada en el ensayo. Después de la incubación, el sobrenadante se descartó. Para la fijación, se agregaron 100 µl/cavidad de 50 %/50 % de acetona/metanol. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, se secaron al aire, luego se volvieron a hidratar con 100 µl/cavidad de 1X PBS. El anticuerpo primario (suero policlonal de conejo anti-rotavirus A, generado internamente) se diluyó 1:1000 en 1X PBS. Se agregaron 100 µl/cavidad de anticuerpo primario diluido y las placas se incubaron a 37 °C ± 5 % de CO₂ durante una hora. Después de la incubación, las placas se lavaron dos veces con 100 µl/cavidad de 1X PBS. El anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo en cabra etiquetado con FITC de Jackson ImmunoResearch, N.º de catálogo 111-095-003) se diluyó 1:100 en 1X PBS. Se agregaron 100 µl/cavidad de anticuerpo secundario diluido y las placas se incubaron a 37 °C ± 5 % de CO₂ durante una hora. Después de la incubación, las placas se lavaron dos veces con 100 µl/cavidad de 1X PBS. Las placas se leyeron para determinar la presencia de fluorescencia mediante el uso de un microscopio ultravioleta. El ensayo se consideró válido si se descubrió que el título (generado mediante el método de Reed-Muench) del virus diluido era 2,8 ± 0,5 log TCID₅₀/ml. Además, se incluyeron muestras positivas y negativas conocidas en cada ensayo

como un control. Los títulos de suero se informaron como la dilución más alta en la que no se observaba tinción.

EJEMPLO 11

Experimento de prueba de concepto en cerdos:

El objetivo principal de este estudio es evaluar si la administración de una vacuna prototipo, también denominada en la presente "IgG:AVP8 P[6,7,13] + IgG:CVP8", que incluye tres proteínas Fc de IgG-AVP8 (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14), una proteína Fc IgG-CVP8 (SEQ ID NO:15) y una vacuna de control no relevante, denominada en la presente "placebo", a hembras convencionales confiere protección pasiva a los cerdos contra una exposición virulenta al rotavirus A. Se incluyen un total de 24 hembras en el estudio. Las hembras se aleatorizan en dos grupos de tratamiento y un grupo de control estricto, como se describe en la Tabla 15 a continuación. Las hembras en T01 y T02 se mezclan en tres salas. Las hembras en T03 se alojan en una sala separada. Todas las hembras se vacunan con el material adecuado mediante la vía apropiada, como se indica en la Tabla 15. Las hembras en T03 no se vacunaron (control estricto). Se recolecta suero de las hembras periódicamente durante el período de vacunación y se lo analiza para detectar evidencia de seroconversión. Se recolectan muestras fecales antes del parto y se criban mediante RT-qPCR para confirmar que las madres no están eliminando activamente el rotavirus antes del parto. Se registran diariamente las observaciones de salud general de cada cerda. Se deja que el parto se produzca de forma natural hasta que la cerda alcanza el día 114 de gestación. A partir de ese momento, se induce el parto. Los lechones se incluyen en el ensayo en el momento del parto. Solo los cerdos sanos al momento del nacimiento se etiquetan, se procesan de acuerdo con procedimientos operativos estándar de la instalación y se incluyen en el ensayo. Cuando los lechones tienen entre uno y cinco días, se les extrae sangre, se recolecta un hisopo fecal y se los expone (sin incluir el T03). Al momento de la exposición, se les administra a los lechones una dosis intragástrica de 5 ml de bicarbonato de sodio y luego, una dosis intragástrica de 1 ml del material de exposición. A lo largo del periodo de exposición, se monitorea diariamente a todos los animales para detectar la presencia de enfermedades entéricas (diarrea y cambios de comportamiento). Se recolectan muestras fecales un día después de la exposición (DPC1). En DPC3, todos los lechones en T01 y T02 se someten a eutanasia. Se recolectan secciones intestinales para su evaluación microscópica e inmunohistológica. Las hembras en el

grupo T01 (IgG:AVP8 P[6,7,13] + IgG:CVP8) tienen una media de nivel de anticuerpos contra el genotipo de rotavirus A P[6] P[7] y P[13] y rotavirus C más alta que los animales vacunados con T02 (placebo), que no experimentan un aumento en el título. Las hembras en el grupo T01 (IgG:AVP8 P[6,7,13] + IgG:CVP8) tienen lechones menos afectados (según se determina mediante signos clínicos y evaluación inmunohistológica) en comparación con las hembras en el grupo T02 (placebo).

Tabla 15: Diseño del estudio

Grupo	N (hembras)	Vacunación de las hembras (6 y 2 semanas antes del parto)		Exposición de los lechones (DPC0; 1-5 días de vida)	Necropsia
		Descripción	Vía/dosis*		
T01	10	IgG:AVP8 P[6,7,13] + IgG:CVP8	2 ml IM	Rotavirus A P[7] homogeneizado de tejido en dilución 1:2 Dosis de 1 ml por vía intragástrica	DPC2
T02	10	Placebo	2 ml IM		
T03	4	Control estricto	No aplicable	Ninguna	No aplicable

*IM = intramuscular

LISTADO DE FIGURAS:

Figura 1: Respuesta de IgG sérica de cerdos, ya sea vacunados con la proteína Fc de IgG-AVP8 formulada con Emulsigen D (denominada "IgG-AVP8" en el etiquetado) o con placebo ("control no relevante"), dirigida contra el rotavirus porcino A.

Figura 2: Resultados de un ensayo de neutralización viral (VN) realizado para detectar y cuantificar los anticuerpos capaces de neutralizar el rotavirus porcino A en muestras de cerdos vacunados con la proteína Fc de IgG-AVP8 formulada con Emulsigen D (denominada "IgG-AVP8" en el etiquetado) o con placebo ("control no relevante").

Figura 3: Títulos promedio de VN contra el rotavirus en suero de cerdas por grupo y día de estudio, en donde los días de estudio D0 y D28 representan los puntos temporales "seis semanas y dos semanas antes del parto" (es decir, cuando se administraron los productos en investigación a los grupos de estudio T02 y T04, respectivamente) y los días de estudio D7, D28 y D35 representan los puntos temporales "cinco semanas, dos semanas y una semana antes del parto" (es decir, cuando se administró la vacuna comercial a T06).

Figura 4: Mediana del grupo de copias genómicas de ARN del rotavirus A (gc)/ml en heces por día de estudio.

Figura 5: A) SDS-PAGE de muestras del producto de proteína Fc de IgG-AVP8 (SEQ ID NO: 12) purificada con proteína A, reducidas con ditiotritol ("+DTT") o no reducidas ("-DTT"); B) transferencia Western del producto de biorreactor de proteína Fc de IgG-

AVP8 (SEQ ID NO: 12), en donde se centrifugó una muestra para separar una fracción de pélet celular ("pélet") y una fracción de sobrenadante ("sobrenadante"), que después de un proceso de congelación y descongelación se procesaron en SDS-PAGE en condiciones reductoras (+DTT), se transfirieron a una membrana de PVDF y se sondaron con anticuerpo anti-cerdo en cabra conjugado con HRP para detectar el fragmento Fc de IgG porcina.

Figura 6: Títulos promedio de VN contra el rotavirus en suero de cerdas por grupo y día de estudio, en donde los días de estudio D0 y D28 representan los puntos temporales "seis semanas y dos semanas antes del parto" (es decir, cuando se administraron los productos en investigación al grupo de estudio T01 y T03, respectivamente).

Figura 7: Títulos promedio de VN contra el rotavirus en suero de cerdas por grupo y día de estudio, en donde el día de estudio D0 representa el punto temporal de la primera administración de los productos en investigación al grupo de estudio T01 y T03, respectivamente.

Figura 8: Resultados de "ELISA de IgG:AVP8 P[6]", en donde las placas de ELISA recubiertas con la proteína de rotavirus A VP8 P[6] se incubaron con sueros de prueba diluidos, y en donde se detectaron luego anticuerpos anti-rotavirus AVP8 P[6] mediante el uso de anticuerpo anti-IgG de cerdo en cabra conjugado con HRP.

Figura 9: Resultados de "ELISA de IgG:AVP8 P[13]", en donde las placas de ELISA recubiertas con la proteína de rotavirus A VP8 P[13] se incubaron con sueros de prueba diluidos, y en donde se detectaron luego anticuerpos anti-rotavirus AVP8 P[13] mediante el uso de anticuerpo anti-IgG de cerdo en cabra conjugado con HRP.

EN EL LISTADO DE SECUENCIAS / fuente y origen geográfico (cuando corresponda):

SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de una proteína VP8 de rotavirus (genotipo P[7]), procedente de una granja de Carolina del Norte, EE. UU.,

SEQ ID NO: 2 corresponde a la secuencia de un dominio similar a la lectina de una proteína VP8 de rotavirus (genotipo P[7]), procedente de una granja de Carolina del Norte, EE. UU.,

SEQ ID NO: 3 corresponde a la secuencia de un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus (genotipo P[7]) procedente de una granja de Carolina del Norte, EE. UU.,

SEQ ID NO: 4 corresponde a la secuencia de un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, es decir, una secuencia de consenso de una porción de la

proteína VP8 de rotavirus (basada en el genotipo P[6])),

SEQ ID NO: 5 corresponde a la secuencia de un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, es decir, una secuencia de consenso de una porción de un fragmento inmunógeno de la proteína VP8 de rotavirus (basada en el genotipo P[13]),

SEQ ID NO: 6 corresponde a la secuencia de un fragmento inmunógeno de la proteína VP8 de rotavirus C,

SEQ ID NO: 7 corresponde a la secuencia de un fragmento Fc de IgG porcina,

SEQ ID NO: 8 corresponde a la secuencia de un fragmento Fc de IgG de cobayo,

SEQ ID NO: 9 (Gly-Gly-Ser) corresponde a la secuencia de una porción ligadora,

SEQ ID NO: 10 corresponde a la secuencia de una porción ligadora,

SEQ ID NO: 11 corresponde a la secuencia de una porción ligadora,

SEQ ID NO: 12 corresponde a la secuencia de un polipéptido (proteína de fusión) que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9 (Gly-Gly-Ser) y SEQ ID NO: 7,

SEQ ID NO: 13 corresponde a la secuencia de un polipéptido (proteína de fusión) que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9 (Gly-Gly-Ser) y SEQ ID NO: 7,

SEQ ID NO: 14 corresponde a la secuencia de un polipéptido (proteína de fusión) que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9 (Gly-Gly-Ser) y SEQ ID NO: 7,

SEQ ID NO: 15 corresponde a la secuencia de un polipéptido (proteína de fusión) que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 (Gly-Gly-Ser) y SEQ ID NO: 7,

SEQ ID NO: 16 corresponde a la secuencia de un polipéptido (proteína de fusión) que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9 (Gly-Gly-Ser), SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 5,

SEQ ID NO: 17 corresponde a la secuencia de un polinucleótido que codifica el polipéptido (proteína de fusión) de SEQ ID NO: 12,

SEQ ID NO: 18 corresponde a la secuencia de un polinucleótido que codifica el polipéptido (proteína de fusión) de SEQ ID NO: 13,

SEQ ID NO: 19 corresponde a la secuencia de un polinucleótido que codifica el polipéptido (proteína de fusión) de SEQ ID NO: 14,

SEQ ID NO: 20 corresponde a la secuencia de un polinucleótido que codifica el polipéptido (proteína de fusión) de SEQ ID NO: 15,

SEQ ID NO: 21 corresponde a la secuencia de un polinucleótido que codifica el

polipéptido (proteína de fusión) de SEQ ID NO: 16,

SEQ ID NO: 22-25: secuencias de cebadores y sondas (Tabla 5).

Las siguientes cláusulas también se divulgan en la presente. Así, la presente divulgación incluye además aspectos destacados en las cláusulas siguientes:

1. Una composición inmunógena que comprende
 - (i) un polipéptido que comprende
 - un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
 - un fragmento Fc de inmunoglobulina;
 - y
 - (ii) al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido.
2. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 1, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus,
o en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.
3. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 1 o 2, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de una porción ligadora,
o en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de una porción ligadora.
4. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 3, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está unido al terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de un enlace peptídico entre el residuo de aminoácidos del terminal N de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina y el residuo de aminoácidos del terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus,
o en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus mediante un enlace peptídico entre el residuo de aminoácido del terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina y el residuo de aminoácido del terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.
5. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 4, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de

dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.

6. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 5, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de una porción ligadora,
o en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus a través de un enlace peptídico entre el residuo de aminoácido del terminal N de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina y el residuo de aminoácido del terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.
7. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 6, en donde dicho polipéptido es una proteína de fusión.
8. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 7, en donde dicho polipéptido es una proteína de fusión de la fórmula x-y-z, en donde
x consiste en un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus;
y es una porción ligadora; y
z es un fragmento Fc de inmunoglobulina.
9. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 8, en donde dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra el rotavirus en un sujeto al que se le administra dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.
10. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 9, en donde dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus tiene una longitud de 50 a 200, preferentemente de 140 a 190 residuos de aminoácidos.
11. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 10, en donde dicho rotavirus es un rotavirus porcino.
12. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 11, en donde dicho rotavirus se selecciona del grupo que consiste en rotavirus A y rotavirus C.
13. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 12, en donde dicho rotavirus es rotavirus A.
14. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a

- 13, en donde dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus comprende el dominio similar a la lectina de una proteína VP8 de rotavirus.
15. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 14, en donde dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus es un dominio similar a la lectina de una proteína VP8 de rotavirus con el terminal N extendido, en donde la extensión del terminal N es de 1 a 20 residuos de aminoácidos, en particular, de 5 a 15 residuos de aminoácidos de longitud.
16. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 14 o 15, en donde dicho dominio similar a la lectina de una proteína VP8 de rotavirus consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 65-224 de una proteína VP8 de rotavirus.
17. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 15 o 16, en donde la secuencia de aminoácidos de dicha extensión del terminal N es la secuencia de aminoácidos de la longitud respectiva que flanquea el residuo de aminoácido del terminal N del dominio similar a la lectina en la secuencia de aminoácidos de la proteína VP8 de rotavirus.
18. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 17, en donde dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 60-224, los residuos de aminoácidos 59-224, los residuos de aminoácidos 58-224, los residuos de aminoácidos 57-224, los residuos de aminoácidos 56-224, los residuos de aminoácidos 55-224, los residuos de aminoácidos 54-224, los residuos de aminoácidos 53-224, los residuos de aminoácidos 52-224, los residuos de aminoácidos 51-224, los residuos de aminoácidos 50-224 o los residuos de aminoácidos 49-224, de una proteína VP8 de rotavirus.
19. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 18, en donde dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 57-224 de una proteína VP8 de rotavirus.
20. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 16 a 19, en donde la numeración de dichos residuos de aminoácidos se refiere a la secuencia de aminoácidos de una proteína VP8 de rotavirus de tipo silvestre, en particular de una proteína VP8 de rotavirus A de tipo silvestre, y en donde dicha proteína VP8 de rotavirus de tipo silvestre es preferentemente la proteína

establecida en SEQ ID NO: 1.

21. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 20, en donde dicho rotavirus se selecciona del grupo que consiste en rotavirus de genotipo P[7], rotavirus de genotipo P[6] y rotavirus de genotipo P[13].
22. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 21, en donde la proteína VP8 de rotavirus comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 98 % o incluso con mayor preferencia al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1.
23. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 14 a 22, en donde el dominio similar a la lectina de la proteína VP8 de rotavirus consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 98 % o incluso con mayor preferencia al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 2.
24. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 23, en donde el fragmento inmunógeno de la proteína VP8 de rotavirus consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 98 % o incluso con mayor preferencia al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3.
25. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 24, en donde el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus es o consiste en una secuencia de consenso de una porción de una proteína VP8 de rotavirus, en particular de una porción de una proteína VP8 de rotavirus A,
 y en donde dicha secuencia de consenso de una porción de una proteína VP8 de rotavirus se puede obtener preferentemente a través de un método que comprende las etapas de:
 - traducir una pluralidad de secuencias de nucleótidos que codifican una porción de una proteína VP8 de rotavirus en secuencias de aminoácidos,
 - alinear dichas secuencias de aminoácidos con las proteínas VP8 de rotavirus conocidas, preferentemente, mediante el *software* de alineación de secuencias MUSCLE, con parámetros de penalización por brecha y agrupación UPGMB predeterminados.
 - someter dichas secuencias alineadas a un análisis filogenético y

generar una reconstrucción de filogenia de unión de vecinos (neighbor joining) en función de la secuencia de la proteína VP8 de rotavirus, en particular, importar dichas secuencias de aminoácidos alineadas al *software* MEGA7 para su análisis filogenético y generar una reconstrucción de filogenia de unión de vecinos en función de la secuencia de la proteína VP8 de rotavirus.

- calcular el contenido óptimo mediante el uso del método de corrección Poisson con una prueba de filogenia de arranque (n=100),
- dibujar el contenido óptimo a escala con longitudes de ramificación iguales a las distancias evolutivas en unidades de sustituciones de aminoácidos por sitio en 170 posiciones totales,
- considerar significativos los nodos donde la asociación de cúmulos de arranque es mayor de 70 %,
- designar como grupos los nodos con una distancia aproximada de 10 % y las asociaciones de cúmulos de arranque superiores a 70 %, y
- seleccionar un grupo y generar las secuencias de consenso mediante la identificación de la mayor frecuencia por posición alineada dentro del grupo,
- y opcionalmente, en los casos donde se observan proporciones equivalentes de aminoácidos en una posición alineada, seleccionar el residuo de aminoácido en función de los datos epidemiológicos informados junto con un perfil de protección del producto predefinido.

26. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 25, en donde el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 98 % o incluso con mayor preferencia al menos 99 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
27. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 26, en donde dicho rotavirus es rotavirus C.
28. La composición inmunógena de acuerdo con las cláusulas 1 a 27, en donde el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 98 % o incluso con mayor preferencia al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 6.
29. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a

- 28, en donde dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus es o consiste en
- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus A, según se especifica en cualesquiera una o más de las cláusulas 9 a 24, o
 - una secuencia de consenso de una porción de una proteína VP8 de rotavirus, en particular de una porción de una proteína VP8 de rotavirus A, según se especifica en cualquiera de las cláusulas 9 a 13, 25 y 26, o
 - un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C, según se especifica en cualquiera de las cláusulas 9 a 12, 27 y 28.
30. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 29, en donde el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 98 % o incluso con mayor preferencia al menos 99 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
31. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 30, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina tiene una longitud de al menos 220 residuos de aminoácidos, preferentemente de 220 a 250 residuos de aminoácidos, y/o en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina no está glicosilado.
32. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 31, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina comprende o consiste en la región constante de la cadena pesada 2 (CH2) y en la región constante de la cadena pesada 3 (CH3), y opcionalmente la región bisagra o una parte de la región bisagra, de una inmunoglobulina.
33. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 32, en donde dicha inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.
34. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 33, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de inmunoglobulina codificado por el genoma de una especie cuyas células intestinales son susceptibles a una infección por el rotavirus del que deriva el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.

35. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 34, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG porcina.
36. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 35, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
37. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 3 a 36, en donde dicha porción ligadora es una secuencia de aminoácidos de 1 a 50 residuos de aminoácidos de longitud.
38. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 3 a 37, en donde dicha porción ligadora comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 66 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 (Gly-Gly-Ser), SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.
39. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 5 a 38, en donde dicho polipéptido tiene un residuo de metionina del terminal N que flanquea el residuo de aminoácidos del terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus.
40. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 5 a 39, en donde dicho polipéptido comprende otro fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus ligado al terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina.
41. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 40, en donde dicho polipéptido comprende
 - un fragmento inmunógeno (1) de una proteína VP8 de rotavirus,
 - un fragmento Fc de inmunoglobulina, y
 - un fragmento inmunógeno adicional (2) de una proteína VP8 de rotavirus,en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de

dicho fragmento inmunógeno (1),

y en donde dicho fragmento inmunógeno adicional (2) de una proteína VP8 de rotavirus está ligado al terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina.

42. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 40 o 41, en donde dicho fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus es o consiste en
 - un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 del rotavirus A, según se especifica en cualesquiera una o más de las cláusulas 9 a 24, o
 - una secuencia de consenso de una porción de una proteína VP8 de rotavirus, en particular de una porción de una proteína VP8 de rotavirus A, según se especifica en cualesquiera una o más de las cláusulas 9 a 13, 25 y 26; o
 - un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C, según se especifica en cualesquiera una o más de las cláusulas 9 a 12, 27 y 28.
43. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 40 a 42, en donde el fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 98 % o incluso con mayor preferencia al menos 99 % de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 6, y/o en donde dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus es diferente del fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus cuyo terminal C está ligado a dicho fragmento Fc de inmunoglobulina.
44. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 40 a 43, en donde dicho fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus está ligado al terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina a través de una porción ligadora, en donde dicha porción ligadora es preferentemente una porción ligadora según se especifica en la cláusula 37 o 38, o en donde dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus está ligado al terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un enlace peptídico entre el residuo de aminoácido del terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus y el residuo de aminoácido del terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina.

45. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 44, en donde dicho polipéptido consiste en:
- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, en particular un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus según se especifica en cualesquiera una o más de las cláusulas 9 a 30,
 - un residuo de metionina del terminal N que flanquea el residuo de aminoácido del terminal N de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
 - un fragmento Fc de inmunoglobulina, en particular un fragmento Fc de inmunoglobulina según se especifica en cualesquiera una o más de las cláusulas 31 a 36,
en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está ligado al terminal C de dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, en particular a través de una porción ligadora, en donde dicha porción ligadora es preferentemente una porción ligadora según se especifica en la cláusula 37 o 38,
 - y opcionalmente, un fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus ligado al terminal C de dicho fragmento Fc de inmunoglobulina, en particular, a través de una porción ligadora, en donde dicho fragmento inmunógeno adicional de una proteína VP8 de rotavirus es preferentemente el fragmento inmunógeno adicional según se especifica en cualesquiera una o más de las cláusulas 41 a 44 y en donde dicha porción ligadora es preferentemente una porción ligadora según se especifica en la cláusula 37 o 38.
46. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 45, en donde dicho polipéptido es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.
47. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 46, en donde dicho polipéptido es una proteína recombinante, en particular una proteína recombinante expresada por baculovirus.
48. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a

- 47, en donde dicho polipéptido forma un homodímero con un polipéptido idéntico adicional.
49. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 48, en donde el componente **(i)** está presente en un multímero que comprende o está compuesto por una pluralidad de dicho polipéptido, y en donde dicho multímero es preferentemente un homodímero formado por dicho polipéptido con un polipéptido idéntico adicional.
50. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 49, en donde la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, consiste en dos o más sustancias inmunógenas, en donde todas esas sustancias inmunógenas son diferentes de dicho polipéptido y diferentes entre sí.
51. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 50, en donde la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, es al menos una sustancia inmunógena que comprende o consiste en un antígeno de reovirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno.
52. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 51, en donde la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, consiste en dos o más sustancias inmunógenas, en donde cada una de dichas sustancias comprende un antígeno de reovirus, y en donde todos dichos antígenos de reovirus son diferentes de dicho fragmento inmunógeno y diferentes entre sí.
53. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 52, en donde la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, es al menos una proteína que comprende o consiste en un antígeno de reovirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno.
54. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 53, en donde la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, consiste en dos o más proteínas, en donde cada una de dichas proteínas comprende un antígeno de reovirus, y en donde todos dichos antígenos de reovirus son diferentes de dicho fragmento inmunógeno y diferentes entre sí.
55. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 54, en donde el componente **(ii)** consiste en al menos una sustancia

inmunógena que comprende un antígeno de rotavirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno del componente (i).

56. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 55, en donde el componente (ii) consiste en dos o más sustancias inmunógenas, en donde cada una de dichas sustancias comprende un antígeno de rotavirus, y en donde todos dichos antígenos de rotavirus son diferentes de dicho fragmento inmunógeno del componente (i) y diferentes entre sí.
57. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 56, en donde el componente (ii) consiste en al menos una proteína que comprende un antígeno de rotavirus, diferente de dicho fragmento inmunógeno del componente (i).
58. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 57, en donde el componente (ii) consiste en dos o más proteínas, en donde cada una de dichas proteínas comprende un antígeno de rotavirus, y en donde todos dichos antígenos de rotavirus son diferentes de dicho fragmento inmunógeno del componente (i) y diferentes entre sí.
59. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 1 a 58, en donde
dicho polipéptido es un primer polipéptido;
y
la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, es al menos un polipéptido adicional, diferente de dicho primer polipéptido.
60. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 59, en donde la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o es
 - un segundo polipéptido diferente de dicho primer polipéptido,
y preferentemente comprende un tercer polipéptido, diferente de dicho primer y segundo polipéptido, y
opcionalmente comprende un cuarto polipéptido, diferente de la totalidad de dicho primer a tercer polipéptido.
61. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 59 o 60, en donde la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o es
 - un segundo polipéptido que comprende un antígeno de reovirus,

- diferente de dicho fragmento inmunógeno,
y preferentemente comprende un tercer polipéptido, diferente de dicho primer y segundo polipéptido, y
opcionalmente comprende un cuarto polipéptido, diferente de la totalidad de dicho primer a tercer polipéptido.
62. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 61, en donde dicho tercer polipéptido comprende un antígeno de reovirus, diferente tanto de dicho fragmento inmunógeno como del antígeno de reovirus del segundo polipéptido, y en donde opcionalmente dicho cuarto polipéptido comprende un antígeno de reovirus, diferente de la totalidad de
- dicho fragmento inmunógeno,
 - el antígeno de reovirus del segundo polipéptido y
 - el antígeno de reovirus del tercer polipéptido.
63. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 51 a 54, y 61 a 62, en donde dicho antígeno de reovirus es un antígeno de rotavirus y, respectivamente, dichos antígenos de reovirus son antígenos de rotavirus.
64. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 60 a 63,
en donde dicho segundo polipéptido es un polipéptido según se especifica en cualquiera de las cláusulas 1 a 49, y en donde dicho segundo péptido es diferente de dicho primer polipéptido,
y en donde preferentemente dicho tercer polipéptido es un polipéptido según se especifica en cualquiera de las cláusulas 1 a 49, y en donde dicho tercer polipéptido es diferente tanto de dicho primer polipéptido como de dicho segundo polipéptido,
y en donde opcionalmente dicho cuarto polipéptido es un polipéptido según se especifica en cualquiera de las cláusulas 1 a 49, y en donde dicho cuarto polipéptido es diferente de la totalidad de dicho primer a tercer polipéptido.
65. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 1 a 64, en donde
dicho polipéptido es un primer polipéptido que comprende
- un primer fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
 - un fragmento Fc de inmunoglobulina;
- y
la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido,

comprende o consiste en

un segundo polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, en donde dicho segundo fragmento inmunógeno es diferente de dicho primer fragmento inmunógeno,

y preferentemente un tercer polipéptido que comprende un tercer fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, en donde dicho tercer fragmento inmunógeno es diferente de dicho primer fragmento inmunógeno como de dicho segundo fragmento inmunógeno,

y opcionalmente un cuarto polipéptido que comprende un cuarto fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, en donde dicho cuarto fragmento inmunógeno es diferente de la totalidad de dicho primer al tercer fragmento inmunógeno.

66. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 65, en donde cada uno de dicho segundo al cuarto fragmento inmunógeno se selecciona individualmente del grupo que consiste en

- un fragmento inmunógeno según se especifica en cualesquiera una o más de las cláusulas 9 a 24,

- una secuencia de consenso de una porción de una proteína VP8 de rotavirus, en particular de una porción de una proteína VP8 de rotavirus A, según se especifica en cualesquiera una o más de las cláusulas 9 a 13, 25 y 26,

y

- un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C, según se especifica en cualesquiera una o más de las cláusulas 9 a 12, 27 y 28,

en particular siempre que la totalidad de dichos segundo al cuarto fragmentos inmunógenos sea diferente de dicho primer fragmento inmunógeno y diferentes entre sí.

67. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 65 o 66, en donde dicho primer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en

X7, X13, X6 y XC, y/o

dicho segundo fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7, X13, X6 y XC**, y/o

dicho tercer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7, X13, X6 y XC**, y/o

dicho cuarto fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7, X13, X6 y XC**;

en donde

X7 representa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[7],

X13 representa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[13],

X6 representa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[6],

y

XC representa un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C.

68. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 67, en donde la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o es

un segundo polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus,

y en donde cada uno de dicho primer y segundo fragmento inmunógeno se selecciona individualmente del grupo que consiste en **X7**, **X13**, **X6** y **XC**,

siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X7**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X13**, **X6** y **XC**,

siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X6**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7**, **X13** y **XC**,

siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X13**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7**, **X6** y **XC**,

y siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **XC**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X7**, **X13** y **X6**.

69. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 67 o 68, en donde la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o consiste en

un segundo polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y

un tercer polipéptido que comprende un tercer fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus,

en donde cada uno de dicho primer a tercer fragmento inmunógeno se selecciona individualmente del grupo que consiste en **X7**, **X13**, **X6** y **XC**,
 siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X7**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X13** y dicho tercer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X6** y **XC**,
 siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X6**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7** y dicho tercer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X13** y **XC**,
 siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X13**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7** y dicho tercer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X6** y **XC**,
 y siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **XC**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7** y dicho tercer fragmento inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en **X13** y **X6**.

70. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 67 a 69, en donde la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o consiste en
 un segundo polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
 un tercer polipéptido que comprende un tercer fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus, y
 un cuarto polipéptido que comprende un cuarto fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus,
 y en donde cada uno de dicho primer al cuarto fragmento inmunógeno se selecciona individualmente del grupo que consiste en **X7**, **X13**, **X6** y **XC**,
 siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X7**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X13**, dicho tercer fragmento inmunógeno es **X6** y dicho cuarto fragmento inmunógeno es **XC**,
 siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X6**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7**, dicho tercer fragmento inmunógeno es **X13** y dicho cuarto fragmento inmunógeno es **XC**,
 siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **X13**, entonces dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7**, dicho tercer fragmento inmunógeno es **X6** y dicho cuarto fragmento inmunógeno es **XC**,
 y siempre que cuando dicho primer fragmento inmunógeno sea **XC**, entonces

dicho segundo fragmento inmunógeno es **X7**, dicho tercer fragmento inmunógeno es **X13** y dicho cuarto fragmento inmunógeno es **X6**.

71. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 67 a 70, en donde

X7 consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3, y/o

X13 consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 5, y/o

X6 consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 4, y/o

XC consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 6.

72. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 65 a 71, en donde dicho primer fragmento inmunógeno es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[7], y dicho segundo fragmento inmunógeno es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[13], y preferentemente dicho tercer fragmento inmunógeno es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[6], y y opcionalmente dicho cuarto fragmento inmunógeno es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus C.

73. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 65 a 72, en donde

dicho primer fragmento inmunógeno consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3, y

dicho segundo fragmento inmunógeno consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 5, y
y, preferentemente, dicho tercer fragmento inmunógeno consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 4, y
y, opcionalmente, dicho cuarto fragmento inmunógeno consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 98 % o, incluso con mayor preferencia, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 6.

74. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 59 a 73, en donde
dicho primer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7, R13, R6 y RC**, y/o
dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7, R13, R6 y RC**, y/o
dicho tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7, R13, R6 y RC**, y/o
dicho cuarto polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7, R13, R6 y RC**;
en donde
R7 es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12,
R13 es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14,

R6 es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, y

RC es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15.

75. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 59 a 74, en donde
la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o es un segundo polipéptido de una proteína VP8 de rotavirus, y en donde
cada uno de dicho primer y segundo polipéptido se selecciona individualmente del grupo que consiste en **R7, R13, R6 y RC**,
siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R7**, entonces dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R13, R6 y RC**,
siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R6**, entonces dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7, R13 y RC**,
siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R13**, entonces dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7, R6 y RC**,
y siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **RC**, entonces dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7, R13 y R6**.
76. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 74 o 75, en donde
la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o consiste en un segundo polipéptido de una proteína VP8 de rotavirus, y en donde
cada uno de dicho primer y segundo polipéptido se selecciona individualmente del grupo que consiste en **R7, R13 y R6**,
siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R7**, entonces dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R13 y R6**,
siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R6**, entonces dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7 y R13**,

- y siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R13**, entonces dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R7** y **R6**.
77. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 74 a 76, en donde
dicho primer polipéptido es **R7** y dicho segundo polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R13** y **R6**.
78. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 74 a 77, en donde
la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o consiste en
un segundo polipéptido y
un tercer polipéptido,
y en donde cada uno de dicho primer a tercer polipéptido se selecciona individualmente del grupo que consiste en **R7**, **R13**, **R6** y **RC**,
siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R7**, entonces dicho segundo polipéptido es **R13** y dicho tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R6** y **RC**,
siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R6**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7** y dicho tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R13** y **RC**,
siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R13**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7** y dicho tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R6** y **RC**,
y siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **RC**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7** y dicho tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R13** y **R6**.
79. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 74 a 78, en donde
dicho primer polipéptido es **R7**, y
dicho segundo polipéptido es **R13**, y
dicho tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste en **R6** y **RC**.
80. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 74 a 79, en donde
la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o consiste en

un segundo polipéptido y

un tercer polipéptido,

y en donde cada uno de dicho primer a tercer polipéptido se selecciona individualmente del grupo que consiste en **R7**, **R13** y **R6**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R7**, entonces dicho segundo polipéptido es **R13** y dicho tercer polipéptido es **R6**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R6**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7** y dicho tercer polipéptido es **R13**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R13**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7** y dicho tercer polipéptido es **R6**.

81. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 74 a 80, en donde

la al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, comprende o consiste en

un segundo polipéptido y

un tercer polipéptido, y

un cuarto polipéptido,

y en donde cada uno de dicho primer a cuarto polipéptido se selecciona individualmente del grupo que consiste en **R7**, **R6**, **R13** y **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R7**, entonces dicho segundo polipéptido es **R13**, dicho tercer polipéptido es **R6** y dicho cuarto polipéptido es **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R6**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7**, dicho tercer polipéptido es **R13** y dicho cuarto polipéptido es **RC**,

siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **R13**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7**, dicho tercer polipéptido es **R6** y dicho cuarto polipéptido es **RC**,

y siempre que cuando dicho primer polipéptido sea **RC**, entonces dicho segundo polipéptido es **R7**, dicho tercer polipéptido es **R13** y dicho cuarto polipéptido es **R6**.

82. La composición inmunógena de acuerdo con una o más de las cláusulas 74 a 81, en donde

dicho primer polipéptido es **R7**, y

dicho segundo polipéptido es **R13**, y

dicho tercer polipéptido es **R6**, y

dicho cuarto polipéptido es **RC**.

83. Una composición inmunógena, en particular la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 82, que comprende
 - una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, aun con mayor preferencia al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 12, y
 - una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, incluso con mayor preferencia al menos 95 % o en particular al menos 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15.
84. Una composición inmunógena, en particular la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 83, que comprende
 - una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, aun con mayor preferencia al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 12, y
 - una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 90 %, aun con mayor preferencia al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia y con la secuencia de SEQ ID NO: 14.
85. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 84, que comprende
 - una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13.
86. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 84 u 85, que

comprende

- una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15.
87. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 86, en donde la composición inmunógena comprende además un portador o excipiente aceptable desde el punto de vista veterinario o farmacéutico.
 88. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 87, en donde la composición inmunógena comprende además un adyuvante.
 89. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 88, que comprende
 - un portador o excipiente aceptable desde el punto de vista veterinario o farmacéutico,
 - y opcionalmente un adyuvante.
 90. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 88 u 89, en donde el adyuvante es un adyuvante emulsionado de aceite en agua.
 91. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 88 u 89, en donde el adyuvante es un carbómero.
 92. El uso de la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91 para la preparación de un medicamento, preferentemente de una vacuna.
 93. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91 para su uso como medicamento.
 94. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91 para su uso como vacuna.
 95. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91 para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el rotavirus en un sujeto.
 96. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91 para su uso en un método para reducir o prevenir uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por rotavirus en un sujeto o para su uso en un método para tratar o prevenir una infección por

rotavirus en un sujeto.

97. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 95 o 96, en donde el sujeto es un mamífero o un ave, y en donde el ave es preferentemente un pollo.
98. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 95 a 97, en donde el sujeto es un mamífero, y en donde el mamífero es preferentemente un cerdo o un bovino.
99. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 95 a 98, en donde el sujeto es un cerdo, y en donde el cerdo es preferentemente un lechón o una cerda.
100. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 95, en donde el sujeto es una cerda preñada.
101. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 96, en donde el sujeto es un lechón.
102. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91 para su uso en un método para reducir o prevenir uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por rotavirus en un lechón, en donde el lechón ha de ser amamantado por una cerda a la que se le administró la composición inmunógena.
103. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 102, en donde dicha cerda a la que se le administró la composición inmunógena es una cerda a la que se le administró la composición inmunógena mientras dicha cerda estaba preñada, en particular de dicho lechón.
104. Un método para el tratamiento o la prevención de una infección por rotavirus, la reducción, la prevención o el tratamiento de uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por rotavirus, o la prevención o el tratamiento de una enfermedad causada por una infección por rotavirus, que comprende administrar la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91 a un sujeto.
105. Un método para inducir la producción de anticuerpos específicos para rotavirus en una cerda, en donde dicho método comprende administrar la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91 a dicha cerda.
106. Un método para reducir o prevenir uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por rotavirus en un lechón, en donde dicho método comprende

- administrar la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91 a una cerda, y
 - permitir que dicho lechón sea amamantado por dicha cerda.
107. El método de acuerdo con la cláusula 106, en donde dicha cerda es una cerda que está preñada, en particular, de dicho lechón.
108. El método de acuerdo con la cláusula 106 o 107, que comprende las etapas de
- administrar la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91 a una cerda que está preñada de dicho lechón,
 - permitir que dicha cerda de a luz a dicho lechón, y
 - permitir que dicho lechón sea amamantado por dicha cerda.
109. Un método para reducir uno o más signos clínicos, mortalidad o excreción fecal causados por una infección por rotavirus en un lechón, en donde el lechón ha de ser amamantado por una cerda a la que se le administró la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91.
110. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 96 a 103 o el método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 104 a 109, en donde dichos uno o más signos clínicos se seleccionan del grupo que consiste en
- diarrea,
 - colonización por rotavirus,
 - lesiones, en particular lesiones macroscópicas,
 - disminución del aumento de peso diario promedio, y
 - gastroenteritis.
111. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 110 o el método de acuerdo con la cláusula 110, en donde dicha colonización por rotavirus es una colonización por rotavirus del intestino y/o en donde dichas lesiones son lesiones entéricas.
112. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 95 a 103, 110 y 111, o el método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 104 a 111, en donde
- dicha infección por rotavirus es una infección con rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7],
 - dicha infección con un rotavirus es una infección con rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7],
 - dicha respuesta inmunitaria contra rotavirus es una respuesta

- inmunitaria contra rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7], o
- dichos anticuerpos específicos para rotavirus son anticuerpos específicos para rotavirus de genotipo P[23] y/o rotavirus de genotipo P[7],
113. La composición inmunógena o el método de acuerdo con la cláusula 112, en donde la composición inmunógena comprende un polipéptido según se especifica en cualquiera de las cláusulas 21 a 26 y 29 a 48, en donde dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus es un fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[7].
114. La composición inmunógena de acuerdo con la cláusula 113, en donde dicho fragmento inmunógeno de una proteína VP8 de rotavirus de genotipo P[7] consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 98 % o incluso con mayor preferencia al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 3.
115. Un método para producir la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91, en donde el método comprende las etapas de:
- (a) permitir la infección de células susceptibles en cultivo con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido según se especifica en cualquiera de las cláusulas 1 a 48, en donde dicho vector expresa dicho polipéptido;
 - (b) a partir de esto, recuperar dicho polipéptido, en particular en el sobrenadante del cultivo celular, en donde, preferentemente, los residuos celulares se separan de dicho polipéptido mediante una etapa de separación, preferentemente, que incluye una microfiltración a través de al menos un filtro, preferentemente, dos filtros, en donde el al menos un filtro, preferentemente, tiene un tamaño de poro de alrededor de 1 a alrededor de 20 μm y/o de alrededor de 0,1 μm a alrededor de 4 μm ;
 - (c) inactivar el vector mediante la adición de etilenimina binaria (BEI) a la mezcla de la etapa (b);
 - (d) neutralizar el BEI mediante la adición de tiosulfato de sodio a la mezcla resultante de la etapa (c); y
 - (e) concentrar el polipéptido en la mezcla resultante de la etapa (d)

mediante la eliminación de una porción del líquido de la mezcla mediante una etapa de filtración mediante el uso de un filtro con una membrana de filtro que tiene un recorte de peso molecular de entre alrededor de 5 kDa y alrededor de 100 kDa, preferentemente, entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 50 kDa; y en donde dicho método comprende las etapas de

(f) mezclar la mezcla restante después de la etapa (e) con al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido;

(g) y, opcionalmente, mezclar la mezcla restante después de la etapa (f) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en portadores, adyuvantes, diluyentes y excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico, y combinaciones de estos,

o en donde dicho método comprende las etapas de

(f) mezclar la mezcla restante después de la etapa (e) con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en portadores, adyuvantes, diluyentes y excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico, y combinaciones de estos, y

(g) mezclar la mezcla restante después de la etapa (f) con al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido.

116. El método de acuerdo con la cláusula 115, en donde dicha al menos una sustancia inmunógena es la al menos una sustancia inmunógena según se especifica en cualquiera de las cláusulas 50 a 76.
117. El método de acuerdo con la cláusula 115 o 116, en donde, en la etapa (a), el polipéptido según se especifica en cualquiera de las cláusulas 1 a 48 es una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12.
118. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 115 a 117, en donde dicha al menos una sustancia inmunógena, diferente de dicho polipéptido, es al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo

que consiste en SEQ ID NO: 14,

una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, y

una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, incluso con mayor preferencia, al menos 95 % o en particular 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15.

119. La composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 a 91, 93 a 103 y 110 a 114, el uso de acuerdo con la cláusula 92 o el método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 104 a 112, 113 y 114, en donde la composición inmunógena se puede obtener mediante el método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 115 a 118.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH
 <120> COMPOSICIÓN INMUNÓGENA ÚTIL PARA LA VACUNACIÓN CONTRA EL ROTAVIRUS
 <130> 23-0015
 <160> 25
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Rotavirus
 <400> 1

Met Ala Ser Leu Ile Tyr Arg Gln Leu Leu Thr Asn Ser Tyr Thr Val
 1 5 10 15

Asn Leu Ser Asp Glu Ile Gln Glu Ile Gly Ser Ala Lys Ser Gln Asp
 20 25 30

Val Thr Ile Asn Pro Gly Pro Phe Ala Gln Thr Gly Tyr Ala Pro Val
 35 40 45

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

Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Thr Phe Asn Pro Pro Thr Ser Tyr
 65 70 75 80

Trp Val Leu Leu Ala Pro Thr Val Glu Gly Val Ile Ile Gln Gly Thr
 85 90 95

Asn Asn Thr Asp Arg Trp Leu Ala Thr Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val
 100 105 110

Gln Thr Thr Asn Arg Ile Tyr Asn Leu Phe Gly Gln Gln Val Thr Leu
 115 120 125

Ser Val Glu Asn Thr Ser Gln Thr Gln Trp Lys Phe Ile Asp Val Ser
 130 135 140

Thr Thr Thr Pro Thr Gly Ser Tyr Thr Gln His Gly Pro Leu Phe Ser
145 150 155 160

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

Tyr Ser Gly Thr Thr Pro Asn Ala Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr
180 185 190

Asn Tyr Asp Thr Val Asn Met Thr Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile
195 200 205

Pro Arg Asn Gln Glu Glu Lys Cys Thr Glu Tyr Ile Asn His Gly Leu
210 215 220

Pro Pro Ile Gln Asn Thr Arg Asn Val Val Pro Val Ser Leu Ser Ala
225 230 235 240

Arg Glu Ile Val His Thr Arg
245

<210> 2
<211> 160
<212> PRT
<213> Rotavirus

<400> 2

Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Thr Phe Asn Pro Pro Thr Ser Tyr
1 5 10 15

Trp Val Leu Leu Ala Pro Thr Val Glu Gly Val Ile Ile Gln Gly Thr
20 25 30

Asn Asn Thr Asp Arg Trp Leu Ala Thr Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val
35 40 45

Gln Thr Thr Asn Arg Ile Tyr Asn Leu Phe Gly Gln Gln Val Thr Leu
50 55 60

Ser Val Glu Asn Thr Ser Gln Thr Gln Trp Lys Phe Ile Asp Val Ser
65 70 75 80

Thr Thr Thr Pro Thr Gly Ser Tyr Thr Gln His Gly Pro Leu Phe Ser
85 90 95

Thr Pro Lys Leu Tyr Ala Val Met Lys Phe Ser Gly Arg Ile Tyr Thr
100 105 110

Tyr Ser Gly Thr Thr Pro Asn Ala Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr
115 120 125

Asn Tyr Asp Thr Val Asn Met Thr Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile
130 135 140

Pro Arg Asn Gln Glu Glu Lys Cys Thr Glu Tyr Ile Asn His Gly Leu
145 150 155 160

<210> 3
<211> 168
<212> PRT
<213> Rotavirus

<400> 3

Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Leu Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr
1 5 10 15

Thr Phe Asn Pro Pro Thr Ser Tyr Trp Val Leu Leu Ala Pro Thr Val
20 25 30

Glu Gly Val Ile Ile Gln Gly Thr Asn Asn Thr Asp Arg Trp Leu Ala
35 40 45

Thr Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val Gln Thr Thr Asn Arg Ile Tyr Asn
50 55 60

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

Gln Trp Lys Phe Ile Asp Val Ser Thr Thr Thr Pro Thr Gly Ser Tyr
85 90 95

Thr Gln His Gly Pro Leu Phe Ser Thr Pro Lys Leu Tyr Ala Val Met

100

105

110

Lys Phe Ser Gly Arg Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Pro Asn Ala
 115 120 125

Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Asn Tyr Asp Thr Val Asn Met Thr
 130 135 140

Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Asn Gln Glu Glu Lys Cys
 145 150 155 160

Thr Glu Tyr Ile Asn His Gly Leu
 165

<210> 4

<211> 167

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de rotavirus

<400> 4

Asp Ser Thr Thr Ile Glu Pro Val Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr
 1 5 10 15

Ser Phe Lys Pro Pro Asn Asp Tyr Trp Ile Leu Leu Asn Pro Thr Asn
 20 25 30

Gln Gln Ile Val Leu Glu Gly Thr Asn Arg Thr Asp Val Trp Val Ala
 35 40 45

Leu Leu Leu Ile Glu Pro Asn Val Thr Asn Gln Ser Arg Gln Tyr Thr
 50 55 60

Leu Phe Gly Glu Thr Lys Gln Ile Thr Val Glu Asn Asn Thr Asn Lys
 65 70 75 80

Trp Lys Phe Phe Glu Met Phe Arg Asn Ser Ala Asn Ala Glu Phe Gln
 85 90 95

His Lys Arg Thr Leu Thr Ser Asp Thr Lys Leu Ala Gly Phe Leu Lys

100

105

110

His Gly Gly Arg Val Trp Thr Phe His Gly Glu Thr Pro Asn Ala Thr
 115 120 125

Thr Asp Tyr Ser Ser Thr Ser Asn Leu Ser Glu Ile Glu Thr Val Ile
 130 135 140

His Thr Glu Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Ser Gln Glu Ser Lys Cys Asn
 145 150 155 160

Glu Tyr Ile Asn Thr Gly Leu
 165

<210> 5

<211> 170

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de rotavirus

<400> 5

Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Val Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr
 1 5 10 15

Thr Phe Asn Pro Pro Ile Glu Tyr Trp Thr Leu Phe Ala Pro Asn Asp
 20 25 30

Lys Gly Val Val Ala Glu Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Trp Leu Ala
 35 40 45

Ile Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val Pro Gln Glu Leu Arg Thr Tyr Thr
 50 55 60

Ile Phe Gly Gln Gln Val Asn Leu Val Ile Glu Asn Thr Ser Gln Thr
 65 70 75 80

Lys Trp Lys Phe Ala Asp Phe Arg Arg Arg Ser Gln Asn Asp Thr Tyr
 85 90 95

Val Leu Asn Asp Thr Leu Leu Ser Asp Thr Lys Leu Gln Ala Ala Met

100

105

110

Lys Tyr Gly Ala Arg Leu Phe Thr Phe Thr Gly Asp Thr Pro Asn Ala
 115 120 125

Ala Pro Gln Glu Tyr Gly Tyr Glu Thr Asn Asn Tyr Ser Ala Ile Glu
 130 135 140

Ile Arg Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Met Pro Arg Glu
 145 150 155 160

Val Cys Arg Asn Tyr Ile Asn His Gly Leu
 165 170

<210> 6
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Rotavirus

<400> 6

Glu Ser Thr Phe Lys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Pro His Asn Asn Thr
 1 5 10 15

Val Ile Glu Trp Ser Asn Leu Met Asn Ser Asp Ile Trp Leu Leu Tyr
 20 25 30

Gln Lys Pro Leu Asp Ile Thr Ala Pro Ile Arg Leu Leu Lys His Gly
 35 40 45

Pro Glu Asn His Ala Asp Val Ala Ala Phe Glu Leu Trp Tyr Gly Lys
 50 55 60

Ala Gly His Thr Val Thr Ser Ile Tyr Tyr Ser Ala Ile Ser Asn Pro
 65 70 75 80

Asn Asn Thr Val Thr Leu Thr Ser Asp Ser Leu Val Leu Phe Trp Asn
 85 90 95

Glu Gly Gln Thr Ile Leu Asp Thr Lys Thr Val Asn Phe Asn Trp Asn
 100 105 110

Met Gly Gly Ile Leu Val Arg Pro Ser Arg Gly Thr Arg Val Asp Ile
115 120 125

Cys Met Ser Asp Met Asp Asn Thr Asp Gly Thr Asn Phe Asn Trp Ile
130 135 140

Gln Trp Lys His Glu Phe Pro Arg Ser Ser Ser Asn Ala Asn Val Ser
145 150 155 160

Met Tyr Val Glu Tyr Tyr Leu Ala Ser Ser Asp Pro Tyr His Glu Leu
165 170 175

Lys Glu Leu Gln Arg
180

<210> 7
<211> 229
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 7

Thr Lys Thr Lys Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
35 40 45

Glu Asn Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Thr Arg Ile Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser
130 135 140

Ile Thr Cys Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu
145 150 155 160

Trp Gln Arg Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Phe
180 185 190

Ser Val Asp Lys Ala Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys Ala
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser
210 215 220

Lys Thr Pro Gly Lys
225

<210> 8
<211> 233
<212> PRT
<213> *Cavia porcellus*

<400> 8

Arg Thr Pro Gln Pro Asn Pro Cys Thr Cys Pro Lys Cys Pro Pro Pro
1 5 10 15

Glu Asn Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Arg Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser Gln Asp Glu Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Phe Val Asp
50 55 60

Asn Lys Pro Val Gly Asn Ala Glu Thr Lys Pro Arg Val Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Thr Thr Phe Arg Val Glu Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Tyr Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Ala Pro Arg
115 120 125

Met Pro Asp Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Ser Lys
130 135 140

Ser Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Ile Ile Asn Phe Phe Pro Ala Asp
145 150 155 160

Ile His Val Glu Trp Ala Ser Asn Arg Val Pro Val Ser Glu Lys Glu
165 170 175

Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Glu Asp Ala Asp Gly Ser Tyr Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Trp Asp Gln Gly Thr Val
195 200 205

Tyr Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Val Thr Gln
210 215 220

Lys Ala Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 9
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligador

<400> 9

Gly Gly Ser
1

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ligador

<400> 10

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ligador

<400> 11

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 12

<211> 401

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína de fusión

<400> 12

Met Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Leu Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro
1 5 10 15

Thr Thr Phe Asn Pro Pro Thr Ser Tyr Trp Val Leu Leu Ala Pro Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Ile Ile Gln Gly Thr Asn Asn Thr Asp Arg Trp Leu
35 40 45

Ala Thr Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val Gln Thr Thr Asn Arg Ile Tyr
50 55 60

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

Thr Gln Trp Lys Phe Ile Asp Val Ser Thr Thr Thr Pro Thr Gly Ser
85 90 95

Tyr Thr Gln His Gly Pro Leu Phe Ser Thr Pro Lys Leu Tyr Ala Val
100 105 110

Met Lys Phe Ser Gly Arg Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Pro Asn
115 120 125

Ala Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Asn Tyr Asp Thr Val Asn Met
130 135 140

Thr Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Asn Gln Glu Glu Lys
145 150 155 160

Cys Thr Glu Tyr Ile Asn His Gly Leu Gly Gly Ser Thr Lys Thr Lys
165 170 175

Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro Ser Val
180 185 190

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
195 200 205

Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu
210 215 220

Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala Gln
225 230 235 240

Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
245 250 255

Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys
260 265 270

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile
275 280 285

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
290 295 300

Pro His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu
305 310 315 320

Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Arg Asn
325 330 335

Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln
340 345 350

Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Phe Ser Val Asp Lys
355 360 365

Ala Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu
370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Pro Gly
385 390 395 400

Lys

<210> 13
<211> 400
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína de fusión

<400> 13

Met Asp Ser Thr Thr Ile Glu Pro Val Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro
1 5 10 15

Thr Ser Phe Lys Pro Pro Asn Asp Tyr Trp Ile Leu Leu Asn Pro Thr
20 25 30

Asn Gln Gln Ile Val Leu Glu Gly Thr Asn Arg Thr Asp Val Trp Val
35 40 45

Ala Leu Leu Leu Ile Glu Pro Asn Val Thr Asn Gln Ser Arg Gln Tyr
50 55 60

Thr Leu Phe Gly Glu Thr Lys Gln Ile Thr Val Glu Asn Asn Thr Asn
65 70 75 80

Lys Trp Lys Phe Phe Glu Met Phe Arg Asn Ser Ala Asn Ala Glu Phe
85 90 95

Gln His Lys Arg Thr Leu Thr Ser Asp Thr Lys Leu Ala Gly Phe Leu
100 105 110

Lys His Gly Gly Arg Val Trp Thr Phe His Gly Glu Thr Pro Asn Ala
115 120 125

Thr Thr Asp Tyr Ser Ser Thr Ser Asn Leu Ser Glu Ile Glu Thr Val
130 135 140

Ile His Thr Glu Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Ser Gln Glu Ser Lys Cys
145 150 155 160

Asn Glu Tyr Ile Asn Thr Gly Leu Gly Gly Ser Thr Lys Thr Lys Pro
165 170 175

Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro Ser Val Phe
180 185 190

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
195 200 205

Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Val
210 215 220

Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
225 230 235 240

Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
245 250 255

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
260 265 270

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile Ser
275 280 285

Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
290 295 300

His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu Val
305 310 315 320

Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Arg Asn Gly
325 330 335

Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp
340 345 350

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

Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu Ala
370 375 380

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Pro Gly Lys
385 390 395 400

<210> 14
<211> 403
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína de fusión

<400> 14

Met Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Val Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro
1 5 10 15

Thr Thr Phe Asn Pro Pro Ile Glu Tyr Trp Thr Leu Phe Ala Pro Asn
20 25 30

Asp Lys Gly Val Val Ala Glu Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Trp Leu
35 40 45

Ala Ile Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val Pro Gln Glu Leu Arg Thr Tyr
50 55 60

Thr Ile Phe Gly Gln Gln Val Asn Leu Val Ile Glu Asn Thr Ser Gln
65 70 75 80

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

Tyr Val Leu Asn Asp Thr Leu Leu Ser Asp Thr Lys Leu Gln Ala Ala
100 105 110

Met Lys Tyr Gly Ala Arg Leu Phe Thr Phe Thr Gly Asp Thr Pro Asn
115 120 125

Ala Ala Pro Gln Glu Tyr Gly Tyr Glu Thr Asn Asn Tyr Ser Ala Ile
130 135 140

Glu Ile Arg Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Met Pro Arg
145 150 155 160

Glu Val Cys Arg Asn Tyr Ile Asn His Gly Leu Gly Gly Ser Thr Lys
165 170 175

Thr Lys Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro
180 185 190

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
195 200 205

Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn
210 215 220

Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr
225 230 235 240

Ala Gln Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
245 250 255

Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
260 265 270

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg
275 280 285

Ile Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
290 295 300

Leu Pro Pro His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr
305 310 315 320

Cys Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln
325 330 335

Arg Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro
340 345 350

Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Phe Ser Val
355 360 365

Asp Lys Ala Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys Ala Val Met
370 375 380

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr
385 390 395 400

Pro Gly Lys

<210> 15

<211> 414

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína de fusión

<400> 15

Met Glu Ser Thr Phe Lys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Pro His Asn Asn
1 5 10 15

Thr Val Ile Glu Trp Ser Asn Leu Met Asn Ser Asp Ile Trp Leu Leu
20 25 30

Tyr Gln Lys Pro Leu Asp Ile Thr Ala Pro Ile Arg Leu Leu Lys His
35 40 45

Gly Pro Glu Asn His Ala Asp Val Ala Ala Phe Glu Leu Trp Tyr Gly
50 55 60

Lys Ala Gly His Thr Val Thr Ser Ile Tyr Tyr Ser Ala Ile Ser Asn
65 70 75 80

Pro Asn Asn Thr Val Thr Leu Thr Ser Asp Ser Leu Val Leu Phe Trp
85 90 95

Asn Glu Gly Gln Thr Ile Leu Asp Thr Lys Thr Val Asn Phe Asn Trp
100 105 110

Asn Met Gly Gly Ile Leu Val Arg Pro Ser Arg Gly Thr Arg Val Asp
115 120 125

Ile Cys Met Ser Asp Met Asp Asn Thr Asp Gly Thr Asn Phe Asn Trp
130 135 140

Ile Gln Trp Lys His Glu Phe Pro Arg Ser Ser Ser Asn Ala Asn Val
145 150 155 160

Ser Met Tyr Val Glu Tyr Tyr Leu Ala Ser Ser Asp Pro Tyr His Glu
165 170 175

Leu Lys Glu Leu Gln Arg Gly Gly Ser Thr Lys Thr Lys Pro Pro Cys
180 185 190

Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe
195 200 205

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

<210> 16
<211> 579
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína de fusión

<400> 16

Met Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro Leu Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro
1 5 10 15

Thr Thr Phe Asn Pro Pro Thr Ser Tyr Trp Val Leu Leu Ala Pro Thr
20 25 30

Val Glu Gly Val Ile Ile Gln Gly Thr Asn Asn Thr Asp Arg Trp Leu
35 40 45

Ala Thr Ile Leu Ile Glu Pro Asn Val Gln Thr Thr Asn Arg Ile Tyr
50 55 60

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

Thr Gln Trp Lys Phe Ile Asp Val Ser Thr Thr Thr Pro Thr Gly Ser
85 90 95

Tyr Thr Gln His Gly Pro Leu Phe Ser Thr Pro Lys Leu Tyr Ala Val
100 105 110

Met Lys Phe Ser Gly Arg Ile Tyr Thr Tyr Ser Gly Thr Thr Pro Asn
115 120 125

Ala Thr Thr Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Asn Tyr Asp Thr Val Asn Met
130 135 140

Thr Ser Phe Cys Asp Phe Tyr Ile Ile Pro Arg Asn Gln Glu Glu Lys
145 150 155 160

Cys Thr Glu Tyr Ile Asn His Gly Leu Gly Gly Ser Thr Lys Thr Lys
165 170 175

Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro Ser Val
180 185 190

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
195 200 205

Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu
210 215 220

Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala Gln
225 230 235 240

Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
245 250 255

Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys
260 265 270

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile
275 280 285

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
290 295 300

Pro His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu
305 310 315 320

Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Arg Asn
325 330 335

Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln
340 345 350

Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Phe Ser Val Asp Lys
355 360 365

Ala Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu
370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Pro Gly
385 390 395 400

Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Asp Ser Thr Thr Val Glu Pro
405 410 415

Val Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Thr Phe Asn Pro Pro Ile Glu
420 425 430

Tyr Trp Thr Leu Phe Ala Pro Asn Asp Lys Gly Val Val Ala Glu Leu
435 440 445

Thr Asn Asn Thr Asp Ile Trp Leu Ala Ile Ile Leu Ile Glu Pro Asn
450 455 460

Val Pro Gln Glu Leu Arg Thr Tyr Thr Ile Phe Gly Gln Gln Val Asn
465 470 475 480

Leu Val Ile Glu Asn Thr Ser Gln Thr Lys Trp Lys Phe Ala Asp Phe
485 490 495

Arg Arg Arg Ser Gln Asn Asp Thr Tyr Val Leu Asn Asp Thr Leu Leu
500 505 510

Ser Asp Thr Lys Leu Gln Ala Ala Met Lys Tyr Gly Ala Arg Leu Phe
515 520 525

Thr Phe Thr Gly Asp Thr Pro Asn Ala Ala Pro Gln Glu Tyr Gly Tyr
530 535 540

Glu Thr Asn Asn Tyr Ser Ala Ile Glu Ile Arg Ser Phe Cys Asp Phe
545 550 555 560

Tyr Ile Ile Pro Arg Met Pro Arg Glu Val Cys Arg Asn Tyr Ile Asn
565 570 575

His Gly Leu

<210> 17
<211> 1206
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> codifica una proteína de fusión

<400> 17

atggatagta ccacagtaga accactgttg gacggcccct accaacctac tacgtttaac
60

cccccaacct catactgggt gttgctcgcg cctacagtcg aggggtgtcat aatccaaggt
120

acgaataaca ccgatcgctg gttggctact atccttattg aaccgaatgt tcagaccaca
180

aatcgcattht acaacttggt cggacagcag gtgacccttt cagttgagaa cacgagtcaa
240

acccaatgga aatttatcga cgtttctacc acaacaccta ccggcagcta tacgcaacac
300

ggcccactct ttagcacccc taagctgtat gcagtaatga agtttagcgg acgcatttac
360

acatactcag gtacaactcc taatgctact acgggctact atagcactac taattatgat
420

acggtgaata tgacaagtht ctgtgatttc tacatcatcc ccagaaacca ggaggagaaa
480

tgtactgaat atataaatca tggactgggc ggctcgacca agaccaagcc cccctgtcct
540

atttgcccgg catgcgagag tccgggtccg tccgtcttta ttttcccccc aaagccaaaa
600

gatacgtgta tgatcagccg cccccccag gtcacatgcg tggttgtaga tgtaagccaa
660

gaaaatcccg aagtgcagtt ttcttggtat gtcgatggcg tggaggttca cacagcacag
720

acgcggccga aggaagagca gtttaattcc acgtaccgag tggtgagtgt gctgcctatt
780

cagcatcagg attggttgaa cggaaaggag ttcaagtgcg aggtgaacaa caaagacctg
840

cccgaccaa tctctcgcat aatcagcaag gctaaggagc agacacgcga gccacagggtg
900

tacaccctgc caccgcatgc agaagagctg agccgatcca aggtatccat aacctgcctg
960

gtgatcggat tctaccccc cgatatcgac gtcgagtggc agaggaatgg ccagccggag
1020

ccagagggca actaccggac cagcctccg cagcaggatg tcgatggtac atattttctg
1080

tacagcaaat ttagcgtgga caaggccagt tggcagggcg gcggtatctt ccagtgtgct
1140

gtcatgcacg aggcactcca caatcattac acccagaaat ccatttcgaa gacgccgggc
1200

aagtag
1206

<210> 18
<211> 1203
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> codifica una proteína de fusión

<400> 18
atggatagta ctactatcga accagttttg gatgggccat accagccaac atcgtttaaa
60

ccaccaaatg actattggat tttattgaac cctactaatc aacagattgt gctggaaggc
120

acaaacagaa cagatgtttg ggtcgcgctc ctgctaatag agccgaacgt aaccaaccag
180

tcccgccaat acaccctatt cggtgaaaca aagcaaataa ctgttgaaaa taacacgaat
240

aagtggaagt tttttgaaat gtttagaaac tcagcaaata ccgagtttca gcataaacgg
300

acgttgactt ctgacaccaa gctagcgggt ttccttaaac atggcggccg cgtctggacg
360

ttccacggag agacccccaa tgccaccacc gactactcta gcacaagcaa tctctcagag
420

atagaaaccg taatacatat tgagttctat atcatacccc gaagtcaaga gtccaagtgc
480

aacgagtata tcaatacggg gttgggtgga tctacaaaa ccaagcccc ctgccctatt
540

tgtccagcgt gcgagtcgcc ggggtcccagt gtatttattt ttccaccgaa gcctaaagac
600

acacttatga tcagccgcac tccccaagtc acttgtgtgg tagttgacgt gagccaagaa
660

aatccggaag tccagttttc atggtatgtc gatggggtag aggtgcacac ggctcaaacg
720

aggcctaaag aagagcaatt caattcaaca tatcgtgtgg tctccgtcct tcctatacag
780

caccaagatt ggttaaacgg aaaagaattt aaatgtaaag tgaataacaa ggatctgccg
840

gctccatta cgcggatcat tagcaaagca aaggacaga cgcgtgagcc tcaggtttac
900

actctaccgc cacatgcaga ggaactctcg cgaagtaagg tgtctataac gtgtctggta
960

attgggttct acccgctga catcgacgtt gagtggcaga gaaacggta gccggaaccg
1020

gagggcaact acaggacaac cccccctcag caagatgtag atggcacgta cttcctctat
1080

tctaagttct cggttgacaa ggcctcatgg cagggcggag ggatcttcca atgcgctgtg
1140

atgcatgaag cgttacacaa tcactataca caaaagtcca tatccaaaac tccaggaaaa
1200

tga
1203

<210> 19
<211> 1221
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> codifica una proteína de fusión

<400> 19
atgacttata cgcgccgacg atatcgccga agaaggcata gaccgcggtc tcatctagga
60

caaatattgc ggcgccgcc atggttggtg catcctcgtc atcgataccg ctggcggagg
120

aagaacggca tctttaatac taggctctcc cgaacgttcg ggtatacagt caaggctact
180

acagtcacca caccgagttg ggcagtggac atgatgcgtt ttaatatcga cgatttcgta
240

cctcccgggtg ggggtactaa taaaatatcc attcccttcg agtactacag gatacgcaaa
300

gttaaggtgg aattttggcc ttgttcgcca attacgcaag gcgatagagg ggtcggctcg
360

accgccgtga ttctcgacga caacttcgtt acaaaagcta ctgcgttaac atatgatcca
420

tacgtcaact actcttcaag acacacgata cctcaacat tttcctacca cagccgttat
480

ttcactccta agcccgtact agactccaca atagactact tccagcctaa taataagaga
540

aaccagttat ggcttagact tcaaacctca cggaacgttg accacgttgg cctaggcacg
600

gcctttgaga atagtaaata tgatcaggac tataacatcc gtgtaacgat gtacgtacag
660

tttcgcgagt ttaaccttaa agaccccccc ctcgagcccg gaggatcaga tagcacgaca
720

gttgaaccgg tgctggatgg gccatatcag cctaccacgt tcaatccacc aattgaatac
780

tggaccctct tcgcgccgaa cgacaaaggt gtggtagctg agttaactaa taatactgac
840

atctggttgg ctatcatcct gattgaacca aatgttccgc aggaattgcg tacctatact
900

attttcgggc agcaagtaaa cttgtgcata gagaatacaa gtcaaacc aa atggaagttt
960

gccgatttta gacgtcggtc tcagaatgat acgtatgtcc tgaatgatac gttactatct
1020

gatacaaaac tgcaagccgc aatgaagtat ggagcaaggc tatttacttt tactggagat
1080

accccgaaatg cggcgccgca agaatatggt tacgaaacga ataactatag cgcaatagag
1140

attaggtcgt tttgtgactt ctacatcatt cccaggatgc ctcgggaagt gtgccgaaac
1200

tacataaacc acggtctttg a
1221

<210> 20
<211> 1245
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> codifica una proteína de fusión

<400> 20
atggaatcta cattcaaattc atcaaatata actgggtccac acaataaacac agtcattgaa
60

tggagtaatt taatgaattc tgatatttgg ttattgtatc aaaaaccatt ggatataact
120

gcaccaatca gattattaaa acatggaccg gaaaatcatg ctgatgtagc agcttttgaa
180

ttatgggatg gtaaagctgg tcataccgtg acatcaatat attattcagc aatatctaatt
240

cctaataata ctgttacggt aacgtcggat tcattagttc tatttttgaa cgaagggtcaa
300

acgatactgg atacaaagac agtcaatttt aattggaata tgggtggtat attagttaga
360

ccgtcaagag gtacacgtgt ggacatttgt atgtctgata tggacaatac agatgggtact
420

aattttaatt ggattcaatg gaagcatgag ttcccccgta gtagtagtaa tgctaattgtt
480

agtatgtatg ttgaatatta tctagcaagt agtgatccat accatgaact caaagagttg
540

caaagaggcg gctcgaccaa gaccaagccc cctgtccta tttgcccggc atgcgagagt
600

ccgggtccgt ccgtctttat tttcccccca aagccaaaag atacgtgat gatcagccgc
660

acccccagg tcacatgcgt ggttgtagat gtaagccaag aaaatcccga agtgcagttt
720

tcctgggatg tcgatggcgt ggaggttcac acagcacaga cgcgggccgaa ggaagagcag
780

tttaattcca cgtaccgagt ggtgagtgtg ctgcctattc agcatcagga ttggttgaac
840

ggaaaggagt tcaagtgcaa ggtgaacaac aaagacctgc ccgcaccaat cactcgcata
900

atcagcaagg ctaagggaca gacacgcgag ccacaggtgt acaccctgcc accgcatgca
960

gaagagctga gccgatccaa ggtatccata acctgcctgg tgatcggatt ctaccccccc
1020

gatatcgacg tcgagtggca gaggaatggc cagccggagc cagagggcaa ctaccggacc
1080

acgcctccgc agcaggatgt cgatggtaca tattttctgt acagcaaatt tagcgtggac
1140

aaggccagtt ggcagggcgg cggatatctc cagtgtgctg tcatgcacga ggcactccac
1200

aatcattaca cccagaaatc catttcgaag acgccgggca agtag
1245

<210> 21

<211> 1740

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> codifica una proteína de fusión

<400> 21

atggacagca cgacggttga accgctactg gacggaccat accaacctac tacatttaat
60

cctccaacaa gttattgggt tctgcttget cctacagtcg agggagtgat aatacagggg
120

acaaataata cggaccggtg gttagctaca attttgatcg aaccgaatgt gcaaacgact
180

aatcgcatat acaatttatt cggccaacag gtaaccttaa gtgtggagaa cacctcgcaa
240

actcaatgga aatttattga tgtctccaca acaacccccca ctggatcgta cactcaacac
300

gggccgctct tctctacccc taaactatac gcggttatga aatttagtgg gagaatctac
360

acttattctg gtactacacc caatgcgacc actgggttact attcaaccac aaactacgac
420

actgtcaata tgacgtcctt ttgtgatttt tatataatcc ctaggaatca agaggagaag
480

tgtacggaat acattaacca tggctctgggg ggcagcacga aaacaaaacc gccatgcccc
540

atctgccctg cctgcgaaag tcccggccct tccgttttca tttttccccc aaagcccaag
600

gacacgctaa tgatttccag gacaccacag gtcacgtgtg tggttgtgga tgtagccag
660

gagaatccgg aagttcagtt ttcgtggtat gtagatgggg tagaagtgca tacagcccag
720

acgcgaccaa aagaagagca gttcaacagc acctatcgtg ttgtaagtgt attaccgata
780

caacaccaag actggcttaa tggtaaagag ttcaaagca aggtaaacaa taaggatcta
840

ccggcgccta taacgagaat catttcaaag gctaaggac aaacaaggga gccgcaagtg
900

tacaccttgc cccccacgc cgaggaattg agtaggtcaa aagtctcgat aacttgtttg
960

gttatagggg tctatcctcc agacatcgat gtggaatggc aacggaacgg gcaacccgaa
1020

cctgaaggca actatcgac taccacaccg caacaggatg tcgacggtag ttattttttg
1080

tactccaagt tttctgtaga caaggcatca tggcagggcg gaggtatttt tcaatgtgct
1140

gtcatgcatg aagcactcca caaccattac acccagaaat ctatttcaaa gacacccgga
1200

aaaggcggat cagggggatc aggaggcgat agcactacgg tcgagccggg tctggacgga
1260

ccttatcagc ctaccacttt taatcccccg atagaatatt ggaccctctt tgcaccaaac
1320

gacaagggcg tcgtagcaga gctaacgaac aacaccgata tctgggttagc aattatcctc
1380

atcgagccga acgtaccaca ggaattacgg acgtacacca tcttcgggca gcaagtcaac
1440

ctcgtgattg aaaacacgtc ccagacgaag tggaaattcg cggacttccg tagacgttcg
1500

caaaacgata cgtatgtgct gaatgatact cttctatcgg acactaagct tcaggccgct
1560

atgaaatagc ggcggcgact cttcacattc actggtgata caccacaacgc cgcgccacag
1620

gagtatgggtt acgagaccaa taactatagc gcaatcgaga ttcgctcttt ttgtgatttc
1680

tatataatac cacgaatgcc ccgtgaggta tgccgaaatt atatcaatca tggctctttga
1740

<210> 22
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de cebador

<400> 22
gctagggaya aaattgttga aggta
25

<210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de cebador

<400> 23
attggcaaatt ttctattcc tcc
23

<210> 24
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de sonda

<400> 24
atgaatggaa atgaytttca aac
23

<210> 25
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de sonda

<400> 25

atgaatggaa ataattttca aac

23