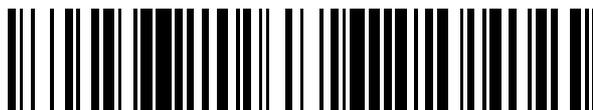


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 685**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 39/108 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 39/02 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2008 E 08722760 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 2169054**

54 Título: **Vacuna contra la enfermedad de edema porcino**

30 Prioridad:

03.07.2007 JP 2007174919

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

28.03.2016

73 Titular/es:

IDEMITSU KOSAN CO., LTD. (33.3%)
1-1 Marunouchi 3-chome Chiyoda-ku
Tokyo 100-8321, JP;
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NARA
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
(33.3%) y
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND
VETERINARY MEDICINE (33.3%)

72 Inventor/es:

SAWADA, KAZUTOSHI;
MATSUI, TAKESHI;
MAKINO, SOU-ICHI;
KAWAMOTO, KEIKO y
YOSHIDA, KAZUYA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 564 685 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

Vacuna contra la enfermedad de edema porcino

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un transformante transformado con un vector recombinante que comprende un constructo de ADN para producir una vacuna contra la enfermedad de edema porcino, a una vacuna contra la enfermedad de edema porcino que contiene un transformante transformado con el constructo de ADN y a una vacuna contra la enfermedad de edema porcino para su uso en el control de la enfermedad de edema porcino.

Técnica anterior

10 La enfermedad de edema porcino es una enfermedad bacteriana provocada por la proliferación rápida de *Escherichia coli* que tiene una Stx2e (bacteria de la enfermedad de edema) en el tracto intestinal superior, dando como resultado la absorción de la toxina en la sangre y se sabe que se produce con mayor incidencia en lechones una o dos semanas después del destete. La mortalidad por la infección con una bacteria de la enfermedad de edema es muy alta (del 50 al 90%). Actualmente, se usan diversos antibióticos para controlar la enfermedad de edema, pero el uso de los antibióticos está limitado debido a problemas tales como aparición de bacterias resistentes a fármacos.

15 Debido a esta situación, se han realizado estudios sobre vacunas contra la enfermedad de edema porcino para proporcionar un método de prevención eficaz de la enfermedad de edema porcino. Por ejemplo, se ha notificado un caso en el que se inmunizan cerdos con una proteína de toxina de bacteria de la enfermedad de edema destoxificada para prevenir la muerte provocada por la infección con la bacteria de la enfermedad de edema (documento no de patente 1). En este caso, se produce una proteína de toxina de bacteria de la enfermedad de edema destoxificada mediante una *Escherichia coli* recombinante y se inocula en los cerdos. Sin embargo, este método tiene el problema de que no se logra un bajo coste desde el punto de vista de la aplicación práctica de una vacuna contra la enfermedad de edema porcino debido a una cantidad insuficiente de la proteína de toxina de bacteria de la enfermedad de edema destoxificada producida por la *Escherichia coli* recombinante y a que la necesidad de inoculación de la vacuna mediante inyección directa o pulverización nasal de la proteína requiere trabajo humano.

20 Mientras tanto, se han realizado estudios sobre la producción de una sustancia útil por una planta usando una tecnología transgénica. Por ejemplo, se ha notificado la producción de la subunidad B de la proteína de toxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* por *Lactuca sativa* (documento no de patente 2). En este estudio, se expresa el gen de la subunidad B de una proteína LT con codones modificados en *Lactuca sativa* usando un promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) que sirve como promotor, que se expresa en una planta a alto nivel, y una secuencia Kozak que sirve como potenciador. Como resultado, se ha notificado que la subunidad B de la proteína LT se acumula en una cantidad de aproximadamente el 2,0% en masa basándose en las proteínas solubles totales de *Lactuca sativa*. Sin embargo, se considera que la cantidad de la proteína acumulada es insuficiente para controlar eficazmente una enfermedad bacteriana usando una planta transgénica. Es decir, es necesario producir eficazmente y acumular una proteína diana en células vegetales expresando el gen de la proteína diana a alto nivel.

25 Por otro lado, se sabe que la secuencia de bases de la región no traducida en 5' (NtADH5'UTR) de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de *Nicotiana tabacum* es un potenciador que puede actuar en *Arabidopsis thaliana* u *Oriza sativa* (documentos de patente 1 y 3). Sin embargo, no se ha notificado ningún caso en el que un gen que codifique para una proteína de toxina bacteriana se exprese usando la secuencia de bases de NtADH5' UTR.

[Documento no de patente 1] Makino *et al.*, Microbial Pathogenesis, volumen 31, número 1, julio de 2001, págs. 1-8(08)

[Documento no de patente 2] Kim *et al.*, Protein Expression and Purification, volumen 51, número 1, enero de 2006, págs. 22-27(06)

45 [Documento de patente 1] Documento JP 2003-79372 A

[Documento no de patente 3] Satoh *et al.* The 5'-untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant. J. Biosci. Bioeng. (2004)98, 1-8

50 El documento WO 99/18225 da a conocer un constructo de ADN que codifica una proteína de fusión que comprende una subunidad no tóxica de una enterotoxina y un péptido de señalización. La proteína de fusión puede comprender un péptido antigénico como la subunidad B de shigatoxina de *Shigella dysenteriae* que es distinta de la subunidad B de Stx2e de *Escherichia coli*. Satoh (J Bioscience Bioeng 98(1), 1-8 (2004)) da a conocer el uso de la región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa como promotor de la traducción. El documento EP-A1 1 057 895 da a conocer el uso de Stx2e como vacuna mediante inyección con jeringa con un adyuvante.

Divulgación de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una tecnología para producir una vacuna contra la enfermedad de edema porcino con bajo coste y alta eficacia. Específicamente, un objeto de la presente invención es producir una vacuna vegetal para la enfermedad de edema porcino con bajo coste expresando eficazmente en células vegetales una proteína de toxina de enfermedad de edema porcino (proteína Stx2e).

5 Los inventores de la presente invención han encontrado que una proteína Stx2e que incluye un péptido señal de secreción derivado de una planta añadido en el extremo amino terminal se expresa usando la región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de una planta (ADH5'UTR), con el resultado de que la proteína Stx2e puede expresarse eficazmente en una planta tal como *Lactuca sativa* y la proteína puede acumularse en la planta a alto nivel, completando por tanto la presente invención. Es decir, la divulgación de la presente invención es tal como sigue.

10 Una primera divulgación de la invención se refiere a un constructo de ADN que incluye una región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de *Nicotiana tabacum* y un ADN que codifica la subunidad B de la proteína Stx2e al que se añade un péptido señal de secreción derivado *Nicotiana tabacum* en el extremo amino terminal y operativamente unido a la región (denominado a continuación en el presente documento "constructo de ADN de la presente invención" en algunos casos).

15 La región no traducida en 5' del gen de alcohol deshidrogenasa se deriva de *Nicotiana tabacum*. Además, el péptido señal de secreción se deriva de *Nicotiana tabacum*. La proteína Stx2e es la subunidad B de la proteína Stx2e.

20 Además, la subunidad B de la proteína Stx2e incluye un péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o un péptido señal de transporte vacuolar añadido en el extremo carboxilo terminal. El péptido señal de retención en el retículo endoplasmático incluye una secuencia HDEL en el extremo carboxilo terminal. El péptido señal de transporte vacuolar se deriva preferiblemente de *Nicotiana tabacum*.

Además, el constructo de ADN que va a usarse según la presente invención incluye preferiblemente una secuencia de bases representada por cualquiera de SEQ ID NO: 23, 24, 75, 77, 78 y 86.

25 Una segunda divulgación de la invención se refiere a un vector recombinante que incluye el constructo de ADN que va a usarse según la presente invención (denominado a continuación en el presente documento "vector de la presente invención" en algunos casos).

Una tercera invención se refiere a un transformante transformado con el vector recombinante de la presente invención (denominado a continuación en el presente documento "transformante de la presente invención" en algunos casos).

30 El transformante de la presente invención es preferiblemente una célula vegetal transformada o una planta transformada. Además, la planta es preferiblemente *Lactuca sativa*.

Una cuarta invención se refiere a una semilla que comprende la célula vegetal transformada (denominada a continuación en el presente documento "semilla de la presente invención" en algunos casos).

35 Una quinta invención se refiere a una vacuna contra la enfermedad de edema porcino que incluye el transformante de la presente invención (denominada a continuación en el presente documento "vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención" en algunos casos).

40 Una sexta invención se refiere a la vacuna contra la enfermedad de edema porcino para su uso en el control de la enfermedad de edema porcino, en la que la vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención se prepara para su administración a un cerdo (denominada a continuación en el presente documento "vacuna contra la enfermedad de edema porcino para su uso en el control de la enfermedad de edema porcino de la presente invención" en algunos casos).

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 es un diagrama que muestra construcciones de vectores de expresión indicadores de GFP. En el diagrama, el símbolo "→" representa un sitio de iniciación de la traducción, y el símbolo "∇" representa un sitio que va a cortarse tras la traducción.

La figura 2 es un diagrama que muestra construcciones de vectores de expresión de Stx2eB. En el diagrama, el símbolo "→" representa un sitio de iniciación de la traducción, y el símbolo "∇" representa un sitio que va a cortarse tras la traducción.

50 La figura 3 es un diagrama que muestra una secuencia de bases diseñada de mStx2eB 1-4 comparada basándose en CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>).

La figura 4 es un diagrama que muestra un concepto de síntesis de mStx2eB mediante PCR.

La figura 5 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos mediante: el desarrollo de productos de PCR en un

- gel de agarosa al 1,5%; la tinción del gel con bromuro de etidio; y la detección de bandas de ADN mediante irradiación por UV (fotografías).
- 5 La figura 6 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos mediante: el desarrollo de una disolución obtenida tras la PCR directa en un gel de agarosa al 1,5%; la tinción del gel con bromuro de etidio; y la detección de bandas de ADN mediante irradiación por UV (fotografías).
- La figura 7 es un diagrama que muestra construcciones de vectores de expresión de Stx2eA. En el diagrama, el símbolo “→” representa un sitio de iniciación de la traducción, y el símbolo “∇” representa un sitio que va a cortarse tras la traducción.
- 10 La figura 8 es un diagrama que muestra los estados de expresión de indicadores de GFP en protoplasto de *Lactuca sativa* (fotografías).
- La figura 9 es un diagrama que muestra cantidades de Stx2eB acumuladas en protoplasto de *Lactuca sativa* transformada con vectores de expresión de Stx2eB a los que se añadió cada péptido señal (fotografía).
- 15 La figura 10 es un diagrama que muestra cantidades de Stx2eB acumuladas en protoplasto de *Lactuca sativa* transformada con vectores de expresión de Stx2eB con codones modificados a los que se añadieron péptidos señal de retención en el retículo endoplasmático (fotografía).
- La figura 11 es un diagrama que muestra cantidades de Stx2eB acumuladas en protoplasto de *Lactuca sativa* transformada con vectores de expresión de Stx2eB con codones modificados a los que se añadieron péptidos señal de retención en el retículo endoplasmático (fotografía).
- 20 La figura 12 es un diagrama que muestra las cantidades de Stx2eA acumuladas en protoplasto de *Lactuca sativa* transformada con vectores de expresión de Stx2eA a los que se añadieron péptidos señal de retención en el retículo endoplasmático (fotografía).
- La figura 13 es un diagrama que muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE de la proteína fusionada Stx2eB-GST (fotografía). M: marcador, 1: disolución en urea 8 M de Stx2eB, 2: disolución de Stx2eB-GST replegada (muestra aplicada), 3: fracción no unida, 4: fracción eluida por el primer lavado, 5: fracción eluida por el segundo lavado, 6: muestra eluida (fracción unida).
- 25 La figura 14 es un diagrama que muestra los resultados de la inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo anti-VT2 (fotografía).
- La figura 15 un diagrama que muestra los resultados de la determinación del título de anticuerpo mediante administración nasal de proteína fusionada Stx2eB-GST.
- 30 La figura 16 es un diagrama que muestra las cantidades de Stx2eB acumuladas en células cultivadas de *Nicotiana tabacum* BY2 transformadas con un vector de expresión de Stx2eB al que se añadieron péptidos señal de retención en el retículo endoplasmático (fotografía).
- La figura 17 es un diagrama que muestra una secuencia de bases diseñada de mStx2eB5 comparada basándose en CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>).
- 35 La figura 18 es un diagrama que muestra las cantidades de Stx2eB acumuladas en células cultivadas de *Nicotiana tabacum* BY2 transformadas con un vector de expresión de Stx2eB con codones modificados al que se añadieron péptidos señal de retención en el retículo endoplasmático (fotografía).
- La figura 19 es un diagrama que muestra las cantidades de Stx2eB acumuladas en células cultivadas de *Nicotiana tabacum* BY2 transformadas con un vector de expresión de Stx2eB con codones modificados al que se añadieron péptidos señal de retención en el retículo endoplasmático (fotografía).
- 40 La figura 20 es un diagrama que muestra los títulos de anticuerpo de IgA específica de Stx en heces recogidas en el día 0 de administración forzada de una bacteria de la enfermedad de edema.
- La figura 21 es un diagrama que muestra los títulos de anticuerpo de IgG específica de Stx en sangre recogida en el día 0 de administración forzada de una bacteria de la enfermedad de edema.
- 45 La figura 22 es un diagrama que muestra el número de bacterias de la enfermedad de edema en heces recogidas en el día 3 de administración forzada de una bacteria de la enfermedad de edema.
- La figura 23 es un diagrama que muestra las razones de conversión de pienso durante todo el periodo.
- La figura 24 es un diagrama que muestra los cambios en las razones de conversión de pienso.
- 50 La figura 25 es un diagrama que muestra los cambios en las puntuaciones de síntomas clínicos promedio por lechón.

La figura 26 es un diagrama que muestra los promedios de las puntuaciones de síntomas clínicos totales por lechón durante todo el periodo.

La figura 27 son fotografías de un lechón del grupo al que no se le administró la vacuna contra la enfermedad de edema y un lechón del grupo al que se le administró la vacuna contra la enfermedad de edema en el día 11 de administración de una bacteria de la enfermedad de edema.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Un constructo de ADN que va a usarse según la presente invención se caracteriza por incluir la región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de *Nicotiana tabacum* y un ADN que codifica la subunidad B de la proteína Stx2e al que se añade un péptido señal de secreción derivado de *Nicotiana tabacum* en el extremo amino terminal y operativamente unido a la región.

La región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa es una región que incluye una secuencia entre la base en el sitio de iniciación de la transcripción de un gen que codifica un gen de alcohol deshidrogenasa y la base antes del sitio de iniciación de la traducción (ATG, metionina). La región tiene la capacidad de aumentar el nivel de traducción. La "capacidad de aumentar el nivel de traducción" es la capacidad de aumentar la cantidad de una proteína producida por traducción cuando se transcribe la información codificada en un gene estructural y, posteriormente, se traduce para producir una proteína. La región se deriva de *Nicotiana tabacum*.

La región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa es de manera particularmente preferible una región que incluye la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1, por ejemplo, la secuencia de bases de la región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de *Nicotiana tabacum*.

La región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de una planta puede aislarse a partir de un gen de alcohol deshidrogenasa de una célula vegetal cultivada en la que se expresa altamente una alcohol deshidrogenasa (véase el documento JP 2003-79372 A). Mientras tanto, en el caso de una región que tiene una determinada secuencia de bases, tal como la región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de *Nicotiana tabacum*, la región puede sintetizarse mediante síntesis química o PCR usando un ADN genómico como molde y usando las secuencias de bases de los extremos 5' y 3' terminales de la región como cebadores. Además, si parte de la región que tiene una determinada secuencia de bases se usa como sonda, puede buscarse y aislarse la región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de otra planta.

La región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa representado por la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1 puede tener una sustitución, delección, inserción o adición de una o varias bases siempre que la región tenga la capacidad de aumentar el nivel de traducción. El término "varios" es un número de preferiblemente 2 a 10, de manera adicionalmente preferiblemente de 2 a 5, de manera particularmente preferible de 2 a 3.

Además, puede usarse un ADN que tiene una identidad de preferiblemente el 85% o más, de manera particularmente preferible el 90% o más con respecto la región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa y que tiene la capacidad de aumentar el nivel de traducción.

Si la región mencionada anteriormente tiene la capacidad de aumentar el nivel de traducción o no puede confirmarse mediante: por ejemplo, un ensayo transitorio usando el gen de GUS (β -glucuronidasa) o gen de luciferasa como gen indicador en células cultivadas de *Nicotiana tabacum*; un ensayo en células transformadas modificadas por ingeniería genética para portar la región en un cromosoma; etc.

La región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de *Nicotiana tabacum* está unida a un ADN que codifica una subunidad B de una proteína Stx2e al que se añade un péptido señal de secreción derivado de *Nicotiana tabacum* en el extremo amino terminal de modo que puede expresarse el ADN. La expresión "puede expresarse el ADN" se refiere al hecho de que la subunidad B de la proteína Stx2e se produce en células huésped cuando un vector obtenido insertando el constructo de ADN de la presente invención en un vector que incluye un promotor adecuado se introduce en células huésped adecuadas. Además, el término "unido" se refiere a un caso en el que dos ADN se unen directamente y un caso en el que dos ADN se unen por medio de otra secuencia de bases.

La proteína Stx2e es una proteína de toxina de una bacteria de la enfermedad de edema e incluye una subunidad A que es una toxina en sí misma y cinco subunidades B implicadas en la invasión de la mucosa intestinal. La subunidad A está representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y la subunidad B está representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

El ADN que codifica una proteína Stx2e incluido en un constructo de ADN de la presente invención es un ADN que codifica sólo para la subunidad B. Sin embargo, en el caso en el que se incluye un ADN que codifica la subunidad A, la secuencia de bases del ADN se modifica preferiblemente antes de su uso de modo que la subunidad A producida no tenga toxina.

En el constructo de ADN de la presente invención, el ADN que codifica una proteína Stx2e es un ADN que codifica sólo la subunidad B.

La subunidad B de la proteína Stx2e codificada en un constructo de ADN de la presente invención puede incluir sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de la proteína Stx2e (SEQ ID NO: 3) siempre que la proteína pueda provocar una respuesta inmunitaria cuando se administra a un cerdo. El término "varios" es, en el caso de la subunidad A, un número de preferiblemente 2 a 30, de manera adicionalmente preferible de 2 a 20, de manera todavía adicionalmente preferible de 2 a 10; mientras que el término es, en el caso de la subunidad B, un número de preferiblemente 2 a 10, de manera adicionalmente preferible de 2 a 5, de manera todavía adicionalmente preferible de 2 a 3.

Además, la proteína puede ser una proteína que tiene una identidad de preferiblemente el 85% o más, más preferiblemente el 90% o más, de manera particularmente preferible el 95% o más con respecto a la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de la proteína Stx2e (SEQ ID NO: 3) y puede provocar una respuesta inmunitaria cuando se administra a un cerdo.

Un ADN que codifica la subunidad B de la proteína Stx2e puede producirse fácilmente mediante una técnica de modificación por ingeniería genética general basándose en las secuencias de bases de SEQ ID NO: 5. Específicamente, se usa una bacteria de la enfermedad de edema que puede producir una subunidad B de la proteína Stx2e para preparar una biblioteca de ADNc según un método convencional, y se selecciona un clon de interés usando una sonda preparada basándose en las secuencias de bases mencionadas anteriormente de la biblioteca, para de ese modo producir un ADN que codifica la subunidad B de la proteína Stx2e. Además, el ADN puede sintetizarse mediante síntesis química basándose en la secuencia de bases o PCR usando las secuencias de bases mencionadas anteriormente de los extremos terminales en 5' y 3' como cebadores y usando ADN genómico como molde.

En la secuencia de bases de un ADN que codifica la subunidad B de la proteína Stx2e que va a usarse para la preparación de un constructo de ADN de la presente invención, los codones que muestran residuos de aminoácido que constituyen la subunidad B de la proteína Stx2e se modifican preferiblemente dependiendo de las células huésped para producir la proteína de modo que se aumenta el nivel de traducción de la subunidad B de la proteína Stx2e.

Los codones pueden modificarse con referencia al método de Kang *et al.* (2004), por ejemplo (el método se describirá en detalle en los ejemplos). Además, los codones pueden modificarse: seleccionando codones que se usan frecuentemente en las células huésped; seleccionando codones con alto contenido en GC; o seleccionando codones que se usan frecuentemente en un gen de mantenimiento de las células huésped.

Los ejemplos de una secuencia de bases obtenida modificando codones en la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 5 incluyen secuencias de bases representadas por SEQ ID NO: 6 a 9 y 79. En la preparación de un constructo de ADN de la presente invención, se usa preferiblemente un ADN que tiene la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 6, 8, 9 ó 79.

Además, puede usarse un ADN que se hibrida con un ADN que tiene cualquiera de las secuencias de bases de SEQ ID NO: 5 a 9 en condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que se forma un denominado híbrido específico y no se forma un híbrido no específico. Los ejemplos de las mismas incluyen condiciones en las que ADN que tienen una alta identidad de, por ejemplo, preferiblemente el 80% o más, más preferiblemente el 90% o más, y de manera particularmente preferible el 95% o más, se hibridan entre sí y ADN que tienen una identidad menor del valor no se hibridan entre sí. Por ejemplo, las condiciones incluyen la hibridación en 2XSSC (NaCl 330 mM, ácido cítrico 30 mM) y a 42°C.

El ADN que codifica la subunidad B de la proteína Stx2e se une al ADN que codifica un péptido señal de secreción derivado de *Nicotiana tabacum* de modo que el péptido señal de secreción se añade al extremo amino terminal de la subunidad B de la proteína Stx2e. El término "añadido" se refiere a un caso en el que el péptido señal de secreción se une directamente al extremo amino terminal de la subunidad B de la proteína Stx2e y un caso en el que el péptido señal de secreción se une por medio de otro péptido al extremo amino terminal de la subunidad B de la proteína Stx2e. En el caso en el que el ADN que codifica la proteína Stx2e codifica una proteína Stx2e que incluye tanto la subunidad A como la subunidad B, con el fin de expresar la subunidad A y la subunidad B como una proteína fusionada, el ADN que codifica la proteína Stx2e puede unirse al ADN que codifica el péptido señal de secreción de modo que el péptido señal de secreción se añade al extremo amino terminal de la proteína fusionada, mientras que con el fin de expresar por separado la subunidad A y la subunidad B, el ADN que codifica la proteína Stx2e puede unirse al ADN que codifica el péptido señal de secreción de modo que el péptido señal de secreción se añade a los extremos amino terminales tanto de la subunidad A como de la subunidad B.

El péptido señal de secreción se deriva preferiblemente de una planta que pertenece a la familia *Solanaceae*, *Brassicaceae* o *Asteraceae*, de manera adicionalmente preferible una planta que pertenece al género *Nicotiana*, *Arabidopsis*, *Lactuca*, etc., más preferiblemente *Nicotiana tabacum* o *Arabidopsis thaliana*, *Lactuca sativa*, etc.

Además, se deriva preferiblemente de una β -D-glucano exohidrolasa de *Nicotiana tabacum* o una peroxidasa de 38 kDa de *Nicotiana tabacum* (registro de GenBank D42064).

Los ejemplos del péptido señal de secreción incluyen un péptido que se deriva de una β -D-glucano exohidrolasa de

Nicotiana tabacum y tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 10. La secuencia de bases de un ADN que codifica el péptido señal de secreción se representa por SEQ ID NO: 11, por ejemplo.

5 El ADN que codifica el péptido señal de secreción puede buscarse y aislarse de diversas plantas o puede obtenerse de ADNc de diversas plantas usando una sonda preparada basándose en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 11 u obtenida mediante una técnica tal como síntesis química o PCR basada en la secuencia de bases.

El constructo de ADN de la presente invención es preferiblemente un constructo de ADN en el que se unen un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1, un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 11 y un ADN que consiste en cualquiera de las secuencias de bases de SEQ ID NO: 5 a 9.

10 El ADN que codifica la subunidad B de la proteína Stx2e se une al ADN que codifica un péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o un péptido señal de transporte vacuolar de modo que el péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o el péptido señal de transporte vacuolar se añade al extremo carboxilo terminal de la subunidad B de la proteína Stx2e. El término "añadido" se refiere a un caso en el que el péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o el péptido señal de transporte vacuolar se enlaza directamente al extremo carboxilo terminal de la subunidad B de la proteína Stx2e y un caso en el que el péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o el péptido señal de transporte vacuolar se enlaza por medio de otro péptido al extremo carboxilo terminal de la subunidad B de la proteína Stx2e. En el caso en el que el ADN que codifica una proteína Stx2e codifica una proteína Stx2e que incluye tanto la subunidad A como la subunidad B, con el fin de expresar la subunidad A y la subunidad B como una proteína fusionada, el ADN que codifica la proteína Stx2e puede unirse al ADN que codifica un péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o péptido señal de transporte vacuolar de modo que el péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o el péptido señal de transporte vacuolar se añade al extremo carboxilo terminal de la proteína fusionada, mientras que con el fin de expresar por separado la subunidad A y la subunidad B, el ADN que codifica la proteína Stx2e puede unirse al ADN que codifica un péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o péptido señal de transporte vacuolar de modo que el péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o el péptido señal de transporte vacuolar se añade a los extremos carboxilo terminales de ambas o una de la subunidad A y la subunidad B.

15 El péptido señal de retención en el retículo endoplasmático incluye una secuencia HDEL (SEQ ID NO: 14). Por ejemplo, el péptido señal de retención en el retículo endoplasmático que incluye la secuencia HDEL es preferiblemente un péptido señal de retención en el retículo endoplasmático representado por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, o similar. Obsérvese que la secuencia de bases de un ADN que codifica el péptido señal de retención en el retículo endoplasmático se representa por SEQ ID NO: 18, por ejemplo.

20 El péptido señal de transporte vacuolar se deriva preferiblemente de una planta que pertenece a la familia Solanaceae, Brassicaceae o Asteraceae, de manera adicionalmente preferible una planta que pertenece al género *Nicotiana*, *Arabidopsis*, *Armoraci*, etc., más preferiblemente *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Armoracia rusticana*, etc. Además, el péptido se deriva preferiblemente de una quitinasa. La secuencia de aminoácidos de un péptido señal de transporte vacuolar derivado de una quitinasa de *Nicotiana tabacum* se representa por SEQ ID NO: 19. Mientras tanto, la secuencia de bases de un ADN que codifica un péptido señal de transporte vacuolar derivado de una quitinasa de *Nicotiana tabacum* se representa por SEQ ID NO: 20, por ejemplo.

25 Además, el péptido se deriva preferiblemente de una isozima C1a de peroxidasa del rábano. La secuencia de aminoácidos de un péptido señal de transporte vacuolar derivado de una isozima C1a de peroxidasa del rábano se representa por SEQ ID NO: 21. Mientras tanto, la secuencia de bases de un ADN que codifica un péptido señal de transporte vacuolar derivado de una isozima C1a de peroxidasa del rábano se representa por SEQ ID NO: 22.

30 El constructo de ADN que va a usarse según la presente invención es un constructo de ADN que incluye la región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de *Nicotiana tabacum*, un ADN que codifica la subunidad B de la proteína Stx2e que incluye un péptido señal de secreción derivado de *Nicotiana tabacum* añadido el extremo amino terminal y un péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o que incluye un péptido señal de transporte vacuolar añadido en el extremo carboxilo terminal. En el constructo de ADN, se unen un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 1, un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 11, un ADN que consiste en cualquiera de las secuencias de bases de SEQ ID NO: 5 a 9 y un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 18 ó 20. Los ejemplos del constructo de ADN de la presente invención al que se añade un péptido señal de retención en el retículo endoplasmático incluyen un constructo de ADN que tiene cualquiera de las secuencias de bases de SEQ ID NO: 23, 75, 77, 78 y 86. Los ejemplos del constructo de ADN de la presente invención al que se añade un péptido señal de transporte vacuolar incluyen un constructo de ADN que tiene las secuencias de bases de SEQ ID NO: 24.

35 El constructo de ADN de la presente invención puede prepararse mediante una técnica de modificación por ingeniería genética general, que incluye los siguientes procedimientos: digerir ADN que incluyen la región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de una planta, un ADN que codifica un péptido señal de secreción derivado de una planta y un ADN que codifica una proteína Stx2e, y opcionalmente un ADN que codifica un péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o un péptido señal de transporte vacuolar con enzimas de restricción adecuadas; y ligar los fragmentos resultantes con una ligasa adecuada.

El vector recombinante de la presente invención se caracteriza por incluir el constructo de ADN de la presente invención. El vector recombinante de la presente invención puede ser un vector obtenido insertando un ADN que codifica la subunidad B de la proteína Stx2e al que se añade un péptido señal de secreción derivado de *Nicotiana tabacum* en el extremo N-terminal en un vector de modo que el ADN puede expresarse en células huésped en las que va a introducirse el vector. El vector no está particularmente limitado siempre que pueda replicarse en células huésped, y los ejemplos del mismo incluyen un ADN de plásmido y un ADN viral. Además, el vector incluye preferiblemente un marcador selectivo tal como un gen de resistencia a fármacos. El ADN de plásmido puede prepararse a partir de *Escherichia coli* o *Agrobacterium* mediante el método de extracción alcalina (Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979) Nucleic Acid Res 7: 1513) o un método modificado del mismo. Pueden usarse plásmidos disponibles comercialmente tales como pBI221, pBI121, pBI101 y pIG121Hm. El ADN viral puede ser, por ejemplo, pTB2 (Donson *et al.*, 1991) (véase Donson J., Kerney CM., Hilf ME., Dawson WO. Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. Proc. Natl. Acad. Sci. (1991) 88: 7204-7208).

Los promotores que van a usarse en los vectores pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo de las células huésped en las que van a introducirse los vectores. Los promotores son preferiblemente un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell *et al.*, 1985, Nature 313:810), un promotor de actina de arroz (Zhang *et al.* 1991 Plant Cell 3:1155), un promotor de ubiquitina de maíz (Cornejo *et al.*, 1993, Plant Mol. Biol., 23:567), etc. por ejemplo. Mientras tanto, los terminadores que van a usarse en vectores pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo de las células huésped en las que van a introducirse los vectores. Los terminadores son preferiblemente un terminador de la transcripción del gen de nopalina sintasa, un terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor, etc.

El vector recombinante de la presente invención puede prepararse tal como sigue.

En primer lugar, se digiere un constructo de ADN de la presente invención con una enzima de restricción adecuada, o se añade un sitio de enzima de restricción al constructo de ADN mediante PCR. Posteriormente, el constructo de ADN se inserta en el sitio de enzima de restricción o sitio de clonación múltiple de un vector.

El transformante de la presente invención se caracteriza por transformarse con el vector recombinante de la presente invención. Las células huésped que van a usarse para la transformación pueden ser células eucariotas o células procariotas.

Las células eucariotas son preferiblemente células vegetales, de manera particularmente preferible células de plantas que pertenecen a la familia *Asteraceae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae* y *Chenopodiaceae*. Además, las células eucariotas son preferiblemente células de plantas que pertenecen al género *Lactuca*, de manera particularmente preferible células de *Lactuca sativa*. En el caso de usar células de *Lactuca sativa* como células huésped, puede usarse el promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor o similar.

Las células procariotas pueden ser células de *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, etc.

El transformante de la presente invención puede prepararse mediante una técnica de modificación por ingeniería genética general introduciendo un vector de la presente invención en células huésped. Por ejemplo, el transformante puede prepararse mediante el método de introducción que usa *Agrobacterium* (Hood, *et al.*, 1993, Transgenic, Res. 2:218, Hiei, *et al.*, 1994 Plant J. 6:271), un método de electroporación (Tada, *et al.* 1990, Theor. Appl. Genet. 80:475), un método de polietilenglicol (Lazzeri, *et al.*, 1991, Theor. Appl. Genet. 81: 437), un método de pistola de partículas (Sanford, *et al.*, 1987, J. Part. Sci. tech. 5:27), un método de policones (Ohtsuki), etc.

Tras la introducción del vector de la presente invención en las células huésped, puede seleccionarse un transformante de la presente invención basándose en el fenotipo de un marcador selectivo. Si se cultiva el transformante seleccionado, puede producirse la subunidad B de la proteína Stx2e. El medio de cultivo y las condiciones para el cultivo pueden seleccionarse adecuadamente dependiendo del tipo de transformante.

Además, en el caso de usar una célula vegetal como célula huésped, el cultivo de una célula vegetal seleccionada según un método convencional puede regenerar una planta y acumular la proteína Stx2e en las células vegetales o fuera de las membranas celulares de las células vegetales. El método depende del tipo de célula vegetal, y los ejemplos del mismo incluyen el método de Visser *et al.* (Theor. Appl. Genet, 78:594 (1989)) para patata y el método de Nagata y Takebe (Planta, 99:12(1971)) para *Nicotiana tabacum*.

En el caso de *Lactuca sativa*, puede regenerarse un brote en medio MS que contiene NAA (ácido naftalenoacético) 0,1 mg/l, BA (benciladenina) 0,05 mg/l y polivinilpirrolidona 0,5 g/l, y el cultivo del brote regenerado en un medio 1/2 MS que contiene polivinilpirrolidona 0,5 g/l puede provocar el arraigamiento.

La semilla de la presente invención puede obtenerse recogiendo una semilla de una planta regenerada como anteriormente. Si la semilla de la presente invención se siembra y se cultiva mediante un método adecuado, puede obtenerse una planta que puede producir una subunidad B de la proteína Stx2e y se incluye en el transformante de la presente invención.

La vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención se caracteriza por incluir un transformante de la presente invención. La vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención

puede incluir todo o parte del transformante que contiene la subunidad B de la proteína Stx2e de la presente invención. Además, el transformante puede usarse sin tratamientos adicionales, o el transformante puede secarse o pulverizarse antes de su uso. Además, la vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención puede contener un adyuvante que puede aumentar la inmunogenicidad de la subunidad B de la proteína Stx2e. En general, en vista de la seguridad, se usa hidróxido de aluminio o similar como adyuvante. Mientras tanto, la propia subunidad B de una proteína Stx2e tiene actividad adyuvante, y por tanto, en el caso en el que el constructo de ADN de la presente invención incluye un ADN que codifica la subunidad B, puede lograrse una alta inmunogenicidad a menos que se añada adicionalmente un adyuvante.

La vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención para su uso en el control de la enfermedad de edema porcino se prepara para administrar la vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención a un cerdo. La inmunización con la vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención se realiza preferiblemente para lechones que tienen una mayor incidencia de enfermedad de edema. Los ejemplos del método de inmunización incluyen: un método que incluye administrar la vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención a una cerda madre para proporcionar un anticuerpo producido por la cerda madre a un lechón por medio de la leche; y un método que incluye administrar la vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención a un lechón para inmunizar directamente el lechón.

Los ejemplos de la administración de la vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención a un cerdo incluyen: administrar una mezcla de pienso para cerdos con la vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención a un cerdo; y administrar por vía nasal la vacuna a un cerdo. En este caso, la dosis de la vacuna es preferiblemente de 4 mg al día o más, más preferiblemente 16 mg al día o más basándose en la masa de la proteína Stx2e. La vacuna contra la enfermedad de edema porcino se administra preferiblemente múltiples veces en un determinado intervalo. Por ejemplo, la vacuna se administra cada de 4 a 7 días dos veces o tres veces en total.

Ejemplos (1) Construcción del vector de expresión de GFP

Con el fin de estudiar el control de la localización de proteínas en células de *Lactuca sativa*, se prepararon de la siguiente manera vectores de expresión que incluían un ADN que codifica una proteína fluorescente verde (GFP) que incluían cada péptido señal añadido (figura 1).

Se amplificó la región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de *Nicotiana tabacum* (5'UTR de NtADH, SEQ ID NO: 1) mediante PCR usando ADH-221 (Sato *et al.*, 2004) como molde y usando el cebador ADH XbaI-F (SEQ ID NO: 25) y el cebador ADH NsiI-R (SEQ ID NO: 26). Se amplificó la región de ADN que codifica un péptido señal de β -D glucano exohidrolasa (registro de GenBank AB017502) (SEQ ID NO: 11) usando un ADN genómico de *Nicotiana tabacum* como molde y usando el cebador β D NsiI-F (SEQ ID NO: 27) y el cebador β D EcoRI-R (SEQ ID NO: 28). Se trataron los fragmentos de ADN resultantes de la 5'UTR de NtADH y el péptido señal con NsiI (fabricado por TOYOBO CO., LTD.), y se realizó el ligamiento usando Ligation High (fabricado por TOYOBO CO., LTD.), seguido por hacer romos los extremos para clonar los fragmentos en el hueco de EcoRV de pBluescript II SK (fabricado por Stratagene) (plásmido 1).

Se trató el plásmido 1 con NsiI, y se hicieron romos los extremos terminales con ADN polimerasa de T4 (fabricada por TOYOBO CO., LTD.), seguido por autoligamiento para realizar la fusión de modo que el codón de iniciación de NtADH (atg) corresponde al codón de iniciación de beta-D glucano exohidrolasa (plásmido 2). Se insertó un ADN que codifica GFP que tiene un péptido señal de transporte vacuolar (SEQ ID NO: 19) en el extremo C-terminal (pSGFP5T, Di Sansebastiano *et al.*, 1998) en el plásmido 2 por medio del sitio EcoRI (GFP de tipo vacuolar).

Se realizó la PCR usando pSGFP5T como molde y usando el cebador GFP-F (SEQ ID NO: 29) y el cebador GFP-R (SEQ ID NO: 30). Se hicieron romos los extremos terminales de los fragmentos de ADN resultantes y se clonaron en el hueco de EcoRV de pBluescript II SK (plásmido 3). Se digirieron los fragmentos de GFP del plásmido 3 con EcoRI y XhoI y se insertaron en el hueco de EcoRI-XhoI del plásmido 2 (GFP de tipo apoplasto).

Se digirieron los fragmentos de GFP del plásmido 3 con NsiI y XhoI y se insertaron en el hueco de NsiI-EcoRI del plásmido 1 (GFP de tipo citosólico).

Se realizó la PCR usando pSGFP5 como molde y usando el cebador GFP-F y el cebador GFP HDEL-R (SEQ ID NO: 31). Se hicieron romos los extremos terminales de los fragmentos de ADN resultantes y se clonaron en el hueco de EcoRV de pBluescript II SK (plásmido 4). Se digirieron los fragmentos de GFP del plásmido 4 con EcoRI y XhoI y se insertaron en el hueco de EcoRI-XhoI del plásmido 2 (GFP de tipo retículo endoplasmático).

Se amplificó un fragmento de ADN que codifica un péptido señal de transporte al cloroplasto derivado de Rbcs de *Lactuca sativa* (subunidad pequeña de Rubisco) (registro de GenBank D14001) (péptido de tránsito, T.P., SEQ ID NO: 45) mediante PCR usando ADNc de una hoja de *Lactuca sativa* como molde y usando el cebador TP NsiI-F (SEQ ID NO: 32) y el cebador TP EcoRI-R (SEQ ID NO: 33). Se trataron los fragmentos resultantes con NsiI y EcoRI y se ligaron en el hueco de NsiI-EcoRI del plásmido 1 (plásmido 5). Se trató el plásmido 5 con NsiI, y se hicieron romos los extremos terminales con ADN polimerasa de T4 (fabricada por TOYOBO CO., LTD.), seguido por autoligamiento para realizar la fusión de modo que el codón de iniciación de NtADH corresponde al codón de

iniciación de Rbcs (plásmido 6). Se digirieron los fragmentos de GFP del plásmido 3 con EcoRI y XhoI y se insertaron en el hueco de EcoRI-XhoI del plásmido 6 (GFP de tipo cloroplasto).

Los vectores de expresión de GFP pueden construirse con referencia a los siguientes documentos.

5 Di Sansebastiano *et al.*, Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. *Plant J.* (1998) 15, 449-457.

Satoh *et al.*, The 5'-untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant. *J. Biosci. Bioeng.* (2004) 98, 1-8.

Los GFP de tipo localizado mencionados anteriormente se insertaron tal como sigue en el sitio de clonación múltiple (MCS) de un vector de expresión transitoria en células vegetales, pBI221 (Clontech).

10 Con el fin de introducir sitios Sall, KpnI y SmaI en el MCS, se aparearon SalKpnSma-F (SEQ ID NO: 34) y SalKpnSma-R (SEQ ID NO: 35) y se fosforilaron con polinucleótido cinasa de T4 (PNK de T4) (TaKaRa) y se insertaron en el hueco de SacI de pBI221 (plásmido 7). Se insertaron los GFP de tipo localizado en el plásmido 7 usando XbaI y KpnI, y se dispuso el producto resultante entre un promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (pro. de 35S) y un terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintasa (NOS-T), para preparar de
15 ese modo un vector de expresión de GFP.

(2) Construcción del vector de expresión de Stx2eB

Se prepararon vectores que incluyen un constructo de ADN de la presente invención que incluye un ADN que codifica la subunidad B de la proteína Stx2e (Stx2eB) (SEQ ID NO: 5) al que se añade cada péptido señal tal como sigue.

20 Se realizó la PCR usando el cebador Kozak-stx2eb-F (SEQ ID NO: 36) y el cebador stx2eb-R (SEQ ID NO: 37) para amplificar un fragmento de ADN que codifica la región madura de una Stx2eB (excluyendo los péptidos señal de secreción al periplasma, A1a19 a Asn87). Se clonó el fragmento de ADN resultante en el hueco de EcoRV de pBluescript II SK. Se digirió el plásmido resultante con HindIII y se trató con ADN polimerasa de T4, y se realizó el autoligamiento para convertir el sitio HindIII en el sitio NheI (plásmido 8).

25 Se digirió el fragmento de Kozak-Stx2eB del plásmido 8 con XbaI y KpnI y se insertó en el hueco de XbaI-KpnI del plásmido 7, para preparar de ese modo un vector de expresión de Stx2eB de tipo citosólico ligado a Kozak (Kozak-Cytosol-Stx2eB) (plásmido 9).

30 Se amplificó el fragmento de 5'UTR de NtADH usando el cebador ADH XbaI-F y ADH BamHI-R (SEQ ID NO: 38). Se trató el fragmento de ADN resultante con XbaI y BamHI insertado en el hueco de XbaI-BamHI del plásmido 9, para preparar de ese modo un vector de expresión de Stx2eB de tipo citosólico ligado a 5'-UTR de NtADH (ADH-Cytosol-Stx2eB) (plásmido 10).

35 Se realizó la PCR usando el plásmido 2 como molde y usando el cebador β D-Kozak-F (SEQ ID NO: 39) y el cebador β D BamHI-R (SEQ ID NO: 40) para amplificar el ADN que codifica un péptido señal de secreción. Se trató el fragmento de ADN resultante con XbaI y BamHI y se insertó en el hueco de XbaI-BamHI del plásmido 9 (plásmido 11) (Kozak-Apoplast-Stx2eB).

40 Con el fin de añadir una señal de retención en el retículo endoplasmático, se aparearon el cebador HDEL-F (SEQ ID NO: 41) y el cebador HDEL-R (SEQ ID NO: 42) y se fosforilaron con PNK de T4, y se insertó el producto resultante en el hueco de BglII del plásmido 11, que se había desfosforilado con fosfatasa alcalina (AP) (TaKaRa), para preparar de ese modo un vector de expresión de Stx2eB de tipo retículo endoplasmático ligado a Kozak (Kozak-ER-Stx2eB) (plásmido 12).

45 Con el fin de preparar un fragmento de ADN obtenido fusionando la 5'UTR de NtADH y ADN que codifica un péptido señal de secreción, se realizó la PCR usando el plásmido 2 como molde y usando el cebador ADH XbaI-F y el cebador β D BamHI-R. Se trató el fragmento de ADN resultante con XbaI y BamHI y se insertó en el hueco de XbaI-BamHI del plásmido 9, para preparar de ese modo un vector de expresión de Stx2eB de tipo apoplasto ligado a NtADH 5' (ADH-Apoplast-Stx2eB) (plásmido 13).

Con el fin de añadir una señal de retención en el retículo endoplasmático, se aparearon un cebador HDEL-F y un cebador HDEL-R y se fosforilaron con PNK de T4, y se insertó el producto resultante en el hueco de BglII del plásmido 13, que se había desfosforilado con AP, para preparar de ese modo un vector de expresión de Stx2eB de tipo retículo endoplasmático ligado a 5'-UTR de NtADH (ADH-ER-Stx2eB) (plásmido 14).

50 Con el fin de añadir una señal de transporte vacuolar, se aparearon el cebador VSD-F (SEQ ID NO: 43) y el cebador VSD-R (SEQ ID NO: 44) y se fosforilaron con PNK de T4, y se insertó el producto resultante en el hueco de BglII del plásmido 13, que se había desfosforilado con AP, para preparar de ese modo un vector de expresión de Stx2eB de tipo vacuolar ligado a 5'-UTR de NtADH (ADH-Vacuole-Stx2eB) (plásmido 15).

Con el fin de añadir un péptido señal de transporte al cloroplasto (SEQ ID NO: 45), se realizó la PCR usando el plásmido 6 como molde y usando el cebador ADH XbaI-F y el cebador TP BamHI-R (SEQ ID NO: 46). Se trató el fragmento de ADN resultante con XbaI y BamHI y se insertó en el hueco de XbaI-BamHI del plásmido 9, para preparar de ese modo un vector de expresión de Stx2eB de tipo cloroplasto ligado a 5'-UTR de NtADH (ADH-Chloroplast-Stx2eB) (plásmido 16).

Se fusionó una etiqueta de HA como etiqueta de péptido para detectar una Stx2eB. Con el fin de añadir la etiqueta de HA, se aparearon el cebador HA-F (SEQ ID NO: 47) y el cebador HA-R (SEQ ID NO: 48) y se fosforilaron con PNK de T4. Se insertó el fragmento de HA fosforilado resultante en los huecos de BamHI de los plásmidos 9, 10, 12, 13, 14, 15 y 16, para preparar de ese modo los vectores de expresión de Stx2eB: Kozak-Cytosol-Stx2eB, ADH-Cytosol-Stx2eB, Kozak-ER-Stx2eB, ADH-Apoplast-Stx2eB, ADH-ERStx2eB, ADH-Vacuole-Stx2eB y ADH-Chloroplast-Stx2eB, que se usaron en las siguientes pruebas de expresión (figura 2).

(3) Construcción del vector de expresión de Stx2eB con codones modificados

Se modificaron los codones en la secuencia de bases de un ADN que codifica Stx2eB representado por SEQ ID NO: 5 mediante el siguiente método para preparar ADN con codones modificados del retículo endoplasmático que codifican Stx2eBs a los que se añadió 5'UTR de NtADH.

(a) Diseño de Stx2eB con codones modificados

Se diseñaron las siguientes cuatro secuencias como Stx2eB con codones modificados: 1) una secuencia basada en el método de Kang *et al.* (2004); 2) una secuencia que incluye codones seleccionados que se usan frecuentemente en *Lactuca sativa*; 3) una secuencia que incluye codones seleccionados que tienen un alto contenido en GC y se usan frecuentemente en *Lactuca sativa*; y 4) una secuencia que incluye codones seleccionados que se usan frecuentemente en genes de mantenimiento (gen de actina, gen de β -tubulina).

1) Secuencia basada en el método de Kang *et al.* (2004)

Se creó un diagrama de flujo de modificación de codones basándose en las secuencias génicas de LTB antes y después de la modificación y la tabla de uso de codones de *Nicotiana tabacum* descrita en el documento, y se modificaron los codones de una Stx2eB basándose en el diagrama de flujo y la tabla de uso de codones de *Lactuca sativa*. Se designó la Stx2eB con codones modificados resultante como mStx2eB1 (SEQ ID NO: 6). La tabla de uso de codones de *Lactuca sativa* usada es el uso de codones de *Lactuca sativa* en la base de datos del Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>).

2) Secuencia que incluye codones seleccionados que se usan frecuentemente en *Lactuca sativa*

Se realizó la modificación de codones basándose en la tabla de uso de codones de *Lactuca sativa* usando sólo el codón más frecuentemente usado. Por ejemplo, entre los codones de Ala, el codón que es el más frecuentemente usado es GCA. Por tanto, todos los codones de Ala en Stx2eB se convirtieron en GCA. Se designó la Stx2eB con codones modificados resultante como mStx2eB2 (SEQ ID NO: 7).

3) Secuencia que incluye codones seleccionados que tienen un alto contenido en GC y se usan frecuentemente en *Lactuca sativa*

Se seleccionó un codón que tiene un alto contenido en GC y se usa frecuentemente en *Lactuca sativa* basándose en la tabla de uso de codones de *Lactuca sativa*, y se realizó la modificación de codones. Por ejemplo, entre los codones de Ala, los codones que tienen el mayor contenido en GC son GCC y GCG, y un codón que se usa frecuentemente es GCC. Por tanto, todos los codones de Ala en Stx2eB se convirtieron en GCC. Se designó la Stx2eB con codones modificados resultante como mStx2eB3 (SEQ ID NO: 8).

4) Secuencia que incluye codones seleccionados que se usan frecuentemente en genes de mantenimiento (gen de actina, gen de β -tubulina)

Se seleccionó un codón que se usa frecuentemente en genes de mantenimiento de *Lactuca sativa*, y se realizó la modificación de codones. Se seleccionaron actina y β -tubulina 1, 2, 3 como genes de mantenimiento de *Lactuca sativa*. Las secuencias de bases de los genes se basaron en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los codones usados en los genes y los usos de codones se muestran colectivamente en las tablas 1 y 2. Entre los codones, se seleccionó el codón que es el más frecuentemente usado, y se realizó la modificación de codones. Se designó la Stx2eB con codones modificados resultante como mStx2eB4 (SEQ ID NO: 9).

Tabla 1

Aminoácido	Triplete	Uso de codones	Actina	β -tubulina			Optimización
				1	2	3	
Ala	GCA	0,35	3	4	3	5	GCC
	GCC	0,20	3	7	5	6	

ES 2 564 685 T3

	GCG	0,11	1	1	1	0	
	GCT	0,34	5	4	7	4	
Arg	AGA	0,39	4	1	3	4	
	AGG	0,22	1	6	3	4	
	CGA	0,13	0	1	1	0	
	CGC	0,06	0	3	0	2	
	CGG	0,07	0	0	1	0	
	CGT	0,14	3	4	7	5	CGT
Asn	AAC	0,46	3	8	8	7	AAC
	AAT	0,54	2	6	6	7	
Asp	GAC	0,31	1	5	7	4	
	GAT	0,69	5	7	5	8	GAT
Cys	TGC	0,42	0	5	4	5	TGC
	TGT	0,58	0	4	5	4	
Gln	CAA	0,71	2	7	9	9	CAA
	CAG	0,29	2	5	3	3	
Gly	GGA	0,33	2	7	4	7	
	GGC	0,14	1	3	0	1	
	GGG	0,20	1	4	6	4	
	GGT	0,34	5	4	8	6	GGT
His	CAC	0,36	3	2	3	1	
	CAT	0,64	2	4	3	5	CAT
Ile	ATA	0,27	0	0	0	1	
	ATC	0,30	2	5	6	6	ATC
	ATT	0,44	5	5	4	3	
Leu	CTA	0,12	0	4	7	2	
	CTC	0,14	4	9	8	8	CTC
	CTG	0,08	0	2	3	3	
	CTT	0,26	3	4	4	6	
	TTA	0,16	1	2	2	1	
	TTG	0,25	0	4	1	4	
Lys	AAA	0,52	2	5	4	7	
	AAG	0,48	3	7	8	5	AAG
Met	ATG	1,00	6	16	16	16	ATG
Phe	TTC	0,49	2	8	7	10	TTC
	TTT	0,51	3	8	9	6	

Tabla 2

Aminoácido	Uso de codones	Triplete	Actina	β-tubulina			Optimización
				1	2	3	
Pro	CCA	0,39	3	6	8	5	CCA
	CCC	0,16	1	3	2	3	
	CCG	0,11	0	0	0	2	
	CCT	0,34	5	5	4	4	
Ser	AGC	0,12	1	2	2	2	TCC
	AGT	0,18	2	1	1	1	
	TCA	0,22	0	3	8	4	
	TCC	0,16	2	8	2	8	
	TCG	0,08	0	2	0	1	
	TCT	0,24	0	6	9	7	
Thr	ACA	0,37	1	7	5	6	

ES 2 564 685 T3

	ACC	0,26	2	5	6	6	
	ACG	0,10	0	1	0	0	
	ACT	0,27	4	8	10	8	ACT
	ACW	-	-	-	-	1	
Trp	TGG	1,00	2	3	3	3	TGG
Tyr	TAC	0,44	1	6	5	7	TAC
	TAT	0,56	4	2	3	1	
Val	GTA	0,16	1	1	0	1	CTT
	GTC	0,17	0	5	8	6	
	GTG	0,28	4	5	5	4	
	GTT	0,39	6	7	5	7	
X	CYC	-	-	-	-	1	

Se compararon las secuencias de bases diseñadas de mStx2eB 1-4 en CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>) (figura 3).

- 5 Las razones de secuencias XXG/C (X: cualquier base) y las razones de GC de Stx2eB antes y después de la modificación de codones se muestran en la tabla 3. Se encontró que las razones de XXG/C para proteínas distintas de mStx2eB2 eran más altas que la razón para Stx2eB, y se encontró que la razón para mStx2eB3 era del 100%. De manera similar, se encontró que las razones de GC para proteínas distintas de mStx2eB2 eran más altas que la razón para Stx2eB, y la razón de GC para mStx2eB3 era la más alta (61,4%).

Tabla 3

	XXG/C (%)	GC (%)
Stx2eB	47,1	42,4
mStx2eB1	67,1	49,0
mStx2eB2	5,7	30
mStx2eB3	100	61,4
mStx2eB4	60	49,0

(b) Preparación de Stx2eB con codones modificados

- 10 Basándose en las secuencias de bases de mStx2eB 1-4, se prepararon cebadores que tenían cada uno seis secuencias de bases.

1) Secuencia basada en el método de Kang *et al.* (2004)

- A: SEQ ID NO: 49
 B: SEQ ID NO: 50
 15 C: SEQ ID NO: 51
 D: SEQ ID NO: 52
 E: SEQ ID NO: 53
 F: SEQ ID NO: 54

2) Secuencia que incluye codones seleccionados que se usan frecuentemente en *Lactuca sativa*

- 20 A: SEQ ID NO: 55
 B: SEQ ID NO: 56
 C: SEQ ID NO: 57
 D: SEQ ID NO: 58
 E: SEQ ID NO: 59
 25 F: SEQ ID NO: 60

3) Secuencia que incluye codones seleccionados que tienen alto contenido en GC y se usan frecuentemente en

Lactuca sativa

A: SEQ ID NO: 61

B: SEQ ID NO: 62

C: SEQ ID NO: 63

5 D: SEQ ID NO: 64

E: SEQ ID NO: 65

F: SEQ ID NO: 66

4) Secuencia que incluye codones seleccionados que se usan frecuentemente en genes de mantenimiento

A: SEQ ID NO: 67

10 B: SEQ ID NO: 68

C: SEQ ID NO: 69

D: SEQ ID NO: 70

E: SEQ ID NO: 71

F: SEQ ID NO: 72

15 Se realizó la primera PCR usando los oligómeros sintetizados anteriormente basándose en el método de Kang *et al.* (2004) en las siguientes condiciones para sintetizar cuatro Stx2eB con codones modificados. Es decir, se realizó la PCR usando los cebadores A y B, los cebadores C y D, y los cebadores E y F en combinación para sintetizar fragmentos génicos de 87 pb (A+B), 78 pb (C+D) y 69 pb (E+F), respectivamente. Posteriormente, se realizó la segunda PCR usando A+B y C+D en combinación para sintetizar un fragmento génico de 153 pb (A+B+C+D).

20 Finalmente, se realizó la tercera PCR usando A+B+C+D y E+F en combinación para sintetizar un gen de 210 pb (véase la figura 4). Las condiciones de reacción son las siguientes: se añadieron 10 pmol de un oligonucleótido, 0,2 mM de dNTP, tampón de ADN polimerasa de pfu y 0,3 U de ADN polimerasa de pfu a un volumen final de 25 µl, y se realizó el calentamiento a 94°C durante 5 minutos, y se realizó un tratamiento de calentamiento en 25 ó 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, a 56°C o 60°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto, seguido por calentamiento a 72°C durante 5 minutos. Para la segunda PCR y la tercera PCR, se usó 1 µl de una disolución de reacción tras la primera PCR y la segunda PCR como moldes. En la primera PCR y la segunda PCR, se amplificó un ADN diana, mientras que en la tercera PCR, no se amplificó un ADN que tenía un tamaño deseado. Sin embargo, en el caso de PCR usando Ex Taq y usando el producto de la tercera PCR como molde, se detectaron productos amplificados en la posición de aproximadamente 210 pb (figura 5). Se realizó la clonación de TA para los productos amplificados, y se confirmó la presencia o ausencia de los insertos mediante PCR directa (figura 6), seguido por secuenciación de los productos que se había confirmado que tenían los insertos. Como resultado, se confirmó que se produjeron las mStx2eB 1-4 de interés.

(c) Construcción del vector de expresión de Stx2eB con codones modificados

35 Se construyó un vector de expresión transitoria para evaluar los niveles de traducción de Stx2eB 1-4 con codones modificados. Se digirió con una enzima de restricción el vector pBI221 mencionado anteriormente que incluía un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, la región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de *Nicotiana tabacum* y ADN que codifica un péptido señal, una señal de retención en el retículo endoplasmático y una etiqueta de HA añadidos, y se ligaron fragmentos de ADN de interés usando un kit de ligamiento de ADN (Mighty Mix) (TaKaRa), para preparar de ese modo un vector de expresión de Stx2eB con codones modificados del retículo endoplasmático (ADH-ER-mStx2eB 1-4) al que se añadió 5'UTR de NtADH.

(4) Construcción del vector de expresión de Stx2eA

Se preparó mediante el siguiente método un ADN que codifica la región madura de una subunidad A de una proteína Stx2e (excluyendo una región de péptido señal de secreción que señala al periplasma, Gln23 a Glu319) (Stx2eA) (SEQ ID NO: 4) al que se añadió un péptido señal de retención en el retículo endoplasmático.

45 Se realizó la PCR usando el cebador Stx2eA BamHI-F (SEQ ID NO: 73) y el cebador Stx2eA BglII-R (SEQ ID NO: 74). Se trató el fragmento de ADN resultante con BamHI y BglII y se insertó en los huecos de BamHI-BglII de los vectores de expresión mencionados anteriormente, Kozak-ER-Stx2eB y ADH-ER-Stx2eB, para preparar de ese modo Kozak-ER-Stx2eA o ADHER-Stx2eA (figura 7).

(5) Prueba de expresión transitoria usando protoplasto de *Lactuca sativa*

- Se cortó una hoja de *Lactuca sativa* en maceta (onda verde) (aproximadamente 1 g) en trozos de 0,5 cm cuadrados usando un bisturí, para preparar de ese modo discos de hoja. Se sumergieron los discos de hoja en manitol 500 mM, y se agitaron durante 1 hora. Se sumergieron los discos de hoja en 50 ml de una disolución enzimática de protoplastización (celulosa RS al 1,0% (Yakult Honsha Co., Ltd.), macerozima R-10 al 0,25% (Yakult Honsha Co., Ltd.), manitol 400 mM, CaCl₂ 8 mM y Mes-KOH 5 mM, pH 5,6) y se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Se hizo pasar la suspensión de protoplastos a través de mallas de 100 μm y 40 μm para separar los discos de hojas. Se centrifugó la suspensión de protoplastos a 60 g durante 5 minutos para precipitar el protoplasto. Se resuspendió el protoplasto en una disolución acuosa que contenía manitol 167 mM y CaCl₂ 133 mM, y se centrifugó la suspensión a 40 g durante 5 minutos. Se resuspendió el protoplasto en una disolución acuosa que contenía manitol 333 mM y CaCl₂ 66,7 mM, y se centrifugó la suspensión a 40 g durante 5 minutos. Se suspendió el protoplasto en disolución W5 (NaCl 154 mM, CaCl₂ 125 mM, KCl 5 mM, Mes-KOH 2 mM, pH 5,6), y se permitió que la suspensión reposara en hielo durante 1 hora. Se centrifugó la suspensión de protoplastos a 40 g durante 5 minutos, y se suspendió el protoplasto en disolución de MaMg (manitol 400 mM, MgCl₂ 15 mM y Mes-KOH 4 mM, pH 5,6) hasta una concentración de protoplastos de 2 x 10⁶ células/ml.
- Se mezclaron por separado cada uno del vector de expresión de indicador de GFP, vector de expresión de Stx2eB, vector de expresión de Stx2eB modificado y vector de expresión de Stx2eA preparados anteriormente con 120 μl de una suspensión de protoplastos, y se añadieron 140 μl de una disolución de PEG (manitol 400 mM, Ca(NO₃)₂ 100 mM y PEG al 40%) y se combinaron suavemente, seguido por incubación durante 7 minutos. Entonces, se añadió 1 ml de disolución W5 a las suspensiones de protoplastos a lo largo de aproximadamente 20 minutos. A los protoplastos precipitados mediante centrifugación se les añadió 1 ml de una disolución obtenida mezclando manitol 400 mM con disolución W5 a una razón de 4:1. Se añadió medio LS que contenía sacarosa al 1%, manitol 400 mM y carbenicilina 0,3 mM en una cantidad de 1 ml a los protoplastos precipitados mediante centrifugación, y se realizó el cultivo en la oscuridad a 25°C durante 24 horas.

(6) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

- A los protoplastos precipitados mediante centrifugación se les añadieron 30 μl de tampón de SDS-muestra (SDS al 4% (p/v), glicerol al 20% (p/v), azul de bromofenol al 0,05% (p/v), β-mercaptoetanol 300 mM, Tris-HCl 125 mM, pH 6,8), seguido por desnaturalización térmica a 95°C durante 2 minutos, para preparar de ese modo muestras. Se separaron las proteínas en un gel de acrilamida al 15% y se transfirieron sobre una membrana de PVDF (Hybond-P; Amersham) usando un sistema de electrotransferencia. Se usó un anticuerpo anti-HA (n.º 11 867 423 001, Roche) para detectar Stx2eB y Stx2eA.

Los resultados se muestran a continuación.

(a) Expresión del vector de expresión de GFP

- Se introdujeron cada uno de los vectores de expresión de GFP preparados en la sección (1) en el protoplasto de *Lactuca sativa* para expresar de manera transitoria un gen indicador. Se realizó la observación de la fluorescencia de GFP usando un microscopio láser confocal para analizar los niveles de expresión de los genes indicadores de GFP (figura 8).

- En el caso de la expresión del GFP de tipo citosólico, se detectaron señales fluorescentes en regiones que se consideraron como citosol alrededor de cloroplastos y en nucleares. Obsérvese que se ha notificado que una proteína de bajo peso molecular tal como GFP puede pasar a través de un poro de la membrana nuclear aunque no tenga péptido señal de transporte nuclear.

- Posteriormente, se examinó una señal de transporte a una ruta de transporte vesicular. En el caso en el que se expresaba cualquiera de GFP de tipo apoplasto, de tipo retículo endoplasmático y de tipo vacuolar, se detectó fluorescencia en regiones que se consideraron como retículos endoplasmáticos durante el periodo de cultivo de protoplastos temprano. A medida que pasaba el tiempo para cultivar el protoplasto, en el caso del GFP de tipo apoplasto, las señales fluorescentes desaparecieron (cabe la posibilidad de que la proteína se secretara fuera de la célula), mientras que en el caso del GFP de tipo vacuolar, se detectaron señales en una vacuola grande que representa la mayor parte del volumen celular. Por otro lado, en el caso del GFP de tipo retículo endoplasmático, la fluorescencia permaneció en el retículo endoplasmático.

- Mientras tanto, se examinó un péptido señal de transporte al cloroplasto. En el caso en el que se expresó el GFP de tipo cloroplasto, se detectaron señales verdes en las regiones de cloroplastos, que emitían una fluorescencia autógena de color rojo.

Estos resultados revelan que la adición de un péptido señal puede controlar la localización de una proteína recombinante en células de *Lactuca sativa*.

(b) Efectos de las señales de localización y el promotor de la traducción en la producción de Stx2eB

- Se introdujo cada uno de los vectores de expresión de Stx2eB preparados en la sección (2) en el protoplasto de *Lactuca sativa* para expresar de manera transitoria Stx2eB, y se realizó el análisis de inmunotransferencia de tipo

Western usando un anticuerpo anti-HA para evaluar las cantidades de Stx2eB acumuladas. Los resultados se muestran en la figura 9.

5 En el caso en el que se expresaba Stx2eB de tipo citosólico usando una secuencia Kozak, no se detectó Stx2eB en absoluto, mientras que en el caso en el que se expresaba Stx2eB de tipo retículo endoplasmático, se detectaron el precursor de Stx2eB (aproximadamente 12 kDa, premadura) que incluía S.P. y Stx2eB (aproximadamente 8 kDa, madura).

10 En el caso en el que se expresaba Stx2eB de tipo citosólico usando 5'UTR de NtADH, no se detectó la Stx2eB, mientras que en los casos en los que se expresaba Stx2eB de tipo retículo endoplasmático y Stx2eB de tipo vacuolar, se detectaron el precursor de Stx2eB que incluía S.P. y la Stx2eB. Además, en el caso en el que se expresaba Stx2eB de tipo apoplasto, se detectó la Stx2eB. Además, en el caso en el que se expresaba el Stx2eB de tipo cloroplasto, se detectó Stx2eB.

La observación de las bandas en los carriles de Kozak-ER (de tipo retículo endoplasmático) y NtADH-ER (de tipo retículo endoplasmático) verificó que los niveles de expresión de Stx2eB en los casos de uso de 5'UTR de NtADH eran significativamente superiores a los casos de uso de la secuencia Kozak.

15 Además, se encontró que las cantidades de Stx2eB acumuladas en células vegetales pudieron aumentarse alimentando la Stx2eB a una ruta de transporte vesicular. Hubo pequeñas diferencias en las cantidades de Stx2eB acumuladas en las tres secciones diferentes (retículo endoplasmático, apoplasto y vacuola) en la ruta de transporte vesicular.

(c) Efecto de la modificación de codones de Stx2eB sobre la expresión

20 Se introdujo cada uno de los vectores de expresión de Stx2eB con codones modificados en el protoplasto de *Lactuca sativa* para expresar de manera transitoria una Stx2eB con codones modificados, y se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo anti-HA para evaluar las cantidades de Stx2eB acumuladas. Los resultados se muestran en las figuras 10 y 11.

25 En todos los carriles: carril 0 (ADH-ER-Stx2eB), carril 1 (ADH-ER-mStx2eB1), carril 2 (ADH-ER-mStx2eB2), carril 3 (ADH-ER-mStx2eB3) y carril 4 (ADH-ER-mStx2eB4), se detectaron el precursor de Stx2eB (aproximadamente 12 kDa, premadura) que incluía S.P. y Stx2eB (aproximadamente 8 kDa, madura), pero en el carril 2, las proteínas se detectaron en pequeñas cantidades.

30 Los resultados revelan que, en los casos de uso de ADH-ER-mStx2eB1, ADH-ER-mStx2eB3 y ADH-ER-mStx2eB4 que tenían las secuencias de bases de SEQ ID NO: 75, 77 y 78, respectivamente, las cantidades de la proteína Stx2eB acumuladas son particularmente altas.

(2) Efecto del potenciador de la traducción en la producción de Stx2eA

Se introdujo cada uno de los vectores de expresión de Stx2eA en el protoplasto de *Lactuca sativa* para expresar de manera transitoria Stx2eA, y se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo anti-HA para evaluar las cantidades de Stx2eA acumuladas. Los resultados se muestran en la figura 12.

35 En el caso en el que se expresaba NtADH-ER-Stx2eA (de tipo retículo endoplasmático), se detectaron dos bandas en las posiciones de aproximadamente 34 kDa y aproximadamente 38 kDa. Por otro lado, en el caso en el que se expresaba Kozak-ER-Stx2eA, el nivel de expresión de Stx2eA era el límite de detección o menos.

Los resultados revelan que el nivel de expresión de Stx2eA en el caso de uso de 5'UTR de NtADH era significativamente más alto que en el caso de uso de la secuencia Kozak.

40 (8) Determinación de la cantidad de producción eficaz de Stx2eB y evaluación del rendimiento

(a) Purificación de la proteína fusionada Stx2eB-GST

45 Con el fin de producir una proteína fusionada de subunidad B de Stx2e y glutatión S-transferasa (GST), se subclonó Stx2eB de modo que se ajustó un marco en el lado de GST3' de un vector de expresión de proteínas de *Escherichia coli*, pGEX-6P-1, seguido por transformación de *Escherichia coli*. Se añadió β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) mediante un método convencional para inducir la expresión de una proteína fusionada Stx2eB-GST recombinante (r), y se realizó la purificación usando una columna de glutatión Sepharose 4B mediante el siguiente método.

50 Se expresó la proteína fusionada Stx2eB-GST en *Escherichia coli*, y se suspendieron las células en un tampón acuoso y se sometieron a sonicación. Como resultado, se encontró que el sobrenadante contenía la proteína fusionada en una pequeña cantidad, y por tanto se encontró que la proteína fusionada estaba presente en la fracción insoluble. Entonces, se solubilizó la proteína fusionada con urea 8 M y se purificó usando la columna, seguido por replegamiento (figura 13).

(b) Experimento de administración nasal de proteína a ratón (determinación del título de anticuerpo)

Para la proteína fusionada Stx2eB-GST eluida, se realizó inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo contra Stx2e (anticuerpo anti-VT2). Como resultado, se detectaron dos bandas específicas correspondientes a los pesos moleculares de la proteína fusionada Stx2eB-GST y Stx2eB, y se confirmó que la proteína fusionada conservaba la antigenicidad (figura 14).

Posteriormente, se administró por vía nasal la proteína fusionada Stx2eB-GST purificada (10, 20 y 50 µg) a ratones tres veces a intervalos de una semana. En las semanas 0, 1, 2 y 3, se tomaron muestras de sangre, y se realizó ELISA usando la proteína fusionada como antígeno para determinar los títulos de anticuerpo de IgG. Como resultado, el título de anticuerpo para el grupo al que se le administraron 50 µg de la proteína fusionada se elevó en la semana 1 de la administración, y en la semana 2 de la administración, los títulos de anticuerpo para los grupos a los que se les administraron 10 y 20 µg de la proteína fusionada se elevaron y aumentaron con el tiempo hasta la tercera semana (figura 15).

(9) Producción de Stx2eB

(a) Construcción del vector binario de expresión de Stx2eB

Con el fin de producir Stx2eB usando un transformante estable de una planta, se subclonó ADH-ER-Stx2eB en un vector de transformación. Es decir, se insertó ADH-ER-Stx2eB en pBI121 (Clontech) usando XbaI y SacI, y se dispuso el producto resultante entre un promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (pro. de 35S) y un terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintasa (NOS-T), para preparar de ese modo un vector binario de expresión de Stx2eB.

(b) Preparación de transformante de *Agrobacterium*

Se inoculó una única colonia de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2: 208-218) en 5 ml de medio YEB (bacto-peptona 5 g/l, extracto de ternera 5 g/l, extracto de levadura 1 g/l, sacarosa 5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,5 g/l) y se cultivó con agitación a 28°C durante la noche. Se inoculó la disolución de cultivo en 500 ml de medio YEP y se cultivó a 28°C hasta que la turbidez a 600 nm alcanzó 0,5. Se centrifugó la disolución de cultivo (5.000 rpm, 10 minutos, 4°C; rotor BECKMAN JLA-10.500) para recoger las células, y se desechó el sobrenadante. Se suspendieron las células en 500 ml de agua esterilizada para lavar las células, y se centrifugó la suspensión (5.000 rpm, 10 minutos, 4°C; rotor BECKMAN JLA-10.500) de nuevo para recoger las células, seguido por desechar el sobrenadante. Se repitió el procedimiento dos veces, y se suspendieron los precipitados en 20 ml de glicerol al 10% esterilizado enfriado. Se añadió la suspensión a un tubo NALGENE y se centrifugó (5000 rpm, 10 min, 4°C, rotor BECKMAN JLA-10.500) para recoger las células, y se desechó el sobrenadante. Se suspendieron los precipitados en 3 ml de glicerol al 10% esterilizado enfriado, y se dispuso la suspensión en alícuotas de 40 µl en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. Se congelaron los tubos en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Se descongelaron células competentes en hielo, y se añadieron a las mismas de 1 a 2 µl de la disolución de vector binario, y se añadió la totalidad a una cubeta de 2 mm enfriada con hielo. Se aplicó un pulso eléctrico (2,5 KV, 25 µF, 400 Ω) usando un electroporador (BIO RAD, Gene Pulser) para introducir el vector. Se añadió un 1 ml de medio SOC, y se realizó el cultivo con agitación a 28°C durante 1 hora. Entonces, se realizó centrifugación para eliminar casi todo el sobrenadante y recoger las células, y se suspendieron las células en el medio residual y se extendieron en medio de agar LB que contenía un antibiótico adecuado, seguido por cultivo a 30°C durante dos noches.

(c) Preparación de transformante de *Nicotiana tabacum*

Se realizó la transformación de células de cultivo de *Nicotiana tabacum* BY2 según el método de An (An G (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 79: 568-570). Se añadieron a una placa de Petri 100 µl de una disolución de cultivo de *Agrobacterium* obtenida cultivando las células transformantes de *Agrobacterium* preparadas según el método en la sección (b) anterior en 5 ml de medio LB que contenía kanamicina 100 mg/l a 28°C durante dos noches y de 5 a 10 ml de suspensión de células de cultivo de *Nicotiana tabacum* BY2 en el día 4 de cultivo y se mezclaron bien, y se permitió que la placa reposara a 25°C durante dos noches en la oscuridad para realizar el cultivo de coexistencia. Con el fin de eliminar *Agrobacterium*, se transfirió la disolución de cultivo en la placa a un tubo de centrifuga de 15 ml y se centrifugó (1000 rpm, 5 minutos, 4°C; centrifuga BECKMAN GS-6KR), y se eliminó el sobrenadante. Se añadió medio LS modificado nuevo, y se realizó centrifugación (1000 rpm, 5 minutos, 4°C; centrifuga BECKMAN GS-6KR) para lavar las células. Se repitió el procedimiento cuatro veces para eliminar *Agrobacterium*, y se extendieron las células de cultivo de *Nicotiana tabacum* BY2 sobre un medio de agar LS modificado que contenía kanamicina 100 mg/l, seguido por cultivo estático en la oscuridad a 25°C. Aproximadamente dos o tres semanas más tarde, se trasplantaron las células del callo a una nueva placa, y se seleccionaron clones que proliferaron. Se transfirieron los clones a 30 ml de medio LS modificado que contenía kanamicina 100 mg/l y se subcultivaron.

(d) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

5 Se evaluaron las cantidades de Stx2eB acumuladas en las células de cultivo de transformante de *Nicotiana tabacum* BY2 preparadas anteriormente mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando el anticuerpo anti-HA del mismo modo que anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 16. En la figura 16, los números de los respectivos carriles representan cepas independientes. El "vector vacío" es un vector obtenido introduciendo sólo un vector pBI121 que no contiene "ADH-ER-Stx2eB".

(10) Producción de Stx2eB

(a) Diseño de Stx2eB con codones modificados

10 Se diseñó una secuencia que incluía codones seleccionados que tienen alto contenido en GC y se usan menos frecuentemente en *Lactuca sativa* como Stx2eB con codones modificados. Se designó la Stx2eB con codones modificados como mStx2eB5 (SEQ ID NO: 79).

Se compararon las secuencias de bases diseñadas de mStx2eB5 mediante CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>) (figura 17). La razón de la secuencia XXG/C (X: cualquier base) de Stx2eB antes y después de la modificación de codones era del 100%, y la razón de GC era del 62,4%.

(b) Preparación de Stx2eB con codones modificados

15 Basándose en la secuencia de bases diseñada de mStx2eB5, se prepararon cebadores que tenían seis secuencias de bases. Se usaron esos cebadores para preparar mStx2eB5 usando esos cebadores del mismo modo que el método de producción de Stx2eB con codones modificados descrito en la sección (3) anterior.

Cebadores

A: SEQ ID NO: 80

20 B: SEQ ID NO: 81

C: SEQ ID NO: 82

D: SEQ ID NO: 83

E: SEQ ID NO: 84

F: SEQ ID NO: 85

25 (c) Construcción del vector de binario de expresión de Stx2eB con codones modificados

30 Con el fin de producir una Stx2eB con codones modificados usando un transformante estable de una planta, se subclonaron ADH-ER-mStx2eB 1-5 (SEQ ID NO: 75 a 78, y 86) en un vector de transformación usando mStx2eB 1-4 preparadas en la sección (3) anterior y mStx2eB5 preparada en la sección (b). Es decir, se insertaron por separado ADH-ER-mStx2eB 1-5 en pBI121 (Clontech) usando XbaI y SacI, y se dispusieron los productos resultantes entre un promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (pro. de 35S) y un terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintasa (NOS-T), para preparar de ese modo vectores binarios de expresión de mStx2eB 1-5.

(d) Preparación de transformante de *Agrobacterium*

35 Se introdujeron los vectores binarios de expresión de mStx2eB 1-5 preparados en la sección (c) en *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 del mismo modo que el método descrito en la sección (9)(b) anterior, para producir de ese modo transformantes de *Agrobacterium*.

(e) Preparación de transformante de *Nicotiana tabacum*

40 Se introdujeron por separado los vectores binarios de expresión de mStx2eB 1-5 en células de cultivo de *Nicotiana tabacum* BY2 del mismo modo que el método descrito en la sección (9)(c) anterior usando las células de los transformantes de *Agrobacterium* obtenidos en la sección (b), para producir de ese modo transformantes de *Nicotiana tabacum*.

Además, se realizó la prueba de expresión transitoria usando protoplasto de *Lactuca sativa* del mismo modo que anteriormente.

(f) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

45 Se evaluaron las cantidades de proteínas Stx2eB acumuladas en las células de cultivo de *Nicotiana tabacum* BY2 y el protoplasto de *Lactuca sativa* preparados anteriormente mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando el anticuerpo anti-HA del mismo modo que anteriormente. Los resultados se muestran en las figuras 18 (protoplasto de *Lactuca sativa*) y 19 (células de cultivo de *Nicotiana tabacum* BY2). La figura 18 también muestra los resultados de medición de las cantidades de ARNm.

Tal como se muestra en la figura 18, en todos los carriles: carril 0 (ADH-ER-Stx2eB), carril 1 (ADH-ER-mStx2eB1), carril 2 (ADH-ERmStx2eB2), carril 3 (ADH-ER-mStx2eB3), carril 4 (ADH-ER-mStx2eB4) y carril 5 (ADH-ER-mStx2eB5), se detectaron el precursor de Stx2eB (aproximadamente 12 kDa, premadura) que incluía S.P. y Stx2eB (aproximadamente 8 kDa, madura), pero en el carril 2 no se detectaron las proteínas.

- 5 En la figura 19, los codones 1 a 5 representan cada uno mStx2eB 1-5. Los números de los respectivos carriles representan cepas independientes. En los casos de mStx2eB1, mStx2eB3, mStx2eB4 y mStx2eB5, se detectaron proteínas para algunas de las cepas, mientras que en el caso de mStx2eB2, no se detectó proteína para ninguna de las cepas. Se compararon las cantidades de proteínas detectadas, y se encontró que eran particularmente altas en los casos de mStx2eB3 y mStx2eB5. Es decir, los resultados revelan que el diseño de un codón que tiene un alto contenido en GC aumentó el nivel de traducción independientemente del uso de codones en *Lactuca sativa*.

(11) Prueba de administración de vacuna contra la enfermedad de edema porcino

(a) Producción de vacuna contra la enfermedad de edema porcino

Se suspendió la proteína de fusión Stx2eB-GST purificada tal como se describió en la sección (8) (a) en PBS a una concentración de 8 mg/ml, para preparar de ese modo una vacuna contra la enfermedad de edema porcino.

- 15 (b) Preparación de una cápsula de bacterias de la enfermedad de edema

[Cepa bacteriana]

Escherichia coli que produce verotoxina (VTEC) n.º 1362-1 aislada de una muestra clínica de cerdo (derivada de un cerdo que había muerto a la edad de 40 días).

Serovar: 0139; fedA, +

- 20 Toxina: stx2e, +; ST, +; LT, -

[Preparación]

Se cultivó la cepa n.º 1362-1 mencionada anteriormente en caldo TS a 37°C durante 4 horas. Se centrifugó el cultivo bacteriano, y se recogió el precipitado y se encapsuló en cápsulas con recubrimiento entérico.

(c) Administración de la vacuna y las bacterias de la enfermedad de edema

- 25 Entre lechones sanos en el periodo de lactancia criados en una granja de cerdos, se seleccionaron 6 lechones de cada una de 3 cerdas madre, es decir, un total de 18 lechones y se dividieron en 5 grupos tal como se muestra en la tabla 4. Cada grupo incluye tanto crías macho como hembra de diferentes cerdas madre. A la edad de 6, 12 y 18 días, se administró por vía nasal una vacuna contra la enfermedad de edema porcino a los lechones de los grupos 2 a 4 usando una pipeta en dosis predeterminadas (por administración) mostradas en la tabla 4, y se criaron los lechones junto con las cerdas madre en la granja de cerdos hasta la edad de 21 días. Por otro lado, se administraron por vía nasal 0,5 ml de PBS a los lechones de los grupos 1 y 5. A la edad de 21 días, se destetaron los lechones y se dividieron en cada grupo. Se mantuvieron en establos para lechones con suelos de hormigón cubiertos con serrín en donde se controló la temperatura mediante una luz térmica. El pienso usado fue SDS n.º 1 (fabricado por Nippon Formula Feed Mfg Co. Ltd.), y se permitió que los cerdos ingiriesen libremente el pienso y el agua. Se monitorizaron las cantidades del pienso ingerido y los pesos corporales durante el experimento. Cuatro días más tarde, se inocularon por vía oral cápsulas que contenían bacterias de la enfermedad de edema a los lechones de los grupos 1 a 4 una vez al día durante 3 días (de 25 a 27 días de edad). Al grupo 5 se le administraron de manera forzada cápsulas con recubrimiento entérico que contenían solución salina fisiológica.

Tabla 4

Grupo de prueba	Vacuna contra la enfermedad de edema porcino	Inoculación de bacterias de la enfermedad de edema	Número de cerdos
1	Sin administración	Inoculación (durante 3 días)	3
2	1 mg/cerdo	Inoculación (durante 3 días)	4
3	4 mg/cerdo	Inoculación (durante 3 días)	4
4	16 mg/cerdo	Inoculación (durante 3 días)	4
5	Sin administración	Sin inoculación (administración de solución salina fisiológica (durante 3 días))	3

- 40 Se monitorizaron los síntomas clínicos cada día durante el periodo desde el día 0 hasta el día 11 de la inoculación oral de bacterias de la enfermedad de edema. Se realizó la observación para los siguientes síntomas clínicos de la enfermedad de edema: edema alrededor de los ojos, síntoma neurológico, función motora, postura, propiedad de las heces, apetito y estado respiratorio, y se registraron las puntuaciones de síntomas clínicos basándose en los

siguientes criterios.

Edema alrededor de los ojos (blefarodema) (0: ausente, 1: leve, 2: moderado, 3: intenso)

Síntoma neurológico (0: ausente, 1: leve, 2: moderado, 3: intenso)

Función motora (0: normal, 1: disminuida, 2: desaparecida)

5 Postura (0: normal, 1: similar a un perro sentado, 2: decúbito prono)

Propiedad de las heces (0: normal, 1: heces blandas, 2: heces fangosas, 3: heces acuosas, mucosa y heces sanguinolentas)

Apetito (0: normal, 1: ligeramente escaso, 2: escaso, 3: perdido)

Estado respiratorio (0: normal, 1: ligeramente rápido, 2: rápido)

10 Se recogieron las heces en los días 0, 3, 7 y 11, mientras que se recogió sangre en los días 0 y 11.

(d) Resultados de prueba

(i) Determinación del título de anticuerpo

15 Se determinaron mediante ELISA los títulos de anticuerpo de IgA específica de Stx en las heces recogidas en el día 0. Se diluyeron las heces con un volumen de 9 veces de PBS y se suspendieron, y se centrifugó la suspensión para recoger los sobrenadantes, que se usaron como muestras para la determinación mediante ELISA. Los resultados se muestran en la figura 20. Mientras tanto, se determinaron mediante ELISA los títulos de anticuerpo de IgG específica de Stx en la sangre recogida en el día 0. Los resultados se muestran en la figura 21. No hubo ninguna diferencia significativa en los títulos de anticuerpo entre diferentes grupos. Sin embargo, en los grupos a los que se les administró la vacuna contra la enfermedad de edema, algunos cerdos mostraron altos títulos de anticuerpo.

20 (ii) Detección de bacterias de la enfermedad de edema

25 Se cuantificaron mediante PCR los genes específicos de bacterias de la enfermedad de edema, y se calcularon los números de células bacterianas de la enfermedad de edema. Se usaron para la PCR muestras de heces recogidas el día 3. Se extrajeron los ADN en las heces usando QUICK GENE (FUJIFILM Corporation), y se cuantificó el gen bacteriano de la enfermedad de edema mediante PCR en tiempo real (según Tsukahara *et al.* (2007)), seguido por el cálculo de los números de células bacterianas de la enfermedad de edema. Los resultados se muestran en la figura 22. Se detectó el mismo número de bacterias de la enfermedad de edema a partir de los grupos infectados (grupo 1 a 4).

(iii) Cálculo de la tasa de conversión de pienso

30 A partir de los resultados de la monitorización de la ingesta de la dieta y los pesos corporales, se determinó la tasa de conversión de pienso en de 4 a 1 días antes de la infección (d -4 a -1), y en los días 0 a 3 (d 0 a 3), en los días 4 a 7 (d 4 a 7) y en los días 8 a 11 (d 8 a 11) tras la infección, respectivamente. Además, se calculó la tasa de conversión de pienso durante todo el periodo (d -4 a 11). Obsérvese que la tasa de conversión de pienso se refiere a la cantidad de pienso requerida para aumentar 1 kg de peso corporal durante un determinado periodo.

Tasa de conversión de pienso = cantidad de pienso ingerida / aumento de peso corporal

35 La figura 23 muestra la tasa de conversión de pienso durante todo el periodo, mientras que la figura 24 muestra los cambios en la tasa de conversión de pienso. La tasa de conversión de pienso durante todo el periodo del grupo 1 (infectado con las bacterias de la enfermedad de edema sin vacuna contra la enfermedad de edema) era la más alta, mientras que la del grupo 3 (infectado con las bacterias de la enfermedad de edema con administración de 4 mg/cerdo de la vacuna contra la enfermedad de edema) era la más baja. Además, el grupo 1 mostró una tasa de conversión de pienso muy alta en los días 0 a 3 tras la infección. La tasa de conversión de pienso aumentada se debía a la diarrea que afectó al aumento de peso corporal según la cantidad del pienso ingerido.

40 (iv) Observación clínica

45 Basándose en las puntuaciones de síntomas clínicos, se calcularon las puntuaciones de síntomas clínicos promedio para cada día. En la figura 25 se muestran los cambios en las puntuaciones de síntomas clínicos promedio. Además, se calcularon los promedios de las puntuaciones de síntomas clínicos totales durante todo el periodo (de 0 a 11 días tras la infección) por lechón. Los resultados se muestran en la figura 26. En el grupo 1, se desarrollaron síntomas clínicos de la enfermedad de edema y empeoraron durante de 1 a 3 días tras la infección, los síntomas persistieron hasta el día 11. En el grupo 2 (al que se le administró 1 mg de la vacuna contra la enfermedad de edema), se desarrollaron síntomas clínicos de la enfermedad de edema, pero menos intensos que en el grupo 1. Por otro lado, 50 el grupo 3 (al que se le administraron 4 mg de la vacuna contra la enfermedad de edema) y el grupo 4 (al que se le

5 administraron 16 mg de la vacuna contra la enfermedad de edema) sólo tienen síntomas leves, lo cual era comparable al grupo 5 que no estaba infectado con las bacterias de la enfermedad de edema. En particular, en los casos de los grupos 3 y 4, no se observó blefaroedema (síntoma típico de la enfermedad de edema). La figura 27 muestra fotografías de cerdos representativos del grupo 1 y el grupo 4, respectivamente. El cerdo del grupo 1 al que no se le administró la enfermedad de edema desarrolló edema intenso alrededor de los ojos y diarrea acuosa. Por otro lado, el lechón del grupo 4 al que se le administraron 16 mg de la vacuna contra la enfermedad de edema no desarrolló edema alrededor de los ojos ni diarrea.

10 Además, las puntuaciones de síntomas clínicos totales durante todo el periodo revelaron que la administración de la vacuna contra la enfermedad de edema puede mejorar o suprimir los síntomas clínicos de la enfermedad de edema. En particular, se encontró que los síntomas clínicos de la enfermedad de edema podrían suprimirse eficazmente administrando tres veces la vacuna contra la enfermedad de edema en una cantidad de 4 mg o más.

Aplicabilidad industrial

15 Si una planta o similar se transforma con el constructo de ADN de la presente invención, puede producirse con alta eficacia un transformante que puede producir una proteína Stx2e. El uso del constructo de ADN de la presente invención puede producir una vacuna contra la enfermedad de edema porcino con alta eficacia usando una planta tal como *Lactuca sativa*, que puede cultivarse con bajo coste. Además, si se usa una vacuna contra la enfermedad de edema porcino de la presente invención, la enfermedad de edema porcino puede controlarse de manera fácil y eficaz.

Lista de secuencias

20 <110> IDEMITSU KOSAN CO., LTD.
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY
MEDICINE

25 <120> VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE EDEMA PORCINO

<130> R3196 EP S3

30 <140> Documento EP 08 72 2760.9
<141> 25-03-2008

<150> Documento JP 2007-174919
<151> 03-07-2007

35 <160> 86

<170> PatentIn versión 3.4

40 <210> 1
<211> 90
<212> ADN
<213> *Nicotiana tabacum*

45 <400> 1
`atttaactca gtattcagaa acaacaaaag ttcttctcta cataaaattt tcctatttta 60`
`gtgatcagtg aaggaaatca agaaaaataa 90`

50 <210> 2
<211> 304
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 2

ES 2 564 685 T3

Met Lys Cys Ile Leu Leu Lys Trp Ile Leu Cys Leu Leu Leu Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Ser Val Ser Tyr Ser Gln Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln
 20 25 30
 Gln Ser Tyr Val Ser Ser Leu Asn Ser Ala Ile Ser Thr Pro Leu Glu
 35 40 45
 His Ile Ser Gln Gly Ala Thr Ser Val Ser Val Ile Asn His Thr Pro
 50 55 60
 Pro Gly Ser Tyr Ile Ser Val Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val Tyr Gln
 65 70 75 80
 Glu Arg Phe Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Arg Asn Asn Leu Tyr
 85 90 95
 Phe Val Asn Thr Thr Thr Asn Thr Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ala
 100 105 110
 His Ile Ser Leu Pro Gly Val Thr Thr Ile Ser Met Thr Thr Asp Ser
 115 120 125
 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Ala Leu Glu Arg Ser Gly Met
 130 135 140
 Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Tyr Leu Ala Leu Met Glu Phe Ser Gly
 145 150 155 160
 Asn Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Arg Ala Val Leu Arg Phe Val Thr
 165 170 175
 Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Glu Phe Arg
 180 185 190
 Leu Ala Leu Ser Glu Thr Ala Pro Val Tyr Thr Met Thr Pro Asp Leu
 195 200 205
 Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val Leu Pro Glu Tyr Arg Gly
 210 215 220
 Glu Ala Gly Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Asn Asn Ile Ser Ala
 225 230 235 240
 Ile Leu Gly Thr Val Ala Val Ile Leu Asn Cys His His Gln Gly Ala
 245 250 255
 Arg Ser Val Arg Ala Glu Ser Gln Pro Glu Cys Gln Ile Thr Gly Asp
 260 265 270
 Arg Pro Val Ile Lys Ile Asn Asn Thr Leu Trp Glu Ser Asn Thr Ala
 275 280 285
 Ala Ala Phe Leu Asn Arg Lys Ser Gln Pro Leu Tyr Thr Thr Gly Glu
 290 295 300

<210> 3
 5 <211> 84
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<400> 3
 Met Lys Lys Met Phe Ile Ala Val Leu Phe Ala Leu Val Ser Val Asn
 1 5 10 15
 Ala Met Ala Ala Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Asn Glu Asp Asn Thr Phe Thr Val Lys Arg Glu Tyr Trp Thr Asn Arg
 35 40 45
 Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr
 50 55 60
 Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ala Gln
 65 70 75 80
 10 Val Lys Phe Asn

<210> 4
 <211> 959
 <212> ADN
 15 <213> *Escherichia coli*

<400> 4

ES 2 564 685 T3

	atgaagtgta	tattgttaaa	gtggatactg	tgtctgttac	tgggtttttc	ttcggtatcc	60
	tattcccagg	agtttacgat	agacttttctg	actcaacaaa	gttatgtatc	ttcgttaaat	120
	agtatacggg	cagcgatatc	gacccctctt	gaacatatat	ctcaggggagc	tacatcggta	180
	tccggtatta	atcatacacc	accaggaagt	tatatttccg	taggtatacg	agggcttgat	240
	gtttatcagg	agcgttttga	ccatcttctg	ctgattattg	aacgaaataa	tttatatgtg	300
	gctggatttg	ttaatacgc	aacaaatact	ttctacagat	tttcagattt	gcacatatat	360
	cattgcccgg	tgtgacaact	atttccatga	caacggacag	cagttatacc	actctgcaac	420
	gtgtcgcagc	gctggaacgt	tccggaatgc	aatcagtcg	tcactcactg	gtttcatcat	480
	atctggcggt	aatggagttc	agtggtaata	caatgaccag	agatgcatca	agagcagttc	540
	tgcgttttgt	cactgtcaca	gcagaagcct	tacggttcag	gcaaatacag	agagaatttc	600
	gtctggcact	gtctgaaact	gctcctgttt	atacgatgac	gccggaagac	gtggacctca	660
	ctctgaactg	ggggagaatc	agcaatgtgc	ttccggagta	tcggggagag	gctggtgtca	720
	gagtgggggag	aatatccttt	aataatata	cagcgatact	tggactctgtg	gccgttatac	780
	tgaattgccca	tcatcagggc	gcacgttctg	ttcgcgccgt	gaatgaagag	agtcaaccag	840
	aatgtcagat	aactggcgac	aggcccgta	taaaaataaa	caatacatta	tgggaaagta	900
	atacagcagc	agcgttttctg	aacagaaaagt	cacagccttt	atatacaact	ggtgaatga	959
	<210> 5						
	<211> 213						
5	<212> ADN						
	<213> <i>Escherichia coli</i>						
	<400> 5						
	atggcggcgg	attgtgctaa	aggtaaaatt	gagttttcca	agtataatga	ggataatacc	60
	tttactgtga	aggtgtcagg	aagagaatac	tggacgaaca	gatggaattt	gcagccattg	120
	ttacaaagtg	ctcagctgac	agggatgact	gtaacaatca	tatctaatac	ctgcagttca	180
	ggctcaggct	ttgcccaagt	gaagtttaac	tga			213
10	<210> 6						
	<211> 213						
	<212> ADN						
	<213> <i>Escherichia coli</i>						
15	<400> 6						
	atggcagcag	attgctgctaa	gggtaagatt	gagtttctcca	agtacaacga	ggataacacc	60
	ttcacagtga	aggtgtcagg	aagggagtac	tggacaaaca	ggtggaactt	gcaaccattg	120
	ttgcaaagcg	ctcaactcac	agggatgaca	gtgacaatca	tctctaacac	ctgcagctca	180
	gggtcagggt	tcgccaagt	gaagttcaac	tga			213
	<210> 7						
	<211> 213						
	<212> ADN						
	<213> <i>Escherichia coli</i>						
20	<400> 7						
	atggcagcag	attgtgcaaa	aggtaaaatt	gaattttctta	aatataatga	agataataca	60
	tttacagtta	aagtttctgg	tagagaatat	tggacaaata	gatggaatct	tcaaccactt	120
	cttcaatctg	cacaacttac	aggtatgaca	gttacaatta	tttctaatac	atgttcttct	180
	ggttctgggt	ttgcacaagt	taaatttaac	tga			213
	<210> 8						
	<211> 213						
	<212> ADN						
	<213> <i>Escherichia coli</i>						
25	<400> 8						
	atggcccggc	actgcgccaa	ggggaagatc	gagtttctcca	agtacaacga	ggacaacacc	60
	ttcaccgtga	aggtgtccgg	gagggagtac	tggaccaaca	ggtggaacct	ccagcccctc	120
	ctccagtcgg	cccagctcac	cgggatgacc	gtgaccatca	tctccaacac	ctgtctctcc	180
	gggtcccgggt	tcgcccaggt	gaagttcaac	tga			213
	<210> 9						
	<211> 213						
	<212> ADN						
	<213> <i>Escherichia coli</i>						
30	<400> 9						
	atggcccggc	actgcgccaa	ggggaagatc	gagtttctcca	agtacaacga	ggacaacacc	60
	ttcaccgtga	aggtgtccgg	gagggagtac	tggaccaaca	ggtggaacct	ccagcccctc	120
	ctccagtcgg	cccagctcac	cgggatgacc	gtgaccatca	tctccaacac	ctgtctctcc	180
	gggtcccgggt	tcgcccaggt	gaagttcaac	tga			213
	<210> 9						
	<211> 213						
	<212> ADN						
	<213> <i>Escherichia coli</i>						
35	<400> 9						

<400> 9
atggccgccg attgcgcaa gggttaagatc gaattctcca agtacaacga agataaacct 60
ttcactgtta aggtttccgg tctgtaatac tggactaac gttggaacct ccaaccactc 120
ctccaatccg cccaactcac tggatgact gttactatca tctccaacac ttgctcctcc 180
ggttccggtt tgcccaagt taagttcaac tga 213

5 <210> 10
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Nicotiana tabacum*

10 <400> 10
Met Gly Arg Met Ser Ile Pro Met Met Gly Phe Val Val Leu Cys Leu
1 5 10 15
Trp Ala Val Val Ala Glu Gly Ser
20

<210> 11
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> *Nicotiana tabacum*

15 <400> 11
atggggagaa tgtcaatacc catgatgggt tttgtggtgt tatgtctatg ggcagtggtgta 60
gcagaaggat cc 72

20 <210> 12
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un constructo de ADN sintetizado artificialmente"

30 <400> 12
atttaactca gtattcagaa acaacaaaag ttcttctcta cataaaattt tcctatttta 60
gtgatcagtg aaggaaatca agaaaaataa atggggagaa tgtcaatacc catgatgggt 120
tttgtggtgt tatgtctatg ggcagtggtg gcagaaggat ccgcggcgga ttgtgctaaa 180
ggtaaaattg agttttccaa gtataatgag gataatacct ttactgtgaa ggtgtcagga 240
agagaatact ggacgaacag atggaatttg cagccattgt taaaaagtgc tcagctgaca 300
gggatgactg taacaatcat atctaatacc tgcagttcag gctcaggctt tgcccagggtg 360
aagtttaact ga 372

<210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un péptido señal sintetizado artificialmente"

40 <400> 13
Lys Asp Glu Leu
1

45 <210> 14
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un péptido señal sintetizado artificialmente"

<400> 14
His Asp Glu Leu
1

5 <210> 15
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un péptido señal sintetizado artificialmente"

<400> 15
Lys Asp Glu Phe
1

15 <210> 16
 <211> 4
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un péptido señal sintetizado artificialmente"

25 <400> 16
His Asp Glu Phe
1

30 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un péptido señal sintetizado artificialmente"

<400> 17
Arg Ser Glu His Asp Glu Leu
1 5

40 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un ADN sintetizado artificialmente que codifica péptido señal"

50 <400> 18
 agatctgaac atgatgaatt g 21

<210> 19
 <211> 7
 55 <212> PRT
 <213> *Nicotiana tabacum*

<400> 19
Asp Leu Leu Val Asp Thr Met
1 5

60

<210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Nicotiana tabacum*

5
 <400> 20
 gatttgttg ttgatactat g 21

10
 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Armoracia rusticana*

15
 <400> 21
 Leu Leu His Asp Met Val Glu Val Val Asp Phe Val Ser Ser Met
 1 5 10 15

20
 <210> 22
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Armoracia rusticana*

25
 <400> 22
 ctactccatg atatggtgga ggtcgttgac tttgtagct ctatg 45

30
 <210> 23
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un constructo de ADN sintetizado artificialmente"

40
 <400> 23
 _ _
 atttaactca gtattcagaa acaacaaaag ttcttctcta cataaaattt tcctatttta 60
 gtgatcagtg aaggaaatca agaaaaataa atggggagaa tgtcaatacc catgatgggt 120
 tttgtggtgt tatgtctatg ggcagtggta gcagaaggat cgcggcggga ttgtgctaaa 180
 ggtaaaattg agttttccaa gtataatgag gataatacct ttactgtgaa ggtgtcagga 240
 agagaatact ggacgaacag atggaatttg cagccattgt tacaagtgc tcagctgaca 300
 gggatgactg taacaatcat atctaatacc tgcagttcag gctcaggctt tgcccagggtg 360
 aagtttaaca gatctgaaca tgatgaattg tga 393

45
 <210> 24
 <211> 432
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un constructo de ADN sintetizado artificialmente"

55
 <400> 24
 atttaactca gtattcagaa acaacaaaag ttcttctcta cataaaattt tcctatttta 60
 gtgatcagtg aaggaaatca agaaaaataa atggggagaa tgtcaatacc catgatgggt 120
 tttgtggtgt tatgtctatg ggcagtggta gcagaaggat cttatcctta tgattatcct 180
 gattatgctg gatccgcggc ggattgtgct aaaggtaaaa ttgagtttc caagtataat 240
 gaggataata cttttactgt gaaggtgtca ggaagagaat actggacgaa cagatggaat 300
 ttgcagccat tgttacaaag tgctcagctg acagggatga ctgtaacaat catatctaat 360
 acctgcagtt caggctcagg ctttgcccag gtgaagttaa acagatctga tttgttgggt 420
 gatactatgt ga 432

60
 <210> 25
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 5
 <400> 25
 aatctagagt ctatttaact cagtattcag aaacaacaaa a 41
 <210> 26
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 <400> 26
 20 aaatgcatta ttttcttga ttccttcac 30
 <210> 27
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 30 <400> 27
 aaatgcatgg ggagaatgac aatacccatg 30
 <210> 28
 <211> 29
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 40 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 <400> 28
 ttgaattctc cttctgtac cactgcca 29
 45 <210> 29
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 <400> 29
 55 gatgcatgaa tcagtaaag gagaagaact 30
 <210> 30
 <211> 30
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 65 <400> 30

gttatttgta tagttcatcc atgccatgtg 30

5 <210> 31
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

15 <400> 31
gttaaagctc atcatgctct ttgtatagtt 30

20 <210> 32
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

30 <400> 32
aaatgcatgg cctccatctc ctctcagcc 30

35 <210> 33
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

45 <400> 33
ttgaattcta ggtatgaaag agtctcgta 29

50 <210> 34
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

60 <400> 34
gtcgacggta cccccgggga gct 23

65 <210> 35
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

75 <400> 35
ccccgggggt accgtcgaca gct 23

80 <210> 36
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 5
 <400> 36
 tatctagagc caccatggga tccgcgccgg attgtgct 38
 <210> 37
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 <400> 37
 20 ttcaagatct gttaaacttc acctgggcaa 30
 <210> 38
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 30 <400> 38
 tatagatcc cattatcttt cttgattcc 30
 <210> 39
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 40 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 <400> 39
 tatatctaga gccacatgg ggagaatgct 30
 45 <210> 40
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 <400> 40
 55 tatagatcc cattatcttt cttgattcc 30
 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 65 <400> 41

gatctgaaca tgatgaattg t 21

<210> 42
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

<400> 42
 gatcacaatt catcatgttc a 21

15 <210> 43
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

<400> 43
 25 gatctgattt gttggtgat actatgt 27

<210> 44
 <211> 27
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

35 <400> 44
 gatcacatag tatcaaccaa caaatca 27

<210> 45
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> *Lactuca sativa*

<400> 45
 Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Ala Ile Ala Thr Val Asn Arg Thr Thr
 1 5 10 15
 45 Ser Thr Gln Ala Ser Leu Ala Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn
 20 25 30
 Val Ala Phe Pro Val Thr Lys Lys Ala Asn Asn Asp Phe Ser Ser Leu
 35 40 45
 Pro Ser Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Lys Val Trp Pro Pro Ile
 50 55 60
 Gly Leu Lys Lys Tyr Glu Thr Leu Ser Tyr Leu
 65 70 75

<210> 46
 <211> 30
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 55 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

<400> 46
 tttggatcct aggtatgaaa gagtctcgta 30

<210> 47
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 10
 <400> 47
 gatcttatcc ttatgattat cctgattatg ctg 33

 <210> 48
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 20
 <400> 48
 gatccagcat aatcaggata atcataagga taa 33
 25
 <210> 49
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 35
 <400> 49
 atggcagcag attgcgctaa gggaagatt gagttctcca agtacaacga ggat 54

 <210> 50
 <211> 45
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 45
 <400> 50
 ctcccctct gacacctca ctggaaggt gttatcctcg ttgta 45
 50
 <210> 51
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

 <400> 51
 60 tcaggaaggg agtactggac aaacaggtgg aactgcaac cattg 45

 <210> 52
 <211> 45
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

5 <400> 52
 cactgtcatc cctgtgagtt gagcgctttg caacaatggt tgcaa 45

<210> 53
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

15 <400> 53
 gggatgacag tgacaatcat ctctaacacc tgcagctcag ggca 45

<210> 54
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

25

<400> 54
 tcagttgaac ttcactggg cgaaccctga ccctgagct 39

30

<210> 55
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

40 <400> 55
 atggcagcag attgtgcaaa aggtaaaatt gaattttcta aatataatga agat 54

<210> 56
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

50 <400> 56
 ttctctacca gaaacttaa ctgtaaatgt attatcttca ttata 45

<210> 57
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

60

<400> 57
 tctgtagag aatattggac aatagatgg aatcttcaac cactt 45

65

<210> 58
 <211> 45
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 10
 <400> 58
 aactgcatata cctgtaagtt gtcagattg aagaagtggt tgaag 45

 <210> 59
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 20
 <400> 59
 ggtatgacag ttacaattat ttctaataca tgttctctg gttct 45
 25
 <210> 60
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 35
 <400> 60
 tcaattaaat ttaactgtg caaaaccaga accagaaga 39

 <210> 61
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 45
 <400> 61
 atggccgccc actgcgcca ggggaagatc gagttctcca agtacaacga ggac 54
 50
 <210> 62
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 55
 <400> 62
 ctccctccc gacacctca cggatgaaggt gttgtcctcg ttgta 45
 60
 <210> 63
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

5 <400> 63
 tccgggaggg agtactggac caacaggtgg aacctccagc ccctc 45

<210> 64
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

15 <400> 64
 cacggtcatc ccggtgagct gggcggactg gaggaggggc tggag 45

<210> 65
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

25 <400> 65
 gggatgaccg tgaccatcat ctccaacacc tgctctccg ggtcc 45

<210> 66
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

35 <400> 66
 tcagttgaac ttcacctggg cgaacccgga cccggagga 39

<210> 67
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

45 <400> 67
 atggccgccc attgcgcaa gggtagatc gaattctcca agtacaacga agat 54

<210> 68
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

55 <400> 68
 ttacgaccg gaaacctaa cagtgaaagt gttatctcg ttgta 45

<210> 68
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

65 <400> 68
 ttacgaccg gaaacctaa cagtgaaagt gttatctcg ttgta 45

<210> 69
 <211> 45
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 10
 <400> 69
 tccggctcgtg aatactggac taaccgttgg aacctccaac cactc 45

 <210> 70
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 20
 <400> 70
 aacagtcata ccagtgagtt gggcggattg gaggagtgtg tggag 45
 25
 <210> 71
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 35
 <400> 71
 ggtatgactg ttactatcat ctccaacact tgctcctccg gttcc 45

 <210> 72
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 45
 <400> 72
 tcagttgaac ttaactggg cgaaaccgga accggagga 39
 50
 <210> 73
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 55
 <400> 73
 tttgatccc aggagtttac gatagacttt 30
 60
 <210> 74
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

ES 2 564 685 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

5 <400> 74
 tttagatctt tcaccagttg tatataaagg 30

<210> 75
 <211> 393
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un constructo de ADN sintetizado artificialmente"

<400> 75

atttaactca	gtattcagaa	acaacaaaag	ttcttctcta	cataaaattt	tcctatttta	60
gtgatcagtg	aaggaaatca	agaaaaataa	atggggagaa	tgtcaatacc	catgatgggt	120
tttgtgggtg	tatgtctatg	ggcagtggtg	gcagaaggat	ccgcagcaga	ttgctgtaag	180
ggtaagattg	agttctccaa	gtacaacgag	gataaacact	tcacagtga	ggtgtcagga	240
agggagtact	ggacaaacag	gtggaacctg	caaccattgt	tgcaaagcgc	tcaactcaca	300
gggatgacag	tgacaatcat	ctctaacc	tgcagctcag	ggtcagggtt	cgccaagtg	360
aagttcaaca	gatctgaaca	tgatgaattg	tga			393

20 <210> 76
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un constructo de ADN sintetizado artificialmente"

<400> 76

atttaactca	gtattcagaa	acaacaaaag	ttcttctcta	cataaaattt	tcctatttta	60
gtgatcagtg	aaggaaatca	agaaaaataa	atggggagaa	tgtcaatacc	catgatgggt	120
tttgtgggtg	tatgtctatg	ggcagtggtg	gcagaaggat	ccgcagcaga	ttgtgcaaaa	180
ggtaaaattg	aattttctaa	atataatgaa	gataatacat	ttacagttaa	agtttctggt	240
agagaatatt	ggacaaatag	atggaactct	caaccacttc	ttcaatctgc	acaacttaca	300
ggatgacag	ttacaattat	ttctaataca	tgttcttctg	gttctgggtt	tgacaagtt	360

30 aaatttaata gatctgaaca tgatgaattg tga 393

<210> 77
 <211> 393
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un constructo de ADN sintetizado artificialmente"

40 <400> 77

atttaactca	gtattcagaa	acaacaaaag	ttcttctcta	cataaaattt	tcctatttta	60
gtgatcagtg	aaggaaatca	agaaaaataa	atggggagaa	tgtcaatacc	catgatgggt	120
tttgtgggtg	tatgtctatg	ggcagtggtg	gcagaaggat	ccgccgccga	ctgctgccaag	180
gggaagatcg	agttctccaa	gtacaacgag	gacaaacact	tcaccgtgaa	ggtgtccggg	240
agggagtact	ggaccaacag	gtggaacctc	cagccccctc	tccagtccgc	ccagctcacc	300
gggatgaccg	tgaccatcat	ctccaacacc	tgtctctccg	ggtcagggtt	cgcccagggtg	360
aagttcaaca	gatctgaaca	tgatgaattg	tga			393

45 <210> 78
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 564 685 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un constructo de ADN sintetizado artificialmente"
 5
 <400> 78
 atttaactca gtattcagaa acaacaaaag ttcttctcta cataaaattt tcctatttta 60
 gtgatcagtg aaggaaatca agaaaaataa atggggagaa tgtcaatacc catgatgggt 120
 tttgtggtgt tatgtctatg ggcagtggtg gcagaaggat ccgccgccga ttgcgccaag 180
 ggtaagatcg aattctccaa gtacaacgaa gataacactt tcaactgttaa ggtttccggt 240
 cgtgaatact ggactaacgg ttggaacctc caaccactcc tccaatccgc ccaactcact 300
 ggtatgactg ttactatcat ctccaacact tgctcctccg gttccggtt cgcccaagtt 360
 aagttcaaca gatctgaaca tgatgaattg tga 393

 <210> 79
 10 <211> 213
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

 <400> 79
 atggcggcgg actgcgcgaa gggcaagatc gagttctcga agtacaacga ggacaacacg 60
 ttcacgggtca aggtctcggg ccgcgagtac tggacgaacc gctggaacct gcagccgctg 120
 ctgcagtcgg cgcagctgac gggcatgacg gtcacgatca tctcgaacac gtgctcgtcg 180
 15 ggctcgggct tcgcgcaggt caagttcaac tga 213

 <210> 80
 <211> 54
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 25
 <400> 80
 atggcggcgg actgcgcgaa gggcaagatc gagttctcga agtacaacga ggac 54

 <210> 81
 30 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 35
 <400> 81
 ctcgcggccc gagacctga ccgtgaacgt gttgtcctcg ttgta 45
 40
 <210> 82
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"
 50
 <400> 82
 tcgggccgag agtactggac gaaccgctgg aacctgcagc cgctg 45

 <210> 83
 <211> 45
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 564 685 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

5 <400> 83
 gaccgcatg cccgtcagct gcgccgactg cagcagcggc tgcag 45

<210> 84
 <211> 45
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

<400> 84
 ggcatgacgg tcacgatcat ctgcaacacg tgctcgtcgg gctcg 45

20 <210> 85
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un cebador sintetizado artificialmente"

<400> 85
 30 tcagttgaac ttgacctgcg cgaagcccga gcccgacga 39

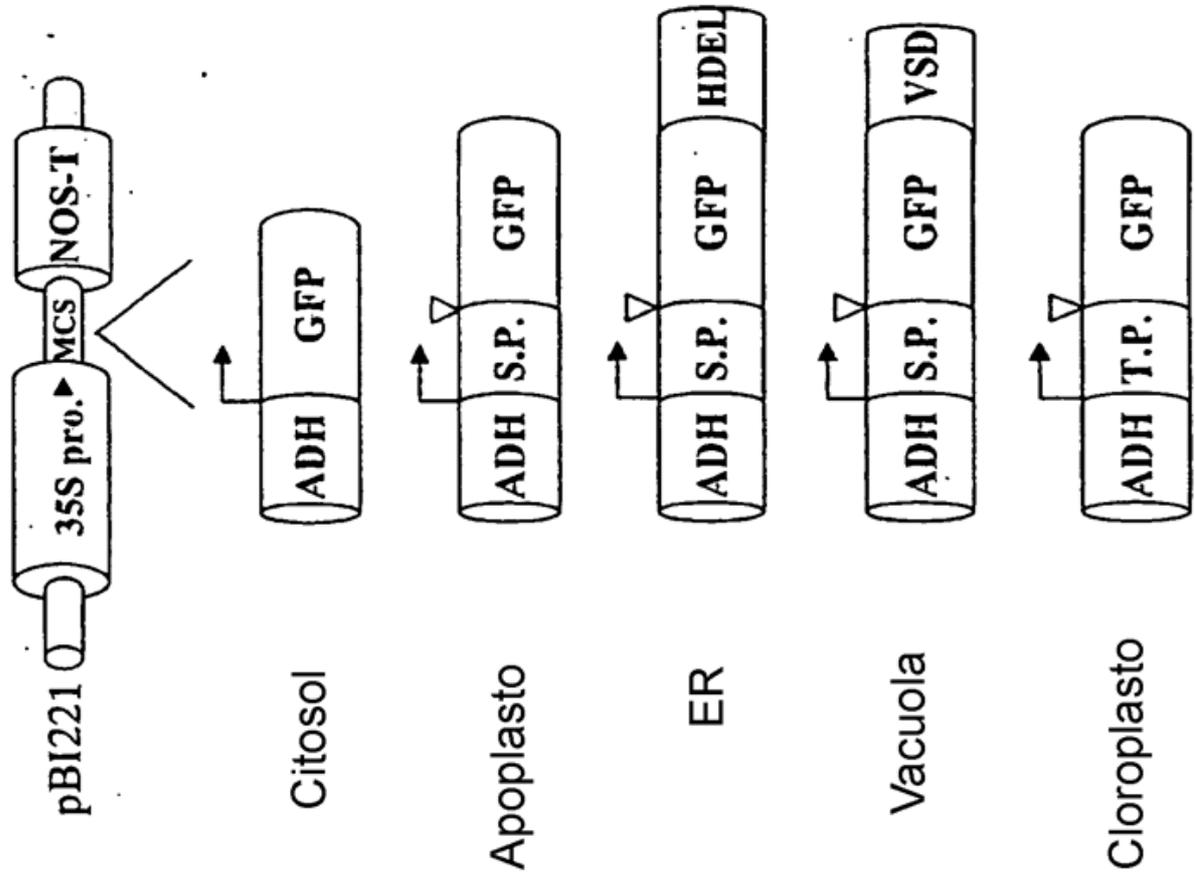
<210> 86
 <211> 396
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: un constructo de ADN sintetizado artificialmente"

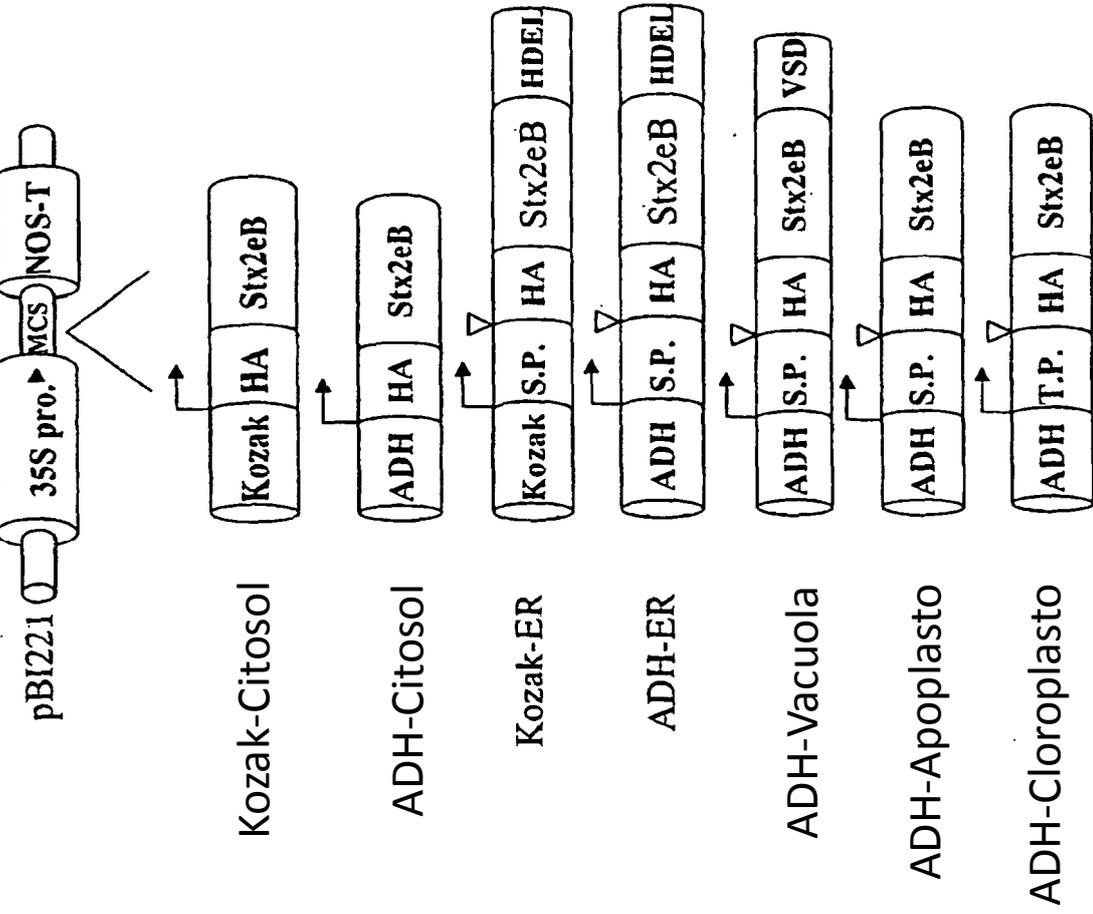
40 <400> 86
 atttaactca gtattcagaa acaacaaaag ttcttctcta cataaaaatt tcctatttta 60
 gtgatcagtg aaggaaatca agaaaaataa atggggagaa tgtcaatacc catgatgggt 120
 ttgtgggtgt tatgtctatg ggcagtggta gcagaaggat ccatggcggc ggactgcgcg 180
 aagggaaga tcgagttctc gaagtacaac gaggacaaca cgttcacggt caaggctctg 240
 ggccgcgagt actggacgaa ccgctggaac ctgcagccgc tgctgcagtc ggcgagctg 300
 acgggcatga cggtcacgat catctcgaac acgtgctcgt cgggctcggg cttcgcgcag 360
 gtcaagttca acagatctga acatgatgaa ttgtga 396

REIVINDICACIONES

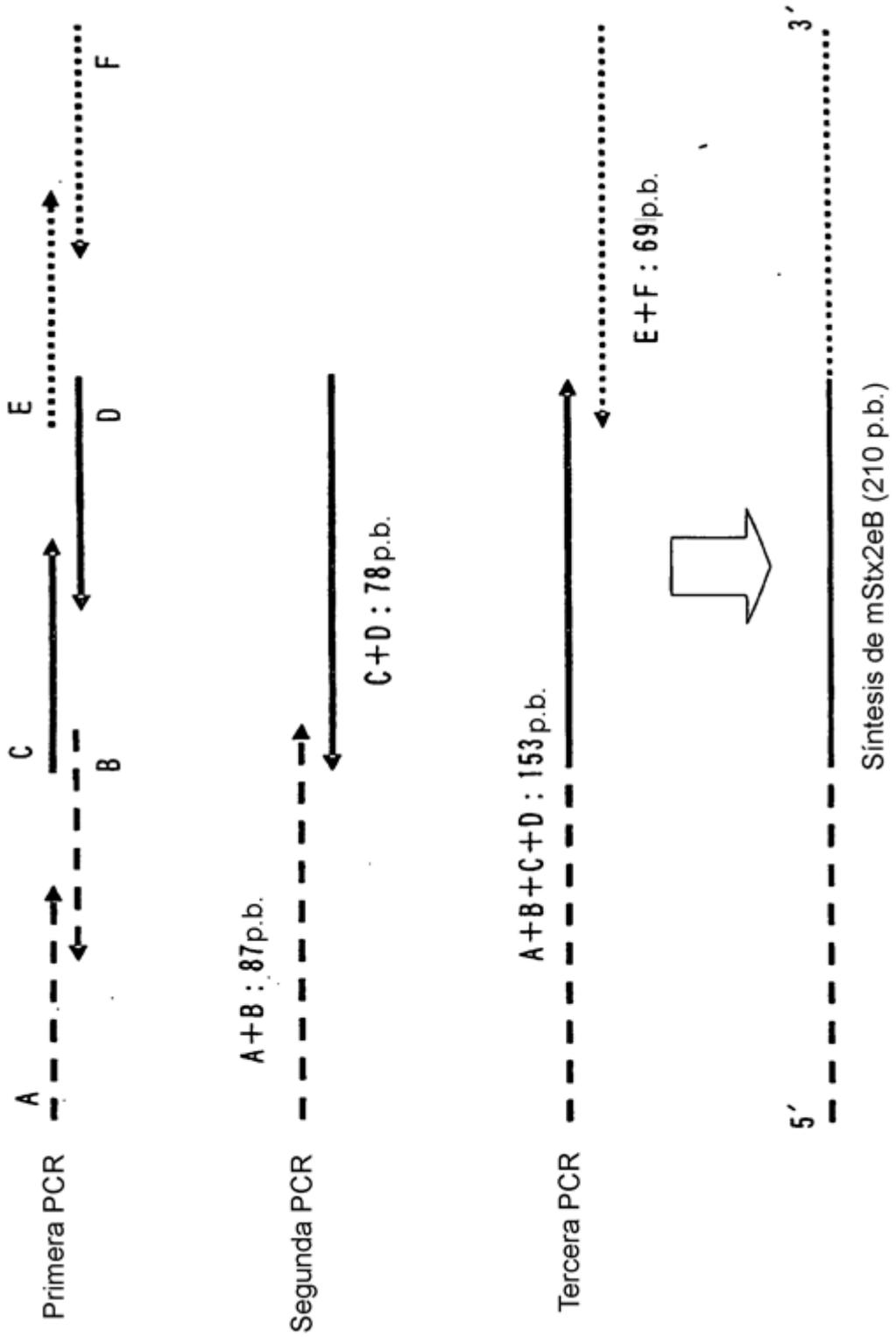
1. Transformante transformado con un vector recombinante que comprende un constructo de ADN que comprende:
una región no traducida en 5' de un gen de alcohol deshidrogenasa derivado de *Nicotiana tabacum*; y
5 un ADN que codifica la subunidad B de la proteína Stx2e al que se añade un péptido señal de secreción derivado de *Nicotiana tabacum* en el extremo amino terminal y operativamente unido a la región, en el que la subunidad B de la proteína Stx2e incluye un péptido señal de retención en el retículo endoplasmático o un péptido señal de transporte vacuolar añadido en un extremo carboxilo terminal, en el que el péptido
10 señal de retención en el retículo endoplasmático incluye una secuencia HDEL en el extremo carboxilo terminal.
2. Transformante según la reivindicación 1, en el que el péptido señal de transporte vacuolar se deriva de *Nicotiana tabacum*.
3. Transformante según la reivindicación 1 ó 2, en el que el constructo de ADN tiene una secuencia de bases representada por cualquiera de SEQ ID NO: 23, 24, 75, 77, 78 y 86.
- 15 4. Transformante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el transformante es una célula vegetal transformada o una planta transformada.
5. Transformante según la reivindicación 4, en el que la planta es *Lactuca sativa*.
6. Semilla que comprende la célula vegetal transformada según la reivindicación 4.
7. Vacuna contra la enfermedad de edema porcino, que comprende el transformante según cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 a 5.
8. Vacuna contra la enfermedad de edema porcino según la reivindicación 7, para su uso en el control de la enfermedad de edema porcino, en la que la vacuna contra la enfermedad de edema porcino se prepara para su administración a un cerdo.



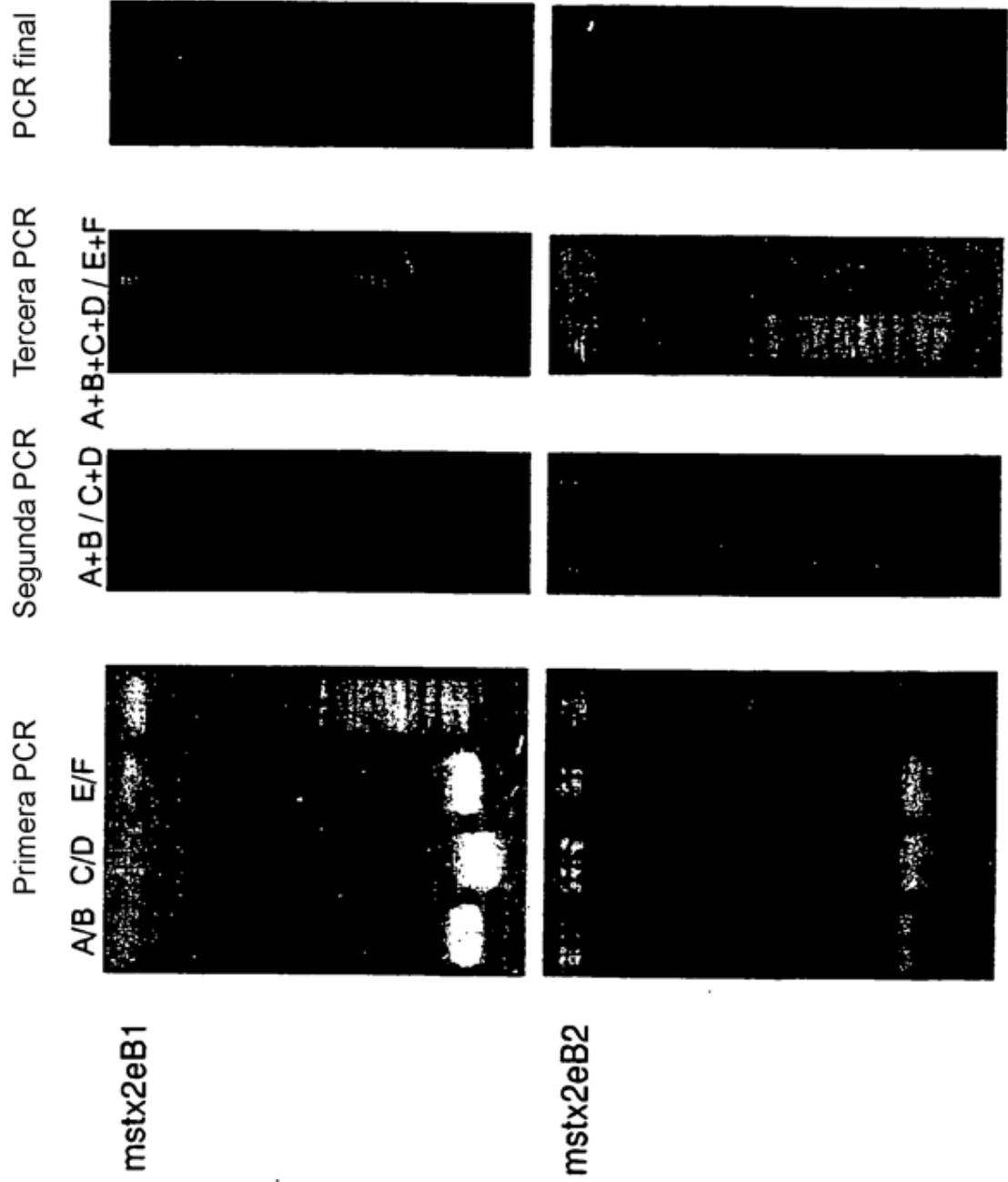
[Fig. 1]



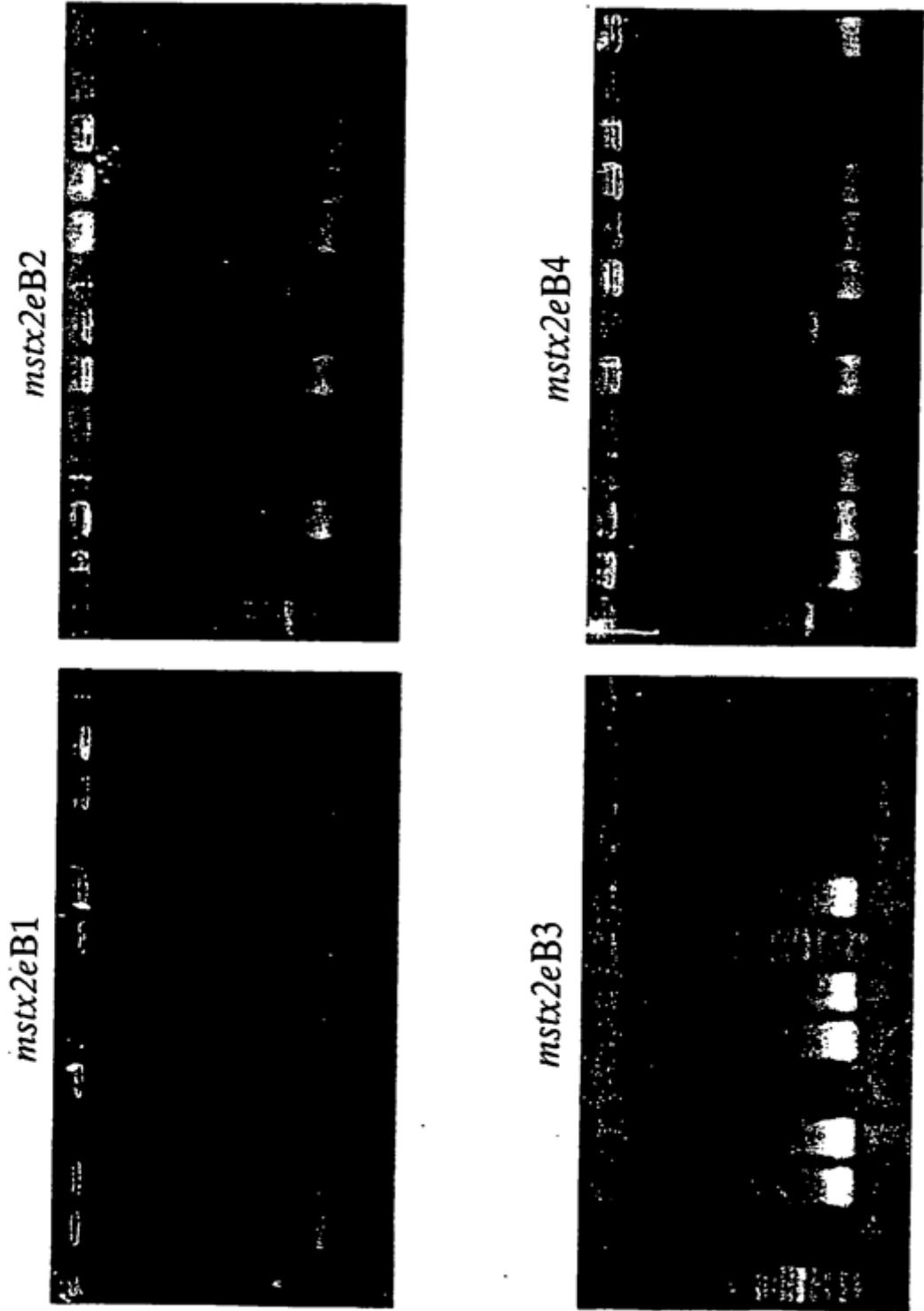
[Fig. 4]

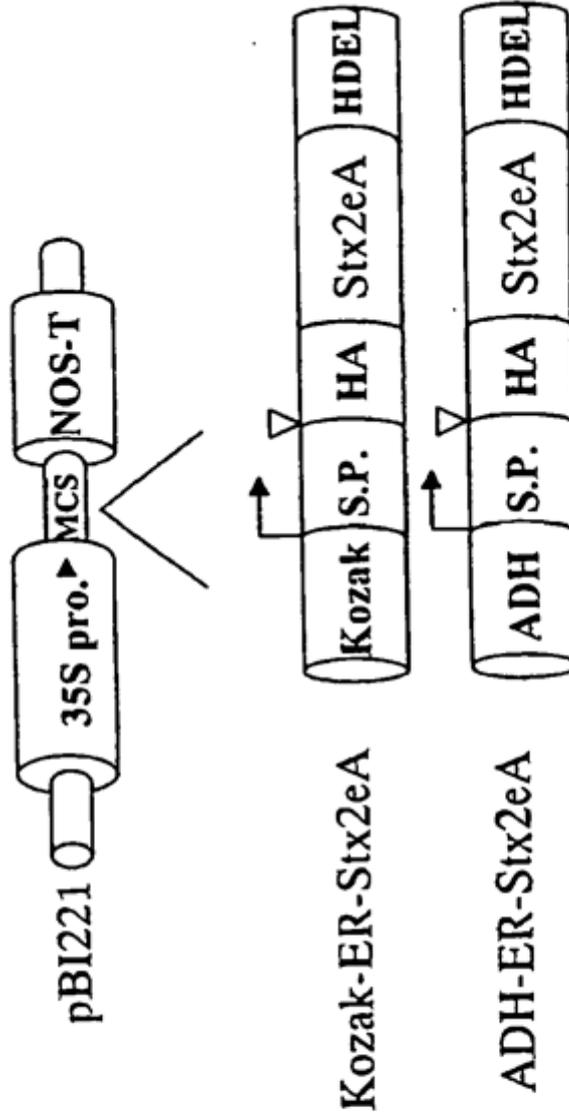


[Fig. 5]



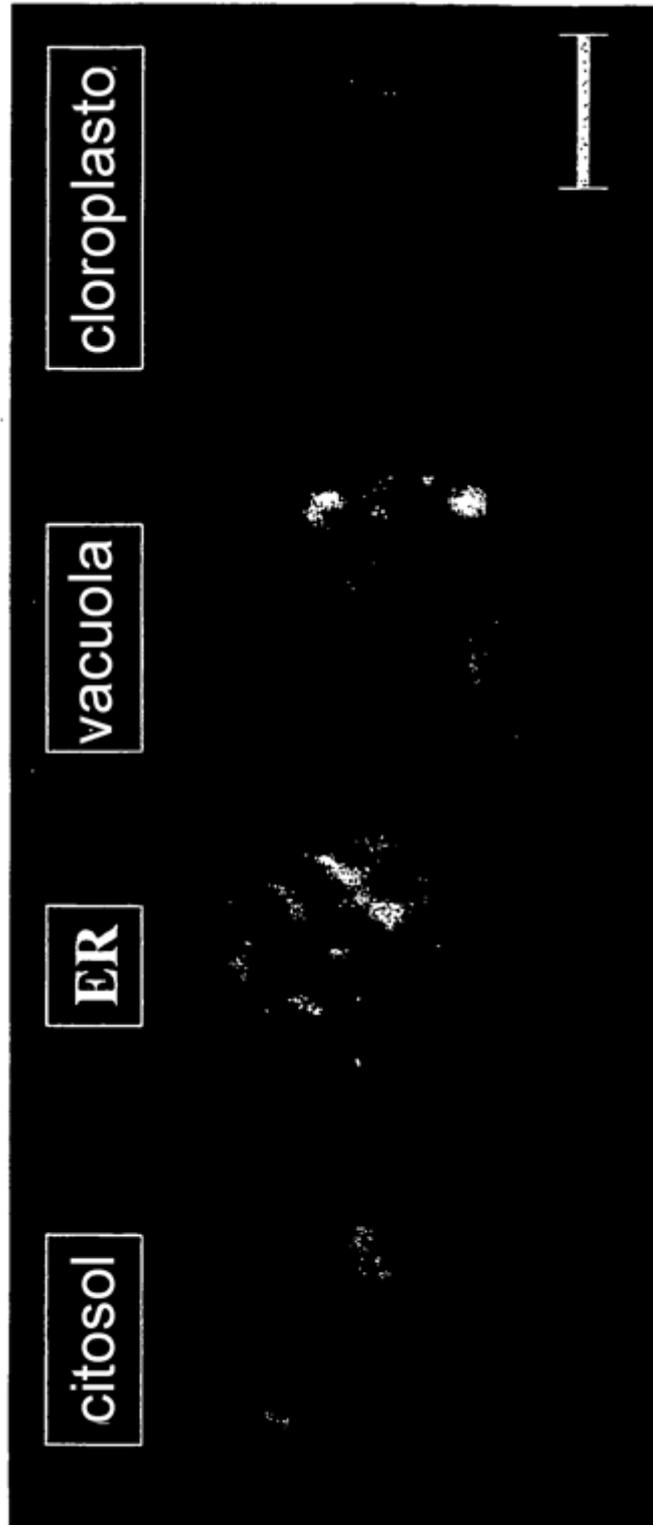
[Fig. 6]



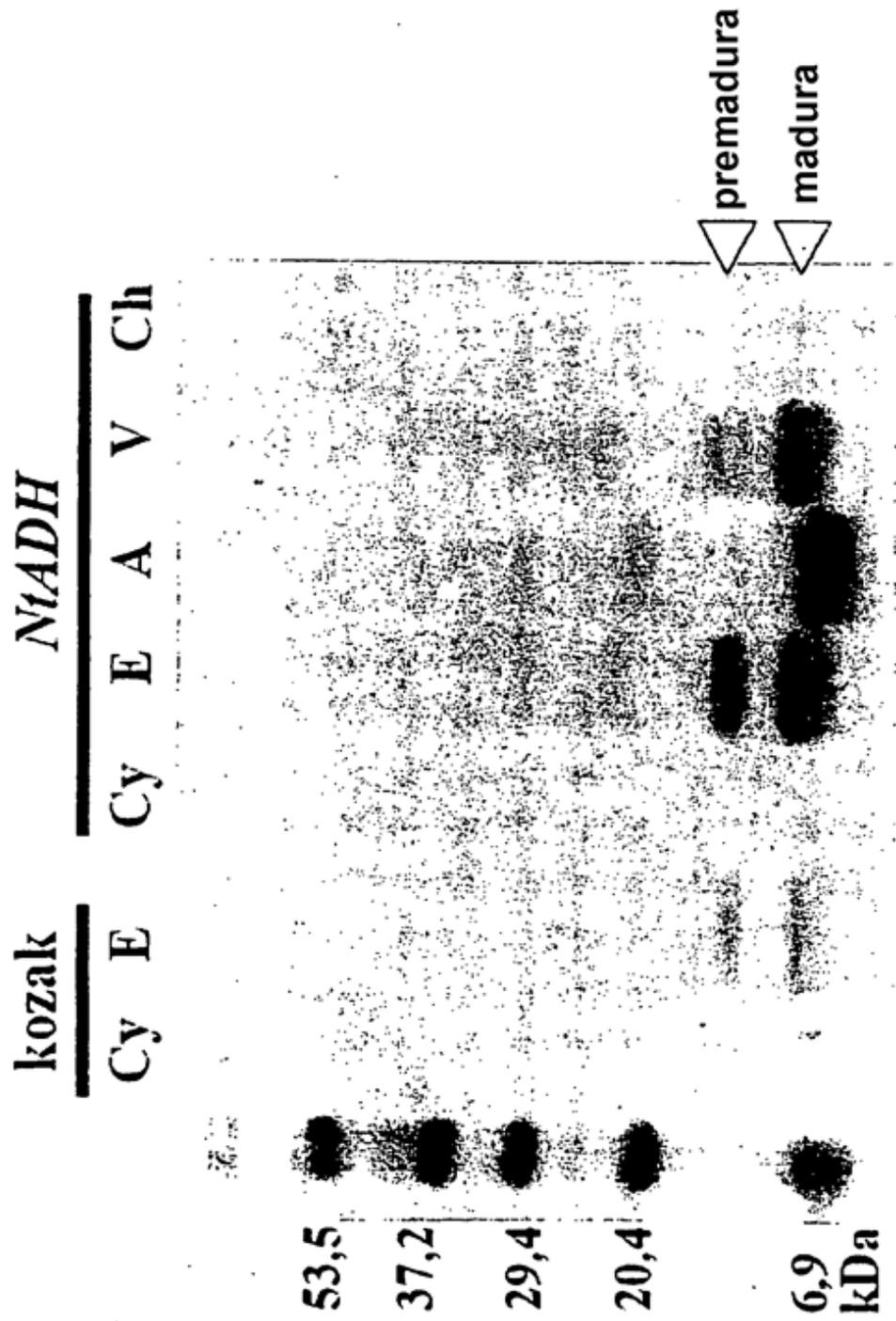


[Fig. 7]

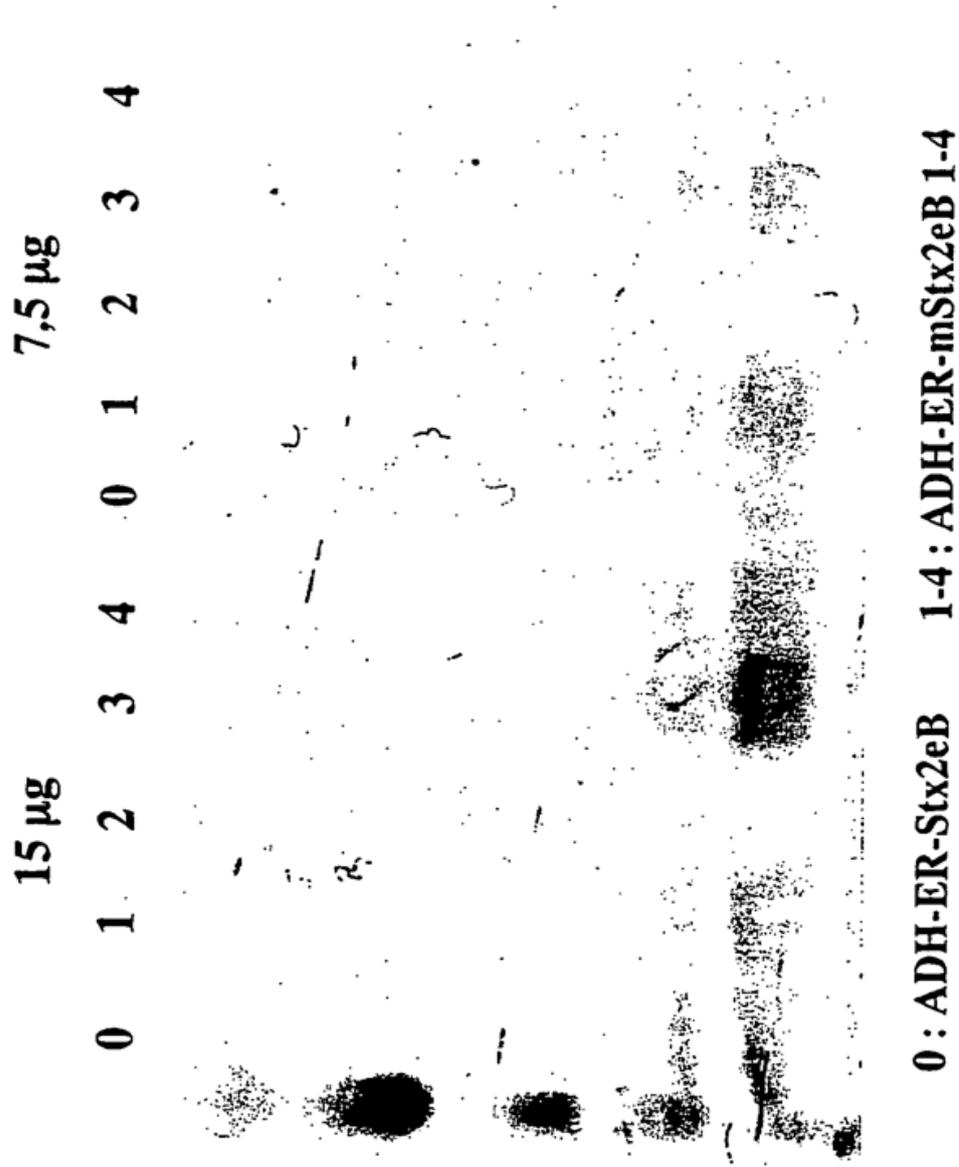
[Fig. 8]



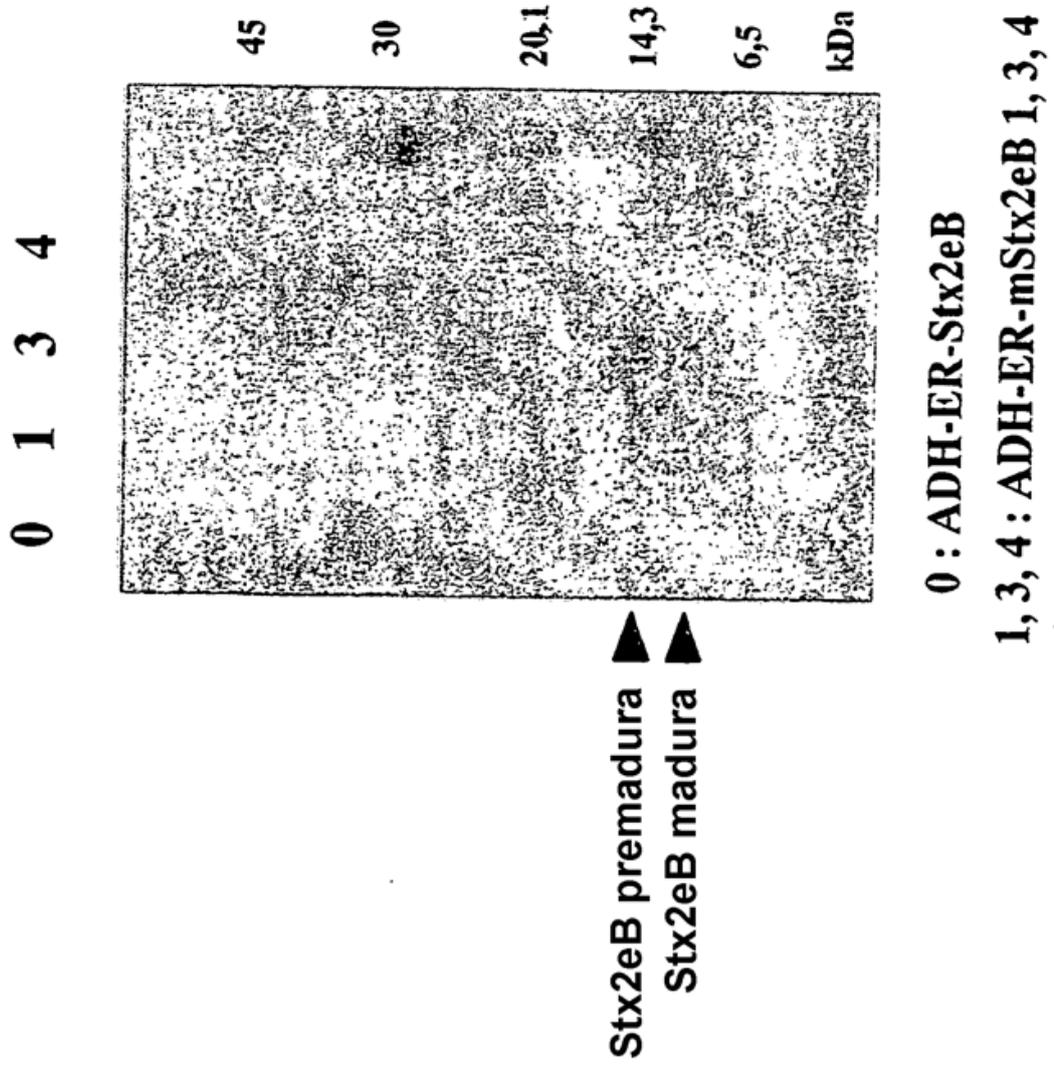
[Fig. 9]



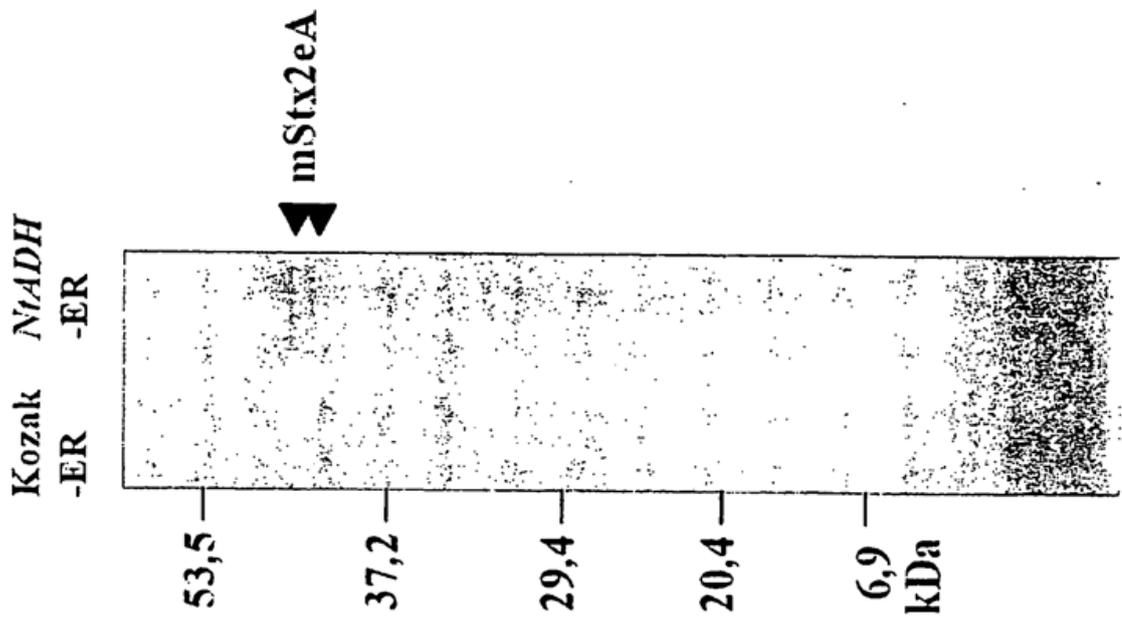
[Fig. 10]



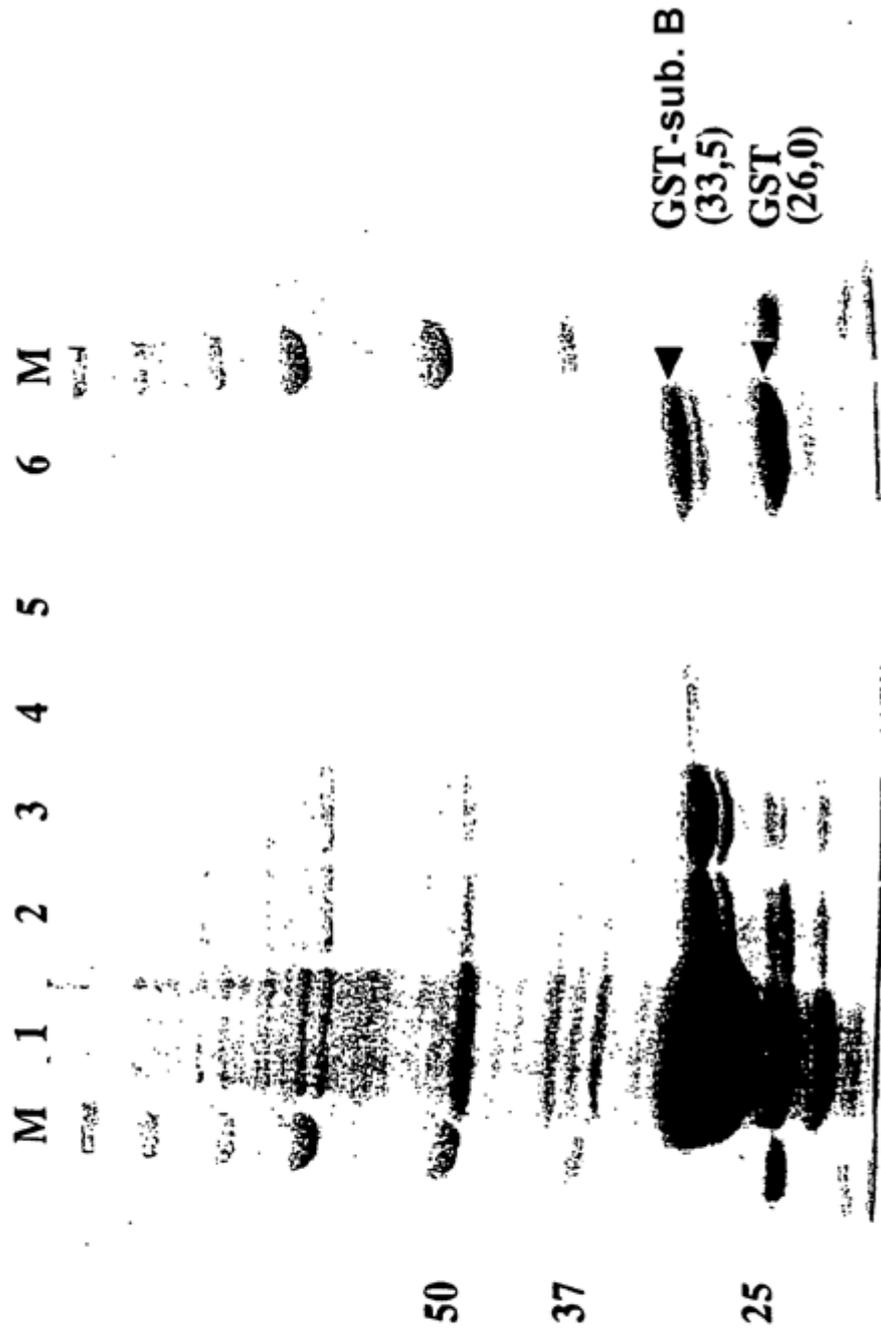
[Fig. 11]



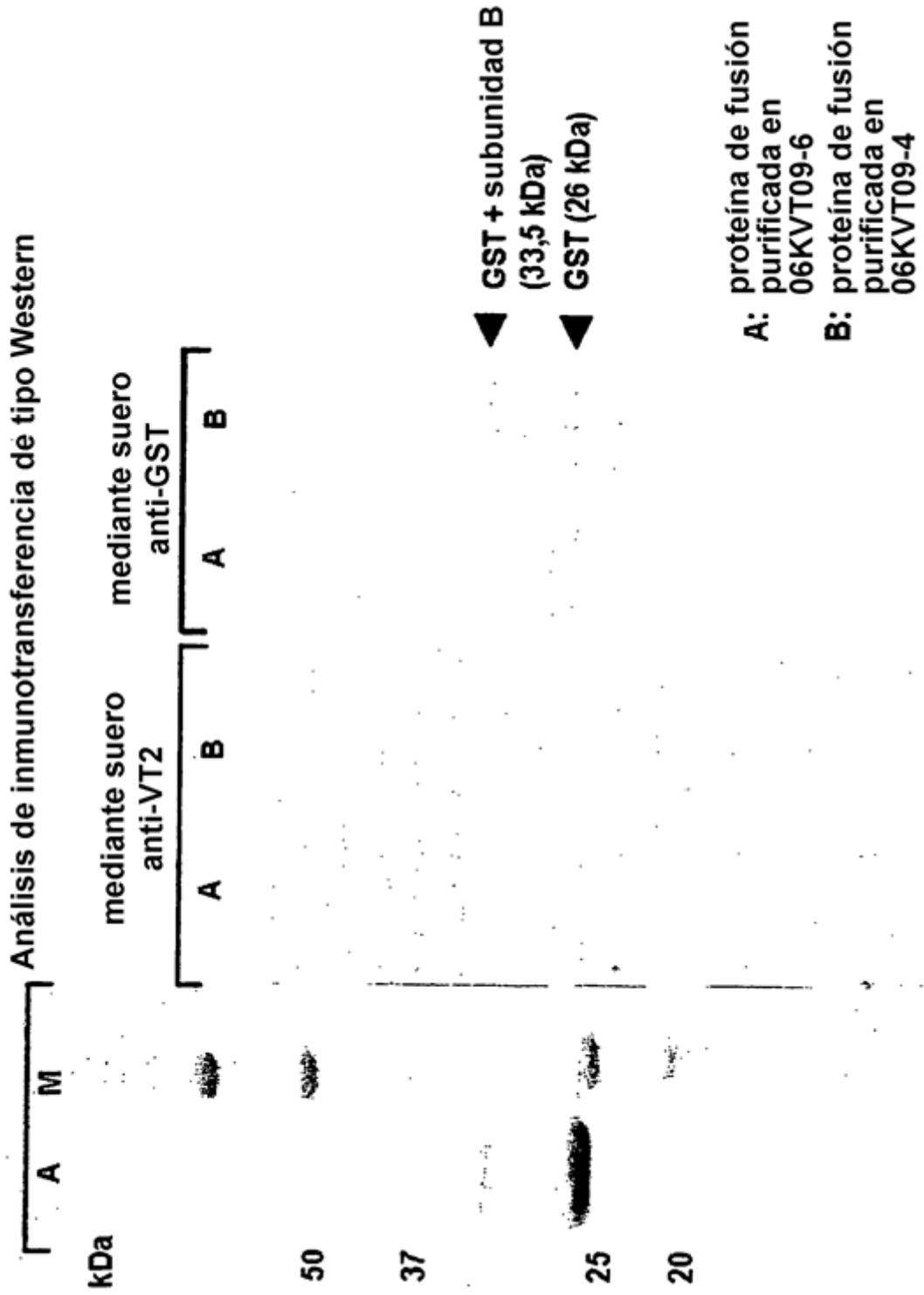
[Fig. 12]



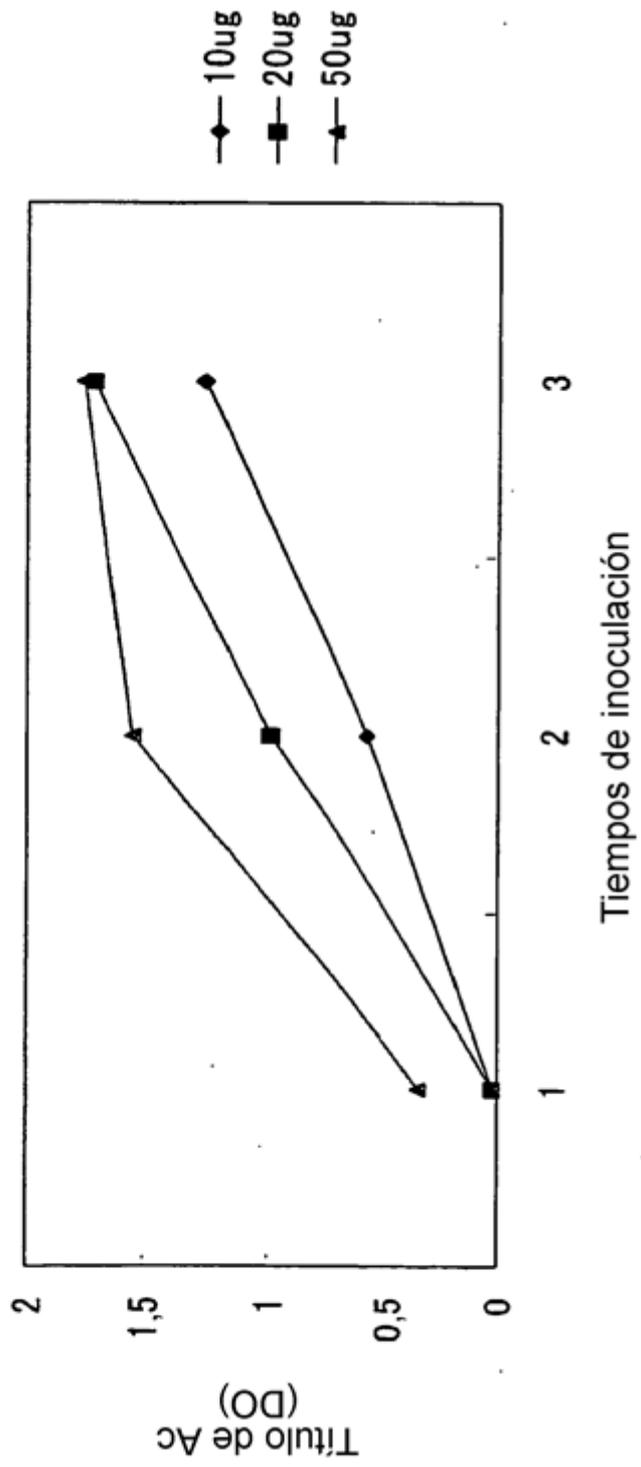
[Fig. 13]



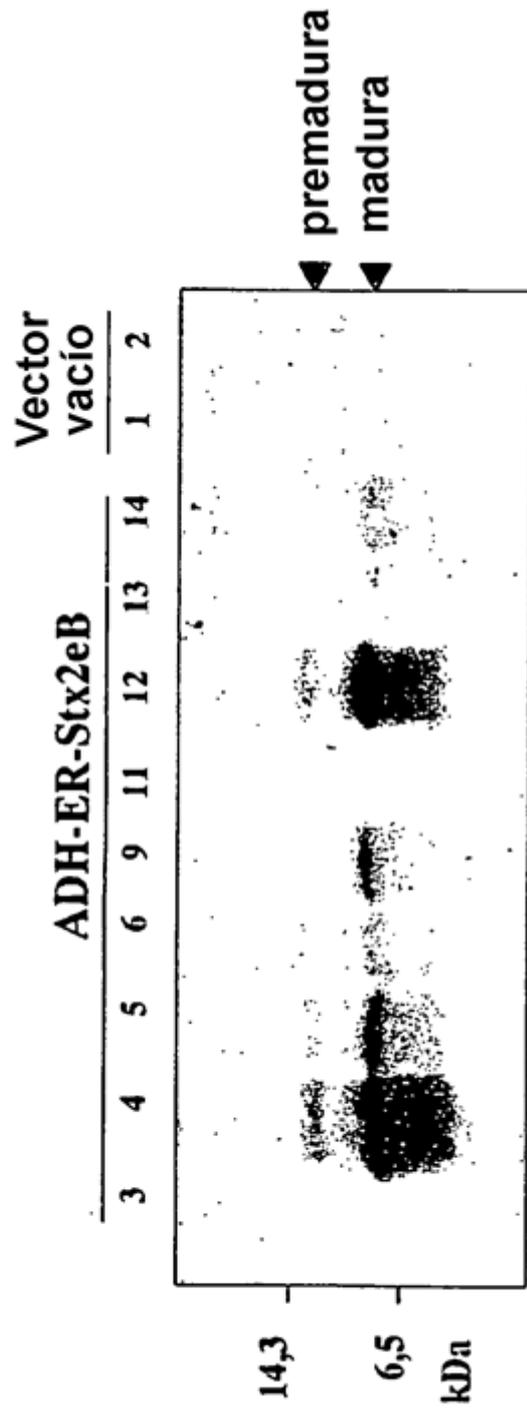
[Fig. 14]



[Fig. 15]



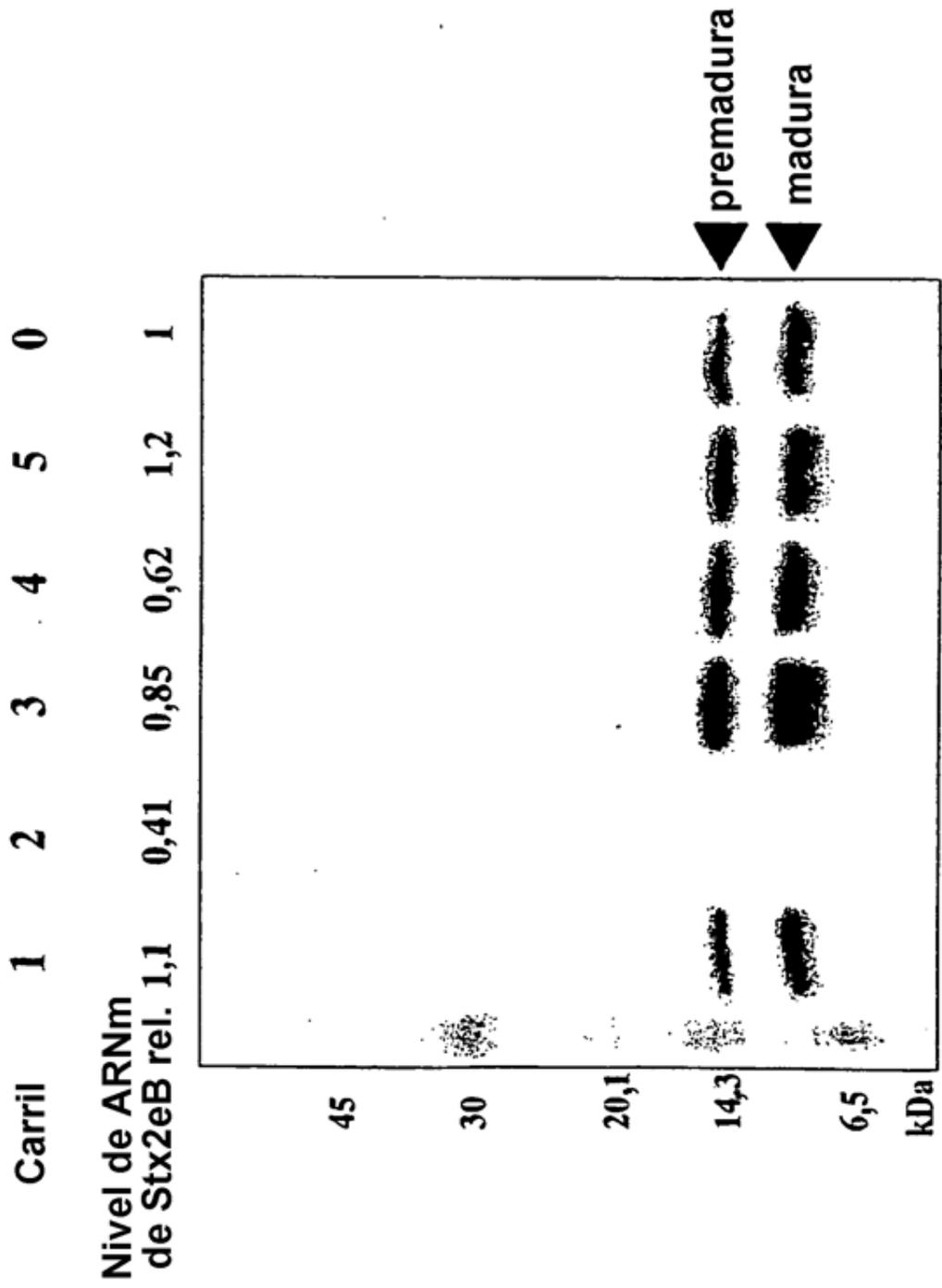
[Fig. 16]

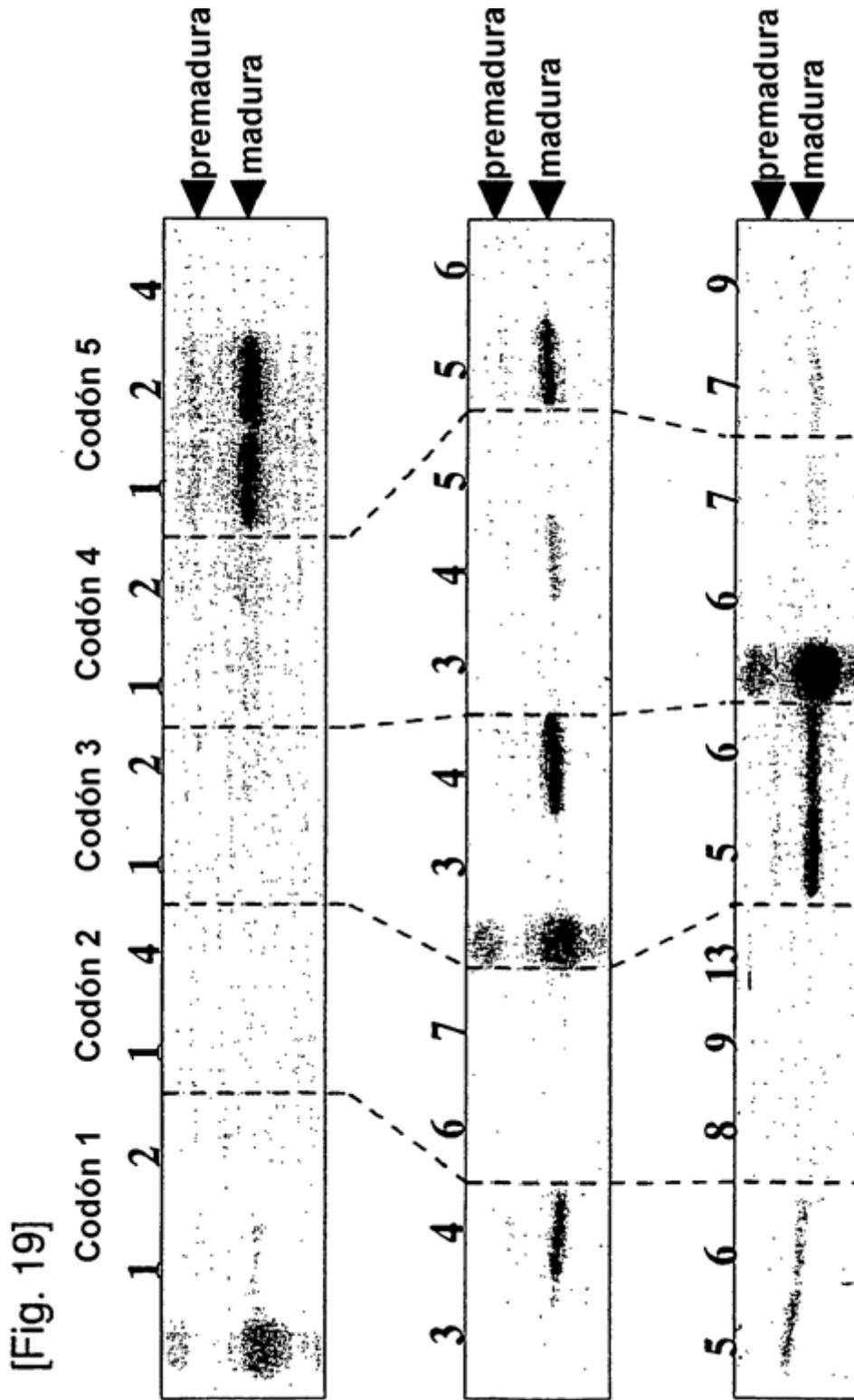


[Fig. 17]

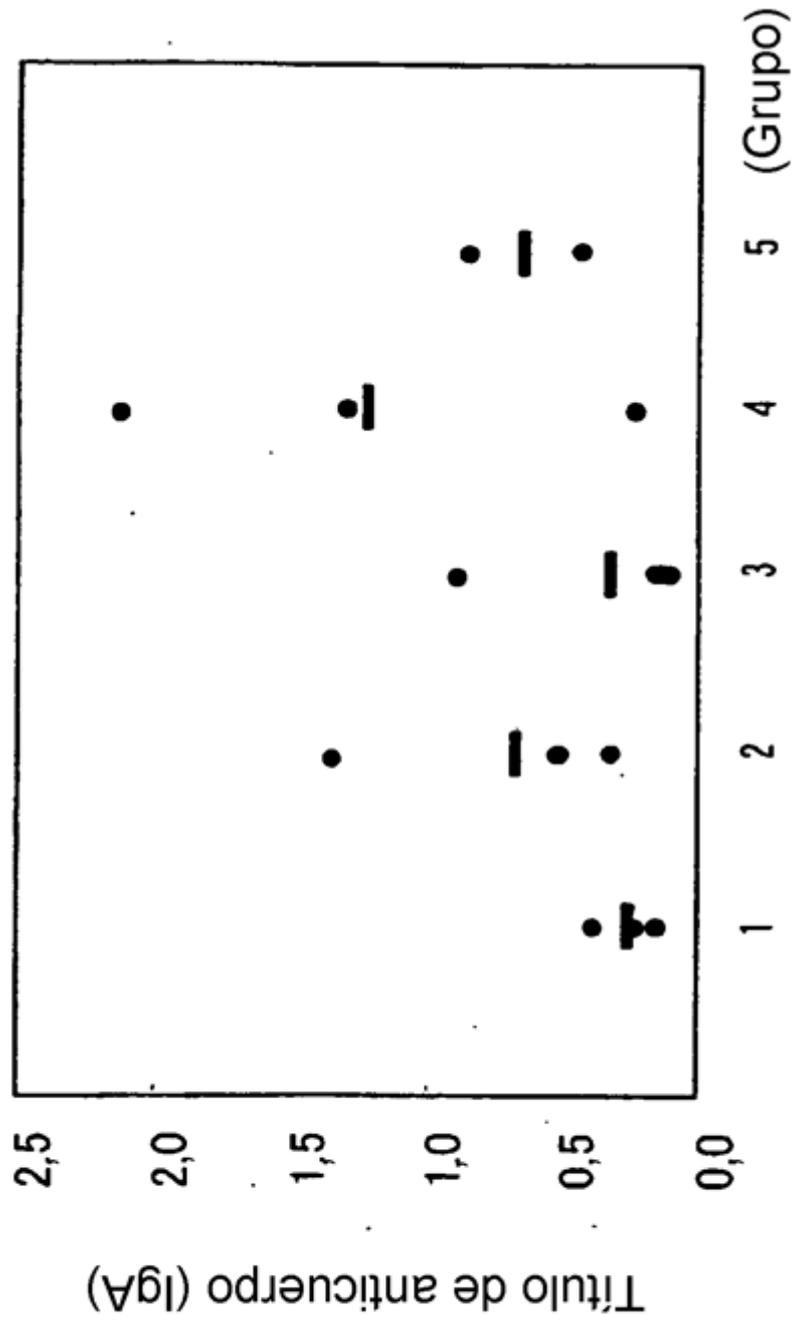
Stx2eB	ATG GCG GCG GAT TGT GCT AAA GGT AAA ATT GAG TTT TCC AAG TAT AAT GAG GAT AAT ACC
mStx2eB5	ATG GCG GCG GAC TGC GCG AAG GGC AAG ATC GAG TTC TCG AAG TAC AAC GAG GAC AAC ACG
	*** **
Stx2eB	TTT ACT GTG AAG GTG TCA GGA AGA GAA TAC TGG ACG AAC AGA TGG AAT TTG CAG CCA TTG
mStx2eB5	TTC ACG GTC AAG GTC TCG GGC CCG GAG TAC TGG ACG AAC CCG TGG AAC CTG CAG CCG CTG
	** **
Stx2eB	TTA CAA AGT GCT CAG CTG ACA GGG ATG ACT GTA ACA ATC ATA TCT AAT ACC TGC AGT TCA
mStx2eB5	CTG CAG TCG GCG CAG CTG ACG GGC ATG ACG GTC ACG ATC ATC TCG AAC ACG TGC TCG TCG
	* ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
Stx2eB	GGC TCA GGC TTT GCC CAG GTG AAG TTT AAC
mStx2eB5	GGC TCG GGC TTC GCG CAG GTC AAG TTC AAC
	** ** ** **^ ** ** ** ** **

[Fig. 18]

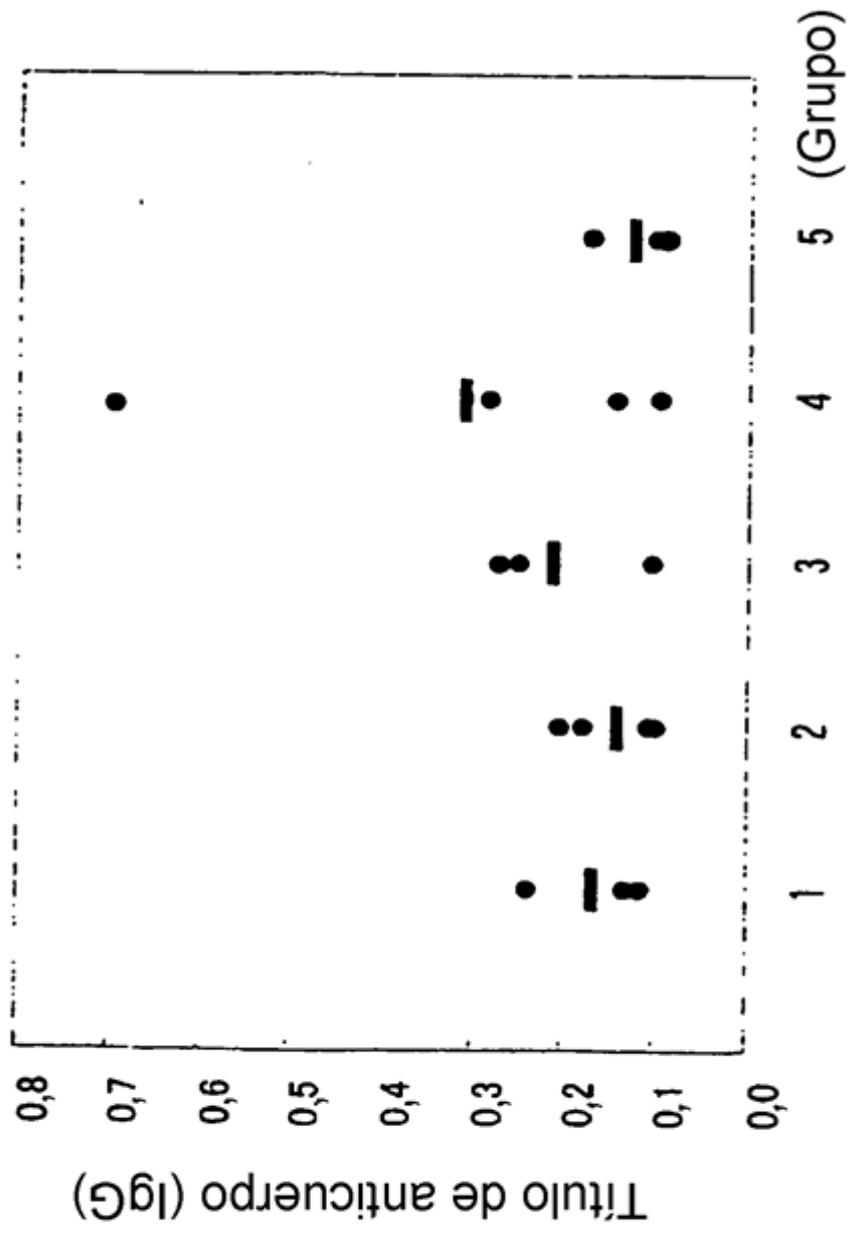




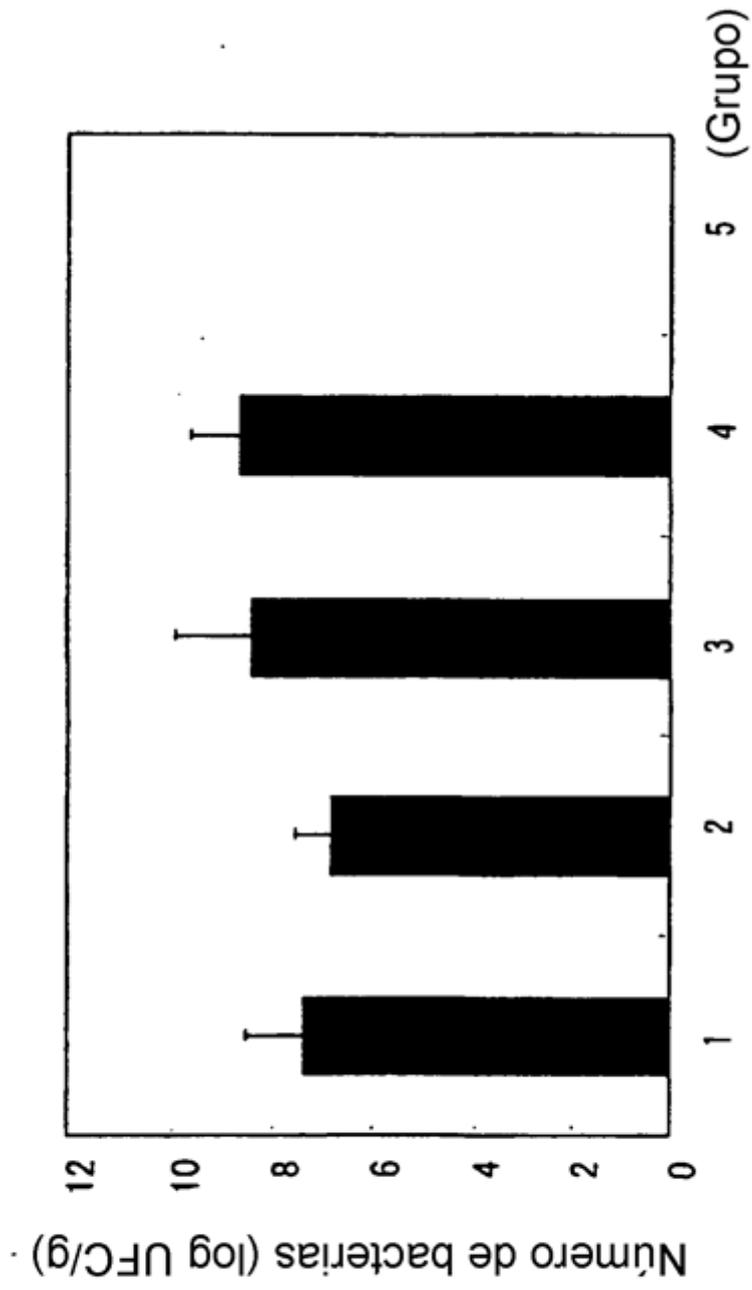
[Fig. 20]



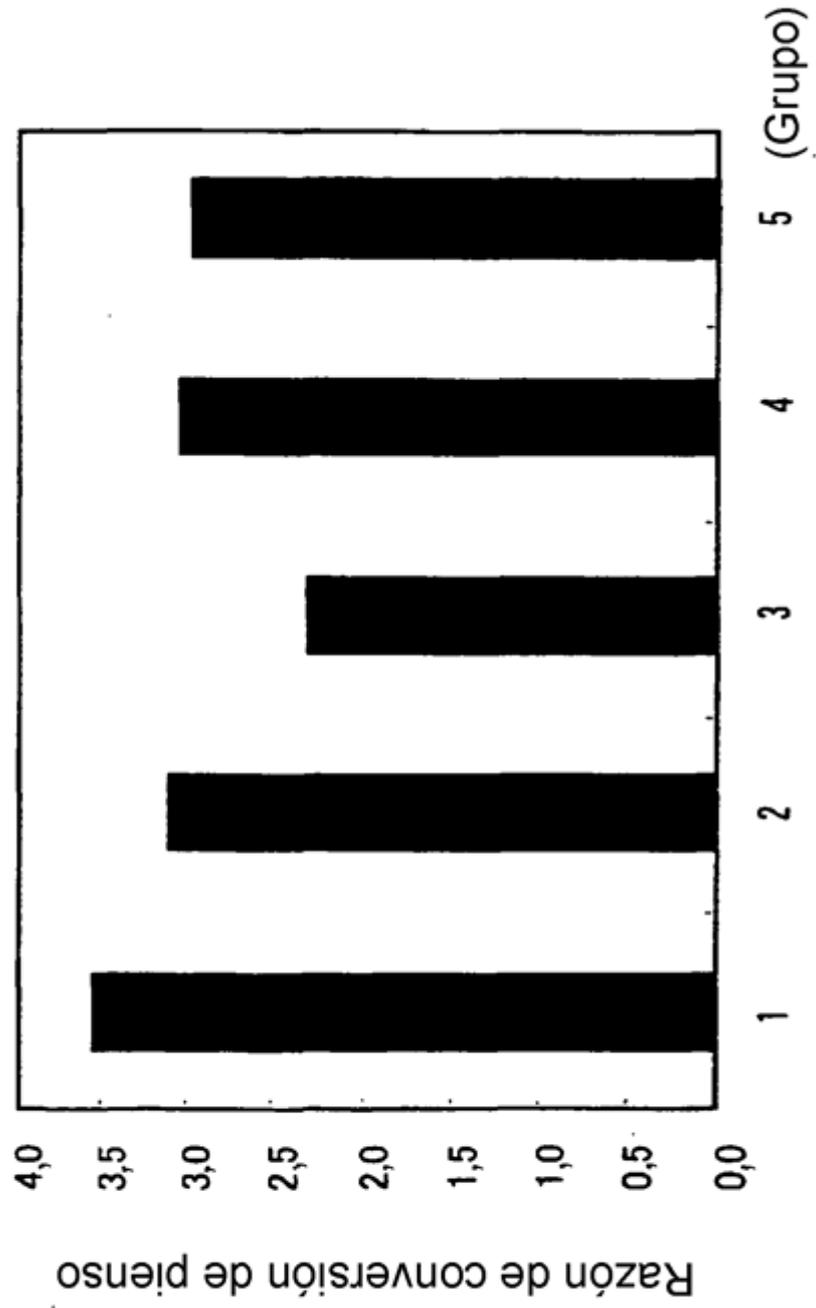
[Fig. 21]



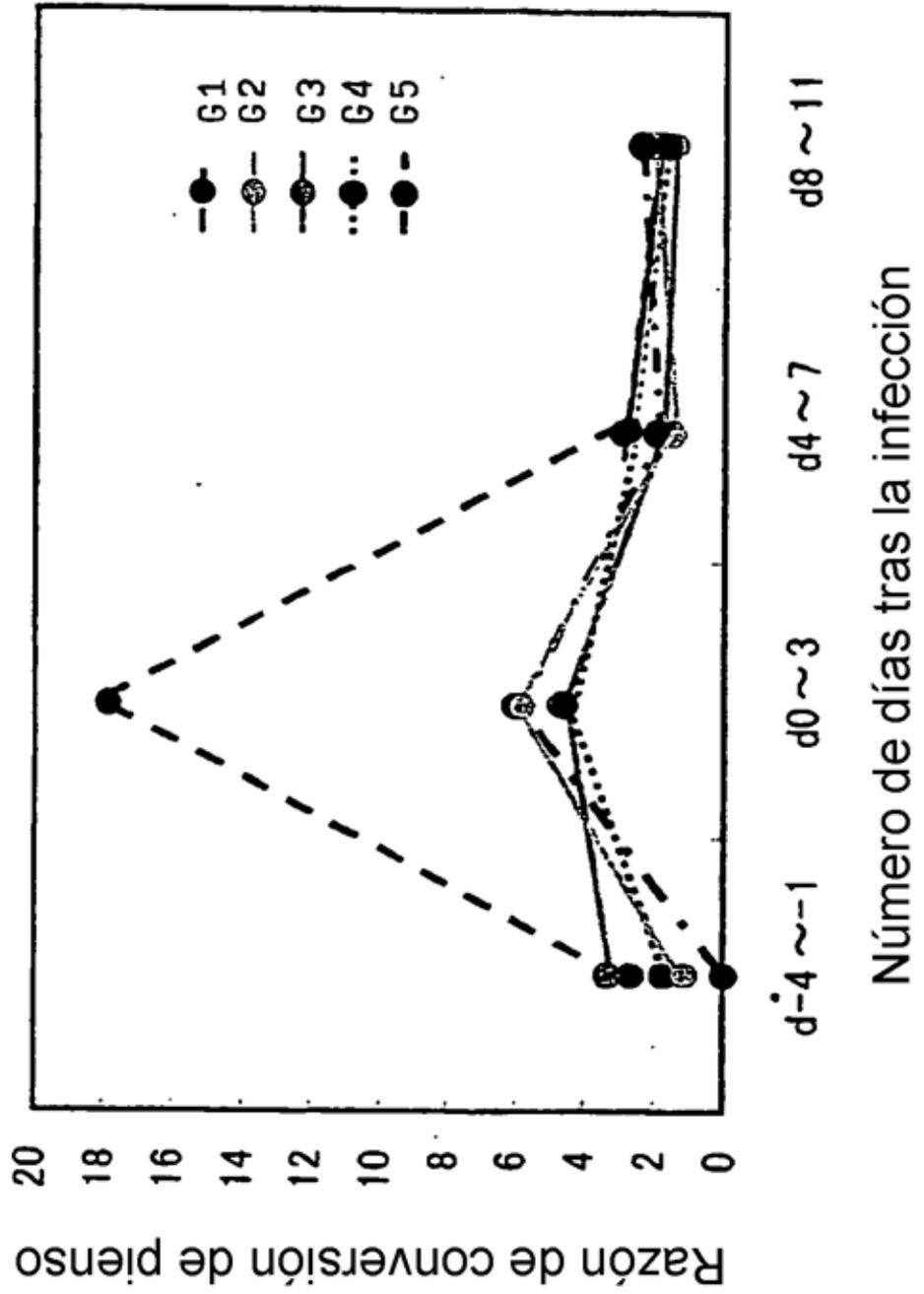
[Fig. 22]

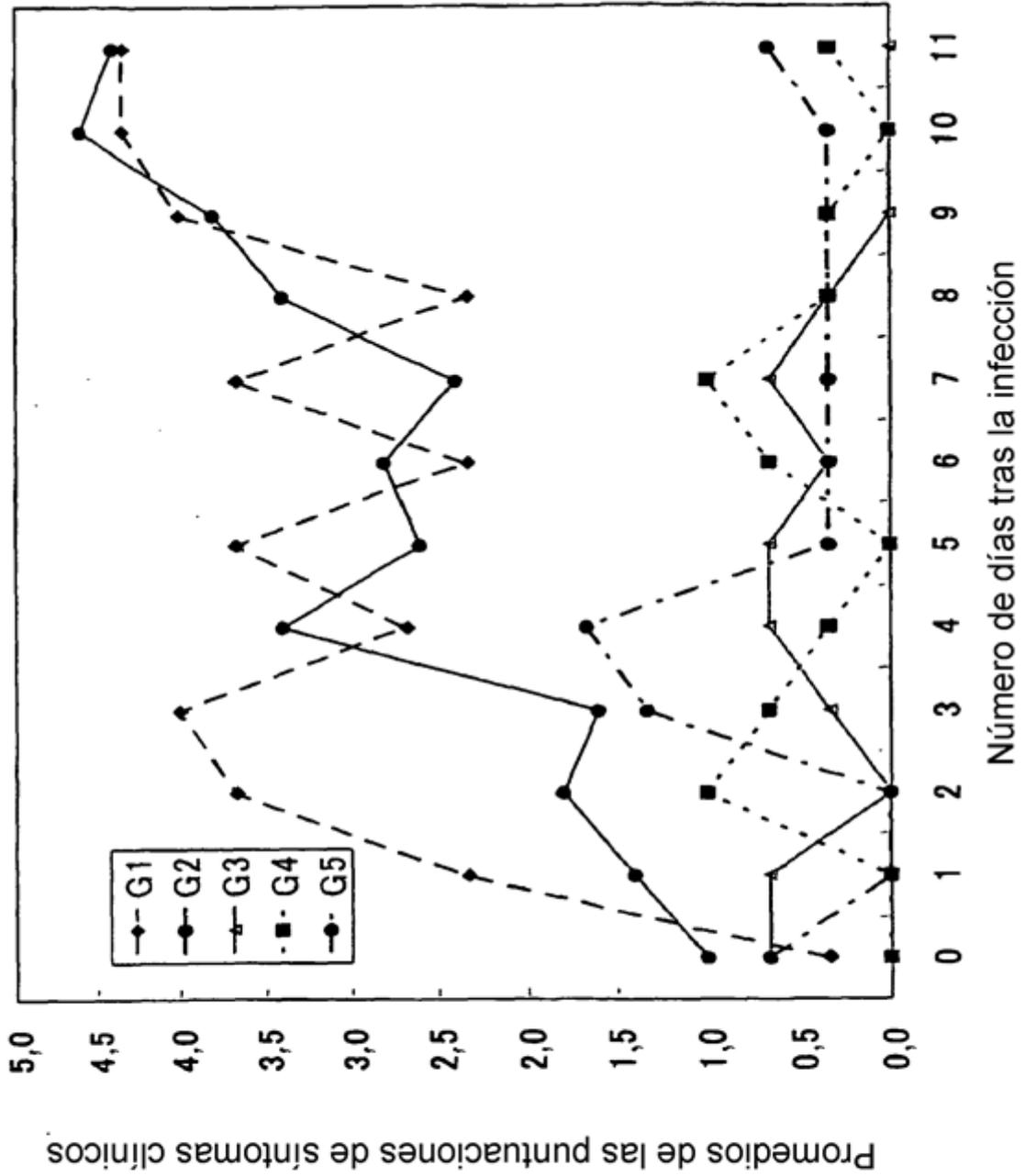


[Fig. 23]

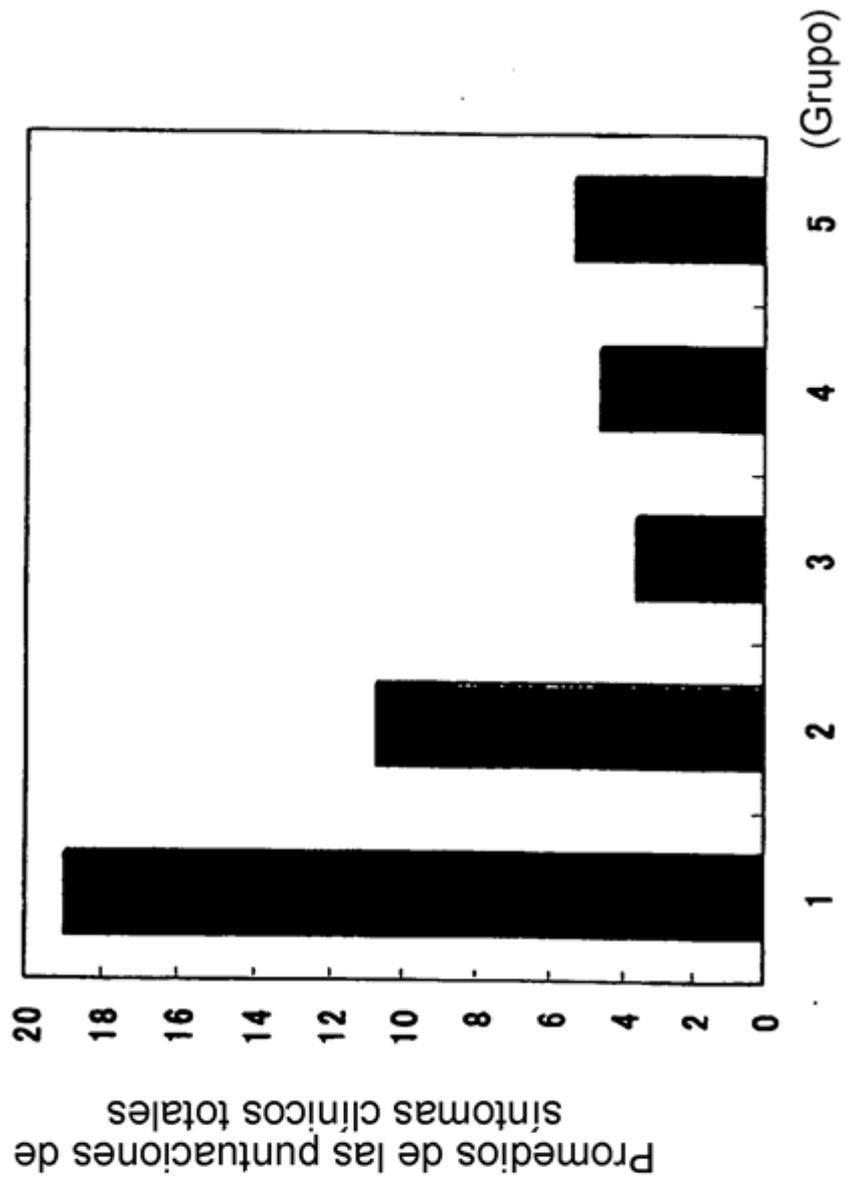


[Fig. 24]





[Fig. 25]



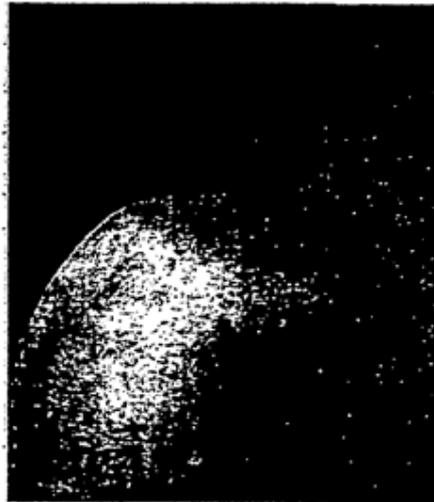
[Fig. 26]

[Fig. 27]

Grupo 1
(al que no se le administró vacuna)



edema alrededor de los ojos



diarrea

Grupo 4
(al que se le administraron
16 mg de vacuna)



sin edema alrededor de los ojos



sin diarrea