



УДК 547.963.320.57 : 577.214.622

© 1991 г.

*В. Г. Горобко, Е. Ф. Болдырева, О. В. Некрасова,  
А. Микульские, С. А. Филиппов, В. Н. Добрынин*

## СИНТЕЗ, КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ИСКУССТВЕННЫХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ АНТИГЕННЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУСА ЯЩУРА ПОДТИПА A<sub>22</sub>

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

Осуществлен химико-ферментативный синтез и клонирование в *Escherichia coli* двухцепочечных ДНК, кодирующих простые или составные антигенные детерминанты вируса ящура подтипа A<sub>22</sub>. Простые антигенные детерминанты представляют собой аминокислотные последовательности 131—152 или 131—160 капсидного белка VP<sub>1</sub> вируса; составные антигенные детерминанты дополнительно на N-конце содержат присоединенную через спейсер Pro-Pro-Ser-Pro аминокислотную последовательность 200—213 белка VP<sub>1</sub>. Сконструированы рекомбинантные ДНК, содержащие гены гибридов фактора некроза опухолей человека (TNF) и простых или составных антигенных детерминант вируса ящура подтипа A<sub>22</sub>. Изучена экспрессия гибридных генов в *E. coli* и свойства кодируемых ими белков. Показано, что все рекомбинантные белки специфически взаимодействуют с поликлональными антителами к TNF и вирусу ящура подтипа A<sub>22</sub>. Продуцируемые клетками бактерий гибридные белки перспективны для изучения в качестве вакцины против вируса ящура.

Вирус ящура вызывает высококонтагиозное заболевание парнокопытных сельскохозяйственных животных, наносящее значительный ущерб странам с высокоразвитым животноводством. Эпидемии этого заболевания, которое широко распространено на всех континентах, за исключением Северной Америки и Австралии, могут быть приостановлены только забоем заболевших животных или иммунизацией. В настоящее время в качестве вакцины против вируса ящура используют инактивированный вирус. Эта технология требует небезопасного крупномасштабного культивирования вируса. Несмотря на то что убитая вирусная вакцина достаточно эффективна, главным недостатком ее применения являются вспышки заболевания, вызванные недостаточно инактивированным вирусом [1]. Поэтому представляется актуальным и важным развитие альтернативных методов получения вакцины против вируса ящура.

Вирус ящура — это нуклеопротеид, состоящий из одной молекулы одноцепочечной значащей РНК и 60 копий каждого из капсидных белков VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> и VP<sub>4</sub>. Установлено [2], что поверхностный белок VP<sub>1</sub> является главным антигеном и способен инициировать при вакцинации образование вируснейтрализующих антител. Однако полученный в чистом виде из вирусной частицы или технологий рекомбинантных ДНК белок VP<sub>1</sub> [3] вызывает слабый иммунный ответ и поэтому не может использоваться в качестве субъединичной вакцины. Такая низкая иммуногенность отражает, по-видимому, различающиеся конформационные состояния этого белка в составе вирусной частицы и в свободном, изолированном виде.

Альтернативный подход к созданию субъединичных вакцин против вируса ящура вытекает из наблюдения, что синтетические пептиды, включающие аминокислотные последовательности 141—160 и 200—213 белка VP<sub>1</sub>, вызывают образование значительного уровня вируснейтрализующих

В работе использовали только олигодезоксирибонуклеотиды, поэтому префикс «d» в формулах олигонуклеотидов для краткости опущен.

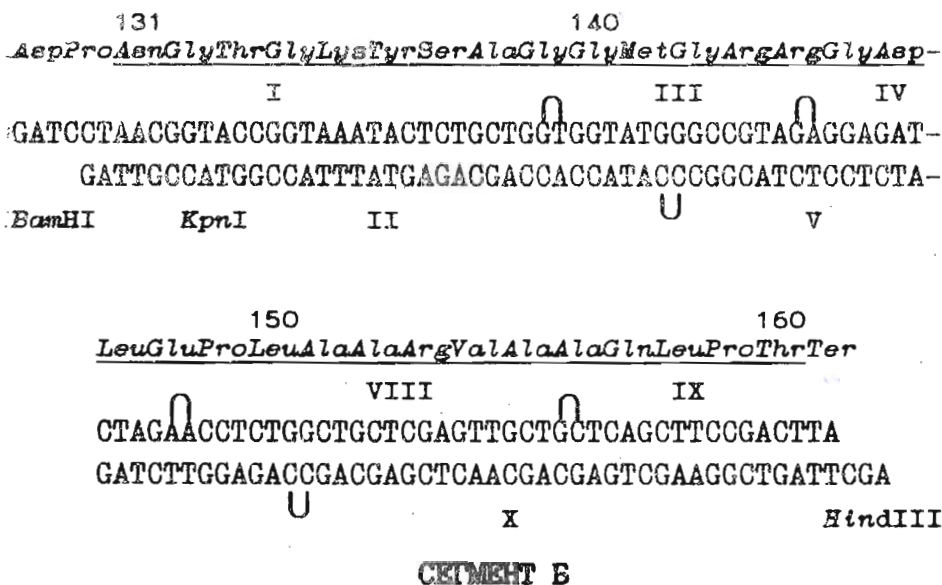
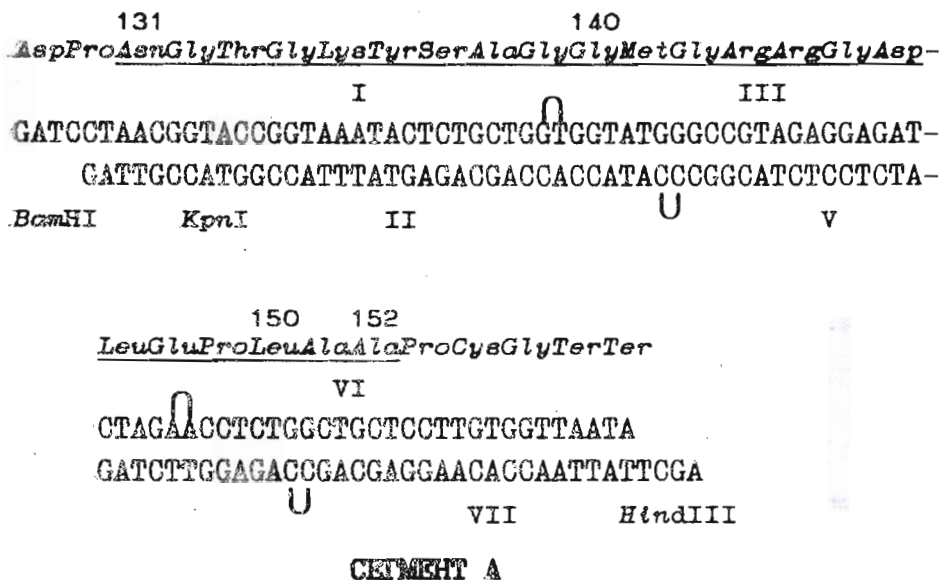


Рис. 1. Нуклеотидные последовательности синтетических двухцепочечных ДНК (сегменты А—В) и кодируемые ими аминокислотные последовательности антигенных детерминант. Указаны сайты эндонуклеаз рестрикции. Подчеркнута аминокислотная последовательность белка VP<sub>1</sub> вируса ящура штамма А<sub>22</sub>. Нумерация аминокислот соответствует таковой белка VP<sub>1</sub>. Дугами обозначены места соединения синтетических олигонуклеотидов в лигазных швах

антител при иммунизации этими пептидами в виде конъюгатов с белком-носителем [4]. Однако и в этом случае иммуногенность наиболее активного из этих пептидов остается в 100—1000 раз ниже, чем иммуногенность целого вируса. Кроме того, только незначительная часть от всех вырабатываемых при этом антител способна нейтрализовать вирусную инфекцию. Недавно в работе [5] было показано, что синтетические 38—40-звенные пептиды, состоящие из аминокислот, соответствующих последовательностям белка VP<sub>1</sub> вируса ящура (штамм О<sub>1</sub>К) 200—213 и 141—158, соединенным трипептидным мостиком, сами по себе или в виде конъюгатов с гемоцианином улитки способны индуцировать образование с высоким

AspProCysCysArgHisLysGlnLysIleIleAlaProAla

XI

GATCCTTGTGTAGACACAAAACAGAAAATCATTTGCACCTGCA-  
GAACAACATCTCTGTTTGTCTTTTAGTAACGTGGACGT-

ВамHI

XII

210

213

LysGlnLeuLeuProProSerProAsnGly

XIII

AAACAACCTTTTGCCTCCTTCTCCTAACGGTAC  
TTTGTGAAAACGGAGGAAGAGGATTGC

VIX

KpnI

### СЕКМЕНТ В

титром вируснейтрализующих антител. Однако использование синтетических пептидов величиной 38—40 звеньев в качестве вакцины вряд ли экономически целесообразно при современном уровне развития пептидного синтеза, так как для вакцинаирования одного животного весом 150—180 кг требуется 1,5—5 мг пептида [5]. Недавно было установлено [5—7], что некоторые пептиды из последовательности капсидного белка VP<sub>1</sub> могут вызывать образование достаточно высокого титра вируснейтрализующих антител при иммунизации в свободном, неконъюгированном состоянии.

Отмеченные трудности в создании субъединичной вакцины можно преодолеть, используя для синтеза иммуногенного пептида технологию рекомбинантных ДНК. Преимущества этой технологии заключаются в том, что таким методом можно получить короткие пептидные антигенные детерминанты, сплавленные с белком-носителем, что, в свою очередь, делает возможным получение стандартных белково-пептидных систем в противоположность с непредсказуемыми вариabельными системами, получаемыми химическими методами в случае конъюгатов иммуногенных пептидов с белком-носителем. Наиболее часто в качестве такого носителя используют β-галактозидазу *E. coli*, во-первых, из-за простоты тестирования ферментативной активности получаемых при этом гибридных белков и, во-вторых, по той причине, что созданы хорошие системы экспрессии β-галактозидазы. В случае антигенных детерминант вируса ящура подтипа O<sub>1</sub>K описан детерминированный рекомбинантными плазмидами биосинтез как С-, так и N-концевых гибридов с бактериальной β-галактозидазой [8—10]. Однако упомянутые гибриды обладают одним существенным недостатком: при иммунизации экспериментальных животных такими белками основная масса возникающих при этом антител специфична к носителю — β-галактозидазе, что, по всей видимости, связано с чрезвычайно высокой иммуногенностью этого бактериального белка.

В настоящей работе мы описываем конструирование плазмид гибридными генами, кодирующими белки, в которых единичные или составные антигенные детерминанты вируса ящура подтипа А<sub>22</sub> слиты с С-концевым фрагментом фактора некроза опухолей (TNF) человека. Выбор этого белка в качестве носителя обусловлен несколькими причинами. Во-первых, TNF, являясь иммуномодулятором, не обладает выраженной видовой специфичностью и вследствие этого представляет собой весьма слабый иммуноген. Это позволяет предположить, что соединенные с TNF пептидные антигенные детерминанты белка VP<sub>1</sub> будут более иммуногенны, чем носитель, к которому они присоединены, и будут индуцировать образование значительных количеств вируснейтрализующих антител. Во-

вторых, недавно методом рентгеноструктурного анализа было установлено пространственное строение этого лимфокина [11, 12], из которого следует, что присоединенные к N- или C-концу аминокислотные последовательности антигенных детерминант должны быть экспонированы на поверхности глобулы тримера TNF. Наконец, в-третьих, ранее нами [13] был клонирован, а затем адаптирован для бактериальной экспрессии ген *tnf* человека и создана система его эффективной экспрессии.

Мы синтезировали два варианта дуплексов, кодирующие аминокислотные последовательности 131—152 (дуплекс А) и 131—160 (дуплекс В) белка VP<sub>1</sub> вируса ящура подтипа А<sub>22</sub> (рис. 1). К началу нашей работы положение главной антигенной детерминанты этого подтипа вируса на последовательности поверхностного белка не было установлено. Поэтому мы выбрали для синтеза ДНК, кодирующих антигенные детерминанты, фрагменты аминокислотной последовательности капсидного белка VP<sub>1</sub> штамма А<sub>22</sub> [14] по аналогии с имевшимися данными по штамму O<sub>1</sub>K [4, 15]. Кроме этого мы синтезировали двухцепочечную ДНК (дуплекс В), которая кодирует С-концевую антигенную детерминанту, являющуюся универсальной для серотипов А и О вируса ящура (последовательность 200—213 белка VP<sub>1</sub>). Структура синтезированных дуплексов предусматривает клонирование дуплекса В внутри дуплексов А или В с целью получения ДНК, кодирующих составные антигенные детерминанты. Следует отметить, что все синтетические гены стыкуются с геном белка-носителя по сайтам рестрикции *Bam*HI или *Bgl*II, что приводит к появлению в гибридном белке последовательности Asp-Pro между белком-носителем и антигенными детерминантами. Это позволяет в случае необходимости отщеплять пептиды антигенных детерминант от белка-носителя с помощью кислотного гидролиза.

Для получения дуплексов А — В фосфитамидным способом синтезировали 14 олигонуклеотидов величиной от 13 до 43 нуклеотидных звеньев. Лигазные сшивки олигонуклеотидов проводили традиционным способом или по цепям, как описано в работе [9].

На первом этапе синтетические дуплексы А и В клонировали по сайтам рестриктаз *Bam*HI и *Hind*III в плазмиду pIFT2. Плазмида pIFT2 содержит искусственный ген, кодирующий гибридный лейкоцитарный интерферон α2 человека (IFN) и фактора некроза опухолей, а также удобные для клонирования сайты рестрикционных нуклеаз *Bam*HI и *Hind*III. Следует отметить, что сайт рестриктазы *Bam*HI разделяет гены *ifn* и *tnf* таким образом, что кодирует дицептидный спейсер Asp-Pro между полипептидами, кодируемыми этими генами. В результате получили плазмиды pFMD7 и pFMD8 (рис. 2), строение которых доказывали рестриктивным анализом, а также секвенированием участков плазмид, прилегающих к клонирующим сайтам. В результате вставки синтетических дуплексов А и В в плазмидах pFMD7 и pFMD8 образовался уникальный сайт рестриктазы *Kpn*I, который был в дальнейшем использован для клонирования синтетического дуплекса В, кодирующего универсальную антигенную детерминанту. Для этого плазмиды pFMD7 и pFMD8 расщепили эндонуклеазами *Bam*HI и *Kpn*I и полученные таким образом векторные ДНК лигировали с синтетическим дуплексом С, после чего частью лигазной смеси трансформировали компетентные клетки *E. coli* HB101.

Скрининг рекомбинантных клонов проводили гибридизацией с <sup>32</sup>P-меченым 31-звенным олигонуклеотидом XI, входящим в состав клонируемого дуплекса В. В результате получили плазмиды pFMD9 и pFMD10, кодирующие гибридные белки, в которых аминокислотная последовательность лейкоцитарного интерферона человека соединена с составными антигенными детерминантами вируса ящура подтипа А<sub>22</sub>. Структуру этих плазмид подтверждали рестриктивным анализом с помощью эндонуклеаз *Hae*III и *Msp*I, а также анализом нуклеотидной последовательности между сайтами рестриктаз *Bam*HI и *Hind*III. Следует отметить, что в плазмидах pFMD7—pFMD10 экспрессия гибридных генов контролируется довольно слабым промотором гена VIII бактериофага M13, поэтому уровень биосинтеза гибридных белков в клетках бактерий, несущих эти плазмиды, невелик.

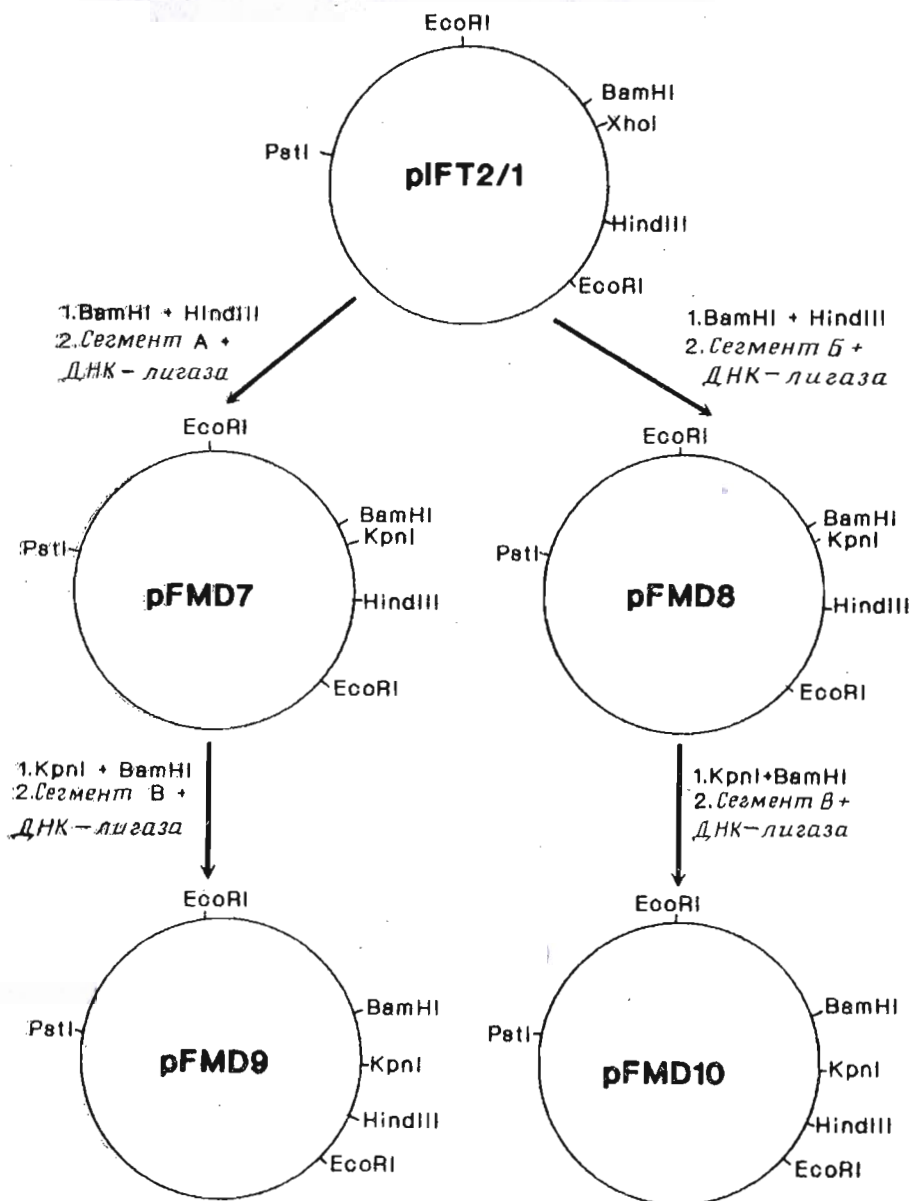
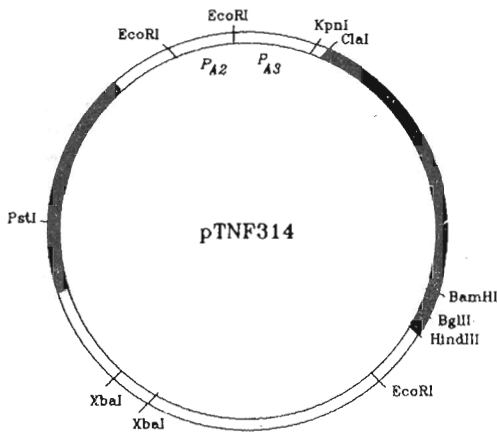


Рис. 2. Схема конструирования плазмид pFMD7, pFMD8, pFMD9 и pFMD10

В дальнейшем мы планируем продолжить исследования по оптимизации экспрессии генов, кодирующих гибриды интерферона человека и антигенные детерминанты вируса ящура, и изучению свойств сплавленных белков.

На следующем этапе проводили конструирование плазмид, кодирующих гибриды TNF и антигенных детерминант вируса ящура. В качестве вектора при этом использовали плазмиду pTNF3314 [16], содержащую мутантный ген *tnf* (рис. 3). В результате олигонуклеотид-направленного мутагенеза в С-концевую часть гена были введены уникальные сайты рестрикции *BamHI* и *BglII*, что привело к замене в аминокислотной последовательности белка остатков Ile<sup>155</sup> — Ala<sup>156</sup> на трипептид Leu-Ile-Asp. Рекомбинацию между плазмидой pTNF3314 и плазмидами pFMD7 — pFMD10 проводили следующим образом: плазмиду pTNF3314 гидролизировали рестриктазами *PstI* и *BglII*, выделяли фрагмент величиной около 1,6 т. п. о., содержащий ген TNF и часть гена β-лактамазы. С другой стороны, ДНК плазмид pFMD7, pFMD8, pFMD9 и pFMD10



а

150  
 ...GluValTyrPheGlyIleLeuIleAspLeuTer  
 ...GAGGTCTACTTTGGGATCCTTATAGATCTATAAGCTT...  
 ...CTCCAGATGAAACCSCTAGGAATATCTAGATATTCGAA...  
 BamHI BglII HindIII

б

Рис. 3. Физическая карта плазмиды pTNF3314 (а) и фрагмент структуры плазмиды pTNF3314 (б). Указаны сайты узнавания рестриктаз. Зачернены *bla* (ген β-лактамазы) и *tnf* (мутантный ген фактора некроза опухоли человека); P<sub>A2</sub> и P<sub>A3</sub> — промоторы A2 и A3 транскрипции ранней области бактериофага T7. Приведена С-концевая аминокислотная последовательность мутантного TNF

расщепили рестриктазами *PstI* и *BamHI*, выделили фрагменты величиной около 2,3 т. п. о., содержащие гены антигенных детерминант, сайт *ori* и часть гена β-лактамазы, после чего лигировали их с выделенным из плазмиды pTNF3314 *PstI/BglII*-фрагментом. В результате получили набор плазмид p7FMD, p8FMD, p9FMD и p10FMD.

Плазмиды p7FMD и p8FMD содержат гибридные гены *tnf* и единичных антигенных детерминант, в то время как плазмиды p9FMD и p10FMD содержат гибридные гены *tnf* и составных антигенных детерминант. Во всех случаях экспрессия гибридных генов контролируется тандемом сильных промоторов A2 и A3 бактериофага T7 и синтетическим участком инициации трансляции. Для экспрессии гибридных генов мы использовали дефективный по La-протеиназе штамм *E. coli* SG20050 [17]. Клетки *E. coli* SG 20050, содержащие перечисленные выше плазмиды, способны к биосинтезу значительных количеств гибридного белка, как показывает SDS-электрофорез суммарного клеточного белка (рис. 4а).

Мы провели предварительные исследования иммуных свойств полученных нами гибридных белков с антигенными детерминантами вируса ящура, используя метод иммуноблоттинга (рис. 4б, в). Для этого суммарные белки клеток *E. coli*, содержащих сконструированные нами рекомбинантные плазмиды, разделяли в 13,5% SDS-ПААГ [18], затем переносили на нитроцеллюлозные фильтры и проводили анализ как описано в работе [13]. Для иммуноблоттинга использовали кроличьи поликлональные антисыворотки против рекомбинантного TNF и против целого вируса ящура штамма A<sub>22</sub>. Видно, что все рекомбинантные белки взаимодействуют с антителами против TNF, тогда как с антителами против вируса ящура взаимодействуют лишь белки, содержащие антигенные детерминанты этого вируса, причем гибридные белки с составными антигенными детерминантами взаимодействуют с этими антителами значительно более активно, чем белки с единичными детерминантами.

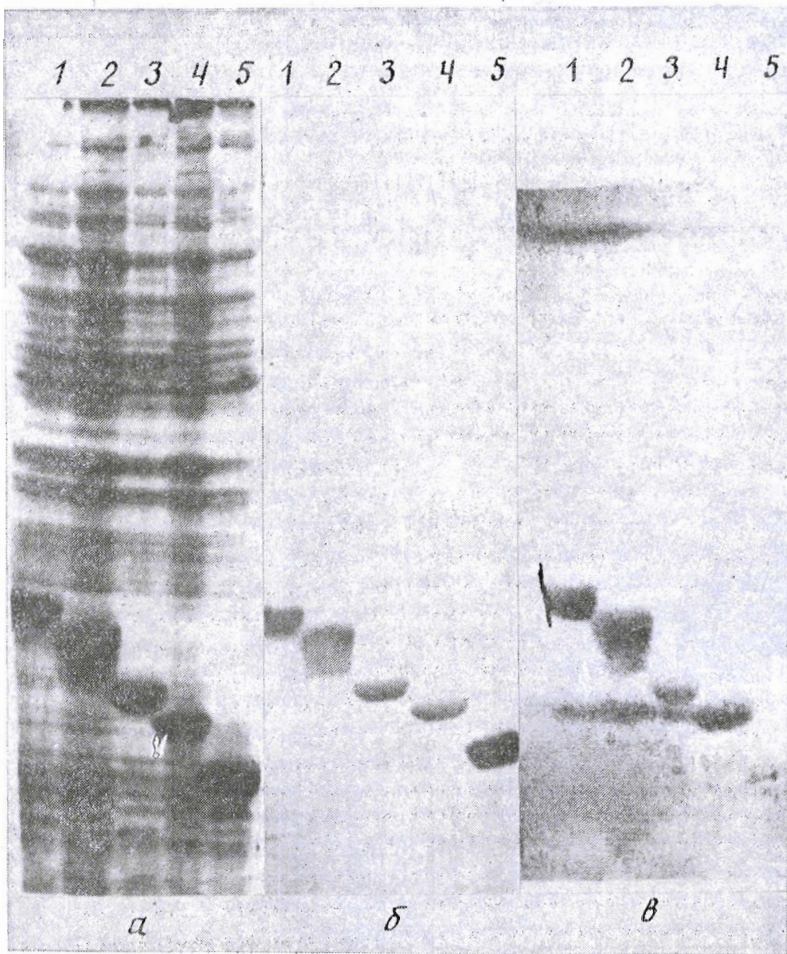


Рис. 4. Электрофорез (а) и иммуноблоты с поликлональными антителами к TNF (б) и к вирусу ящура подтипа  $A_{22}$  (в) лизатов *E. coli* SG20050 с плазмидами p10FMD (1), p9FMD (2), p8FMD (3), p7FMD (4) и pTNF3314 (5)

Следует отметить, что все полученные в этой работе гибридные белки (TNF антигенные детерминанты), оказались нерастворимыми в клетках бактерий, образуя, по всей видимости, «тельца включения». Это в значительной степени облегчает выделение этих рекомбинантных белков в индивидуальном виде из клеточной биомассы.

Таким образом, осуществлен химико-ферментативный синтез генов, кодирующих антигенные детерминанты вируса ящура подтипа  $A_{22}$ , их клонирование и экспрессия в *E. coli* в составе гибридов с TNF человека. Показано, что все рекомбинантные белки специфически взаимодействуют с поликлональными антителами к TNF и вирусу ящура подтипа  $A_{22}$ . Синтезируемые клетками бактерий гибридные белки перспективны для дальнейшего изучения в качестве вакцины против вируса ящура.

Авторы выражают благодарность В. Н. Ивановскому (ВНИИЯИ Госагропрома СССР, г. Владимир) за кроличью антисыворотку против целого вируса ящура подтипа  $A_{22}$  и Н. П. Берковой (Институт биоорганической химии АН СССР им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва) за поликлональные антитела к рекомбинантному TNF человека.

#### Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. [13]. В работе использовали dNTP фирмы P-L Biochemical (США),  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{rATP}$  и  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  (Amersham, Англия); рестрикционные эндонуклеазы *Bam*HI, *Cla*I, *Hind*III, *Pst*I

и BglII (Boehringer, ФРГ); рестриктазу MspI (НПО «Вектор», Бердск). Остальные использованные в работе ферменты были выделены по стандартным методикам в группе химии генов. Поликлональная антисыворотка против рекомбинантного TNF человека любезно предоставлена Н. П. Берковой (ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва), поликлональные антитела против целого вируса ящура подтипа A<sub>22</sub> предоставлены В. Н. Иванющенковым (ВНИИЯИ, г. Владимир); конъюгат поликлональных антител лошади против иммуноглобулинов кролика с пероксидазой хрена производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалея (Москва).

Синтез, очистка и лигазные шивки олигонуклеотидов проводили как описано в работах [9, 12].

Клонирование синтетических дуплексов и анализ клонов гибридизацией с синтетическими олигонуклеотидными зондами проводили как описано в работе [13]. Нуклеотидную последовательность определяли твердофазным методом частичных химических модификаций [19]. Белковый электрофорез и иммуноблоттинг проводили как описано в работах [18] и [13].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. King A. M. Q., Underwood B. O., McCahon D., Newman J. W. I., Brown F. // Nature. 1981. V. 293. № 5832. P. 479—480.
2. Bachrach H. L., Moore D. M., McKercher P. D., Polatnik J. // J. Immunol. 1975. V. 115. № 6. P. 1636—1641.
3. Kleid D. G., Yansura D. G., Dowbenko D., Weddell G. N., Hoatlin M. E., Clayton N., Shire S. J., Bock L. A., Ogez J., Builder S., Patzer E. J., Moore D. M., Robertson B. H., Grubman N. J., Morgan D. O. // Dev. Int. Microbiol. 1984. V. 25. № 3. P. 317—325.
4. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnik T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A., Rowland D. J., Brown F. // Science. 1982. V. 298. № 5869. P. 300—333.
5. DiMarchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T., Mowat N. // Science. 1986. V. 232. № 4764. P. 639—641.
6. Суровой А. С., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенков В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1132—1135.
7. Вольпина О. М., Суровой А. С., Уляшин В. В., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенков В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1988. Т. 15. № 14. С. 1363—1371.
8. Чернышкая Е. А., Гуревич А. И., Коробко В. Г. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 508—513.
9. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чушило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонков Н. М., Васильева Т. Е., Колосов М. Н. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 69—81.
10. Broekhuijsen M. P., Blom T., van Rijn J., Pouwels P. H., Klasen E. A., Fasbender M. J., Enger-Valk B. E. // Gene. 1986. V. 49. № 2. P. 189—197.
11. Jones E. Y., Stuart D. J., Walker N. P. C. // Nature. 1989. V. 338. № 6212. P. 225—228.
12. Eck M. J., Sprang S. R. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 29. P. 17595—17605.
13. Добрынин В. Н., Беркова Н. П., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Кравченко В. В., Филиппов С. А., Чушило С. А., Шамборант О. Г., Коробко В. Г. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1530—1537.
14. Омищенко А. М., Петров Н. А., Блинов В. М., Василенко С. К., Сандахчиев Л. С., Бурдов А. Н., Иванющенков В. Н., Перевозчикова Н. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 416—419.
15. Pfaff E., Thiel H.-J., Beck E., Strohmaier K., Schaller H. // J. Virol. 1988. V. 62. № 6. P. 2033—2040.
16. Gase K., Korobko V. G., Wishniewski H. G., Le J., Dobrynin V. N., Filippov S. A., Gutsche W., Maksimova Yu. N., Schlott B., Shingarova L. N., Vilchek J., Behnke D. // Immunology. 1990. V. 71. № 3. P. 368—371.
17. Trisler P., Gottesman S. // J. Bacteriol. 1984. V. 100. № 1. P. 184—191.
18. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—695.
19. Чушило С. А., Кравченко В. В. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 1634—1637.

Поступила в редакцию  
29.VIII.1990



V. G. KOROBKO, E. F. BOLDYREVA, O. V. NEKRASOVA, A. MIKULSKIS,  
[S. A. FILIPPOV], V. N. DOBRYNIN

SYNTHESIS, CLONING AND EXPRESSION OF ARTIFICIAL GENES  
CODING FOR ANTIGENIC DETERMINANTS OF THE FOOT-AND-MOUTH  
DISEASE VIRUS STRAIN A<sub>22</sub>

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Chemical-enzymatic synthesis and cloning in *Escherichia coli* of double-stranded DNAs, coding for simple and complex antigenic determinants of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A<sub>22</sub>, have been carried out. The simple antigenic determinants are a part of the viral coat protein VP1 (amino acid sequence 131—152 or 131—160) whereas the complex antigenic determinants comprise additionally the amino acid sequence 200—213 of VP1 linked to N-terminus of simple antigenic determinants through a tetrapeptide spacer Pro-Pro-Ser-Pro. Recombinant DNAs containing genes for antigenic determinants of FMDV fused with C-terminus of gene for human tumor necrosis factor (hrTNF) have been constructed. Expression of the hybrid genes and properties of the proteins coded were studied. All recombinant proteins were shown to interact specifically with polyclonal antibodies both against hrTNF and FMDV strain A<sub>22</sub>. The recombinant proteins produced by bacteria are perspective for study as a vaccine against FMDV.