



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 128**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C07K 14/195** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05709866 .7**

96 Fecha de presentación : **08.02.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1724342**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

54

Título: **Procedimiento para preparar una variante del antígeno protector de superficie de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* en *E. Coli*.**

30

Prioridad: **27.02.2004 JP 2004-53882**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.10.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.10.2011**

73

Titular/es: **Juridical Foundation the  
Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute  
6-1, Okubo 1-chome  
Kumamoto-shi Kumamoto-ken 860-8568, JP**

72

Inventor/es: **Ushijima, Toshihiro;  
Sakaguchi, Masashi y  
Tokunaga, Eiji**

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 367 128 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para preparar una variante del antígeno protector de superficie de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* en *E. coli*

5 La presente invención hace referencia a un procedimiento para preparar una variante del antígeno protector de superficie de *Erysipelothrix rhusiopathiae* (también referido en adelante como "SpaA") con *Escherichia coli* como anfitrión. Más concretamente, la presente invención hace referencia a un procedimiento para preparar una variante de SpaA o una forma reducida de SpaA (también referida en adelante como "ΔSpaA"), donde al menos aproximadamente 1/3 del extremo C de la proteína SpaA es suprimido, con la introducción de una sustitución de aminoácidos como se define en las reivindicaciones, donde dicha variante puede ser expresada como cuerpos de inclusión insolubles cuando es expresada dentro de las células de *E. coli*, y a una variante de una proteína SpaA o ΔSpaA recombinante obtenida por medio de dicho procedimiento.

15 La erisipela porcina es una enfermedad de súidos causada por la infección con *Erysipelothrix rhusiopathiae* donde el súido infectado padece síntomas tales como sepsis en los casos agudos, pápulas en los casos subagudos, o endocarditis y artritis en los casos crónicos. Se ha informado de que alrededor de 3.000 súidos al año tienen la enfermedad, lo que representa un perjuicio enorme para un ganadero. *Erysipelothrix rhusiopathiae* es patógeno para animales de consumo tales como jabalíes salvajes, ballenas, pollos y pavos, además de súidos y está especificado como una de las enfermedades infecciosas a supervisar en el Protective Act of Livestock Diseases. La erisipela porcina también es una zoonosis que ocasiona erisipeloide en seres humanos y tiene importancia desde el punto de vista de la higiene de la carne. Existen numerosos serotipos de *Erysipelothrix rhusiopathiae*, de los cuales los serotipos 1 y 2 causan la mayor parte de las erisipelas porcinas en súidos.

25 Para la protección frente a infecciones de erisipela porcina, se han utilizado hasta ahora vacunas vivas atenuadas, esto es, vacunas vivas liofilizadas preparadas utilizando la cepa Koganei que es una cepa atenuada de *Erysipelothrix rhusiopathiae* preparada subcultivando *Erysipelothrix rhusiopathiae* virulento en un medio con un suplemento de acriflavina durante un período prolongado; las vacunas inactivadas, esto es, las vacunas de bacterias preparadas tratando un cultivo de *Erysipelothrix rhusiopathiae* virulento con formalina y haciendo que todas las células y los productos extracelulares sean adsorbidos sobre gel de hidróxido de aluminio; y las vacunas de componentes, esto es, aquellas que comprenden una fracción de proteínas de superficie no purificadas de las células extraídas de células completas con una solución acuosa de álcali. Se piensa que las vacunas vivas atenuadas son mucho menos costosas puesto que pueden ser eficaces con una única administración en una pequeña cantidad. No obstante, se indica que también resultan problemáticas ya que son patógenas en ratones induciendo artritis, muestran efectos secundarios graves en súidos con un bajo nivel de anticuerpo o súidos SPF, y la cepa de la vacuna se aísla de la lesión de súidos que padecen erisipela porcina.

40 En cuanto a un nuevo tipo de vacunas, están en marcha la investigación y el desarrollo de vacunas recombinantes por medio del uso de técnicas de recombinación genética. Galan y Timony inmunizaron ratones con un producto lisado de *E. coli* transfectado con un fago recombinante que expresa genes de una porción del genoma de *Erysipelothrix rhusiopathiae* y realizaron un ensayo de sensibilización con *Erysipelothrix rhusiopathiae* para observar que de 14 a 17% de los ratones inmunizados se libraron de morir después de la infección. Además, revelaron que las proteínas codificadas por los genes tenían un peso molecular de 66, 64, y 43 kDa a partir de su reactividad con un suero inmunitario contra el producto lisado y demostraron que estas proteínas podían ser antígenos protectores para la infección por *Erysipelothrix rhusiopathiae* (véase la referencia no de patente Núm. 1).

50 Makino et al. expresaron un gen que codificaba una proteína de superficie con un peso molecular de 64 kDa (denominada "SpaA") a partir de la cepa tama 96 de *Erysipelothrix rhusiopathiae* de tipo 2 en *E. coli*, inmunizaron ratones con las células vivas de *E. coli* recombinante resultantes, y realizaron un ensayo de sensibilización con *Erysipelothrix rhusiopathiae* para demostrar que la proteína SpaA tenía actividad protectora frente a la infección. También revelaron que la proteína SpaA tenía una secuencia de 606 residuos aminoácido donde, en el extremo N-terminal, se encuentra un péptido señal que consiste en 29 residuos aminoácido y en el extremo C-terminal se encuentran ocho secuencias de repetición homólogas que consisten en 20 aminoácidos exceptuando la 8ª repetición que consiste en 19 aminoácidos (véase la referencia no de patente 2).

55 Imada et al. investigaron la proteína SpaA de la cepa Fujisawa de tipo 1 correspondiente a la proteína SpaA anterior y un gen que codificaba dicha proteína para revelar que dicha proteína SpaA de la cepa Fujisawa de tipo 1 es una que tiene un peso molecular de 69 kDa que tiene una secuencia de 626 residuos aminoácido con una secuencias de repetición homóloga más, esto es, nueve, en su extremo C terminal, en comparación con la proteína SpaA de tipo 1, consistiendo la 9ª repetición en 19 aminoácidos. Demostraron que una proteína de fusión de SpaA completa, SpaA con una delección de las secuencias de repetición homólogas en el extremo C terminal, o SpaA con una delección de una porción de las secuencias N terminal y las secuencias de repetición homólogas del extremo C terminal, con un hexámero de histidina, mostraba un efecto protector frente a la infección (véanse las referencias no de patente 3 y 4).

65

Watanabe et al. también informaron de que un polipéptido de 46,5 kDa preparado suprimiendo las secuencias de repetición homólogas en el extremo C terminal y una secuencia señal de secreción en el extremo N terminal de la proteína SpaA de *Erysipelothrix rhusiopathiae* podría ser un antígeno protector para la infección (antígeno protector de 46,5 kDa; denominado "46,5 KPA")(véase, p. ej., la referencia de patente 1).

Por otra parte, se ha intentado promover la productividad de una proteína candidato para vacunas. Por ejemplo, existe un informe de que 46,5 KPA podía ser expresada satisfactoriamente para la secreción fuera de las células utilizando *Brevibacillus choshinensis* como célula anfitriona (véase, p. ej., la referencia de Patente 2). Con este sistema de expresión, aproximadamente el 50% de la proteína expresada se vuelve insoluble debido a su coagulación en el cultivo. De acuerdo con el informe, la purificación de dicho 46,5 KPA se realizó filtrando un cultivo con una membrana de ultrafiltración, suspendiendo la materia insoluble recuperada sobre la membrana en una solución alcalina, y recuperando 46,5 KPA. De este modo, este procedimiento de purificación requiere al menos tres etapas: (1) condensación por medio de ultrafiltración en condiciones de neutras a alcalinas suaves (pH 7 a 9,5); (2) recuperación de una fracción de filtración por medio de ultrafiltración en condiciones fuertemente alcalinas (pH 10,0 a 12,0); y (3) purificación de la fracción de ultrafiltración mediante cromatografía de intercambio iónico.

Cuando el gen de SpaA es expresado en *E. coli*, la mayor parte de la proteína puede ser expresada como una proteína soluble y por consiguiente puede no aplicarse el procedimiento de purificación para la materia insoluble, descrito más arriba. Un cultivo puede contener, además de la proteína SpaA de interés, diferentes contaminantes tales como desechos celulares de *E. coli*, componentes de un medio de cultivo, productos metabólicos producidos durante el cultivo, etc. No es fácil recuperar y purificar eficazmente la proteína SpaA soluble de interés a partir de tales mezclas de contaminantes. Kesik et al. describen que se pueden utilizar los cuerpos de inclusión de bacterias recombinantes como un sistema novedoso para la liberación de antígenos para vacuna por la ruta oral (Kesik et al., *Immunology Letters* 91 (2004), 197-204). En general, una vacuna para animales, a diferencia de una vacuna para seres humanos, no sería aceptada por un ganadero a menos que tenga un precio bajo así como una elevada pureza y una elevada calidad. Por consiguiente, un fabricante de una vacuna para animales siempre requiere una mejora en el procedimiento de producción y un procedimiento de recuperación y purificación que permita un tratamiento a gran escala y una reducción del coste de producción.

referencia de Patente 1: publicación de patente Japonesa Núm. 2000-279179  
 referencia de Patente 2: publicación de patente Japonesa Núm. 2002-34568  
 referencia no de Patente 1: Garan, J. E. et al., (1990) *Infect. Immun.*, 58, págs. 3116-3121  
 referencia no de Patente 2: Makino, S. et al., (1998) *Microb. Pathog.* 25, pág. 101-109  
 referencia no de Patente 3: Imada, Y. et al. (1999) *Proc. Jpn. Pig. Vet. Soc.* 34, p.12-\$  
 referencia no de Patente 4: Imada, Y. et al. (1999) *Infect. Immun.* 67 (9), págs. 4376-4382

Como se ha descrito más arriba, cuando el gen SpaA de *Erysipelothrix rhusiopathiae* es expresado en *E. coli* o *Brevibacillus choshinensis* como anfitrión, la proteína es expresada en forma de una proteína SpaA soluble o una mezcla de proteínas solubles e insolubles, lo que hace engorrosa su producción y no permite esperar un elevado rendimiento.

La presente invención se ha completado en vista de la necesidad basada en los antecedentes técnicos o industriales descrita más arriba. De este modo, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar SpaA o una forma reducida de SpaA ( $\Delta$ SpaA) donde al menos aproximadamente 1/3 de la proteína SpaA C terminal es suprimido, que comprende introducir una sustitución de aminoácidos como se define en las reivindicaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA de manera que la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA intrínsecamente soluble pueda ser expresada como cuerpos de inclusión en el interior de las células de *E. coli*, y recuperar y purificar los cuerpos de inclusión.

Otro objeto de de la presente invención es proporcionar una proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA obtenida introduciendo las sustituciones de aminoácidos definidas en las reivindicaciones con una pureza elevada.

Los autores de la presente invención han continuado investigando asiduamente con el fin de lograr los objetos descritos más arriba y como consecuencia han encontrado que existen clones que pueden formar cuerpos de inclusión insolubles entre las células de *E. coli* en las cuales es expresada la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA, que se producía una sustitución de aminoácidos en un sitio específico de la secuencia de aminoácidos de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA que formaba los cuerpos de inclusión, y que la introducción artificial de dicha sustitución de aminoácidos puede permitir la acumulación de proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA soluble en forma de cuerpos de inclusión dentro de las células. Además, los autores de la presente invención han descubierto que la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA soluble conservaba la inmunogenicidad incluso después de la formación de los cuerpos de inclusión para completar de ese modo la presente invención. A modo de ejemplo, se pueden formar cuerpos de inclusión cuando el aminoácido 69<sup>a</sup> de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA de la cepa SE-9 es sustituido por glicina; el aminoácido 214<sup>a</sup> aminoácido es sustituido por glutamina; el aminoácido 278<sup>a</sup> es sustituido por glicina; el aminoácido 531<sup>a</sup> es sustituido por glicina; los aminoácidos 154<sup>a</sup> y 203<sup>a</sup> son sustituidos por glicina y treonina, respectivamente; los aminoácidos 214<sup>a</sup> y 253<sup>a</sup> son sustituidos por glutamina y treonina, respectivamente; o los aminoácidos 69<sup>a</sup>, 154<sup>a</sup> y 203<sup>a</sup> son sustituidos por glicina, glicina y treonina, respectivamente.

La presente invención proporciona generalmente un procedimiento para preparar una variante de la proteína SpaA del antígeno protector de superficie de Erysipelothrix rhusiopathiae o de una forma de SpaA reducida ( $\Delta$ SpaA) donde al menos aproximadamente 1/3 del extremo C de la proteína SpaA es suprimido, teniendo dicha variante inmunogenicidad y siendo expresada en E. coli en forma de cuerpos de inclusión, que comprende mutar un gen que codifica dicha proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA de manera que la sustitución de aminoácidos definida en las reivindicaciones pueda ser introducida en la secuencia de aminoácidos de dicha proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA, permitiendo que el gen mutado resultante sea expresado en E. coli, y seleccionando tales variantes que formaban los cuerpos de inclusión entre las variantes expresadas. De este modo, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA, cuya propiedad intrínsecamente soluble ha dificultado la recuperación y la purificación de dicha proteína, puede ser expresada en E. coli en forma de cuerpos de inclusión preparando una variante de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA por medio de la sustitución de aminoácidos como se define en las reivindicaciones que permite la expresión de dicha proteína en forma de cuerpos de inclusión insolubles para facilitar de ese modo la recuperación y la purificación de dicha proteína.

En una realización, el procedimiento de la presente invención comprende las siguientes etapas (A) a (D):

1. (A) introducir una mutación en un gen que codifica una proteína AspA o  $\Delta$ SpaA del antígeno protector de superficie de Erysipelothrix rhusiopathiae soluble de manera que se pueda introducir la sustitución de aminoácidos;
2. (B) transformar las células de E. coli con un vector de expresión que contiene el gen mutado resultante;
3. (C) seleccionar las células de E. coli que formaron los cuerpos de inclusión insolubles entre las células de E. coli transformadas anteriores; y
4. (D) cultivar las células de E. coli seleccionadas para la recuperación de los cuerpos de inclusión en el interior de las células.

Para confirmar que una variante de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA recombinante obtenida mediante el procedimiento de la presente invención conserva una actividad protectora (inmunogenicidad) frente a la infección por Erysipelothrix rhusiopathiae, la variante puede ser sometida adicionalmente a las siguientes etapas (E) a (F):

1. (E) administrar los cuerpos de inclusión o los cuerpos de inclusión tratados con un agente solubilizante a un animal sensible a la infección por Erysipelothrix rhusiopathiae y después atacar a dicho animal con una cepa virulenta de Erysipelothrix rhusiopathiae; y
2. (F) observar la supervivencia o muerte del animal sensible a Erysipelothrix rhusiopathiae para evaluar de ese modo la presencia de una actividad protectora (inmunogenicidad) frente a la infección por Erysipelothrix rhusiopathiae.

El procedimiento de la presente invención se caracteriza porque la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA, que es intrínsecamente soluble, puede ser convertida en su variante que puede ser expresada en E. coli en forma de cuerpos de inclusión insolubles para facilitar de ese modo la recuperación y la purificación de dicha proteína. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, para la expresión de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA en forma de cuerpos de inclusión insolubles, un gen que codifica la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA es mutado para introducir una sustitución de aminoácidos como se define en las reivindicaciones en la secuencia de aminoácidos de dicha proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA. Entre las variantes de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA preparadas de este modo con la sustitución de aminoácidos se incluyen aquellas que pueden ser expresadas formando cuerpos de inclusión, que después son seleccionados. Por consiguiente, la mutación introducida en un gen que codifica la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA o la sustitución de aminoácidos causada en la secuencia de aminoácidos de dicha proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA puede ser cualquier mutación o sustitución de aminoácidos con tal que de como resultado una variante de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA que pueda ser expresada formando cuerpos de inclusión.

La sustitución de aminoácidos de acuerdo con la presente invención incluye una o una combinación de más de una seleccionadas del grupo que consiste en (1) a (7) como se describe más abajo:

1. (1) el 69<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;
2. (2) el 154<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;
3. (3) el 203<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por treonina;
4. (4) el 214<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glutamina;
5. (5) el 253<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por treonina;
6. (6) el 278<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina; y
7. (7) el 531<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina.

Una sustitución de aminoácidos adicional de acuerdo con la presente invención incluye: el 1541<sup>o</sup> y el 203<sup>o</sup> aminoácidos del extremo N terminal que abarca la secuencia señal son sustituidos por glicina y treonina, respectivamente; el 214<sup>o</sup> y el 253<sup>o</sup> aminoácidos del extremo N terminal que abarca la secuencia señal son

sustituídos por glutamina y treonina, respectivamente; y el 69<sup>o</sup>, el 154<sup>o</sup> y el 203<sup>o</sup> aminoácidos del extremo N terminal que abarca la secuencia señal son sustituidos por glicina, glicina y treonina, respectivamente.

5 La secuencia de aminoácidos de la proteína SpaA o ΔSpaA puede ser la secuencia representada en el SEQ ID NO: 2 o la secuencia representada en el SEQ ID NO: 2 con una deleción en su extremo C terminal donde se puede introducir una sustitución de aminoácidos deseada, en particular las descritas más arriba.

10 En otra realización, la presente invención proporciona una proteína SpaA o ΔSpaA de la variante del antígeno protector de superficie de Erysipelothrix rhusiopathiae que es inmunogénica y se expresa en los cuerpos de inclusión de E. coli. La variante de la proteína SpaA o ΔSpaA de la presente invención se prepara preferiblemente mediante el procedimiento descrito en la presente memoria. El término "una variante de la proteína SpaA o ΔSpaA del antígeno protector de superficie de Erysipelothrix rhusiopathiae" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una proteína insoluble mutada a partir de la proteína SpaA o ΔSpaA del antígeno protector de superficie de Erysipelothrix rhusiopathiae soluble por medio de una sustitución de aminoácidos específica. El término "inmunogenicidad" o "inmunogénico" representa la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo protector o la capacidad de proteger frente a la infección por Erysipelothrix rhusiopathiae.

20 En otra realización más, la presente invención proporciona una composición que comprende como ingrediente activo una variante de la proteína SpaA o ΔSpaA del antígeno protector de superficie de Erysipelothrix rhusiopathiae de la presente invención. La variante de la proteína SpaA o ΔSpaA de la presente invención contenida en dicha composición se prepara preferiblemente por medio del procedimiento descrito en la presente memoria.

25 En otra realización más, la presente invención proporciona un gen que codifica una variante de la proteína SpaA o ΔSpaA del antígeno protector de superficie de Erysipelothrix rhusiopathiae que es inmunogénica y se expresa en E. coli en forma de cuerpos de inclusión. El gen que codifica una variante de la proteína SpaA o ΔSpaA de la presente invención se prepara preferiblemente mediante el procedimiento descrito en la presente memoria. El gen que codifica una variante de la proteína SpaA o ΔSpaA de la presente invención incluye al menos una sustitución de nucleótido como se define en las reivindicaciones en comparación con un gen que codifica la proteína SpaA o ΔSpaA. Dicha al menos una sustitución de nucleótido no obstante no debe ser una mutación silenciosa si no que debe inducir al menos una sustitución de aminoácido (mutación puntual) en la proteína SpaA o ΔSpaA como se define en las reivindicaciones.

35 Un ejemplo de un gen que codifica una variante de la proteína SpaA o ΔSpaA de la presente invención incluye, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos con una deleción de una porción del extremo 3', que incluye una o una combinación de más de una sustitución de nucleótidos en el SEQ ID NO: 1 seleccionadas del grupo que consiste en (1) a (7) descritas más abajo:

1. (1) el 206<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
2. (2) el 461<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
3. (3) el 608<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es C;
4. (4) el 642<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
5. (5) el 758<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es C;
6. (6) el 833<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G; y
7. (7) el 1591<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G.

45 Otro ejemplo de un gen que codifica una variante de la proteína SpaA o ΔSpaA de la presente invención incluye, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos con una deleción de una porción del extremo 3', que incluye cualquiera de las sustituciones de nucleótidos del SEQ ID NO: 1 seleccionada del grupo que consiste en (a) a (h) descritas más abajo:

1. (a) el 206<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
2. (b) el 608<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es C;
3. (c) el 642<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
4. (d) el 833<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G; y
5. (e) el 1591<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
6. (f) el 461<sup>o</sup> y 608<sup>o</sup> nucleótidos de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 son G y C, respectivamente;
7. (g) el 642<sup>o</sup> y el 758<sup>o</sup> nucleótidos de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 son G y C, respectivamente; y
8. (h) el 206<sup>o</sup>, el 461<sup>o</sup> y el 608<sup>o</sup> nucleótidos de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 son G, G y C, respectivamente.

65 En otra realización más, la presente invención proporciona un método para utilizar una variante de la proteína SpaA o ΔSpaA del antígeno protector de superficie de Erysipelothrix rhusiopathiae de la presente invención como una vacuna para la erisipela porcina. La variante de la proteína SpaA o ΔSpaA de la presente invención utilizada en dicho método se prepara preferiblemente mediante el procedimiento descrito en la presente memoria.

El Erysipelothrix rhusiopathiae para su uso en la preparación de una variante de la proteína SpaA o ΔSpaA del antígeno protector de superficie de Erysipelothrix rhusiopathiae de la presente invención incluye, por ejemplo, la cepa Fujisawa, la cepa Koganai para el tipo 1, y la cepa Tama 96, la cepa SE-9 o la cepa Shizuoka 63 para el tipo 2, pero en la presente invención se puede utilizar el gen SpaA de cualquier cepa de Erysipelothrix rhusiopathiae.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para expresar la proteína SpaA o ΔSpaA soluble en E. coli en forma de cuerpos de inclusión insolubles. La expresión en E. coli en forma de cuerpos de inclusión permite la purificación de la proteína SpaA o ΔSpaA fácilmente con una elevada pureza simplemente mediante procedimientos de centrifugación y lavado. Los cuerpos de inclusión de la proteína SpaA o ΔSpaA obtenidos de este modo, después de la solubilización, tienen una pureza y una inmunogenicidad suficientes para su uso como vacuna solamente si son diluidos. Así, se proporciona un procedimiento simple y eficaz para preparar la vacuna de proteína SpaA o ΔSpaA. Con el uso de la proteína SpaA o ΔSpaA obtenida mediante este procedimiento, se puede reducir la oportunidad de una infección por Erysipelothrix rhusiopathiae en seres humanos en comparación con un método para preparar una vacuna inactivada o una vacuna de componentes que emplea Erysipelothrix rhusiopathiae como sustancia de partida. La presente invención también elude los problemas de la restauración de la patogenicidad en Erysipelothrix rhusiopathiae, los graves efectos secundarios encontrados en suidos con un bajo título de anticuerpo o en suidos SPF, y similares.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra un vector de expresión para la proteína SpaA o ΔSpaA. a: Plásmido pET11d/SpaA en el que se inserta un gen que codifica la proteína SpaA derivada de la cepa SE-9 de Erysipelothrix rhusiopathiae; b: Plásmido pET11d/ΔSpaA en el que se inserta un gen que codifica la proteína ΔSpaA.

La Fig. 2A muestra los resultados de la SDS-PAGE realizada con una proteína SpaA derivada de la cepa SE-9 de Erysipelothrix rhusiopathiae y una proteína ΔSpaA. M: Marcador; Calle 1: cultivo de E. coli que no expresa una proteína foránea; Calle 2: cultivo de E. coli que expresa la proteína SpaA; Calle 3: cultivo de E. coli que expresa la proteína ΔSpaA.

La Fig. 2B muestra los resultados de la SDS-PAGE realizada con una proteína ΔSpaA derivada de Erysipelothrix rhusiopathiae. M: Marcador; Calle 1: cultivo de E. coli que no expresa una proteína foránea; Calle 2: cultivo de E. coli que expresa la proteína ΔSpaA derivada de la cepa Fujisawa; Calle 3: cultivo de E. coli que expresa la proteína ΔSpaA derivada de la cepa Tama 96; Calle 4: cultivo de E. coli que expresa la proteína ΔSpaA derivada de Koganai; Calle 5: cultivo de E. coli que expresa la proteína ΔSpaA derivada de la cepa SE-9.

La Fig. 3 muestra los resultados de la SDS-PAGE realizada con proteínas ΔSpaA soluble e insoluble (cuerpos de inclusión) derivadas de la cepa SE-9 de Erysipelothrix rhusiopathiae. M: Marcador; Calle 1: sobrenadante de centrifugación de cultivo de E. coli que expresa la proteína ΔSpaA soluble sometido a sonicación; Calle 2: productos precipitados de la centrifugación de cultivo de E. coli que expresa la proteína ΔSpaA soluble sometido a sonicación; Calle 3: sobrenadante de la centrifugación de cultivo de E. coli que expresa la proteína ΔSpaA insoluble sometido a sonicación; Calle 4: productos precipitados de la centrifugación de cultivo de E. coli que expresa la proteína ΔSpaA insoluble sometido a sonicación.

La Fig. 4A muestra los sitios mutados y los sitios de escisión para las enzimas de restricción encontrados en el gen SpaA en los plásmidos extraídos de células transformantes de E. coli (tres clones; Núm. 1, Núm. 2 y Núm. 3) que expresan la proteína ΔSpaA insoluble (cuerpos de inclusión) de la comparación con el SEQ ID NO: 7.

La Fig. 4B muestra los sitios mutados y los sitios de escisión para las enzimas de restricción encontrados en el gen SpaA en el plásmido extraído de células transformantes de E. coli (un clon; Núm. 4) que expresa la proteína SpaA insoluble (cuerpos de inclusión) de la comparación con el SEQ ID NO: 7.

La Fig. 5 muestra los resultados de la SDS-PAGE realizada con proteínas SpaA soluble e insoluble (cuerpos de inclusión) derivadas de la cepa SE-9 de Erysipelothrix rhusiopathiae. M: Marcador; Calle 1: sobrenadante de centrifugación del cultivo de E. coli que expresa la proteína SpaA soluble sometido a sonicación; Calle 2: productos precipitados de la centrifugación del cultivo de E. coli que expresa la proteína SpaA soluble sometido a sonicación; Calle 3: sobrenadante de centrifugación del cultivo de E. coli que expresa la proteína SpaA insoluble sometido a sonicación; Calle 4: productos precipitados de la centrifugación del cultivo de E. coli que expresa la proteína SpaA insoluble sometido a sonicación.

La Fig. 6 muestra los resultados de la SDS-PAGE realizada con proteínas SpaA y ΔSpaA insolubles (cuerpos de inclusión) derivadas de la cepa SE-9 de Erysipelothrix rhusiopathiae después de la purificación. M: Marcador; Calle 1: proteína SpaA; Calle 2: proteína ΔSpaA.

La presente invención se caracteriza por un procedimiento para expresar la proteína SpaA o ΔSpaA en E. coli en forma de cuerpos de inclusión sustituyendo un residuo aminoácido de un sitio específico de la secuencia de

aminoácidos como se define en las reivindicaciones de dicha proteína por un aminoácido específico, y preparar de ese modo la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA.

### **(1) Clonación de un gen que codifica la proteína SpaA o $\Delta$ SpaA**

Para *Erysipelothrix rhusiopathiae*, existen principalmente dos serotipos que muestran una fuerte patogenicidad para los súidos que se clasifican en dos tipos 1 y 2. El tipo 1 incluye la cepa Fujisawa y la cepa Koganai, mientras el tipo 2 incluye la cepa Tama 96, la cepa SE-9 y la cepa Shizuoka 63. No obstante, se puede utilizar un gen de SpaA de cualquier cepa de *Erysipelothrix rhusiopathiae* en la presente invención. Estas células se pueden hacer crecer con los medios de cultivo disponibles en el mercado de acuerdo con las instrucciones adjuntas. Por ejemplo, se puede suspender una cantidad fijada de células en Caldo de Infusión de Cerebro Corazón con un suplemento de Tween 80 al 0,1% e incubar la suspensión a 37°C durante 16 a 48 horas.

Se puede obtener un gen que codifica la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA mediante PCR con los ADN extraídos de las células como se ha descrito más arriba como molde utilizando cebadores diseñados a partir de la secuencia (SEQ ID NO: 1) descrita por Imada, Y. et al. (1999) Infect. Immun. 67 (9), págs. 4376-4382. El SEQ ID NO: 1 representa una secuencia de nucleótidos completa del gen de SpaA derivado de la cepa Fujisawa mientras el SEQ ID NO: 2 representa una secuencia de aminoácidos de una proteína SpaA completa derivada de la cepa Fujisawa que abarca un péptido señal. El SEQ ID NO: 7 representa una porción de una secuencia de nucleótidos completa del gen de SpaA derivado de la cepa SE-9, que corresponde a la secuencia desde los residuos de los nucleótidos 107<sup>o</sup> a 1854<sup>o</sup> del SEQ ID NO: 1. Se puede preparar un ADN molde con un kit de extracción de ADN disponible en el mercado, p. ej. Isoplant (NIPPON GENE CO., LTD.), de acuerdo con las instrucciones adjuntas. Los cebadores de la PCR pueden ser fácilmente asequibles a partir de servicios contratados para la síntesis de ADN, p. ej. QIAGEN, mediante solicitud, y se añaden preferiblemente a una secuencia de un sitio de escisión para una enzima de restricción apropiado en el extremo 5'. Específicamente, se pueden utilizar ADN sintéticos en los que se añade un sitio NcoI al SEQ ID NO: 2 o se añade un sitio BamHI al SEQ ID NO: 4 o al SEQ ID NO: 5. Los cebadores representados en el SEQ ID NO: 3 y el SEQ ID NO: 5 se pueden utilizar para la amplificación de un fragmento de ADN que codifica la proteína SpaA mientras los cebadores representados en el SEQ ID NO: 3 y el SEQ ID NO: 4 se pueden utilizar para la amplificación de un fragmento de ADN que codifica la proteína  $\Delta$ SpaA. El fragmento de ADN resultante que codifica la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA tendrá una adición de doce nucleótidos que codifica una Met derivada de la enzima de restricción NcoI y los tres aminoácidos del extremo C (Ala-Phe-Ala). El fragmento de ADN que codifica la proteína  $\Delta$ SpaA puede ser un gen de SpaA parcial hasta el nucleótido 1260<sup>o</sup> y que codifica una forma reducida de la proteína SpaA con la delección de 207 residuos de aminoácido en el extremo C. La proteína  $\Delta$ SpaA es una proteína en la que se ha suprimido al menos aproximadamente 1/3 del extremo C de la proteína SpaA. El tamaño y el sitio de la proteína  $\Delta$ SpaA en la que se ha suprimido una porción de la proteína SpaA se puede determinar arbitrariamente según demande la ocasión alterando una posición de las secuencias de los cebadores. La reacción de PCR se puede realizar con un kit LA-Taq disponible en el mercado (TAKARA SHUZO CO.), un kit para PCR Advantage HF-2 (BC Bioscience), etc. de acuerdo con los protocolos adjuntos. Se puede determinar la secuencia de nucleótidos de los fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR con un secuenciador de ADN, p. ej. ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PE Biosystems), después de clonarlo en un kit de clonación TA (Invitrogen).

El gen obtenido de este modo que codifica la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA es clonado. Específicamente, los productos de la PCR descrita más arriba son digeridos con las enzimas de de restricción NcoI y BamHI, los fragmentos escindidos son insertados en un plásmido adecuado, p. ej. pET11d (Novagen), que ha sido digerido previamente con las mismas enzimas de restricción, y el plásmido resultante es introducido en *E. coli*. Entre las colonias de *E. coli*, se seleccionan aquellos clones que tienen ADN que codifican la proteína deseada. Para la *E. coli* anfitriona, se pueden utilizar HB101, JM109, LE392, TB1, BL21 y similares, preferiblemente JM109. El método para la introducción de un gen incluye electroporación, protoplastos, PEG, etc. y se puede utilizar cualquiera de estas técnicas. La clonación de un gen deseado se puede confirmar mediante purificación del plásmido y determinación de la secuencia de nucleótidos. Se puede realizar una serie de estos procedimientos para la recombinación genética de acuerdo con una técnica general para la recombinación genética como describen Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989. En la práctica, se puede realizar con un kit disponible en el mercado de acuerdo con las instrucciones adjuntas.

### **(2) Expresión y Purificación de la proteína SpaA o $\Delta$ SpaA insoluble**

Realizando una mutación puntual en un sitio específico en el gen clonado que codifica la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA e introduciendo el gen resultante en *E. coli*, se puede expresar una proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA intrínsecamente soluble en forma de cuerpos de inclusión insolubles.

La mutación puntual se puede realizar mediante mutagénesis dirigida al sitio. En la práctica, se puede utilizar un kit disponible en el mercado, incluyendo Site-Directed Mutagenesis System de Takara (Mutan-Super Express Km, Mutan-Express Km, Mutan-K, etc.), QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit o QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene, o GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System de Invitrogen, de acuerdo con las instrucciones adjuntas. La mutación puntual también puede ser producida reemplazando un fragmento de ácido nucleico de un tamaño adecuado en el cual se ha introducido una mutación puntual.

Alternativamente, como la sustitución de nucleótidos de un número no especificado en sitios no especificados se puede producir en los genes amplificados a una cierta velocidad cuando se realiza una PCR normal, ésta se puede realizar para la introducción de una sustitución de nucleótidos. Si los nucleótidos sustituidos afectan a los codones de aminoácidos, se puede producir una mutación de un aminoácido, posibilitando de este modo la aparición de clones que forman cuerpos de inclusión. Seleccionando estos clones, se pueden obtener los cuerpos de inclusión.

Una proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA soluble es expresada en E. coli en forma de cuerpos de inclusión insolubles p. ej. mediante sustitución en el 69<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal por glicina; la sustitución del 154<sup>o</sup> aminoácido por glicina; la sustitución del 203<sup>o</sup> aminoácido por treonina; la sustitución del 214<sup>o</sup> aminoácido por glutamina; la sustitución del 253<sup>o</sup> aminoácido por treonina; el 278<sup>o</sup> aminoácido por glicina; y/o la sustitución del 531<sup>o</sup> aminoácido por glicina. De este modo, la mutación puntual del gen de SpaA se realiza de manera que se pueden producir estas sustituciones de aminoácidos. Los cuerpos de inclusión se forman introduciendo una mutación de aminoácido en al menos uno de los sitios descritos más arriba pero es posible que la mutación de aminoácido sea introducida en todos estos sitios con tal que los mutantes resultantes sigan siendo inmunogénicos. Preferiblemente, la mutación puntual en el gen de SpaA se realiza de manera que el 69<sup>o</sup> aminoácido de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA es sustituido por glicina; el 214<sup>o</sup> aminoácido es sustituido por glutamina; el 278<sup>o</sup> aminoácido es sustituido por glicina; el 531<sup>o</sup> aminoácido es sustituido por glicina; el 154<sup>o</sup> y el 203<sup>o</sup> aminoácidos son sustituidos por glicina y treonina, respectivamente; el 214<sup>o</sup> y el 253<sup>o</sup> aminoácidos son sustituidos por glutamina y treonina, respectivamente; o el 69<sup>o</sup>, el 154<sup>o</sup> y el 203<sup>o</sup> aminoácidos son sustituidos por glicina, glicina y treonina, respectivamente.

La región y el tamaño de la proteína  $\Delta$ SpaA, obtenida mediante delección de una porción de la proteína SpaA, no están sometidos a restricción con tal que la proteína  $\Delta$ SpaA siga siendo inmunogénica y, cuando se introduzca la sustitución de aminoácido, sea capaz de formar cuerpos de inclusión y a través de lo cual se puede utilizar en la presente memoria una proteína  $\Delta$ SpaA en la que al menos aproximadamente 1/3 del extremo C-terminal de la proteína SpaA está suprimido. Preferiblemente, la proteína  $\Delta$ SpaA comprende 420 residuos aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal por delección de 207 aminoácidos en el extremo C.

Alternativamente, también es posible transformar a la inversa la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA insoluble en una proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA soluble introduciendo una sustitución de aminoácido de una manera inversa a la descrita más arriba. De este modo, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, cualquiera de las proteínas SpaA o  $\Delta$ SpaA soluble o insoluble puede ser obtenida sin restricción según demande la ocasión.

La expresión del gen que codifica la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA en la que se ha realizado una mutación puntual se puede llevar a cabo como se ha descrito más arriba para la clonación del gen. El vector de expresión puede ser uno disponible en el mercado y se selecciona como anfitrión una E. coli apropiada. Por ejemplo, se puede utilizar BL21(DE3) o DH5 $\alpha$ (DE3) para un vector con un promotor de T7; HB101, DH5 $\alpha$  o JM109 para un vector con un promotor de triptófano. Preferiblemente, se puede utilizar una combinación de un vector pET11d (Novagen), que permite la clonación concomitante y la expresión de una proteína deseada, con la cepa BL21 de E. coli.

La E. coli recombinante que expresa la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA puede ser escrutada como se describe más abajo. En presencia de un inductor de la expresión (en el caso de un sistema de expresión como el utilizado en la presente invención, se utiliza IPTG), las células cultivadas y desarrolladas se recogen por centrifugación a una velocidad baja y se suspenden en una cantidad de agua destilada. Las células se desorganizan mediante sonicación o por medio de un homogeneizador tal como Prensa French, Manton Galling y se centrifugan a alta velocidad (15.000 rpm, 15 minutos) para recuperar los cuerpos de inclusión en los productos precipitados. Se puede añadir apropiadamente agua destilada con un tensioactivo (p. ej. Triton X100), un agente quelante (p. ej. EDTA), lisozima, etc. De nuevo, el producto precipitado se suspende en una cantidad adecuada de agua destilada y se aplica una cantidad de la suspensión a una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Después de teñir con Azul Brillante de Coomassie, se confirma la expresión de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA por el tamaño molecular y la imagen teñida. Se puede determinar la cantidad de cuerpos de inclusión formados comparando las cantidades de proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA en el sobrenadante y en los productos precipitados después de la centrifugación como se ha descrito más arriba. De acuerdo con la presente invención, se puede encontrar en los productos precipitados aproximadamente 90% o más de proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA. Para la confirmación (o detección) de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA, también se pueden utilizar procedimientos basados en una reacción antígeno-anticuerpo tal como ELISA, transferencia Western, transferencia puntual, y similares además de los basados en el tamaño molecular. Estos han sido utilizados comúnmente para la detección de una proteína foránea expresada en E. coli y cualquiera de estos puede ser seleccionado adecuadamente según demande la ocasión.

Para la purificación de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA a partir de las células de E. coli que expresan la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA obtenidas de este modo, se puede utilizar el método descrito en la publicación de patente Japonesa Núm. 2002-34568 o los procedimientos de purificación comúnmente utilizados en la química de las proteínas tales como, p. ej. centrifugación, precipitación por adición de sal, ultrafiltración, precipitación isoelectrónica, electroforesis, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía hidrófoba, cromatografía con hidroxapatita, o una combinación de los mismos. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se



puede lograr una pureza de 90% o más de la proteína SpaA o ΔSpaA tratando un cultivo de células de *E. coli* que expresan la proteína SpaA o ΔSpaA con cualquiera o con ambos de una enzima (p. ej. lisozima) y/o sonicación (p. ej. un homogeneizador celular de tipo haz de sonido), seguido de repetición de la centrifugación (p. ej. 15.000 rpm, 15 minutos) y suspensión en un tampón de lavado (p. ej. Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 1%).

### **(3) Inmunogenicidad de la proteína SpaA o ΔSpaA**

La inmunogenicidad de la proteína SpaA o ΔSpaA obtenida de este modo se puede determinar inmunizando ratones u otros animales, infectados por *Erysipelothrix rhusiopathiae*, con estas proteínas y sensibilizando a los animales con una cepa virulenta de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. También se puede determinar el modo de inmunización, p. ej., la ruta de administración tal como subcutánea, intramuscular o intraperitoneal, el periodo de la inmunización, etc., comúnmente utilizados para investigar la inmunogenicidad de una vacuna. Más específicamente, la proteína antigénica se diluye seriadamente 5 veces en solución salina con un suplemento de gel de hidróxido de aluminio al 25% (vol/vol) para preparar una dilución seriada que se utiliza para la inmunización de 5 a 10 ratones (ddy, 5 semanas de edad, hembra) por dilución mediante administración subcutánea. Tres semanas después de la inmunización, los ratones recibieron una inyección transdérmica de células vivas de la cepa Fujisawa, una cepa virulenta de *Erysipelothrix rhusiopathiae*, y se observó la supervivencia o muerte de los ratones durante 10 días. Los efectos inmunizantes de la proteína antigénica se pueden evaluar por medio de una dosis protectora mediana (DP50).

La proteína SpaA o ΔSpaA de la presente invención, después de la purificación en una forma insoluble, puede ser solubilizada con un agente solubilizante tal como urea, hidrocloreto de guanidina o hidrocloreto de arginina, sometida a filtración estéril a través de un filtro de membrana etc., y utilizada como sustancia para preparar una vacuna para la protección de animales sensibles tales como p. ej. jabalíes salvajes, ballenas, pollos, pavos y seres humanos frente a la infección por *Erysipelothrix rhusiopathiae* u otros patógenos. La proteína SpaA o ΔSpaA preparada de este modo puede ser formulada en una composición farmacéutica mezclándola apropiadamente con un coadyuvante inmunológico tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, aceite mineral o aceite no mineral, un agente estabilizante tal como Polisorbato 80, un aminoácido o azúcares tales como lactosa o sacarosa, y un agente conservante tal como formalina, timerosal, 2-fenoxietanol, alcohol bencílico, cloruro de benzetonio o cloruro de benzalconio. Cuando se añaden azúcares tales como lactosa o sacarosa como cargas, también se puede formular en forma de una dosificación liofilizada.

La presente invención se explica con más detalle por medio de los siguientes Ejemplos. En los siguientes Ejemplos, se utilizaron los reactivos fabricados por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., TAKARA SHUZO CO., LTD. o Difco a menos que se mencione de otro modo.

### **Ejemplo 1**

#### **(1) Clonación de genes que codifican proteínas SpaA y ΔSpaA**

Se cultivaron *Erysipelothrix rhusiopathiae*, cepa Fujisawa y cepa Koganai de tipo 1, y cepa Tama 96 y cepa SE-9 de tipo 2, en medio de Infusión Cerebro-Corazón (Difco) con un suplemento de Tween 80 al 0,1% a 37°C durante 16 a 48 horas. El cultivo (aproximadamente 1,5 a 3,0 mL) se centrifugó. Se extrajo el ADN del genoma total a partir del producto precipitado obtenido (aproximadamente 0,03 g o más) con un kit de extracción de ADN (Isoplant, NIPPON GENE CO., LTD.).

Con el ADN del genoma total como molde, se realizó la PCR utilizando cebadores sintéticos (un par de SEQ ID NO: 3 y 4, un par de SEQ ID NO: 3 y 5), preparados basándose en la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1, y LAPCR Kit (TAKARA). La solución de reacción se mantuvo a 94°C durante 3 minutos y después se repitió durante 30 ciclos un ciclo de 94°C durante 60 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. El cebador de SEQ ID NO: 3 se diseñó para amplificar la región aguas abajo desde el 79<sup>o</sup> nucleótido del gen de SpaA en el que se había añadido un sitio NcoI en su extremo 5'. Los cebadores de los SEQ ID NO: 4 y 5 se diseñaron para amplificar la región hasta el 1260<sup>o</sup> y el 1881<sup>o</sup> (codón de terminación del gen de SpaA) nucleótidos del gen de SpaA, respectivamente, en el que se había añadido el sitio BamHI en su extremo 5'. La PCR proporciona un gen de SpaA que tiene la secuencia de nucleótidos desde el 79<sup>o</sup> al 1881<sup>o</sup> y el gen de ΔSpaA que tenía la secuencia de nucleótidos desde el 79<sup>o</sup> al 1260<sup>o</sup>.

Los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR fueron digeridos dualmente con NcoI y BamHI y los productos digeridos resultantes fueron ligados con un plásmido pET11d (Novagen), que había sido digerido dualmente con anterioridad con NcoI y BamHI, utilizando ADN ligasa de T4. Esta solución de reacción se mezcló con *E. coli* JM109. La mezcla se dejó reposar en hielo durante varias decenas de segundos, se aplicó agar LB (Tryptona al 1,0%, Extracto de Levadura al 0,5%, NaCl al 1,0%, agar al 1,5%, pH 7,0) con un suplemento de 50 µg/ml de ampicilina y se dejó reposar a 37°C durante la noche. Se inoculó una sola colonia en 1 a 5 mL de medio LB con un suplemento de 50 µg/ml de ampicilina y el medio se sacudió de 30 a 37°C, seguido de un tratamiento rutinario para extraer los plásmidos que contienen el gen que codifica las proteínas SpaA y ΔSpaA de las células (Figs. 1-a y 1-b).

**(2) Expresión de las proteínas SpaA y ΔSpaA**

Como se describe en el Ejemplo 1-(1), los plásmidos de cada una de las diferentes cepas fueron introducidos en E. coli BL21(DE3) para dar colonias individuales del transformante. Las colonias individuales fueron inoculadas en 1 a 5 mL de medio LB con un suplemento de 50 µg/ml de ampicilina y cultivadas mientras se sacudía de 30 a 37°C hasta que la D.O. a 600 nm del cultivo alcanzó de 0,6 a 1,0. Se añadió 1/100 del volumen de IPTG (100 mM) al cultivo y el cultivo con sacudimiento continuó a 37°C durante 2 a 3 horas. El cultivo se mezcló con un volumen equivalente de 2×tampón de muestra SDS y, después de calentar a 100°C durante 2 minutos, la mezcla se aplicó a una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y se tiñó con Azul Brillante de Coomassie (Nacalai Tesque). Para todas las cepas, se detectaron bandas de alrededor de 70 y 45 kD, a partir de las cuales se confirmó la expresión de las proteínas SpaA y ΔSpaA mediante la imagen teñida. La Fig. 2A muestra los resultados de la SDS-PAGE para las proteínas SpaA y ΔSpaA derivadas de la cepa SE-9; la Fig. 2B muestra los resultados de la SDS-PAGE para las proteínas SpaA y ΔSpaA derivadas de la cepa Fujisawa, la cepa Tama 96, la cepa Koganai y la cepa SE-9.

**(3) Forma de las proteínas SpaA y ΔSpaA**

Se investigó si se habían formado cuerpos de inclusión de las proteínas SpaA y ΔSpaA como se describe más abajo. El cultivo del Ejemplo 1-(2) se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos y el producto precipitado resultante se añadió a 1/5 - 1/10 del volumen, basándose en el cultivo, de un tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 1%) o agua destilada y las células se suspendieron hasta su uniformidad. A la suspensión se le añadió 1/100 del volumen de una solución de lisozima (10 mg/ml) durante la reacción a 30°C durante 15 minutos. La mezcla enfriada con hielo se sometió a sonicación con un sonicador manual (fabricante: Tomy; Modelo: UR-20P; Rendimiento: 5; Tiempo: 15 segundos, 2 a 4 veces) y se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos. Una vez que se hubo recogido el sobrenadante, el producto precipitado se añadió a un volumen equivalente, basándose en la mezcla sometida a sonicación antes de la centrifugación, de un tampón de lavado y de nuevo las células se suspendieron hasta su uniformidad. A cada uno del sobrenadante y el producto precipitado recogidos se les añadió un volumen equivalente de 2x tampón de muestra SDS. Después de calentar, se aplicó cada una de las mezclas a una SDS-PAGE y se tiñó con Azul Brillante de Coomassie. Si se encontraba proteína ΔSpaA en la suspensión de producto precipitado, se evaluaba dicha proteína ΔSpaA para determinar la formación de cuerpos de inclusión (Fig. 3). Como resultado, se detectó la formación de cuerpos de inclusión en varios clones de la cepa SE-9 (Tabla 1). La Tabla 1 muestra el número de clones que formaban cuerpos de inclusión entre el número de clones investigados. NR significa "no realizado".

Tabla 1

	Clones que forman cuerpos de inclusión/Clones que expresan ΔSpaA	Clones que forman cuerpos de inclusión/Clones que expresan SpaA
Cepa Fujisawan	0/3	NR
(tipo 1)		
Cepa SE-9	3/30	1/15
(tipo 2)		
Cepa Tama 96	0/3	NR
(tipo 2)		
Cepa Koganai	0/3	NR
(tipo 1)		

**(4) Determinación de la secuencia de nucleótidos en clones que forman cuerpos de inclusión**

A continuación, se extrajeron los plásmidos de los cuatro clones de la cepa SE-9 de la Tabla 1 que formaban cuerpos de inclusión (Núm. 1, Núm. 2, Núm. 3 y Núm. 4) y se analizó la secuencia de nucleótidos del gen que codificaba la proteína ΔSpaA encargándose a TAKARA BIO INC., centro de servicios personalizados. Al comparar con la secuencia del SEQ ID NO: 7, se observaron sustituciones de aminoácidos debidas a las mutaciones de nucleótidos representadas en la Tabla 2.

Tabla 2

Posición de Nucleótido	Sustitución de Nucleótido	Clon
	(sustitución de aminoácido correspondiente)	
206 <sup>o</sup>	de A a G (el 69 <sup>o</sup> ácido glutámico a glicina)	Núm. 2
461 <sup>o</sup>	de A a G (el 154 <sup>o</sup> ácido glutámico a glicina)	Núm.2
608 <sup>o</sup>	de T a C (la 203 <sup>a</sup> isoleucina a treonina)	Núm. 2
642 <sup>o</sup>	de T a G (la 214 <sup>a</sup> histidina a glutamina)	Núm. 1
758 <sup>o</sup>	de T a C (la 253 <sup>a</sup> metionina a treonina)	Núm.1
833 <sup>o</sup>	de A a G (el 278 <sup>o</sup> ácido aspártico a glicina)	Núm. 3
1591 <sup>o</sup>	de A a G (la 531 <sup>a</sup> arginina a glicina)	Núm. 4

## 5 **Ejemplo 2**

### **(1) Expresión de proteínas en forma de cuerpos de inclusión mediante sustitución de aminoácidos de la proteína ΔSpaA**

10 Se construyeron plásmidos en los cuales los fragmentos de ADN con las sustituciones de nucleótidos representadas en la Tabla 2 producidos escindiendo los plásmidos a partir de los clones que formaban cuerpos de inclusión en el Ejemplo 1-(4) con las enzimas de restricción adecuadas fueron reemplazados por la correspondiente región del gen que codificaba la proteína ΔSpaA en los plásmidos extraídos de los clones (cepa SE-9) que expresaban la proteína ΔSpaA soluble.

15 Específicamente,

20 1. (a) el plásmido del clon Núm. 1, después de la digestión dual con las enzimas de restricción EcoRI y ClaI, fue aplicado a una electroforesis en agarosa para aislar y separar un fragmento EcoRI-ClaI que comprendía el gen que codificaba la proteína ΔSpaA abarcando desde el 587<sup>o</sup> al 1152<sup>o</sup> nucleótidos (Fig. 4A-1). El fragmento obtenido fue insertado en el plásmido a partir de los clones (cepa SE-9) que expresaban la proteína ΔSpaA soluble previamente tratada con EcoRI y ClaI para preparar de ese modo un plásmido que comprendía el gen que codificaba la proteína ΔSpaA en la cual los nucleótidos 642<sup>o</sup> y 758<sup>o</sup> estaban sustituidos.

25 De la misma manera, se construyeron

30 2. (b) un plásmido en el cual se había insertado un fragmento EcoRI-ClaI que comprendía el gen que codificaba la proteína ΔSpaA abarcando desde los nucleótidos 587<sup>o</sup> a 1152<sup>o</sup> (Fig. 4A-b) del clon Núm. 3 (sustitución en el 833<sup>o</sup> nucleótido);

3. (c) un plásmido en el cual se había insertado un fragmento KpnI-ClaI que comprendía el gen que codificaba la proteína ΔSpaA abarcando desde los nucleótidos 266<sup>o</sup> a 1152<sup>o</sup> (Fig. 4A-c) del clon Núm. 2 (sustituciones en los nucleótidos 461<sup>o</sup> y 608<sup>o</sup>); y

35 4. (d) un plásmido en el cual se había insertado un fragmento EcoRI-ClaI que comprendía el gen que codificaba la proteína ΔSpaA abarcando desde los 587<sup>o</sup> 1152<sup>o</sup> (Fig. 4A-d) del clon Núm. 2 (sustitución en el nucleótido 608<sup>o</sup>).

40 5. (e) Se construyó un plásmido que comprendía el gen que codificaba la proteína ΔSpaA en el cual el 206<sup>o</sup> nucleótido había sido sustituido insertando un fragmento KpnI-ClaI que comprendía el gen que codificaba la proteína ΔSpaA soluble abarcando desde los nucleótidos 266<sup>o</sup> a 1152<sup>o</sup> (Fig. 4A-e) en el plásmido del clon Núm. 2 tratado con KpnI y ClaI.

45 6. (f) Se construyó un plásmido que comprendía el gen que codificaba la proteína ΔSpaA en el cual el nucleótido 642<sup>o</sup> había sido sustituido mediante mutagénesis dirigida al sitio (Takara, Mutan-Super Express Km). Específicamente, el plásmido (Fig. 1-b) de los clones (cepa SE-9) que expresaban la proteína ΔSpaA fue digerido dualmente con EcoRI y HindIII y el fragmento EcoRI-HindIII resultante (967 pb), que comprendía el gen que codificaba la proteína ΔSpaA que abarcaba desde los nucleótidos 587<sup>o</sup> a 1260<sup>o</sup> y una porción del plásmido pET11d, fue clonado en un plásmido vector pKF18k (Takara). Utilizando este plásmido como molde, se realizó la PCR como se describe en el Ejemplo 1-(1) con el oligonucleótido sintético para la mutagénesis del SEQ ID NO: 6, que comprendía una secuencia desde los nucleótidos 632<sup>o</sup> a 657<sup>o</sup> del gen que codificaba la proteína ΔSpaA en la cual el nucleótido T 642<sup>o</sup> había sido sustituido por G, 5 pmoles de los cebadores de selección anclados al Kit Mutan-Super

Express Km de Takara, 5 µl de 10× tampón LAPCR (+Mg<sup>2+</sup>), 8 µl de una mezcla de dNTP, 0,5 µl de una solución de polimerasa LA-Taq y agua destilada esterilizada hasta hacer un volumen total de 50 µl. La solución de PCR resultante, tras la precipitación/lavado con etanol, fue clonada en la cepa MV1184 de *E. coli* (Takara). El plásmido obtenido con la mutagénesis fue digerido dualmente con EcoRI y BamHI para separar y aislar un fragmento EcoRI-BamHI que comprendía el gen que codificaba la proteína ΔSpaA que abarcaba desde los nucleótidos 587<sup>o</sup> a 1260<sup>o</sup>. Este fragmento fue insertado en la correspondiente región del plásmido de los clones (cepa SE-9) que expresaban la proteína ΔSpaA soluble, una sustancia de partida, para dar el plásmido deseado. Del mismo modo, se construyó un plásmido que comprendía el gen que codificaba la proteína ΔSpaA en el cual el 642<sup>o</sup> nucleótido T había sido sustituido por G para la cepa Fujisawa y la cepa Tama 96 por medio del mismo procedimiento.

Los plásmidos obtenidos de este modo se utilizaron para la transformación de *E. coli* BL21(DE3) y se analizó la forma de las proteínas ΔSpaA expresadas. Como resultado, se encontró que cada proteína ΔSpaA de los transformantes con cualquiera de los plásmidos formaba cuerpos de inclusión.

## **(2) Expresión de la proteína en forma de cuerpos de inclusión mediante sustitución de aminoácidos de la proteína SpaA completa**

Se construyeron plásmidos en los cuales los fragmentos de ADN con las sustituciones de nucleótidos representadas en la Tabla 2 producidos escindiendo los plásmidos de los clones que formaban cuerpos de inclusión en el Ejemplo 1-(4) con las enzimas de restricción adecuadas fueron reemplazados por la correspondiente región en el gen que codificaba la proteína SpaA en los plásmidos extraídos de los clones (cepa SE-9) que expresaban la proteína SpaA soluble.

Específicamente,

1. (a) el plásmido del clon Núm.4, tras la digestión dual con las enzimas de restricción Clal y BamHI, fue aplicado a una electroforesis en agarosa para aislar y separar un fragmento Clal-BamHI (Fig. 4B-a) que comprendía una secuencia desde los nucleótidos 1152<sup>o</sup> a 1881<sup>o</sup> (codón de terminación del gen que codificaba la proteína SpaA) del gen que codificaba la proteína SpaA. El fragmento obtenido se insertó en el plásmido de los clones (cepa SE-9) que expresaban la proteína SpaA completa soluble tratados con Clal y BamHI para preparar de ese modo un plásmido que comprendía el gen que codificaba la proteína SpaA en el cual el nucleótido 1591<sup>o</sup> había sido sustituido.

2. (b) el plásmido obtenido en el Ejemplo 2-(1)-(a), tras la digestión dual con PstI y Clal, fue aplicado a una electroforesis en agarosa para aislar y separar un fragmento PstI-Clal (Fig. 4A-f) que comprendía una secuencia desde los nucleótidos 611<sup>o</sup> a 1152<sup>o</sup> del gen que codificaba la proteína ΔSpaA. El fragmento obtenido fue insertado en el plásmido de los clones (cepa SE-9) que expresaban la proteína SpaA completa soluble previamente tratados con PstI y Clal para preparar de ese modo un plásmido que comprendía el gen que codificaba la proteína SpaA en el cual los nucleótidos 642<sup>o</sup> y 758<sup>o</sup> habían sido sustituidos.

Los plásmidos obtenidos de este modo se utilizaron para la transformación de *E. coli* BL21(DE3) y se analizó la forma de las proteínas SpaA expresadas. Como resultado, se encontró que cada proteína SpaA de los transformantes con cualquiera de los plásmidos formaba cuerpos de inclusión (Fig. 5).

## **Ejemplo 3**

### **(1) Purificación de la proteína SpaA o ΔSpaA que forma cuerpos de inclusión**

Se cultivaron cada una de las células de *E. coli* que expresaban la proteína ΔSpaA en forma de cuerpos de inclusión obtenidas en el Ejemplo 2-(1) y las células de *E. coli* que expresaban la proteína SpaA completa en forma de cuerpos de inclusión obtenidas en el Ejemplo 2-(2). Se centrifugaron 100 ml de los cultivos a 10.000 rpm durante 5 minutos y el producto precipitado resultante se añadió a 1/5 - 1/10 del volumen, basándose en el cultivo, de un tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 1%) y las células se suspendieron hasta su uniformidad. A la suspensión se añadió 1/100 del volumen de una solución de lisozima (10 mg/ml) para que reaccionara a 30°C durante 15 minutos. La mezcla enfriada con hielo se sometió a sonicación con un homogeneizador celular de tipo haz de sonido (fabricante: Branson Sonic Power Co.,; Modelo: 350; Rendimiento: 4; Ciclo Pesado; 30%; Tiempo: 5 a 15 minutos) y se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos. Una vez recogido el sobrenadante, al producto precipitado se le añadió un volumen equivalente, basado en la mezcla sonicada antes de la centrifugación, de un tampón de lavado (o agua destilada esterilizada) y las células se suspendieron de nuevo hasta su uniformidad. La suspensión se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos. Después de recoger el sobrenadante, al producto precipitado se le añadió a un tampón de lavado (o agua destilada esterilizada). Este procedimiento de centrifugación/lavado se repitió de tres a cinco veces. Para el procedimiento de lavado final, se suspendió el producto precipitado después de la centrifugación en agua destilada esterilizada. La suspensión se centrifugó de nuevo a 15.000 rpm durante 15 minutos. Una vez recogido el sobrenadante, el producto precipitado se suspendió en 10 ml de urea 8 M. Mientras se sacudía suavemente a la temperatura ambiente durante 2 horas y después a 5°C durante 18 horas, la proteína de los cuerpos de inclusión se solubilizó para dar la proteína SpaA o ΔSpaA purificada. Tras la SDS-PAGE el gel se tiñó con Azul Brillante de Coomassie. La determinación con un

densitómetro demostró que las proteínas SpaA y ΔSpaA obtenidas de este modo tenían una pureza de 90% o más (Fig. 6).

**(2) Inmunogenicidad de la proteína SpaA o ΔSpaA**

La inmunogenicidad de la proteína SpaA o ΔSpaA se determinó como se describe más abajo. A 4 ml de una solución de la proteína SpaA o ΔSpaA purificada en el Ejemplo 3-(1) se añadieron 11 ml de solución salina y 5 ml de coadyuvante de gel de hidróxido de aluminio (ALHYDROGEL "85", Superfos Biosector) y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas para dar una solución de vacuna. Esta solución de vacuna se diluyó seriadamente 5 veces en solución salina con un suplemento de gel hidróxido de aluminio al 25% (vol/vol) para preparar una dilución seriada que se utilizó para la inmunización de 10 ratones (ddy, 5 semanas de edad, hembra) por dilución mediante la administración subcutánea de 0,5 ml. Tres semanas después de la inmunización, los ratones fueron sensibilizados mediante inyección transdérmica de aproximadamente 1.000 células bacterianas vivas de la cepa Fujisawa, una cepa virulenta de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. La supervivencia o muerte de los ratones se observó durante 10 días y se determinó una dosis protectora mediana (DP50) de la proteína purificada SpaA o ΔSpaA. Como se muestra en la Tabla 3, la proteína SpaA o ΔSpaA purificada mostró una inmunogenicidad extremadamente alta, esto es una dosis protectora mediana (DP50) de 0,0621 a 0,1885 µg. La dosis protectora mediana (dosis eficaz del 50%) en ratones fue calculada por el método de Behrens-Karber como describe Karber G: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. Exp. Path. Pharm., 162:480, 1931; "Saikingaku Jisshu Teiyo" [Summary Practice in Bacteriology], 5ª ed., Ed. por "alumni association of Ikagakukenyusho" [Medical Science Laboratory], Maruzen, p.564-565, y de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Dosis protectora mediana en ratones } (\mu\text{g}) = 10^m, m = X_4 - [(h_0 + h_1) (X_1 - X_0) \times 1/2 + (h_1 + h_2)$$

$$(X_2 - X_1) \times 1/2 + (h_2 + h_3) (X_3 - X_2) \times 1/2 + (h_4 + h_3) (X_4 - X_3) \times 1/2]$$

donde cada uno de X<sub>0</sub>, X<sub>1</sub>,...X<sub>4</sub>, representa el logaritmo de las dosis respectivas, y cada uno de h<sub>0</sub>, h<sub>1</sub>,...h<sub>4</sub> representa la correspondiente tasa de eficacia (número de supervivientes/número de sensibilizados) mediante la medida real. El logaritmo (X) de las respectivas dosis puede venir dado por la ecuación: X= Log10 [concentración de proteína de una muestra (µg/ml) × dosis en ratones (ml) ÷ veces de dilución].

Tabla 3

Proteína purificada	ΔSpaA			Spa	
	Sitio de sust. en el gen de SpaA	642 <sup>o</sup> 758 <sup>o</sup>	206 <sup>o</sup> 461 <sup>o</sup> 608 <sup>o</sup>	833 <sup>o</sup>	1591 <sup>o</sup>
Conc. proteína (mg/ml)	2,30	1,91	2,33	2,11	2,28
Veces de dilución	Núm. de supervivientes/ Núm. de sensibilizados	Núm. de supervivientes/ Núm. de sensibilizados	Núm. de supervivientes/ Núm. de sensibilizados	Núm. de supervivientes/ Núm. de sensibilizados	Núm. de supervivientes/ Núm. de sensibilizados
625	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
3125	9/10	8/10	10/10	10/10	10/10
15625	5/10	0/10	4/10	4/10	6/10
78125	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Dosis protectora mediana en ratones (µg)	0,0864	0,1885	0,0875	0,0793	0,0621

**APLICABILIDAD INDUSTRIAL**

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar una proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA soluble en E. coli en forma de cuerpos de inclusión insolubles. La aplicación del procedimiento de la presente invención a un procedimiento para la preparación de una proteína soluble permite el establecimiento de un procedimiento para preparar la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA a nivel práctico, lo que asegura la provisión estable de la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA en el mercado comercial. La proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA recombinante obtenida mediante el procedimiento de la presente invención conserva una inmunogenicidad equivalente a la de la proteína soluble original y se puede utilizar como sustancia para preparar una vacuna para la infección por Erysipelothrix rhusiopathiae sola o mezclada con diferentes aditivos tales como un agente estabilizante, un agente protector, un agente conservante, y similares. También se puede utilizar como antígeno para preparar un anticuerpo monoclonal/policlonal o como sustancia de búsqueda para investigar la unión entre anticuerpos anti-SpaA o anti- $\Delta$ SpaA y Erysipelothrix rhusiopathiae. Como tal, la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA obtenida mediante el procedimiento de la presente invención contribuiría enormemente al campo médico y de la investigación.

15

LISTA DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIÓN JURÍDICA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN QUIMIO-SERO-TERAPÉUTICA

5 <120> Un método para la producción del antígeno protector de superficie de *Erysipelothrix rhusiopathiae* en *Escherichia coli*

<130> 664968

10 <140> JP 2004-53882 <141> 2004-02-27

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1

<211> 1881

<212> ADN

<213> *Erysipelothrix rhusiopathiae*

20 <400> 1

```

atgaaaaaga aaaaacacct atttccgaaa gtaagtctta tgtcgtgctt acttttaaca 60
gcaatgccac tacaaacagc ttttgctgat tgcacagata tttctgtgat tccactaatc 120
ggggaacaag ttggattgct cccagtttta cctgggacag ggtacatgc tcaggaatac 180
aacaaaatga ctgatgctta tattgaaaaa ttggtatctc taattaatca aaaagtgaag 240
ccgtttctta taatgagcc aaaggggtac caaagtttcg aagcagtga tgaagagatt 300
aactcgattg taagtgaact taaaaatgaa ggaatgagtc ttcaaaacat tcaccatag 360
tttaaacaaa gcatccaaaa cctagcaact agaatcggct acagaagttt tatgcaggat 420
gctatgtatc ttgaaaatft tgaagatta acgattcctg aacttgatga agcatacgtt 480
gatttactcg tgaattacga ggtgaaacac cgtattttag taaaatatga aggtaaagtt 540
aaaggtagag ctcccttaga agcatttata gttcctctaa gagatagaat tcgtagtatg 600
aatgaaattg ctgcagaagt aaattatfta cctgaagcgc atgaggattt cttagtttca 660
gattcaagcg agtataatga caaactaaat aatatcaact ttgctttggg tctaggggtc 720
agcagattta ttgactataa cgggctcgaa aatatgatgg aaaagaact tcatccactg 780
tatcttgaac tttatgctat gcggagaaat cgccaaattc aagttgtaag agatgtatat 840
ccaaacttgg aacgtgcgaa cgcggttgtt gaatccttaa agacaattaa agatataaaa 900
caaaagagga agaaactaca ggaacttctt gaaatttata tccaaagaag tggagatgtt 960
cgaaaaccag atgtactcca acgattttatt ggaaaatatt aatcagtagt tgatgaagaa 1020
aaaaataaac ttcaagatta tttagaatca gatatttttg attcatatag tgtggatggc 1080
gagaaaataa gaaatgaaga aattacactc atcaatagag atgcatactt atctatgatt 1140
tacagagctc aatcgatttc ggaaattaag acgattcgtg cagattttaga atcacttgtc 1200
aaatcattcc aaaatgaaga aagtgactct aaagttagagc ctgaaagtcc cgttaaagta 1260
gaaaaaccag ttgatgaaga aaaacctaaa gatcaaaaga agctagtgtga tcaatcaaaa 1320
cccgaatcga attcaaaaga agggttggatt aagaaagata ataagtggtt ctatattgag 1380
aaatcaggtg gaatggcaac aggttggaaag aaggtagcag acaaatggta ctacctcgat 1440
aatacgggtg ctatagttac gggttggaag aaggtagcaa acaaatggta ctatctttaa 1500
aaatcaggtg caatggcaac aggatggaaag aaagtatcaa acaagtggta ctacctttaa 1560
aactcaggtg caatggcaac aggatggaaag aaagtatcaa acaagtggta ctacctttaa 1620
aattcaggtg caatggctac aggatggaaa aaggtagcaa acaaatggta ctacctttaa 1680
aactcaggtg cgatggcaac aggatggaaag aaagtatcga acaagtggta ctacctttaa 1740
aactcaggtg caatggctac aggatggaaa aaggtagcaa acaaatggta ctacctttaa 1800
aaatcaggtg tgatggttac aggttcaaaa tctattgatg gtaaaaagta tgcatttaag 1860
aacgatggaa gtttaaaata g 1881
    
```

<210> 2

25 <211> 626

<212> PRT

<213> *Erysipelothrix rhusiopathiae*

<400> 2

```

Met Lys Lys Lys Lys His Leu Phe Pro Lys Val Ser Leu Met Ser Cys
1 5 10 15
Leu Leu Leu Thr Ala Met Pro Leu Gln Thr Ala Phe Ala Asp Ser Thr
20 25 30
Asp Ile Ser Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Gln Val Gly Leu Leu Pro
35 40 45
Val Leu Pro Gly Thr Gly Val His Ala Gln Glu Tyr Asn Lys Met Thr
    
```

30

50 55 60  
 Asp Ala Tyr Ile Glu Lys Leu Val Ser Leu Ile Asn Gln Lys Val Lys  
 65 70 75 80  
 Pro Phe Leu Ile Asn Glu Pro Lys Gly Tyr Gln Ser Phe Glu Ala Val  
 85 90 95  
 Asn Glu Glu Ile Asn Ser Ile Val Ser Glu Leu Lys Asn Glu Gly Met  
 100 105 110  
 Ser Leu Gln Asn Ile His His Met Phe Lys Gln Ser Ile Gln Asn Leu  
 115 120 125  
 Ala Thr Arg Ile Gly Tyr Arg Ser Phe Met Gln Asp Ala Met Tyr Leu  
 130 135 140  
 Glu Asn Phe Glu Arg Leu Thr Ile Pro Glu Leu Asp Glu Ala Tyr Val  
 145 150 155 160  
 Asp Leu Leu Val Asn Tyr Glu Val Lys His Arg Ile Leu Val Lys Tyr  
 165 170 175  
 Glu Gly Lys Val Lys Gly Arg Ala Pro Leu Glu Ala Phe Ile Val Pro  
 180 185 190  
 Leu Arg Asp Arg Ile Arg Ser Met Asn Glu Ile Ala Ala Glu Val Asn  
 195 200 205  
 Tyr Leu Pro Glu Ala His Glu Asp Phe Leu Val Ser Asp Ser Ser Glu  
 210 215 220  
 Tyr Asn Asp Lys Leu Asn Asn Ile Asn Phe Ala Leu Gly Leu Gly Val  
 225 230 235 240  
 Ser Glu Phe Ile Asp Tyr Asn Arg Leu Glu Asn Met Met Glu Lys Glu  
 245 250 255  
 Leu His Pro Leu Tyr Leu Glu Leu Tyr Ala Met Arg Arg Asn Arg Gln  
 260 265 270  
 Ile Gln Val Val Arg Asp Val Tyr Pro Asn Leu Glu Arg Ala Asn Ala  
 275 280 285  
 Val Val Glu Ser Leu Lys Thr Ile Lys Asp Ile Lys Gln Arg Gly Lys  
 290 295 300  
 Lys Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ile Tyr Ile Gln Arg Ser Gly Asp Val  
 305 310 315 320  
 Arg Lys Pro Asp Val Leu Gln Arg Phe Ile Gly Lys Tyr Gln Ser Val  
 325 330 335  
 Val Asp Glu Glu Lys Asn Lys Leu Gln Asp Tyr Leu Glu Ser Asp Ile  
 340 345 350  
 Phe Asp Ser Tyr Ser Val Asp Gly Glu Lys Ile Arg Asn Lys Glu Ile  
 355 360 365  
 Thr Leu Ile Asn Arg Asp Ala Tyr Leu Ser Met Ile Tyr Arg Ala Gln  
 370 375 380  
 Ser Ile Ser Glu Ile Lys Thr Ile Arg Ala Asp Leu Glu Ser Leu Val  
 385 390 395 400  
 Lys Ser Phe Gln Asn Glu Glu Ser Asp Ser Lys Val Glu Pro Glu Ser  
 405 410 415  
 Pro Val Lys Val Glu Lys Pro Val Asp Glu Glu Lys Pro Lys Asp Gln  
 420 425 430  
 Lys Lys Leu Val Asp Gln Ser Lys Pro Glu Ser Asn Ser Lys Glu Gly  
 435 440 445  
 Trp Ile Lys Lys Asp Asn Lys Trp Phe Tyr Ile Glu Lys Ser Gly Gly  
 450 455 460  
 Met Ala Thr Gly Trp Lys Val Ala Asp Lys Trp Tyr Tyr Leu Asp  
 465 470 475 480  
 Asn Thr Gly Ala Ile Val Thr Gly Trp Lys Lys Val Ala Asn Lys Trp  
 485 490 495  
 Tyr Tyr Leu Glu Lys Ser Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Val  
 500 505 510  
 Ser Asn Lys Trp Tyr Tyr Leu Glu Asn Ser Gly Ala Met Ala Thr Gly  
 515 520 525  
 Trp Lys Lys Val Ser Asn Lys Trp Tyr Tyr Leu Glu Asn Ser Gly Ala  
 530 535 540  
 Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Val Ala Asn Lys Trp Tyr Tyr Leu Glu  
 545 550 555 560  
 Asn Ser Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Val Ser Asn Lys Trp  
 565 570 575  
 Tyr Tyr Leu Glu Asn Ser Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Val  
 580 585 590  
 Ala Asn Lys Trp Tyr Tyr Leu Asp Lys Ser Gly Met Met Val Thr Gly  
 595 600 605  
 Ser Lys Ser Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Ala Phe Lys Asn Asp Gly Ser  
 610 615 620  
 Leu Lys  
 625

- <210> 3
- <211> 37
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>

5



<223> Cebador efector diseñado para la preparación de la proteína SpaA y ΔSpaA mediante amplificación por PCR

<400> 3

5 catgccatgg ctttcgctga ttcgacagat atttctg 37

<210> 4

<211> 33

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador antisentido diseñado para la preparación de la proteína ΔSpaA mediante amplificación por PCR

15 <400> 4

cgcgatcct tatacttaa cgggacttc agg 33

20 <210> 5

<211> 38

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Cebador antisentido diseñado para la preparación de la proteína SpaA mediante amplificación por PCR

<400> 5

30 cgcgatccg tctatftaa acttccatcg ttctaaa 38

<210> 6

<211> 24

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

40 <223> oligonucleótido diseñado para la preparación de la proteína SpaA con una mutación puntual mediante mutagénesis dirigida al sitio

<400> 6

45 ctgaagcgca ggaggattc ttag 24

<210> 7

<211> 1748

<212> ADN z

50 <213> Erysipelothrix rhusiopathiae

<400> 7

tgattccact aatcggtgaa caagttgat tgctcccagt tttacctggg acagggatac 60  
 atgctcagga atacaacaaa atgactgatg cttatattga aaatttgga tctctaatta 120  
 atcaaaaagt gaagccgttt cttataaatg aaccaaaggg gtaçcaaagt ttcgaagcag 180

tgaatgaaga	gattaactcg	attgtaagtg	aacttaaca	tgaaggaatg	agtcctcaaa	240
acattcacca	tatgtttaaa	caaagcatcc	aaaacctagc	aactagaatc	ggctacagaa	300
gttttatgca	ggatgctatg	tatcttgaaa	atthttgaaag	attaacgatt	cctgaacttg	360
atgaagcata	cgttgattta	ctcgtgaatt	acgaggtgaa	acaccgtatt	ttagtaaaat	420
atgaagataa	agttaaaagg	agagctccat	tagaagcatt	tatagttcct	ctaagaaata	480
gaattcgtag	tatgaatgaa	attgctgcag	aagtaaat	tttacctgaa	gcgcatgagg	540
atctcttagt	ttcagatfca	agcgagtata	atgacaaact	aaataatata	aactttgctt	600
tgggtctagg	ggtcagcgag	tttattgact	ataaccggct	cgaaaatata	atggaaaaag	660
aaattcatcc	attgtatctt	gaactttatg	ctatgctggag	aaatcgccaa	attcaagttg	720
taagagatgt	atatccaaac	ttggaacgct	cgaacgcggt	tgttgaatcc	ttaaagcaaa	780
ttaaagatat	aaaacaaga	gagaagaaac	tacaggaact	tcttgaaatt	tatatccaaa	840
gaagtggaga	tgttcgaaaa	ccagatgtac	tccaacgatt	tattggaaaa	tatcaatcag	900
tagttgatga	agaaaaaaat	aaacttcaag	attatttaga	atcagatatt	tttgattcat	960
atagtgtgga	tggcgaagaaa	ataagaaata	aagaaattac	actcatcaat	agagatgcat	1020
acttatctat	gatttacaga	gctcaatcga	tttcggaaat	taagacgatt	cgctgcagatt	1080
tagaatcact	tgtcaaatca	ttccaaaaatg	aagaaaagtga	ttctaaagta	gagcctgaaa	1140
gtcccgttaa	agtacaaaaa	ccagttgata	aagaaaaacc	taaagatcaa	aagaagccag	1200
ttgatcaatc	aaaaccgaa	tcgaattcaa	aagaaggggtg	gattaagaaa	gataataagt	1260
ggttctatat	tgagaaatca	ggtggaatgg	caacaggatg	gaagaaggta	ggagacaaat	1320
ggtactacct	cgataaatcg	ggtgctatgg	ttacgggttg	gaagaaggta	gcaaacaaat	1380
ggtactacct	tgaaaactca	ggtgctatgg	caacaggatg	gaagaaagta	tcaaacaagt	1440
ggtactacct	tgaaaactca	ggtgctatgg	caacaggatg	gaagagagta	tcaaacaagt	1500
ggtactacct	tgaaaactca	ggtgctatgg	caacaggatg	gaaaaaggta	gcaaacaaat	1560
ggtactacct	tgaaaactca	ggtgctatgg	caacaggatg	gaagaaagta	tcaaacaagt	1620
ggtactacct	tgaaaactca	ggtgctatgg	caacaggatg	gaagaaata	gcaataaat	1680
ggtactacct	tgataaatca	ggaatgatgg	ttacaggttc	aaaatctatt	gatggtaaaa	1740
agtatgca						1748

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una variante de la proteína SpaA del antígeno protector de superficie de *Erysipelothrix rhusiopathiae* o de una forma reducida de la misma, la proteína  $\Delta$ SpaA, donde al menos aproximadamente 1/3 del extremo C de la proteína SpaA es suprimido, teniendo dicha variante inmunogenicidad y siendo expresada en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión, que comprende mutar un gen que codifica dicha proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA de manera que se pueda introducir una sustitución de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de dicha proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA, permitiendo que el gen mutado resultante sea expresado en *E. coli*, y seleccionando dicha variante que formaba cuerpos de inclusión entre las variantes expresadas, donde dicha sustitución de aminoácido es una o una combinación de más de una seleccionada del grupo que consiste en (1) a (7) descritos más abajo:

- (1) el 69<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;
- (2) el 154<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;
- (3) el 203<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por treonina;
- (4) el 214<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glutamina;
- (5) el 253<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por treonina;
- (6) el 278<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina; y
- (7) el 531<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina; o

donde dicha sustitución de aminoácido es una seleccionada del grupo que consiste en (a) a (h) descritos más abajo:

- (a) el 69<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;
- (b) el 203<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por treonina;
- (c) el 214<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glutamina;
- (d) el 278<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;
- (e) el 531<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;
- (f) el 154<sup>o</sup> y el 203<sup>o</sup> aminoácidos del extremo N terminal que abarca la secuencia señal son sustituidos por glicina y treonina, respectivamente;
- (g) el 214<sup>o</sup> y el 253<sup>o</sup> aminoácidos del extremo N terminal que abarca la secuencia señal son sustituidos por glutamina y treonina, respectivamente; y
- (h) el 69<sup>o</sup>, el 154<sup>o</sup> y el 203<sup>o</sup> aminoácidos del extremo N terminal que abarca la secuencia señal son sustituidos por glicina, glicina y treonina, respectivamente.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas (A) a (D):

- (A) introducir una mutación en un gen que codifica la proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA del antígeno protector de superficie de *Erysipelothrix rhusiopathiae* soluble de manera que se pueda introducir una sustitución de aminoácido;
- (B) transformar las células de *E. coli* con un vector de expresión que contiene el gen mutado resultante;
- (C) seleccionar las células de *E. coli* que formaron cuerpos de inclusión insolubles entre las células de *E. coli* transformadas anteriores; y
- (D) cultivar las células de *E. coli* seleccionadas para la recuperación de los cuerpos de inclusión en el interior de las células.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, que después de la etapa (D) comprende adicionalmente las etapas (E) a (F):

- (E) administrar los cuerpos de inclusión o los cuerpos de inclusión tratados con un agente solubilizante a un animal sensible a infección por *Erysipelothrix rhusiopathiae* y después atacar dicho animal con una cepa virulenta de *Erysipelothrix rhusiopathiae*; y

(F) observar la supervivencia o muerte del animal sensible a *Erysipelothrix rhusiopathiae* para evaluar de ese modo la presencia de actividad protectora (inmunogenicidad) frente a la infección por *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

5 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde dicho *Erysipelothrix rhusiopathiae* se selecciona del grupo que consiste en la cepa Fujisawa, la cepa Koganai, la cepa Tama 96, la cepa SE-9 y la cepa Shizuoka 63.

10 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la proteína SpaA o ΔSpaA antes de la introducción de dicha sustitución de aminoácido tiene la secuencia de aminoácidos representada en el SEQ ID NO: 2 o la secuencia representada en el SEQ ID NO: 2 con una delección en su extremo C, respectivamente.

15 6. Una variante de la proteína SpaA o de una forma reducida de la misma, ΔpaA del antígeno protector de superficie de *Erysipelothrix rhusiopathiae* donde al menos aproximadamente 1/3 del extremo C de la proteína SpaA es suprimido, donde la sustitución de aminoácido es una o una combinación de más de una seleccionada del grupo que consiste en (1) a (7) descritas más abajo:

(1) el 69<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;

20 (2) el 154<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;

(3) el 203<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por treonina;

(4) el 214<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glutamina;

25 (5) el 253<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por treonina;

(6) el 278<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina; y

30 (7) el 531<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina, que es inmunogénica y se expresa en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión.

35 7. Una variante de la proteína SpaA o de una forma reducida de la misma, ΔSpaA del antígeno protector de superficie *Erysipelothrix rhusiopathiae* donde al menos aproximadamente 1/3 del extremo C de la proteína SpaA es suprimido, donde se introduce una sustitución de aminoácido que es una seleccionada del grupo que consiste en (a) a (h) descritos más abajo:

(a) el 69<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;

40 (b) el 203<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por treonina;

(c) el 214<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glutamina;

(d) el 278<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;

45 (e) el 531<sup>o</sup> aminoácido del extremo N terminal que abarca la secuencia señal es sustituido por glicina;

(f) el 154<sup>o</sup> y el 203<sup>o</sup> aminoácidos del extremo N terminal que abarca la secuencia señal son sustituidos por glicina y treonina, respectivamente;

50 (g) el 214<sup>o</sup> y 253<sup>o</sup> aminoácidos del extremo N terminal que abarca la secuencia señal son sustituidos por glutamina y treonina, respectivamente; y

55 (h) el 69<sup>o</sup>, 154<sup>o</sup> y 203<sup>o</sup> aminoácidos del extremo N terminal que abarca la secuencia señal son sustituidos por glicina, glicina y treonina, respectivamente, que es inmunogénica y se expresa en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión.

60 8. La variante de la reivindicación 6 o 7 que se prepara mutando un gen que codifica la proteína SpaA o ΔSpaA para introducir una sustitución de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de dicha proteína SpaA o ΔSpaA, expresando el gen mutado de este modo en *E. coli*, y seleccionando entre las variantes expresadas aquellas que formaban cuerpos de de inclusión.

9. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 que se prepara mediante las siguientes etapas (A) a (D):

65 (A) introducir una mutación en un gen que codifica la proteína SpaA o ΔSpaA del antígeno protector de superficie de *Erysipelothrix rhusiopathiae* soluble de manera que se pueda introducir la sustitución de aminoácido;

- (B) transformar las células de E. coli con un vector de expresión que contiene el gen mutado resultante;
- 5 (C) seleccionar las células de E. coli que formaban cuerpos de inclusión insolubles entre las células de E. coli transformadas anteriores; y
- (D) cultivar las células de E. coli seleccionadas para la recuperación de los cuerpos de inclusión en el interior de las células.
- 10 10. La variante de la reivindicación 9, que se prepara mediante las siguientes etapas (E) a (F) posteriores a la etapa (D):
- (E) administrar los cuerpos de inclusión o los cuerpos de inclusión tratados con un agente solubilizante a un animal sensible a infección por Erysipelothrix rhusiopathiae y después atacar dicho animal con una cepa virulenta de Erysipelothrix rhusiopathiae; y
- 15 (F) observar la supervivencia o muerte del animal sensible a Erysipelothrix rhusiopathiae para evaluar de ese modo la presencia de una actividad protectora (inmunogenicidad) frente a la infección por Erysipelothrix rhusiopathiae.
- 20 11. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que tiene la secuencia de aminoácidos representada en el SEQ ID NO: 2 o la secuencia representada en el SEQ ID NO: 2 con la delección de su extremo C donde se introduce la sustitución de aminoácido.
- 25 12. La variante de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, donde dicha proteína SpaA o  $\Delta$ SpaA deriva de una seleccionada del grupo que consiste en la cepa Fujisawa, la cepa Koganai, la cepa Tama 96, la cepa SE-9 y la cepa Shizuoka 63.
- 30 13. Una composición que comprende como ingrediente activo la variante de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12.
14. Un gen que codifica la variante de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12.
15. El gen de la reivindicación 14, que tiene una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos por delección de una porción del extremo 3', que incluye una o una combinación de más de una sustitución de nucleótidos en el SEQ ID NO: 1 seleccionada del grupo que consiste en (1) a (7) descritas más abajo:
- 35 (1) el 206<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
- (2) el 461<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
- 40 (3) el 608<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es C;
- (4) el 642<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
- 45 (5) el 758<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es C;
- (6) el 833<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G; y
- 50 (7) el 1591<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G.
16. El gen de la reivindicación 14, que tiene una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos por delección de una porción del extremo 3', que incluye cualquier sustitución de nucleótidos en el SEQ ID NO: 1 seleccionada del grupo que consiste en (a) a (h) descritas más abajo:
- 55 (a) el 206<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
- (b) el 608<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es C;
- (c) el 642<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
- 60 (d) el 833<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G; y
- (e) el 1591<sup>o</sup> nucleótido de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 es G;
- 65 (f) el 461<sup>o</sup> y el 608<sup>o</sup> nucleótidos de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 son G y C, respectivamente;

(g) el 642<sup>o</sup> y el 758<sup>o</sup> nucleótidos de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 son G y C, respectivamente; y

5 (h) el 206<sup>o</sup>, el 461<sup>o</sup> y el 608<sup>o</sup> nucleótidos de la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 1 son G, G y C, respectivamente.

17. El uso de la variante de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, para la preparación de una vacuna para la infección por *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Fig. 1

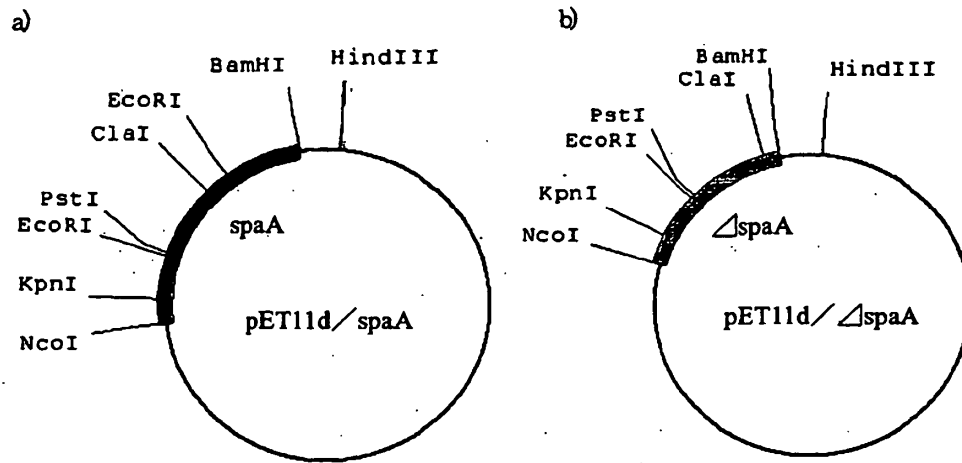


Fig. 2A

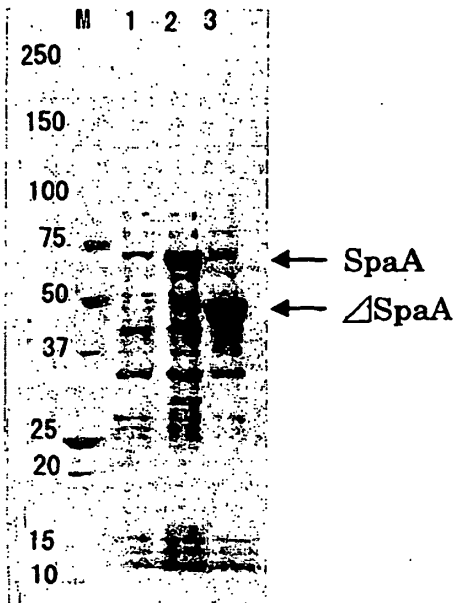


Fig. 2B

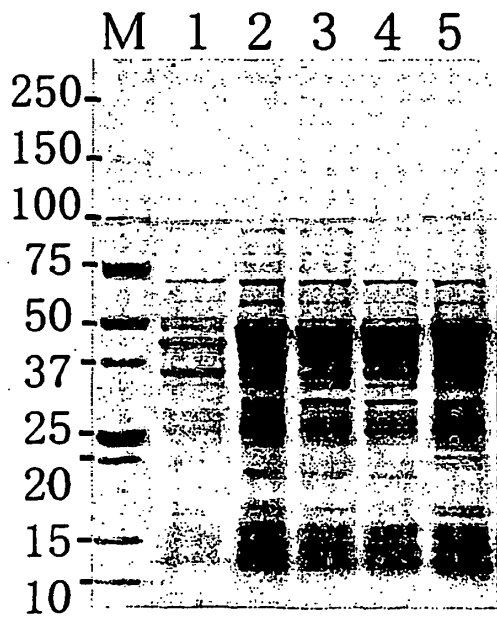
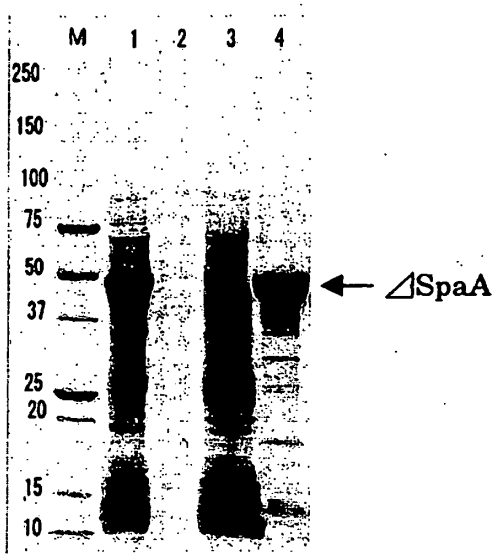
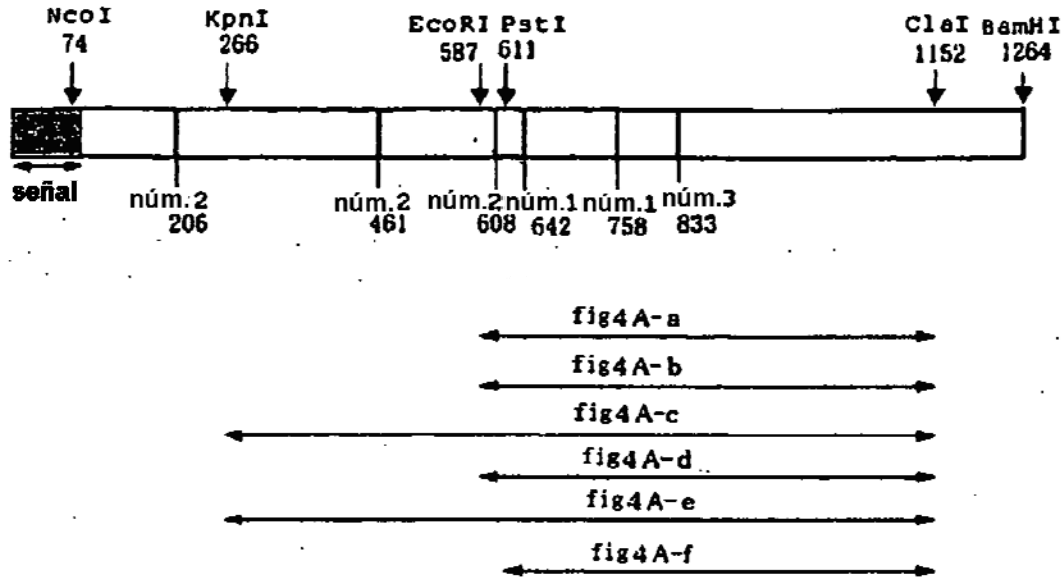




Fig. 3



**Fig. 4A**



**Fig. 4B**

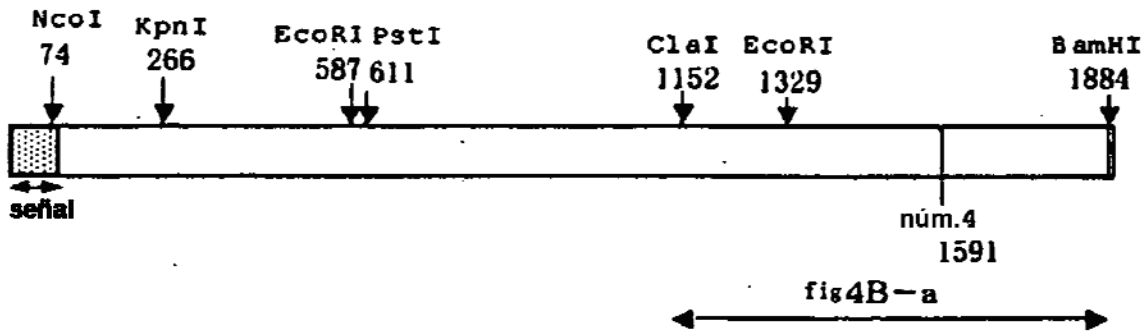


Fig. 5

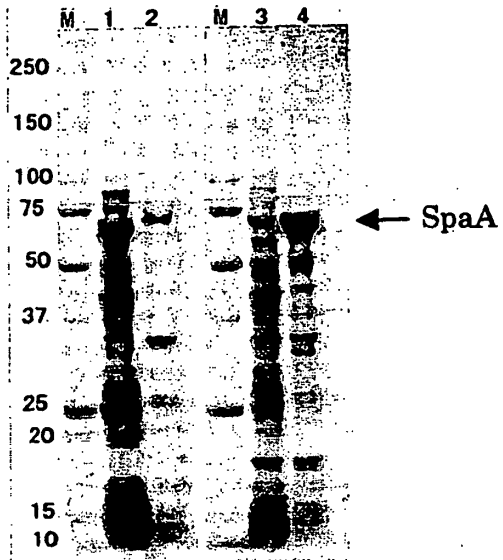


Fig. 6

