

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 962**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)	C07K 16/12	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)	C07K 16/14	(2006.01)
A61K 39/385	(2006.01)	C07K 16/18	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	C07K 19/00	(2006.01)
A61K 47/42	(2007.01)	C12N 1/15	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)	C12N 1/19	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)	C12N 1/21	(2006.01)
C07K 14/195	(2006.01)	C12N 5/10	(2006.01)
C07K 14/395	(2006.01)	G01N 33/53	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2013 PCT/JP2013/078305**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14065210**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2013 E 13848760 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2910634**

54 Título: **Vacuna para prevenir la enfermedad de edema porcino**

30 Prioridad:

22.10.2012 JP 2012233224

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

24.05.2019

73 Titular/es:

**KM BIOLOGICS CO., LTD. (50.0%)
1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto-shi
Kumamoto 860-8568, JP y
JECTAS INNOVATORS COMPANY LIMITED
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**YOKOGAWA, KENJI;
WAKI, TAKASHI;
HONDA, YOKO;
UEFUJI, HIROTAKA;
SEWAKI, TOMOMITSU;
ARAKAWA, TAKESHI;
HARAKUNI, TETSUYA y
MIYATA, TAKESHI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 713 962 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 para prevenir la enfermedad de edema porcino

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una vacuna para prevenir la enfermedad de edema porcino. Más específicamente, la vacuna contiene una proteína recombinante en la que un polipéptido que tiene una unidad formadora de superhélice y una subunidad B de Stx2e (Stx2eB), que es una toxina que causa la enfermedad de edema porcino se fusionan, y/o un multímero de la misma como principio activo. Vacunando los cerdos con la proteína de fusión y/o el multímero, se inducen potentes anticuerpos neutralizantes de la toxina, y la vacuna puede prevenir el inicio de la enfermedad de edema.

Antecedentes de la técnica

10 La enfermedad de edema porcino a menudo se manifiesta en cerdos jóvenes de 4 a 12 semanas de edad, causa edema palpebral, síntomas neurológicos y similares, y en su mayoría produce la muerte dentro de las 24 horas posteriores al inicio (NPL 1, Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 2006, 48, 7-13). Su tasa de mortalidad es de hasta el 50 al 90 %, y la pérdida económica es enorme porque la productividad disminuye debido a la recidiva, el desarrollo incompleto y similares. Esta enfermedad es causada por la toxina Shiga Stx2e producida por *Escherichia coli* que produce toxina Shiga (*E. coli* que produce toxina Shiga, STEC) que se adhiere al tracto intestinal. La Stx2e es una proteína de toxina de tipo AB₅ que contiene una subunidad A (Stx2eA) que tiene actividad N-glucosidasa de ARNr y un pentámero de subunidad B (Stx2eB) que tiene la capacidad de unirse a un receptor (globotetraosil ceramida (Gb4)). Se sabe que Stx2e, que fue extraída del tracto intestinal y fue llevada a la superficie de una célula tal como una célula endotelial vascular por la subunidad B, envía la subunidad A al citoplasma de la célula diana e inhibe la síntesis de proteínas por parte del ribosoma, induciendo de este modo los síntomas de la enfermedad de edema. En Japón, no está disponible en el mercado una vacuna para prevenir la enfermedad de edema porcino y, aunque se usan antibióticos, la administración después del inicio generalmente es demasiado tarde. Además, se han notificado bacterias resistentes a los fármacos y se desea el desarrollo de un procedimiento preventivo y un procedimiento terapéutico eficaces.

15 En estas circunstancias, se han investigado procedimientos para prevenir eficazmente la enfermedad de edema porcino. Por ejemplo, un caso de inmunización con un toxoide de Stx2e ha demostrado un efecto de defensa contra la infección experimental (NPL 2, Vet. Microbiol. 1991, 29, 309-318). Sin embargo, en otro informe, se ha observado el inicio de enfermedad de edema en algunos cerdos después de la inmunización con un toxoide porque la detoxificación es difícil (NPL 3, Infect. Immun. 1992, 60, 485-90). Además, en otro ejemplo, se notifica que la inducción de anticuerpos neutralizantes se confirmó cuando los cerdos se inmunizaron con Stx2e recombinante que se detoxificó modificando una parte de la secuencia de aminoácidos de Stx2eA (NPL 3, Infect. Immun. 1992, 60, 485-90). Sin embargo, la producción de Stx2e detoxificada por *E. coli* recombinante es extremadamente baja, y aún existen problemas para el uso práctico.

Lista de citas**Referencias de patente**

PTL 1: JP-A-2008-50344

Referencias no de patente

40 NPL 1: Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 2006, 48, 7-13
NPL 2: Vet. Microbiol. 1991, 29, 309-318
NPL 3: Infect. Immun. 1992, 60, 485-90
NPL 4: Adv. Protein Chem. 2005, 70, 37-78
NPL 5: Infect. Immun. 2005, 7, 5654-65
NPL 6: Infect. Immun. 2011, 79(10), 4260-4275

45 RAN XQ. Y COL., VET. MICROBIOL., vol. 127, no. 1-2, 2008, páginas 209-15 y MATSUI T. Y COL., TRANSGENIC RES., vol. 20, 2011, las páginas 735-48 desvelan el uso de una subunidad Stx2eB como un antígeno y una proteína que contiene dicho antígeno como una vacuna contra la enfermedad de edema porcino.

El documento WO 2010/092963 desvela un fármaco que porta proteínas multiméricas de una estructura de hélice y una molécula de ligando para el receptor de células inmunocompetentes.

50 TAKESHI MIYATA Y COL., INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 79, no. 10, 2011 desvela que los antígenos y adyuvantes de vacunas contra diversas enfermedades infecciosas pueden cargarse en un sistema inmunopotenciador de tres componentes. Se hace referencia específica a un antígeno de la malaria, pero no se usa ninguna proteína formadora de hélice en dicha estructura de tres componentes.

Sumario de la invención

Problema técnico

5 Un objetivo que la invención es conseguir proporcionar granjas en las que se anticipa el inicio de la enfermedad de edema porcino con una vacuna que pueda prevenir eficazmente la enfermedad de edema porcino. Solución al problema

10 Los inventores de la invención han estudiado intensamente para lograr el objetivo y, como resultado, se descubrió que se inducen potentes anticuerpos neutralizantes de toxinas vacunando a los cerdos con una proteína de fusión de un polipéptido que consiste en una unidad formadora de superhélice de la proteína oligomérica de la matriz de cartílago (COMP) y una subunidad B de la toxina Shiga Stx2eB como vacuna. Por tanto, los inventores han consumado la invención.

Es decir, la invención se refiere a lo siguiente:

- [1] Una proteína de fusión en la que están unidos un polipéptido que consiste en una unidad formadora de superhélice de la proteína oligomérica de la matriz de cartílago (COMP) y una subunidad B de la toxina Shiga Shx2e (Stx2eB).
- 15 [2] La proteína de fusión descrita en el punto [1], que tiene una secuencia enlazadora y/o una secuencia de etiqueta entre el polipéptido y la Stx2eB.
- [3] La proteína de fusión descrita en los puntos [1] o [2], en la que la proteína COMP es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:27 o la SEQ ID NO:28 o un polipéptido que tiene
- 20 una homología de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % o más preferentemente al menos el 95 % con dichas secuencias.
- [4] La proteína de fusión descrita en uno cualquiera de los puntos [1] a [3], en la que la Stx2eB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:20, la SEQ ID NO:22 o la SEQ ID NO:24 o un polipéptido que tiene una homología de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % o más preferentemente al menos el 95 % con dichas secuencias.
- 25 [5] Un multímero de proteína de fusión, en el que la proteína de fusión descrita en uno cualquiera de los puntos [1] a [4] está multimerizada.
- [6] Un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión descrita en uno cualquiera de los puntos [1] a [4].
- 30 [7] Un vector de expresión recombinante que comprende el fragmento de ácido nucleico descrito en el punto [6].
- [8] Una célula huésped que comprende el fragmento de ácido nucleico descrito en el punto [6] o el vector de expresión recombinante descrito en el punto [7].
- [9] Una vacuna contra la enfermedad de edema porcino que comprende la proteína de fusión descrita en uno cualquiera de los puntos [1] a [4] o el multímero de proteína de fusión descrito en el punto [5] como principio activo.
- 35 [10] Una vacuna de ADN contra la enfermedad de edema porcino que comprende el fragmento de ácido nucleico descrito en el punto [6] o el vector de expresión recombinante descrito en el punto [7] como principio activo.
- [11] Un kit para medir la cantidad de anticuerpos contra la Stx2eB en una muestra, que comprende la proteína de fusión descrita en uno cualquiera de los puntos [1] a [4] o el multímero de proteína de fusión descrito en el punto [5].
- 40 [12] Un procedimiento para producir un multímero de proteína de fusión, que comprende un procedimiento de expresar una proteína de fusión en la que un polipéptido que tiene una unidad formadora de superhélice de la proteína oligomérica de la matriz de cartílago (COMP) y una subunidad B de la toxina Shiga Stx2e (Stx2eB) se unen en un huésped y a continuación replegar la proteína de fusión,
- 45 en el que la proteína de fusión tiene preferentemente un espaciador entre el polipéptido y la Stx2eB.
- [13] El procedimiento de producción descrito en el punto [12], en la que la proteína COMP es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:27 o la SEQ ID NO:28 o un polipéptido que tiene una homología de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % o más preferentemente al menos el 95 % con dichas secuencias.
- 50 [14] El procedimiento de producción descrito en uno cualquiera de los puntos [12] o [13], en la que la Stx2eB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:20, la SEQ ID

NO:22 o la SEQ ID NO:24 o un polipéptido que tiene una homología de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % o más preferentemente al menos el 95 % con dichas secuencias.

5 [15] Una proteína de fusión como se describe en uno cualquiera de los puntos [1] a [4] o un multímero de proteína de fusión como se describe en el punto [5] o un fragmento de ácido nucleico como se describe en el punto [6] o un vector de expresión recombinante como se describe en el punto [7] para su uso en un procedimiento para prevenir la enfermedad de edema porcino.

Efectos ventajosos de la invención

10 Cuando se inocular a los cerdos con una vacuna que contiene como principio activo una proteína de fusión en la que se unen un polipéptido que tiene una unidad formadora de superhélice y Stx2eB como se definió anteriormente, es posible inducir potentes anticuerpos neutralizantes de toxinas y prevenir el inicio de la enfermedad de edema porcino.

Breve descripción de los dibujos

15 [Figura 1] Un diagrama esquemático de Stx2eB-His.
 [Figura 2] Un diagrama esquemático de Stx2eB-His-COMP.
 [Figura 3] Una figura que muestra la formación de multímeros de Stx2eB-His-COMP observada.
 [Figura 4] Un diagrama esquemático de Stx2eB-His-COMP-Z.
 [Figura 5] Una figura que muestra la formación de multímeros de Stx2eB-His-COMP-Z observada.
 [Figura 6] Un diagrama esquemático de Stx2eB-His-CMP.
 [Figura 7] Una figura que muestra la formación de multímeros de Stx2eB-His-CMP observada.

20 **Descripción de las realizaciones**

(1) Proteína de fusión

La invención incluye una proteína de fusión en la que están unidos un polipéptido que tiene una unidad formadora de superhélice de la proteína oligomérica de la matriz de cartílago (COMP) y una subunidad B de la toxina Shiga Shx2e (Stx2eB).

25 Los ejemplos de Stx2eB que constituyen la proteína de fusión de la invención son Stx2eB precursora que contiene una señal secretora (por ejemplo, SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:20), Stx2eB madura sin una señal secretora (por ejemplo, SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:22) y Stx2eB obtenida optimizando los codones de Stx2eB madura para la expresión en *E. coli* y levaduras (por ejemplo, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24).

30 Como la secuencia de ADN que codifica Stx2eB (la secuencia de ADN de Stx2eB), además de las secuencias de ADN de la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 23, se incluyen estas secuencias de ADN a las que se añade un sitio de escisión apropiado para una enzima de restricción y estas secuencias de ADN con eliminación, sustitución o inserción de uno o varios nucleótidos. Además, también se incluyen secuencias de ADN que tienen una homología del 80 % o más, preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el 95% o más, con estas secuencias de ADN.

35 Stx2eB incluye polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por la SEQ ID NO:20, la SEQ ID NO:22 y la SEQ ID NO:24 y, polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos, cada una con una homología del 80 % o más, preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el 95% o más, con estas secuencias de aminoácidos.

40 Por otro lado, el polipéptido que tiene una unidad formadora de superhélice que se une con Stx2eB para constituir la proteína de fusión de la invención proviene de la proteína oligomérica de la matriz de cartílago (COMP). De acuerdo con la invención, se usa un polipéptido que tiene una unidad formadora de superhélice derivada de una proteína que forma un pentámero tal como COMP, porque la proteína de fusión de dicho polipéptido y Stx2eB es una proteína soluble que es menos cohesiva y es excelente en el efecto de inducir anticuerpos neutralizantes de toxinas.

45 Como la secuencia de ADN que codifica el polipéptido que tiene la unidad formadora de superhélice de COMP (la secuencia de ADN de la unidad formadora de superhélice), además de la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:26, se incluyen secuencias con codones optimizados para la expresión en *E. coli* y levadura (por ejemplo, SEQ ID NO:10), estas secuencias de ADN a las que se añade un sitio de escisión apropiado para una enzima de restricción y estas secuencias de ADN con eliminación, sustitución o inserción de uno o varios nucleótidos. Además, también se incluyen secuencias de ADN que tienen una homología del 80 % o más, preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el 95% o más, con estas secuencias de ADN.

50 Además, el polipéptido que tiene la unidad formadora de superhélice de COMP incluye polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por la SEQ ID NO:27 y secuencias con codones optimizados para la expresión en *E. coli* y levadura (por ejemplo, SEQ ID NO:28) y polipéptidos que comprenden estas secuencias de aminoácidos, cada una con una homología del 80 % o más, preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el

95% o más, con estas secuencias de aminoácidos.

En la proteína de fusión de la invención, el péptido que tiene la unidad formadora de superhélice y Stx2eB puede estar adyacentes y unidos entre sí, o un espaciador tal como una secuencia enlazadora y una secuencia de etiqueta pueden insertarse entre el péptido y Stx2eB con el fin de reducir las interacciones intermoleculares o similares. La secuencia enlazadora no está particularmente limitada, sino que por ejemplo, se puede usar una secuencia que tenga una combinación de GPGP o GGGGS (G₄S). Además, una secuencia que tiene de uno a cuatro (G₄SX(G₄S)₁ a (G₄S)₄) también se puede usar como la secuencia enlazadora, y (GP)₂ se puede combinar adicionalmente. Ejemplos de la secuencia de etiqueta son la glutatión-S-transferasa (GST), la proteína de unión a maltosa (MBP) y Hisx6 (H₆). Un ejemplo preferible de la combinación de la secuencia de etiqueta y la secuencia enlazadora es (GP)₂GH₆(G₄S)₃. Además, es posible reemplazar la secuencia parcial (G₄S) en la secuencia con una secuencia repetitiva ((G₄S)_{1 a 3}). Además, también se pueden usar las secuencias GPGPH₆GPGP y G₄SH₆G₄S.

Un ejemplo de la proteína de fusión de la invención es una proteína de fusión del polipéptido que tiene la unidad de formación de superhélice de COMP y Stx2eB con codones optimizados para la expresión en *E. coli* y levadura, en la que una secuencia de etiqueta (H₆) y una secuencia enlazadora ((G₄S)₃) se insertan entre el polipéptido y Stx2eB (por ejemplo, SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:16). La proteína de fusión de la invención incluye no solo la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16, sino también un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos con eliminación, sustitución o inserción de uno o varios restos de aminoácidos. Además, también se incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos, cada una con una homología del 80 % o más, preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el 95 % o más, con estas secuencias de aminoácidos.

Cuando el polipéptido que tiene la unidad formadora de superhélice y Stx2eB se unen, el polipéptido y el Stx2eB pueden unirse por ingeniería genética y a continuación expresarse. Por ejemplo, en un procedimiento, se prepara un vector de expresión de tal manera que la secuencia de ADN de la unidad formadora de superhélice y la secuencia de ADN de Stx2eB sean adyacentes entre sí y a continuación se introduce en un huésped apropiado, y se expresa la proteína de fusión. La secuencia de ADN de la unidad formadora de superhélice puede estar en el extremo 5' o en el extremo 3' de la secuencia de ADN de Stx2eB. Preferentemente, la secuencia de ADN de la unidad formadora de superhélice está en el extremo 3'. Cuando se prepara el vector de expresión, se puede insertar una secuencia de ADN de la secuencia enlazadora y/o secuencia de etiqueta entre la secuencia de ADN de la unidad formadora de superhélice y la secuencia de ADN de Stx2eB o unirla al extremo 5' o al extremo 3' de la secuencia de ADN. Por ejemplo, en un procedimiento, se prepara un vector de expresión de tal manera que la secuencia de ADN de Stx2eB, la secuencia de ADN de la secuencia de etiqueta y/o la secuencia enlazadora y la secuencia de ADN de la unidad formadora de superhélice se alinean en este orden desde el extremo 5'.

La secuencia de ADN anterior puede obtenerse por síntesis química y usarse como modelo para un procedimiento conocido de amplificación génica para amplificar el fragmento de ADN, y se puede preparar un vector de expresión recombinante insertando el fragmento de ADN en un vector de expresión usando una enzima de restricción. Los oligonucleótidos usados para la amplificación génica están diseñados para hibridar con el extremo 5' o el extremo 3' de la secuencia de ADN modelo y preferentemente contienen un sitio de escisión para una enzima de restricción. El ADN modelo puede amplificarse mediante un procedimiento conocido de amplificación génica usando los oligonucleótidos, el ADN modelo, una ADN polimerasa y similares. Tratando la secuencia de ADN amplificada y un vector de expresión con una enzima de restricción y uniéndolos a continuación con una ADN ligasa apropiada, se puede construir un vector de expresión recombinante que contenga la secuencia de ADN diana. Dicho vector de expresión recombinante también se incluye en la invención.

El vector de expresión es un vector plasmídico, un vector de fago, un vector vírico, un vector de cromosoma artificial o similar, y es preferible un vector plasmídico debido a la facilidad de manejo y al coste. Por ejemplo, cuando el huésped es *E. coli*, el vector de expresión es pFN6A (HQ) Flexi Vector (Promega), pFN7A (HQ) Flexi Vector (Promega), pFN2A (GST) Flexi Vector (Promega), pET-22b (MERCK), pET-21d (MERCK), pCold vector (Takara Bio Inc.) o similar, mientras que cuando el huésped es un mamífero, el vector de expresión es pF4A CMV Flexi Vector (Promega), pF5A CMV-neo Flexi Vector (Promega), pF9A CMV hRluc-neo Flexi Vector (Promega) o pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega). El vector de expresión puede contener un origen de replicación, una secuencia reguladora que desempeña un papel de regulación de la expresión génica tal como una secuencia promotora y una secuencia potenciadora y la secuencia de un marcador de selección.

Como ejemplos de la secuencia promotora, los promotores bacterianos son promotores de *E. coli* *lacI* y *lacZ*, promotores T3 y T7, promotor *gpt*, promotor PR, PL de lambda, promotor *tac* y promotores *trp* y *trc*. Promotores eucariotas conocidos que son apropiados a este respecto son el promotor inmediato temprano de citomegalovirus ("CMV"), promotor de timidina cinasa de HSV, promotores temprano y tardío de SV40, promotor LTR de retrovirus, promotor del virus del sarcoma de Rous ("RoSV"), por ejemplo, y promotores de metalotioneína tales como el promotor de metalotioneína-I.

Cuando la proteína de fusión se expresa usando una célula eucariota superior como huésped, la actividad transcripcional puede potenciarse insertando una secuencia potenciadora en el vector de expresión. La secuencia potenciadora actúa para potenciar la actividad transcripcional del promotor en una cierta célula huésped. Los ejemplos del potenciador incluyen el potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus,

el potenciador de poliovirus corriente abajo del origen de replicación, el potenciador de β -actina y el potenciador de adenovirus.

Ejemplos del marcador de selección son un gen resistente a la ampicilina de *E. coli*, el gen *trp1* de *Saccharomyces cerevisiae* y un gen resistente a la neomicina de una célula de mamífero.

- 5 La invención incluye un fragmento de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención y contiene la secuencia de ADN de la unidad formadora de superhélice y la secuencia de ADN de Stx2eB. El fragmento de ácido nucleico de la invención incluye un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de ADN de la unidad formadora de superhélice y la secuencia de ADN de Stx2eB que están alineadas adyacentes entre sí o un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de ADN de la secuencia de etiqueta y/o secuencia enlazadora entre la secuencia de ADN de la unidad formadora de superhélice y la secuencia de ADN de Stx2eB. Por ejemplo, se incluyen los fragmentos de ácido nucleico de las SEQ ID NO:17 y 34.

15 La secuencia completa del fragmento de ácido nucleico de la invención se puede obtener por síntesis química. Además, una parte del fragmento de ácido nucleico y la parte restante del fragmento de ácido nucleico pueden obtenerse primero mediante síntesis química y a continuación unirse mediante una técnica conocida de recombinación génica. Por ejemplo, después de sintetizar químicamente las secuencias de ADN de Stx2eB y la unidad formadora de superhélice, los fragmentos de ADN se amplifican mediante un procedimiento conocido de amplificación génica y se insertan en vectores de clonación independientes. La secuencia de ADN de Stx2eB y la secuencia de ADN de la unidad formadora de superhélice se cortan de los respectivos vectores de clonación usando un enzima de restricción y a continuación se insertan en un vector de expresión que también se ha tratado con una enzima de restricción, preparando de este modo un vector de expresión recombinante. El procedimiento de inserción debe diseñarse de modo que los fragmentos se alineen adyacentes entre sí. A continuación, cortando el fragmento de ácido nucleico del vector de expresión recombinante usando una enzima de restricción o similar, se puede obtener el fragmento de ácido nucleico en el que se unen las secuencias de ADN de la unidad formadora de superhélice y Stx2eB. Cuando el fragmento de ácido nucleico se prepara mediante el procedimiento anterior, la secuencia de ADN de la secuencia de etiqueta o la secuencia enlazadora puede insertarse entre las secuencias de ADN de la unidad formadora de superhélice y Stx2eB para preparar el vector de expresión y preparar el fragmento de ácido nucleico.

20 Transfectando un huésped con el vector de expresión preparado anteriormente, se puede obtener un transformante que contiene el vector de expresión. Dicho transformante también se incluye en la invención. El huésped es un huésped conocido tal como *E. coli*, levadura, una línea celular de mamífero, una célula de insecto y una planta. Ejemplos de *E. coli* son la cepa BL21 y DH5 α . La levadura es *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae*, y la célula de mamífero es una célula CHO, una célula HEK293, una célula COS-1/-7 o similar.

30 El huésped puede ser transfectado con el vector de expresión mediante un procedimiento conocido de acuerdo con el huésped, y los ejemplos son un procedimiento que usa fosfato de calcio, electroporación y lipofección. Tras la transfección, el transformante, que es la célula huésped que ha captado el vector de expresión, puede seleccionarse cultivando en un medio de cultivo que contiene un marcador de selección.

Proliferando el transformante preparado anteriormente en una condición preferible y a continuación induciendo el promotor seleccionado en una condición específica (pH, temperatura o adición de un compuesto), se puede producir la proteína de fusión. La proteína de fusión expresada se acumula en la célula o se secreta de la célula.

40 Cuando se expresa en *E. coli* como huésped, la proteína de fusión puede expresarse en la fracción de cuerpo de inclusión. Ejemplos del procedimiento para recuperar los cuerpos de inclusión de *E. coli* son fragmentación ultrasónica, homogeneización a alta presión y un procedimiento que usa BugBuster (Merck KGaA).

45 La proteína de fusión de la invención obtenida de este modo se puede usar como un monómero, pero es preferible formar un multímero porque pueden inducirse potentes anticuerpos neutralizantes de toxinas. Por ejemplo, el multímero de proteína de fusión es un dímero, un trímero, un tetrámero, un pentámero o un multímero superior, y también se incluye una mezcla de los multímeros. Con el fin de formar dicho multímero de proteína de fusión, por ejemplo, los cuerpos de inclusión se recuperan de *E. coli* como se ha descrito anteriormente, la proteína de fusión se solubiliza, y a continuación la solución solubilizada se somete a un tratamiento de replegamiento. Los ejemplos del procedimiento para solubilizar la proteína de fusión proveniente de los cuerpos de inclusión son un procedimiento para añadir clorhidrato de guanidina o una solución de urea a los cuerpos de inclusión, el reactivo de solubilización de cuerpos de inclusión (Funakoshi) y el kit de aislamiento de cuerpos de inclusión Proteospin (Norgen). Ejemplos del tratamiento de replegamiento son un procedimiento para añadir arginina, Tween 80, acetato de sodio y DL-cistina a la solución solubilizada y un procedimiento que usa TAPS-sulfonato (Katayama Chemical., Ltd.) o un kit de replegamiento CA (Takara Bio Inc.)

55 A este respecto, el polipéptido que tiene la unidad formadora de superhélice y Stx2eB se unen para formar la proteína de fusión de la invención, y pueden unirse químicamente. En este caso, en un procedimiento, el polipéptido que tiene la unidad formadora de superhélice y Stx2eB se expresan individualmente y a continuación se unen usando un reticulante.

- 5 Cuando el polipéptido que tiene la unidad formadora de superhélice y Stx2eB se expresan individualmente, las secuencias de ADN respectivas se pueden obtener mediante síntesis química, los fragmentos de ADN se pueden amplificar mediante un procedimiento conocido de amplificación génica usando las secuencias de ADN como moldes, y los respectivos plásmidos de expresión se pueden construir de acuerdo con el procedimiento anterior.
- 5 Cada plásmido de expresión se puede introducir en el huésped como se ha descrito anteriormente y se puede obtener cada proteína diana.
- 10 Cuando el polipéptido que tiene la unidad formadora de superhélice y Stx2eB se unen usando un reticulador, se pueden usar grupos amino y grupos tiol (grupos SH) en las proteínas, se pueden usar grupos aldehído de cadenas de azúcar en las proteínas y similares, aunque los grupos funcionales a usar no están limitados. Por ejemplo, en un procedimiento, se hacen reaccionar los grupos SH del polipéptido que tienen la unidad formadora de superhélice y los grupos amino de Stx2eB, y más específicamente, el polipéptido que se ha reducido usando un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) y la Stx2eB en la que se han introducido grupos disulfuro de piridilo mediante N-succinil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) puede incubarse y unirse de este modo. Además, el polipéptido que tiene la unidad formadora de superhélice y Stx2eB pueden unirse químicamente mediante usando enlaces mediante el uso de interacciones entre las biomoléculas tales como biotina y avidina.
- 15 La proteína de fusión y su multímero obtenido mediante los procedimientos anteriores pueden aislarse y purificarse adicionalmente mediante un medio de purificación general. En este contexto, como medio de purificación, se mencionan procedimientos de purificación tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de filtración en gel.
- 20 La invención incluye una vacuna contra la enfermedad de edema porcino que contiene la proteína de fusión y/o el multímero de proteína de fusión de la invención como principio activo. Es preferible que la vacuna de la invención contenga el multímero de la proteína de fusión. Es preferible un dímero, un trímero, un tetrámero, un pentámero o un multímero superior o una mezcla de los multímeros.
- 25 La vacuna contra la enfermedad de edema porcino contiene preferentemente de 0,1 a 1000 µg de la proteína de fusión y/o el multímero de la proteína de fusión en una dosis. Además, cuando un animal susceptible se inmuniza con la vacuna, se pueden inducir anticuerpos neutralizantes de toxinas a un nivel para defenderse contra el inicio o superior.
- 30 La vacuna de la invención puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos son solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, un tampón acuoso isotónico y una combinación de los mismos. Además, se pueden añadir apropiadamente aditivos tales como un adyuvante, un agente emulsionante, un conservante, un agente de tonicidad y un agente de ajuste del pH.
- 35 Como adyuvante, Emulsigen (MVP Laboratories), acetato de tocoferol, alumbre, saponina (QS21, ISCOM), oligo CpG y similares están incluidos.
- 40 Un antígeno que previene una enfermedad infecciosa en cerdos se puede añadir a la vacuna de la invención además de la proteína de fusión. Entre las enfermedades infecciosas se encuentran infección por parvovirus porcino, erisipela porcina, gastroenteritis transmisible en cerdos, neumonía por micoplasma porcina, rinitis atrofica porcina, encefalitis japonesa en cerdos, infección por circovirus porcino, síndrome reproductivo y respiratorio porcino, infección estreptocócica en cerdos, gripe porcina, pleuroneumonía porcina, enfermedad de Glasser, disentería porcina, diarrea epidémica porcina, infección por *E. coli* en cerdos, enteropatía proliferativa, enterocolitis necrosante en cerdos, salmonelosis porcina e infección por rotavirus porcino.
- 45 La vacuna de la invención puede administrarse a través de cualquier vía de administración tal como administración transdérmica, administración sublingual, administración oftálmica, administración intradérmica, administración intramuscular, administración oral, administración enteral, administración nasal, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intraperitoneal y administración por inhalación desde la boca al pulmón.
- 50 Al inocular cerdos con la vacuna de la invención, la vacuna induce potentes anticuerpos neutralizantes de toxinas y puede prevenir la aparición efectiva de la enfermedad de edema porcino. Se infiere que la razón para esto es que cuando se fusionan Stx2eB y el polipéptido capaz de formar una estructura de superhélice, la conformación original apropiada de Stx2eB, incluyendo la formación de pentámeros, se consigue fácilmente.
- 55 La invención incluye un kit para medir la cantidad de anticuerpos para Stx2eB en una muestra, en el que el kit contiene la proteína de fusión y/o el multímero de la proteína de fusión. El kit que contiene la proteína de fusión de la invención puede ser una placa en la que se inmoviliza la proteína de fusión. Se añade una muestra a la placa y se hacen reaccionar la proteína de fusión en la placa y anticuerpos contenidos en la muestra. Los anticuerpos secundarios etiquetados con una enzima o una sustancia fluorescente se añaden y se hacen reaccionar con los anticuerpos primarios. La cantidad de anticuerpos contenidos en la muestra se puede medir añadiendo un sustrato de la enzima si es necesario y detectando el producto de la reacción enzimática o la intensidad de la fluorescencia. El kit de la invención se puede usar para evaluar la eficacia de una vacuna inmunizando a un cerdo con la vacuna que contiene la proteína de fusión y/o el multímero de proteína de fusión como principio activo y detectando a continuación la producción de anticuerpos derivados de la vacuna.

La invención incluye una vacuna de ADN contra la enfermedad de edema porcino que contiene el fragmento de ácido nucleico o el vector de expresión recombinante como principio activo. En la vacuna de ADN de la invención, el fragmento de ácido nucleico o el vector de expresión recombinante contienen preferentemente una secuencia promotora para expresar la proteína de fusión después de inmunizar un cerdo.

5 Con respecto al procedimiento para producir la vacuna de ADN de la invención, la prueba de provocación se realiza en cerdos con STEC o Stx2e antes y después de inocular a los cerdos con la vacuna de ADN. Como resultado, se selecciona un fragmento de ácido nucleico o un vector de expresión recombinante que ha reducido significativamente un síntoma clínico de la enfermedad de edema porcino como principio activo de un agente para tratar la enfermedad de edema porcino, y la cantidad de principio activo se puede determinar a partir de la dosis en este punto.

La vacuna de ADN de la invención puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos son solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, un tampón acuoso isotónico y una combinación de los mismos. Además, se pueden añadir apropiadamente aditivos tales como un adyuvante, un agente emulsionante, un conservante, un agente de tonicidad y un agente de ajuste del pH.

15 La vacuna de ADN de la invención puede administrarse a través de cualquier vía de administración tal como administración transdérmica, administración sublingual, administración oftálmica, administración intradérmica, administración intramuscular, administración oral, administración enteral, administración nasal, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intraperitoneal y administración por inhalación desde la boca al pulmón.

20 La invención describe un anticuerpo que se une a la proteína de fusión y/o al multímero de la proteína de fusión. Pueden producirse anticuerpos monoclonales y policlonales o similares, o puede producirse un anticuerpo humano de los mismos, usando la proteína de fusión y/o el multímero de la proteína de fusión de la invención como antígeno, mediante un procedimiento de inmunización general (Current Protocols in Molecular Biology, Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH, Editado por J. McCAFFERTY y col., o ANTIBODY ENGINEERING segunda edición, Editado por Carl A. K. BORREBAECK). Un anticuerpo que se une a la proteína de fusión y/o su multímero puede producirse mediante un procedimiento de producción de anticuerpos mediante la técnica de presentación en fagos (Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Edited by Brian K. Kay y col., Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH, Editado por J. McCAFFERTY y col., o ANTIBODY ENGINEERING segunda edición, Editado por Carl A. K. BORREBAECK). Se supone que el anticuerpo de la invención se usa como un agente para tratar la enfermedad de edema porcino, un kit y un portador para cromatografía de afinidad, que se explican a continuación.

La invención describe un agente para tratar la enfermedad de edema porcino que contiene el anticuerpo como principio activo. Con respecto al procedimiento para producir el agente terapéutico de la invención, la prueba de provocación se realiza en cerdos con STEC o Stx2e antes y después de inocular a los cerdos con el anticuerpo producido mediante el procedimiento anterior. Como resultado, un anticuerpo que ha reducido significativamente un síntoma clínico de la enfermedad de edema porcino se selecciona como principio activo del agente para tratar la enfermedad de edema porcino, y la cantidad de principio activo se puede determinar a partir de la dosis del anticuerpo en este momento.

40 El agente para tratar la enfermedad de edema porcino contiene el anticuerpo como principio activo y puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos son solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, un tampón acuoso isotónico y una combinación de los mismos. Además, se pueden añadir apropiadamente aditivos tales como un adyuvante, un agente emulsionante, un conservante, un agente de tonicidad y un agente de ajuste del pH.

45 El agente para tratar la enfermedad de edema porcino puede administrarse a través de cualquier vía de administración tal como administración transdérmica, administración sublingual, administración oftálmica, administración intradérmica, administración intramuscular, administración oral, administración enteral, administración nasal, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intraperitoneal y administración por inhalación desde la boca al pulmón.

50 La invención describe un kit para medir el contenido de Stx2eB en una muestra, en el que el kit contiene el anticuerpo que se une a la proteína de fusión y/o al multímero de la proteína de fusión. Como un kit de este tipo, se incluye un kit en el que el anticuerpo que se une a la proteína de fusión se inmoviliza en una placa o similar. El kit que contiene el anticuerpo de la invención se puede usar para evaluar si un sujeto está infectado con edema porcino o no, usando el contenido de Stx2eB como índice. Por ejemplo, se añade una muestra a la placa en la que se inmoviliza el anticuerpo, y a continuación se añaden los anticuerpos etiquetados con una enzima o un colorante fluorescente. El contenido de Stx2eB en la muestra se puede medir incubando y lavando la placa, añadiendo un sustrato cromógeno si es necesario y midiendo la intensidad de la fluorescencia.

Ejemplos de la placa son Nunc Immuno plate MaxiSorp (Thermo scientific), una placa para ELISA (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), ELISPOT (MERCK), Immuno plate (Cosmo Bio Co., Ltd.), Placa ELISA (IWAKI) y placa ELISA

(ExtraGene), y el anticuerpo puede inmovilizarse en la placa mediante un procedimiento que generalmente es empleado por un experto en la materia.

Ejemplos del procedimiento para etiquetar el anticuerpo con una enzima o un colorante fluorescente son los kits de conjugación de anticuerpos EasyLink (abcam), el sistema de conjugación rápida Lightning-Link (Innova Biosciences Ltd), el kit de etiquetado de anticuerpos Oyster (Luminartis GmbH), el kit de etiquetado de enzimas EZ-Link (PIERCE Biotechnology), kit de etiquetado de proteínas PlatinumLink (Kreatech Biotechnology BV) y el kit de etiquetado de anticuerpos DyLight (PIERCE Biotechnology).

La invención describe un vehículo para cromatografía de afinidad en el que el anticuerpo para la proteína de fusión y/o el multímero de la proteína de fusión está unido a un vehículo. La proteína de fusión y/o el multímero de la proteína de fusión se expresan dentro o fuera del huésped, y cuando se expresan en el huésped, la proteína de fusión y/o el multímero de la proteína de fusión se recuperan rompiendo el huésped, mientras que cuando se expresan fuera del huésped, la proteína de fusión y/o el multímero de proteína de fusión se recuperan del entorno de cultivo. Se supone que el vehículo de la invención se usa para recuperar la proteína de fusión y/o el multímero de proteína de fusión de dicha fracción contaminante o similar.

Ejemplos del vehículo son HP activada por HiTrap NHS (GE Healthcare), Sepharose 4 Fast Flow activada por NHS (GE Healthcare), Sepharose 4B activada por CNBr (GE Healthcare), Sepharose 4 Fast Flow activada por CNBr (GE Healthcare), EAH Sepharose 4B (GE Healthcare), ECH Sepharose 4B (GE Healthcare), resina epoxi Profinity (BIORAD) y gel de hidrazida Affi-Gel Hz (BIORAD), y el anticuerpo puede unirse mediante un procedimiento que generalmente es usando por un experto en la materia.

Ejemplos

La invención se explica más detalladamente con los ejemplos a continuación, pero la invención no está limitada por estos ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de la proteína Stx2eB-His-COMP y su multímero

(1) Construcción del vector de expresión

Construcción del vector que expresa Stx2eB-His y preparación de *E. coli* que expresa Stx2eB-His

Se diseñó una secuencia de ADN (SEQ ID NO:2) basada en una secuencia de ADN que codifica un precursor de Stx2eB (SEQ ID NO:1) optimizando los codones para la expresión en *E. coli* y levadura y añadiendo la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Nde* I hasta el extremo 5' y la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Xho* I hasta el extremo 3' para inserción en un vector de expresión, y el fragmento de ADN se sintetizó artificialmente. El ADN sintético y el plásmido pET-22b (Merck KGaA) se trataron con *Nde* I y *Xho* I y se unieron. El producto unido se introdujo en *E. coli* DH5a, y el plásmido obtenido se denominó "vector intermedio 1".

La reacción de PCR se realizó usando el vector intermedio 1 como modelo y el oligo-ADN que contiene la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Nco* I (SEQ ID NO:3) y el oligo-ADN que contiene la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Xho* I (SEQ ID NO:4) como los cebadores, y se amplificó el ADN que codifica Stx2eB madura que no contiene una secuencia señal secretora.

El producto amplificado y el plásmido pET-21d (Merck KGaA) se trataron con *Nco* I y *Xho* I y se unieron. El producto unido se introdujo en *E. coli* DH5a, y el plásmido obtenido se denominó pSTXB. El plásmido expresa una proteína de fusión de Stx2eB y etiqueta de His (en lo sucesivo denominada Stx2eB-His) (SEQ ID NO:5) (figura 1). Una secuencia de nucleótidos de ADN que codifica Stx2eB-His se muestra en la SEQ ID NO:6. Se transfirió *E. coli* BL21 (DE3) (Merck KGaA) con pSTXB, y se obtuvo una cepa de *E. coli* STXB que expresaba Stx2eB-His.

(2) Construcción del vector que expresa Stx2eB-His-COMP y preparación de *E. coli* que expresa Stx2eB-His-COMP

La reacción de PCR se realizó usando pB (NPL 5, Infect Immun. 2005, 7, 5654-65), que es un vector de expresión de un precursor de la subunidad de la toxina B del cólera, como modelo y oligo-ADN que contiene la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Mun* I (SEQ ID NO:7) y oligo-ADN que contiene la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Mun* I y una secuencia que codifica un enlazador (GP)₂GH₆(EcoR I)H₆ (una secuencia artificial) (SEQ ID NO:8) como los cebadores, y se amplificó el ADN que codifica CTB-(GP)₂GH₆(EcoRI)H₆.

El ADN amplificado se trató con *Mun* I y un pPIC3.5K (Life Technologies) se cortó con EcoR I, y el ADN y el vector pPIC3.5K se unieron. El producto unido se introdujo en *E. coli* DH5a, y el plásmido obtenido se denominó "vector intermedio 2".

ADN (SEQ ID NO:11) que codifica una proteína de fusión de ADN que codifica un enlazador (G₄S)₃ (una secuencia artificial) (SEQ ID NO:9) y ADN que codifica el dominio formador de pentámeros de la proteína de la matriz

oligomérica de cartílago (en lo sucesivo denominada COMP) con codones optimizados para la expresión en *E. coli* y levadura (SEQ ID NO:10) fue diseñado y sintetizado artificialmente. La reacción de PCR se realizó usando el ADN sintético como modelo y el oligo-ADN que contiene la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Mun* I (SEQ ID NO:12) y el oligo-ADN que contiene la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoR* I (SEQ ID NO:13) como los cebadores y el ADN que codifica enlazador (G₄S)₃-COMP se amplificaron. Se unieron el producto amplificado que se trató con *Mun* I y *EcoR* I y el vector intermedio 2 que se trató con *EcoR* I. El producto unido se introdujo en *E. coli* DH5a, y el plásmido obtenido se denominó "vector intermedio 3".

La reacción de PCR se realizó usando el vector intermedio 3 como modelo y el oligo-ADN que contiene la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Xho* I (SEQ ID NO:14) y el oligo-ADN que contiene la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Xho* I (SEQ ID NO:15) como los cebadores, y se amplificó el ADN que codifica una proteína de fusión de un enlazador (GP)₂GH₆(G₄S)₃ y COMP. El ADN amplificado y pSTXB se trataron con *Xho* I y se unieron. El producto unido se introdujo en *E. coli* DH5a, y el plásmido obtenido se denominó pSTXC. El plásmido es un vector para expresar una proteína de fusión de Stx2eB, el enlazador (GP)₂GH₆(G₄S)₃ y COMP (en lo sucesivo denominado Stx2eB-His-COMP) (SEQ ID NO:16) (figura 2). Una secuencia de nucleótidos de ADN que codifica Stx2eB-His-COMP se muestra en la SEQ ID NO:17. Se transfectó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Merck KGaA) con pSTXC, y se obtuvo una cepa de *E. coli* STXC que expresaba Stx2eB-His-COMP.

(3) Construcción del vector que expresa Stx2eB-His-COMP-His-Z y preparación de *E. coli* que expresa Stx2eB-His-COMP-His-Z

Se cortó un vector que expresa COMP-His-Z (NPL 6, Infect. Immune. 2011, 79 (10), 4260-4275) con *Nco* I y *Xho* I, y se preparó un fragmento de ADN que codifica una proteína de fusión de COMP, un enlazador (GP)₂G₄SH₆G₄S(GP)₂ y el dominio Z de unión a inmunoglobulina (en lo sucesivo denominado dominio Z) (la proteína de fusión se denomina COMP-His-Z a continuación). Se unieron el fragmento de ADN y un vector pET-21d (MERCK) que se trató con enzimas de restricción *Nco* I y *Xho* I. El producto unido se introdujo en *E. coli* DH5a, y el plásmido obtenido se denominó "vector intermedio 4". El vector intermedio 4 se trató adicionalmente con *Nco* I y *Bsm* I, y se preparó un "vector intermedio 5" en el que se preparó la secuencia desde el extremo 5' de COMP al sitio de reconocimiento para *Bsm* I.

A continuación, se realizó la reacción de PCR usando pSTXC como modelo y el oligo-ADN de la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:15 como los cebadores, y se amplificó el ADN que codificaba Stx2eB-His-COMP. El ADN amplificado se trató con las enzimas de restricción *Nco* I y *Bsm* I. El fragmento de ADN carece de una parte del extremo carboxilo de COMP. El fragmento de ADN y el vector intermedio 5 se unieron. El producto unido se introdujo en *E. coli* DH5a, y el plásmido obtenido se denominó pSTXZ. El plásmido expresa una proteína de fusión de Stx2eB, el enlazador (GP)₂GH₆(G₄S)₃, COMP, el enlazador (GP)₂G₄SH₆G₄S(GP)₂ y el dominio Z (en lo sucesivo denominado Stx2eB-His-COMP-His-Z (SEQ ID NO:18) (figura 4). Una secuencia de ADN que codifica Stx2eB-His-COMP-His-Z se muestra en la SEQ ID NO:19. Se transfectó *E. coli* BL21 (DE3) (MERCK) con pSTXZ y se obtuvo una cepa de *E. coli* STXZ que expresaba Stx2eB-His-COMP-His-Z.

Ejemplo 2

Cultivo de *E. coli* recombinante y purificación de proteínas expresadas

(1) Cultivo de la cepa STXB y purificación de Stx2eB-His

A un tubo de ensayo de 12 ml, se le añadieron 3 ml de un medio de cultivo 2xYT y una solución de ampicilina (concentración final de 200 µg/ml) y se inoculó la cepa STXB, seguida de cultivo a 37 °C con agitación durante aproximadamente 16 horas (precultivo). A un matraz cónico de 2 l, se le añadieron 200 ml de un medio de cultivo 2xYT y una solución de ampicilina (concentración final de 200 µg/ml) y se inocularon 2 ml de la solución de precultivo, seguida de cultivo a 37 °C con agitación hasta que la DO₅₉₀ superó 0,5. Cuando la DO₅₉₀ del cultivo superó 0,5, se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) para dar una concentración final de 10 µM, y la solución se cultivó a 25 °C con agitación durante 20 horas. La solución de cultivo se transfirió a un tubo de centrifuga y las células bacterianas se recuperaron mediante centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. La fracción de cuerpo de inclusión se preparó mediante centrifugación usando BugBuster (Merck KGaA) a partir de las células bacterianas recuperadas.

La fracción de cuerpo de inclusión preparada se solubilizó con una solución de SDS al 1 % y el tampón se reemplazó con PBS mediante diálisis (Spectrum Laboratories, inc. Membrana de diálisis Spectra/Por CE. MWCO: 3,5-5 kD), obteniendo de este modo un antígeno Stx2eB-His.

(2) Cultivo de la cepa STXC y purificación de Stx2eB-His-COMP

A un tubo de ensayo de 12 ml, se le añadieron 3 ml de un medio de cultivo 2xYT y una solución de ampicilina (concentración final de 200 µg/ml) y se inoculó la cepa STXC, seguida de cultivo a 37 °C con agitación durante aproximadamente 16 horas (precultivo). A un matraz cónico de 2 l, se le añadieron 200 ml de un medio de cultivo 2xYT y una solución de ampicilina (concentración final de 200 µg/ml) y se inocularon 2 ml de la solución de precultivo, seguida de cultivo a 37 °C con agitación hasta que la DO₅₉₀ superó 0,5. Cuando la DO₅₉₀ del cultivo

superó 0,5, se añadió isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) para dar una concentración final de 10 μ M, y la solución se cultivó a 37°C con agitación durante seis horas. La solución de cultivo se transfirió a un tubo de centrífuga y las células bacterianas se recuperaron mediante centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. La fracción de cuerpo de inclusión se preparó mediante centrifugación usando BugBuster (Merck KGaA) a partir de las células bacterianas recuperadas.

A continuación, se añadió una solución de clorhidrato de guanidina 6 M (pH 8,2) a los cuerpos de inclusión, y se preparó una solución solubilizada. La solución solubilizada se sometió a un tratamiento de replegamiento con referencia a PTL 1 (JP-A-2008-50344). Específicamente, se añadieron Tween 80 (concentración final del 0,05 %), acetato de sodio (concentración final de 1 M) y DL-cistina (concentración final de 2 mM) a la solución solubilizada y la mezcla se dejó reposar a 4 °C durante una noche. Tras el tratamiento de replegamiento, Stx2eB-His-COMP se purificó usando His Trap HP (GE Healthcare Japan Corporation), y el tampón se reemplazó con PBS por ultrafiltración (Amicon Ultra-15 30kDa, Millipore Corporation), obteniendo de este modo un antígeno Stx2eB-His-COMP. Se realizó SDS-PAGE en una condición no reductora usando un gel de acrilamida al 12,5 %, y la formación de multímeros se confirmó mediante tinción con CBB y transferencia de western usando un anticuerpo anti-His (figura 3).

(3) Cultivo de la cepa STXZ y purificación de Stx2e-His-COMP-His-Z

A un tubo de ensayo de 12 ml, se le añadieron 3 ml de un medio de cultivo 2xYT y una solución de ampicilina (concentración final de 200 μ g/ml) y se inoculó la cepa STXZ, seguida de cultivo a 37 °C con agitación durante aproximadamente 16 horas (precultivo). A un matraz cónico de 2 l, se le añadieron 200 ml de un medio de cultivo 2xYT y una solución de ampicilina (concentración final de 200 μ g/ml) y se inocularon 2 ml de la solución de precultivo, seguida de cultivo a 37 °C con agitación hasta que la DO_{590} superó 0,5. Cuando la DO_{590} del cultivo superó 0,5, se añadió IPTG para dar una concentración final de 10 μ M, y la solución se cultivó a 37°C con agitación durante seis horas. La solución de cultivo se transfirió a un tubo de centrífuga y las células bacterianas se recuperaron mediante centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. La fracción de cuerpo de inclusión se preparó mediante centrifugación usando BugBuster (MERCK) a partir de las células bacterianas recuperadas.

A continuación, se añadió una solución de clorhidrato de guanidina 6 M (pH 8,2) a los cuerpos de inclusión, y se preparó una solución solubilizada. La solución solubilizada se sometió a un tratamiento de replegamiento con referencia a PTL 1 (JP-A-2008-50344). Específicamente, se añadieron Tween 80 (concentración final del 0,05 %), acetato de sodio (concentración final de 1 M) y DL-cistina (concentración final de 2 mM) a la solución solubilizada y la mezcla se dejó reposar a 4 °C durante una noche. Tras el tratamiento de replegamiento, Stx2eB-His-COMP-His-Z se purificó usando His Trap HP (GE Healthcare), y el tampón se reemplazó con PBS por ultrafiltración (Amicon Ultra-15 30kDa, Millipore Corporation), obteniendo de este modo un antígeno Stx2e-His-COMP-His-Z. Se realizó SDS-PAGE en una condición no reductora usando un gel de acrilamida del 5 al 20%, y la formación de multímeros se confirmó mediante tinción con CBB y transferencia de western usando un anticuerpo anti-His (figura 5).

Ejemplo 3

1. Confirmación de la inducción de anticuerpos neutralizantes en ratones

(1) Preparación de vacunas e inmunización de ratones

a. Comparación de las capacidades inductoras de anticuerpos neutralizantes entre el antígeno Stx2eB-His y el antígeno Stx2eB-His-COMP

Se preparó una vacuna en la que se mezclaron 50 μ g de antígeno Stx2eB-His-COMP y 50 μ l de Imject Alum (marca registrada) (Thermo Fisher Scientific Inc.) por 100 μ l. Debido a que la cantidad de Stx2eB-His que es equivalente a 50 μ g de Stx2eB-His-COMP en términos de moles es 26,6 μ g, se preparó una vacuna en la que se mezclaron 26,6 μ g del antígeno Stx2eB-His y 50 μ l de Imject Alum (marca registrada) por 100 μ l.

Además, mezclando y emulsionando 50 μ g del antígeno Stx2e-His-COMP y 50 μ l de adyuvante incompleto de Freund (Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.) por 100 μ l, se preparó una vacuna.

Las vacunas se inyectaron por vía subcutánea en una cantidad de 100 μ l a ratones BALB/c hembra de siete semanas de edad (cinco ratones por grupo) tres veces a intervalos de dos semanas. La sangre se recogió dos semanas después de la tercera inmunización, y los títulos de anticuerpos se midieron mediante el ensayo de neutralización Stx2e usando las células Vero a continuación.

b. Comparación de las capacidades inductoras de anticuerpos neutralizantes entre el antígeno Stx2eB-His-COMP y el antígeno Stx2eB-His-COMP-His-Z

Se preparó una vacuna en la que se mezclaron 50 μ g de antígeno Stx2eB-His-COMP y 50 μ l de Imject Alum (marca registrada) por 100 μ l. Debido a que la cantidad de Stx2eB-His-COMP-His-Z que es equivalente a 50 μ g de Stx2eB-His-COMP en términos de moles es 75 μ g, se preparó una vacuna en la que se mezclaron 75 μ g del antígeno Stx2eB-His-COMP-His-Z y 50 μ l de Imject Alum (marca registrada) por 100 μ l.

Las vacunas se inyectaron por vía subcutánea en una cantidad de 100 µl a ratones BALB/c hembra de siete semanas de edad (cinco ratones por grupo) tres veces a intervalos de dos semanas. La sangre se recogió dos semanas después de la tercera inmunización, y los títulos de anticuerpos se midieron mediante el ensayo de neutralización Stx2e usando las células Vero a continuación.

5 (2) Preparación de la solución de toxina

Se inoculó un asa de siembra de una reserva en glicerol de la bacteria del edema aislada de un cerdo en un medio de agar Circlegrow (MP Biomedicals) y se cultivó a 37 °C durante una noche. Se inoculó una única colonia en un matraz cónico de 500 ml que contenía 50 ml de un medio de cultivo Circlegrow y se cultivó a 37 °C con rotación a 220 rpm durante una noche. La solución de cultivo (5 ml) se inoculó en cuatro matraces cónicos de 500 ml que contenían 50 ml de un medio de cultivo Circlegrow y se cultivó a 37 °C con rotación a 220 rpm durante ocho horas. Las soluciones de cultivo se agruparon y se midió la absorbancia (DO₆₅₀). Después de la centrifugación a 10000 g a 4 °C durante 15 minutos, se recogieron los precipitados. Los precipitados se suspendieron en 20 ml de Tris-HCl 10 mM (7,0). El tratamiento ultrasónico (Branson, ciclo de trabajo 30 %, Salida 1) se realizó hasta que la absorbancia (DO₆₅₀) disminuyó al 60 % del valor antes del tratamiento. Después de la centrifugación a 10000 g a 4 °C durante 30 minutos, se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. La muestra se congeló y se almacenó a -80 °C.

(3) Medición de las actividades citotóxicas

<Materiales>

- Células: células Vero
- 20 • Medio de cultivo para el cultivo: Medio de cultivo de Eagle (TPB al 10 %, bicarbonato de sodio al 1,5 %, PS al 0,1 %) con adición de FBS al 5 %
- Medio de cultivo para la dilución: Medio de cultivo de Eagle (TPB al 10 %, bicarbonato de sodio al 1,5 %, PS al 0,1 %)

<Preparación de la suspensión celular>

25 Se cultivaron células Vero en el medio de cultivo para el cultivo y se retiró el sobrenadante. Por cuadrado de tamaño medio (75 cm²), se añadieron 3 ml de tripsina-EDTA, y el tratamiento se realizó a 37 °C durante de 5 a 10 minutos. Después de añadir 10 ml del medio de cultivo para el cultivo, las células se separaron mediante pipeteo y se recogieron en un tubo de centrifuga. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante cinco minutos. Las células se resuspendieron en 5 ml del medio de cultivo para el cultivo, y se contó el número de células. 30 La concentración se ajustó a 4,0x10⁵ células/ml usando el medio de cultivo para el cultivo.

<Medición de la actividad citotóxica>

El medio de cultivo para la dilución se dispensó a una placa de 96 pocillos para el cultivo celular en una cantidad de 125 µl/pocillo. Se añadieron diluciones sucesivas de dos veces de la solución de toxina, que se diluyeron con el medio de cultivo para la dilución, en una cantidad de 25 µl/pocillo. La suspensión celular ajustada a 4,0x10⁵ células/ml se añadió en una cantidad de 50 µl/pocillo. La placa se selló y se cultivó a 37 °C durante cinco días. 35

<Evaluación>

Se confirmó que el porcentaje de formación de la lámina celular del control negativo es del 95 % o más, y se determinó que la dilución que muestra un porcentaje de formación de la lámina celular del 50 % o menos es la cantidad de actividad citotóxica del 50 % (dosis citotóxica, DC₅₀).

40 (4) Ensayo de neutralización de Stx2e usando células Vero

<Materiales>

- Células: células Vero
- Medio de cultivo para el cultivo: Medio de cultivo de Eagle (TPB al 10 %, bicarbonato de sodio al 1,5 %, PS al 0,1 %) con adición de FBS al 5 %
- 45 • Medio de cultivo para la dilución: Medio de cultivo de Eagle (TPB al 10 %, bicarbonato de sodio al 1,5 %, PS al 0,1 %)

<Preparación de la suspensión celular>

Después de cultivar las células Vero en el medio de cultivo para el cultivo, se retiró el sobrenadante de las células. Por cuadrado de tamaño medio (75 cm²), se añadieron 3 ml de tripsina-EDTA, y el tratamiento se realizó a 37 °C durante de 5 a 10 minutos. Después de añadir 10 ml del medio de cultivo para el cultivo, las células se separaron mediante pipeteo y se recogieron en un tubo de centrifuga. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante cinco minutos. Las células se resuspenden en 5 ml del medio de cultivo para el cultivo, y se cuenta el número de células. La concentración se ajustó a 4,0x10⁵ células/ml usando el medio de cultivo para el 50

cultivo.

<Neutralización>

5 La solución de toxina (60 µl) que se ajustó a 10 DC₅₀ con el medio de cultivo para la dilución y 60 µl de diluciones sucesivas de dos veces de una muestra de suero diluida con el medio de cultivo para la dilución se mezclaron y se hicieron reaccionar a 37 °C durante una hora. El medio de cultivo para la dilución se dispensó a una placa de 96 pocillos en una cantidad de 100 µl/pocillo. Las soluciones de neutralización que se hicieron reaccionar a 37°C se añadieron, cada una, en una cantidad de 50 µl. La suspensión celular ajustada a 4,0x10⁵ células/ml se añadió en una cantidad de 50 µl/pocillo. La placa se selló y se cultivó a 37 °C durante cinco días.

<Evaluación>

10 Se confirmó que el porcentaje de formación de la lámina celular del control negativo era del 95 % o más, y se determinó que la mayor dilución de la muestra de suero que mostraba un porcentaje de formación de la lámina celular del 50 % o más era el título de anticuerpos neutralizantes. Los resultados se muestran en la tabla 1 y la tabla 2.

[Tabla 1]

15 Comparación de las capacidades inductoras de anticuerpos neutralizantes entre el antígeno Stx2eB-His y el antígeno Stx2eB-His-COMP

Antígeno	Adyuvante	Individuo No.				
		1	2	3	4	5
Placebo (PBS)	ImjectAlum	<1	<1	<1	<1	<1
Stx2eB-His	ImjectAlum	<1	<1	<1	<1	<1
Stx2eB-His-COMP	ImjectAlum	>64	>64	32	32	8
Stx2eB-His-COMP	IFA	>64	>64	>64	8	16

[Tabla 2]

Comparación de las capacidades inductoras de anticuerpos neutralizantes entre el antígeno Stx2eB-His-COMP y el antígeno Stx2eB-His-COMP-His-Z

Antígeno	Adyuvante	Individuo No.				
		1	2	3	4	5
Placebo (PBS)	ImjectAlum	<2	<2	<2	<2	<2
Stx2eB-His-COMP	ImjectAlum	>128	16	>128	>128	>128
Stx2eB-His-COMP-Z	ImjectAlum	8	32	4	16	32

20 A partir de estos resultados, se confirmó que el antígeno Stx2eB-His-COMP induce anticuerpos neutralizantes para Stx2e en ratones. Por otro lado, el aumento en los anticuerpos neutralizantes no se observó en el grupo de inyección de Stx2eB-His. Los resultados de este estudio muestran que es difícil que una estructura multimérica apropiada esté formada solo por Stx2eB, y la fusión con COMP es ventajosa. Además, se confirmó que el antígeno Stx2eB-His-COMP puede inducir anticuerpos neutralizantes de la toxina significativamente potentes en comparación con el antígeno Stx2eB-His-COMP-His-Z.

2. Prueba de provocación con Stx2e en ratones

30 Se preparó una vacuna en la que se mezclaron 50 µg del antígeno Stx2e-His-COMP y 50 µl de adyuvante incompleto de Freund (Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.) por 100 µl y se emulsionaron. Se sometieron a la prueba ratones BALB/c hembra de siete semanas de edad, y se inyectaron 100 µl de la vacuna por vía subcutánea tres veces a intervalos de dos semanas (10 ratones por grupo). Dos semanas después de la tercera inmunización, se inyectaron por vía intraperitoneal 0,4 ml (32000 50 % de la cantidad de degeneración de células Vero) de una solución de toxina preparada a partir de la bacteria del edema (el procedimiento de preparación se ha descrito anteriormente). Los ratones se observaron durante siete días después de la administración de Stx2e, y se contó el número de muertes. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

35

[Tabla 3]

Grupo	Número de ratones	Número de supervivientes	Tasa de supervivencia (%)
Placebo (PBS)	10	4	40
Stx2eB-His-COMP	10	10	100

A partir de la tabla 3, se observó una diferencia significativa ($p=0,0041$) entre el grupo de placebo y el grupo inmunizado, y se confirmó que la inmunización de ratones con el antígeno Stx2eB-His-COMP defiende contra la provocación con Stx2e.

5 Ejemplo 4

Confirmación de la inducción de anticuerpos neutralizantes en cerdos

10 Se preparó una vacuna que contenía 100 μg de antígeno Stx2eB-His-COMP y 0,4 ml de Emulsigen (MVP Laboratories) por 2 ml. La vacuna se inyectó por vía intramuscular en cerdos de tres a cuatro semanas de edad en la región cervical dos veces en un intervalo de dos semanas. La sangre se recogió en el momento de la primera inmunización, en el momento de la inmunización adicional y dos semanas después de la inmunización adicional, y los títulos de anticuerpos se midieron mediante el ensayo de neutralización con Stx2e usando células Vero. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Grupo	Individuo No.	Primera Inmunización	Inmunización adicional	Dos semanas después de la inmunización adicional
Placebo (PBS)	1	<2	<2	<20
	2	<2	<2	<20
	3	<2	8	<20
Stx2eB-His-COMP	4	<2	<2	20
	5	<2	8	40
	6	<2	8	80
	7	2	2	80

15 A partir de estos resultados, se confirmó que el antígeno Stx2eB-His-COMP induce anticuerpos neutralizantes para Stx2e también en cerdos.

Ejemplo 5

Prueba de provocación con Stx2e en cerdos

20 A los cerdos usados en el ejemplo 4 se les inyectaron por vía intraperitoneal 20 ml (600000 50 % de la cantidad de degeneración de células Vero) de una solución de toxina preparada a partir de la bacteria del edema (el procedimiento de preparación se ha descrito anteriormente) dos semanas después de la inmunización adicional. Además, para excluir la influencia de LPS mixto, se administró una solución de Stx2e que se calentó a 80 °C durante 10 minutos para inactivar térmicamente Stx2e a un cerdo en el grupo de placebo. Los síntomas clínicos se observaron durante tres días después de la administración de Stx2e. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

[Tabla 5]

Grupo	Individuo No.	Título de anticuerpo neutralizante en la provocación	Calentamiento de la toxina	Observación tres días después de la provocación
Placebo (PBS)	1	<20	Sin calentar	Muerto el día siguiente a la provocación
	2	<20	Calentada	Sin anomalías
	3	<20	Sin calentar	Sin anomalías
Stx2eB-His-COMP	4	20	Sin calentar	Sin anomalías
	6	80	Sin calentar	Sin anomalías

25 A partir de los resultados en la tabla 5, se confirmó que la inmunización de cerdos con el antígeno Stx2eB-His-COMP puede defender contra la provocación con Stx2e.

Ejemplo 6

Preparación de la proteína Stx2eB-His-CMP y su multímero

(1) Construcción del vector que expresa Stx2eB-His-CMP y preparación de *E. coli* que expresa Stx2eB-His-CMP

5 Se diseñó una secuencia de ADN (SEQ ID NO:36) optimizando los codones (SEQ ID NO:34) para expresar una proteína de fusión de Stx2eB, un enlazador (GP)₂GH₆(G₄S)₃ y CMP (en lo sucesivo denominado Stx2eB-His-CMP) (SEQ ID NO:35) (figuras 6) en *E. coli*, añadiendo la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Nco* I al extremo 5' y la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Xho* I al extremo 3' para la inserción en un vector de expresión y añadiendo además nucleótidos protectores al extremo 5' y al extremo 3', y la secuencia de ADN se sintetizó artificialmente. El ADN sintético se insertó en el sitio de *Eco* RV del plásmido pUC57 (GenScript Corporation). El producto unido se introdujo en *E. coli* DH5 α , y el plásmido obtenido se denominó "vector intermedio 6".

15 El vector intermedio 6 se trató con *Nco* I y *Xho* I, y se obtuvo un fragmento de ADN que codifica Stx2eB-His-CMP. El fragmento de ADN y el plásmido pET-21d (Merck KGaA) que se trató con *Nco* I y *Xho* I se unieron. El producto unido se introdujo en *E. coli* DH5 α , y el plásmido obtenido se denominó pSTX-CMP. Además, se introdujo pSTX-CMP en *E. coli* BL21 (DE3) (Merck KGaA), y se obtuvo una cepa de *E. coli* STX-CMP que expresaba Stx2eB-His-CMP.

(2) Cultivo de la cepa STX-CMP y preparación de antígeno Stx2e-His-CMP

20 A un tubo de ensayo de 12 ml, se le añadieron 3 ml de un medio de cultivo 2xYT y una solución de ampicilina (concentración final de 200 μ g/ml) y se inoculó la cepa STX-CMP, seguida de cultivo a 37 °C con agitación durante aproximadamente 16 horas (precultivo). A un matraz cónico de 2 l, se le añadieron 200 ml de un medio de cultivo 2xYT y una solución de ampicilina (concentración final de 200 μ g/ml) y se inocularon 2 ml de la solución de precultivo, seguida de cultivo a 37 °C con agitación hasta que la DO₅₉₀ superó 0,5. Cuando la DO₅₉₀ del cultivo superó 0,5, se añadió isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) para dar una concentración final de 10 μ M, y la solución se cultivó a 37°C con agitación durante seis horas. La solución de cultivo se transfirió a un tubo de centrifuga y las células bacterianas se recuperaron mediante centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos.

25 Las células bacterianas en 100 ml de la solución de cultivo se suspendieron en un tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM) que contenía lisozima (concentración final de 1 mg/ml) y las células bacterianas se desorganizaron mediante el homogeneizador ultrasónico UD-201 (Tomy Co., Ltd.). La solución de células bacterianas desorganizadas se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, y se obtuvieron cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se resuspendieron en el tampón de lisis para lavar los cuerpos de inclusión, y los cuerpos de inclusión se recogieron mediante centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos.

30 A continuación, se añadió un tampón que contenía tris 50 mM (pH 8,2) y clorhidrato de guanidina 6 M a los cuerpos de inclusión, y se preparó una solución solubilizada. La solución solubilizada se sometió a un tratamiento de replegamiento mediante diálisis por etapas. Específicamente, la solución solubilizada se dializó durante cuatro horas usando un tampón que contenía tris 50 mM (pH 8,2) y clorhidrato de guanidina 2 M, a continuación se dializó durante cuatro horas usando un tampón que contenía tris 50 mM (pH 8,2), clorhidrato de guanidina 1 M, clorhidrato de arginina 1 M y DL-cistina 5 mM, a continuación se dializó durante 16 horas usando un tampón que contenía tris 50 mM (pH 8,2), clorhidrato de guanidina 0,5 M, clorhidrato de arginina 1 M y DL-cistina 5 mM y finalmente se dializó durante cuatro horas usando un tampón de PBS que contenía clorhidrato de arginina 1 M. La muestra obtenida en este contexto se usó como un antígeno Stx2eB-His-CMP. Se realizó SDS-PAGE en una condición no reductora usando un gel de acrilamida al 12,5 %, y la formación de multímeros se confirmó mediante tinción con CBB y transferencia de western usando un anticuerpo anti-His (figura 7).

Ejemplo 7

Prueba de provocación con Stx2e en ratones

(1) Preparación de la vacuna

45 Debido a que la cantidad de Stx2eB-His-CMP que es equivalente a 50 μ g de Stx2eB-His-CMP descrita en el ejemplo 3 en términos de moles es 46,5 μ g, se preparó una vacuna en la cual 46,5 μ g del antígeno Stx2eB-His-CMP y 50 μ l de adyuvante incompleto de Freund (Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.) se mezclaron por 100 μ l y se emulsionaron.

(2) Prueba de provocación con Stx2e en ratones

50 Se sometieron a la prueba ratones BALB/c hembra de nueve semanas (10 ratones por grupo). La vacuna en una cantidad de 100 μ l se inyectó por vía subcutánea al grupo inmunizado dos veces en un intervalo de dos semanas. No se administró nada al grupo de no administración. Dos semanas después de la segunda inmunización, se inyectaron por vía intraperitoneal 0,4 ml (64000 50 % de la cantidad de degeneración de células Vero) de una solución de toxina Stx2e preparada a partir de la bacteria del edema (el procedimiento de preparación se ha descrito anteriormente). Los ratones se observaron durante siete días después de la administración de Stx2e, y se contó el

número de muertes. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

[Tabla 6]

Grupo	Número de ratones	Número de supervivientes	Tasa de supervivencia (%)
No administración	10	1	10
Stx2eB-His-CMP	10	5	50

5 A partir de la tabla 6, se observó una diferencia significativa ($p=0,047$) entre el grupo de no administración y el grupo inmunizado, y se confirmó que la inmunización de ratones con el antígeno Stx2eB-His-CMP protege a la mitad de los ratones de la provocación con Stx2e.

Aplicabilidad industrial

Es posible prevenir el inicio de la enfermedad de edema porcino en granjas donde se prevé el inicio de la enfermedad de edema porcino.

LISTA DE SECUENCIAS

- 10 <110> The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute Jectas Innovators Company Limited
 <120> Vacuna para prevenir la enfermedad de edema porcino
 <130> PF-130023-WO
 <150> JP2012-233224
 <151> 22/10/2012
- 15 <160> 36
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 264
 <212> ADN
 <213> STEC
- 20 <400> 1
 atgagaaga tgtttatagc ggttttatatt gcattggttt ctgttaatgc aatggcggcg 60
 gattgtgcta aaggtaaaat tgagttttcc aagtataatg aggataatac ctttactgtg 120
 aagggtgtcag gaagagaata ctggacgaac agatggaatt tgcagccatt gttacaaagt 180
 gctcagctga cagggatgac tgtaacaatc atatctaata cctgcagttc aggctcaggc 240
 tttgcccagg tgaagtttaa ctga 264
- 25 <210> 2
 <211> 270
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Modificado para expresión en E. coli y levadura
 <400> 2

ES 2 713 962 T3

catatgaaaa aaatgtttat cgcggtgctg ttgcgcttgg tgagcgttaa tgcgatggcc 60
 gcggattgcg cgaaaggcaa aattgaattt tcgaaatata atgaagataa cacctttacc 120
 gtgaaagtga gcggtcgcga atattggacc aatcgttgga atctgcagcc gttactgcaa 180
 tcggcccagc tgaccggcat gaccgttacc attatcagca acacctgcag ctcgggcagt 240
 ggttttgctc aggtgaaatt caatctcgag 270

5 <210> 3
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Contiene la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Nco I

<400> 3
 catgccatgg attgcgcaa aggcaaaatt g 31
 10 <210> 4
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Contiene la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Xho I
 <400> 4
 ccgctcgaga ttgaattca cctgcgcaaa ac 32

20 <210> 5
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Stx2eB-His
 <400> 5

Met Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn Glu Asp
 1 5 10 15

Asn Thr Phe Thr Val Lys Val Ser Gly Arg Glu Tyr Trp Thr Asn Arg
 20 25 30

Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr
 35 40 45

Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ala Gln
 50 55 60

25 Val Lys Phe Asn Leu Glu His His His His His His
 65 70 75

<210> 6
 <211> 231
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 713 962 T3

<220>
 <223> Stx2eB-His

<400> 6

atggattgcg cgaaaggcaa aattgaattt tcgaaatata atgaagataa cacctttacc 60
 gtgaaagtga gcgggtcgca atattggacc aatcgttgga atctgcagcc gttactgcaa 120
 tcggcccagc tgaccggcat gaccgttacc attatcagca acacctgcag ctcgggcagt 180
 ggttttgctc aggtgaaatt caatctcgag caccaccacc accaccactg a 231

5 <210> 7
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Contiene la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Mun I

<400> 7
 gcgccaatg gccaccatga ttaaataaa attggtgtt 40

15 <210> 8
 <211> 88
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Mun I y el enlazador (GP)2GH6 (EcoRI) H6

<400> 8

ggcaattggt aatgatggtg atggtgatgg aattcatggt gatggtgatg atgtccaggt 60
 cctggaccat ttgccatact aattgcgg 88

20 <210> 9
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Enlazador (G4S)3

<400> 9
 ggcggtggcg gtagcggcg tggcgtagc ggcggtggcg gtagc 45

30 <210> 10
 <211> 165
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Modificado para expresión en E.coli y levadura

35 <400> 10

ggcggtgatc tggcgccgca gatgctgctc gaactgcagg aaaccaacgc ggccttgcga 60
 gatgtgctgt aactgctgct ccagcaagtg aaagaaatta cttttctgaa aaataccgtt 120
 atggaatgct atgcgtgtgg catgcagccg gcccgtagcc cgggc 165

<210> 11
 <211> 210
 <212> ADN

ES 2 713 962 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Modificado para enlazador (G4S)3 y E. coli

<400> 11

ggcgggtggcg gtagcggcgg tggcggtagc ggcgggtggcg gtagcggcgg tgatctggcg 60

ccgcagatgc tgcgcgaact gcaggaaacc aacgcgggcc tgcaagatgt gcgtgaactg 120

ctgcgccagc aagtgaaaga aattaccttt ctgaaaaata cggttatgga atgcgatgcg 180

5 tgtggcatgc agccggcccg taccccgggc 210

<210> 12

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Contiene la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Mun I

<400> 12

gcgcaattgg gcggtggcgg tagcggcgg 30

<210> 13

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Contiene la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción EcoR I

<400> 13

gcggaattcg cccgggttac gggccggctg c 31

<210> 14

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Contiene la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Xho I

<400> 14

gggctcgagg gtccaggacc tggacatc 28

<210> 15

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Contiene la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Xho I

<400> 15

gggctcgagt cagcccgggg tacgggcc 28

<210> 16

<211> 153

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Stx2eB-His-COMP

<400> 16

40

ES 2 713 962 T3

Met Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn Glu Asp
 1 5 10 15

Asn Thr Phe Thr Val Lys Val Ser Gly Arg Glu Tyr Trp Thr Asn Arg
 20 25 30

Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr
 35 40 45

Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ala Gln
 50 55 60

Val Lys Phe Asn Leu Glu Gly Pro Gly Pro Gly His His His His His
 65 70 75 80

His Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 85 90 95

Gly Ser Gly Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu
 100 105 110

Thr Asn Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val
 115 120 125

Lys Glu Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys
 130 135 140

Gly Met Gln Pro Ala Arg Thr Pro Gly
 145 150

<210> 17
 <211> 462
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Stx2eB-His-COMP
 <400> 17

atggattgcg cgaaaggcaa aattgaattt tcgaaatata atgaagataa cacctttacc 60
 gtgaaagtga gcggtcgca atattggacc aatcgttgga atctgcagcc gttactgcaa 120
 tcggcccagc tgaccggcat gaccgttacc attatcagca acacctgcag ctcgggcagt 180
 ggttttgcg aggtgaaatt caatctcgag ggtccaggac ctggacatca tcaccatcac 240
 catgaattgg gcggtggcgg tagcggcggg ggcggtagcg gcggtggcgg tagcggcggg 300
 gatctggcgc cgcagatgct gcgcgaactg caggaaacca acgcggccct gcaagatgtg 360
 cgtgaactgc tgcgccagca agtgaaagaa attacctttc tgaaaatac cgttatggaa 420
 tgcatgcatgcat gtggcatgca gccggcccgt acccggggct ga 462

10

<210> 18
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 713 962 T3

<220>

<223> Stx2eB-His-COMP-His-Z

<400> 18

Met Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn Glu Asp
 1 5 10 15

Asn Thr Phe Thr Val Lys Val Ser Gly Arg Glu Tyr Trp Thr Asn Arg
 20 25 30

Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr
 35 40 45

Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ala Gln
 50 55 60

Val Lys Phe Asn Leu Glu Gly Pro Gly Pro Gly His His His His His
 65 70 75 80

His Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 85 90 95

Gly Ser Gly Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu
 100 105 110

Thr Asn Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val
 115 120 125

Lys Glu Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys
 130 135 140

Gly Leu Asp Gly Pro Gly Pro Gly Gly Gly Ser His His His His
 145 150 155 160

His His Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Gly Pro Leu Asp Val Asp Asn
 165 170 175

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
 180 185 190

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 195 200 205

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
 210 215 220

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 225 230

ES 2 713 962 T3

<210> 19
 <211> 696
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Stx2eB-His-COMP-His-Z

<400> 19
 atggattgcg cgaaaggcaa aattgaattt tcgaaatata atgaagataa cacctttacc 60
 gtgaaagtga gcggtcgcga atattggacc aatcgttggga atctgcagcc gttactgcaa 120
 tcggcccagc tgaccggcat gaccgttacc attatcagca acacctgcag ctcgggcagt 180
 ggttttgcbc aggtgaaatt caatctcgag ggtccaggac ctggacatca tcaccatcac 240
 catgaattgg gcggtggcgg tagcggcggg ggcggtagcg gcggtggcgg tagcggcggg 300
 gatctggcgc cgcagatgct gcgcgaactg caggaaacca acgcggccct gcaagatgtg 360
 cgtgaactgc tgcgccagca agtgaaagaa attacctttc tgaaaaatac cgttatggaa 420
 tgcgatgcgt gtggcctcga cggcccgggc ccgggcbggtg gcggtagcca tcatcaccat 480
 catcacggcg gtggcggtag cggcccgggc ccgctcgacg tggataacaa atttaataaa 540
 gaacagcaga acgccttcta tgaaattctg catctgccga acctgaacga agaacagcgt 600
 aacgccttta ttcagagcct gaaagatgat ccgagccaga gcgccaatct gctggcagaa 660
 gccaaaaaac tgaacgatgc acaggccccg aaataa 696

10 <210> 20
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> STEC

<400> 20
 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 Val Ser Gly Arg Glu Tyr Trp
 35 40 45
 Thr Asn Arg Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr
 50 55 60
 Gly Met Thr Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly
 65 70 75 80
 Phe Ala Gln Val Lys Phe Asn
 85

15

ES 2 713 962 T3

<210> 21
 <211> 207
 <212> ADN
 <213> STEC

5 <400> 21

gcggattgtg ctaaaggtaa aattgagttt tccaagtata atgaggataa tacctttact 60
 gtgaagggtg caggaagaga atactggacg aacagatgga atttgcagcc attgttacia 120
 agtgctcagc tgacagggat gactgtaaca atcatatcta atacctgcag ttcaggctca 180
 ggctttgccc aggtgaagtt taactga 207

<210> 22
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> STEC

10 <400> 22

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

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

15 <220>
 <223> Modificado para expresión en E. coli y levadura que no contiene señales de secreción

<400> 23

atggattgcg cgaaaggcaa aattgaattt tcgaaatata atgaagataa cacctttacc 60
 gtgaaagtga gcggtcgcga atattggacc aatcgttgga atctgcagcc gttactgcaa 120
 tcggcccagc tgaccggcat gaccgttacc attatcagca acacctgcag ctcgggcagt 180
 ggttttgcgc aggtgaaatt caatctcgag 210

<210> 24
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Modificado para expresión en E. coli y levadura que no contiene señales de secreción

25

ES 2 713 962 T3

<400> 24

Met Asp Cys Ala Lys Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn Glu Asp
 1 5 10 15

Asn Thr Phe Thr Val Lys Val Ser Gly Arg Glu Tyr Trp Thr Asn Arg
 20 25 30

Trp Asn Leu Gln Pro Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr
 35 40 45

Val Thr Ile Ile Ser Asn Thr Cys Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ala Gln
 50 55 60

Val Lys Phe Asn Leu Glu
 65 70

<210> 25

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador (G4S)3

<400> 25

10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 26

<211> 165

<212> ADN

<213> mamífero

15 <400> 26

gggtggagacc tagccccaca gatgcttcga gaactccagg agactaatgc ggcgctgcaa 60

gacgtgagag agctcttgcg acagcaggtc aaggagatca ccttcctgaa gaatacgggtg 120

atggaatgtg acgcttgccg aatgcagccc gcacgcaccc ccggt 165

<210> 27

<211> 55

<212> PRT

20 <213> mamífero

<400> 27

ES 2 713 962 T3

Gly Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys Glu
 20 25 30

Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys Gly Met
 35 40 45

Gln Pro Ala Arg Thr Pro Gly
 50 55

- <210> 28
- <211> 55
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 5
- <220>
- <223> Modificado para expresión en E. coli y levadura
- <400> 28

Gly Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys Glu
 20 25 30

Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys Gly Met
 35 40 45

Gln Pro Ala Arg Thr Pro Gly
 50 55

- 10
- <210> 29
- <211> 70
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15
- <223> Que codifica enlazador (G4S)3 y COMP
- <400> 29

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn Ala
 20 25 30

Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys Glu Ile
 35 40 45

Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys Gly Met Gln
 50 55 60

Pro Ala Arg Thr Pro Gly
 65 70

ES 2 713 962 T3

<210> 30
 <211> 129
 <212> ADN
 <213> Gallus gallus

5 <400> 30

gaggaagatc catgCGAATG taaatctata gtgaagttcc agacaaaagt tgaagaactc 60

atcaatacac tgcagcagaa attggaagct gtggcaaaaa ggattgaagc cctggagaat 120

aagatcatc 129

<210> 31
 <211> 129
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Modificado para expresión en E.coli y levadura

<400> 31

gaagaagatc cgtgCGAATG taaatccatt gtgaaatttc agaccaaagt tgaagaactg 60

atcaacacgc tgcaacaaaa actggaagcg gtggcgaaac gcattgaagc actggaaaac 120

aaaatcatc 129

15 <210> 32
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<400> 32

20 **Glu Glu Asp Pro Cys Glu Cys Lys Ser Ile Val Lys Phe Gln Thr Lys**
1 5 10 15

Val Glu Glu Leu Ile Asn Thr Leu Gln Gln Lys Leu Glu Ala Val Ala
20 25 30

Lys Arg Ile Glu Ala Leu Glu Asn Lys Ile Ile
35 40

<210> 33
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Modificado para expresión en E.coli y levadura

<400> 33

Glu Glu Asp Pro Cys Glu Cys Lys Ser Ile Val Lys Phe Gln Thr Lys
1 5 10 15

Val Glu Glu Leu Ile Asn Thr Leu Gln Gln Lys Leu Glu Ala Val Ala
20 25 30

Lys Arg Ile Glu Ala Leu Glu Asn Lys Ile Ile
35 40

ES 2 713 962 T3

<210> 34
 <211> 426
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Stx2eB-His-CMP

<400> 34
 atggactgtg cgaaaggcaa aatcgaattt agcaaataca atgaagataa tacgtttacg 60
 gtgaaagtgt cgggtcgtga atactggacc aaccggttga atctgcagcc gctgctgcag 120
 tctgcgcaac tgaccggtat gaccgtcacg attatctcga acacgtgcag ctctggcagc 180
 ggttttgccc aagttaaatt caatctggaa ggcccgggtc cgggccatca ccatcacat 240
 cacgaactgg gcggtggcgg tagtgccggt gccggttccg gcggtggcgg ttcagaagaa 300
 gatccgtgcg aatgtaaadc cattgtgaaa tttcagacca aagtgaaga actgatcaac 360
 acgctgcaac aaaaactgga agcgggtggcg aaacgcattg aagcactgga aaacaaaatc 420
 atctaa 426

10 <210> 35
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Stx2eB-His-CMP

15 <400> 35

Met	Asp	Cys	Ala	Lys	Gly	Lys	Ile	Glu	Phe	Ser	Lys	Tyr	Asn	Glu	Asp	1	5	10	15
Asn	Thr	Phe	Thr	Val	Lys	Val	Ser	Gly	Arg	Glu	Tyr	Trp	Thr	Asn	Arg	20	25	30	
Trp	Asn	Leu	Gln	Pro	Leu	Leu	Gln	Ser	Ala	Gln	Leu	Thr	Gly	Met	Thr	35	40	45	
Val	Thr	Ile	Ile	Ser	Asn	Thr	Cys	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Phe	Ala	Gln	50	55	60	
Val	Lys	Phe	Asn	Leu	Glu	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	His	His	His	His	His	65	70	75	80
His	Glu	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	85	90	95	
Gly	Ser	Glu	Glu	Asp	Pro	Cys	Glu	Cys	Lys	Ser	Ile	Val	Lys	Phe	Gln	100	105	110	
Thr	Lys	Val	Glu	Glu	Leu	Ile	Asn	Thr	Leu	Gln	Gln	Lys	Leu	Glu	Ala	115	120	125	
Val	Ala	Lys	Arg	Ile	Glu	Ala	Leu	Glu	Asn	Lys	Ile	Ile	130	135	140				

ES 2 713 962 T3

<210> 36
 <211> 473
 <212> **ADN**
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Stx2eB-His-CMP

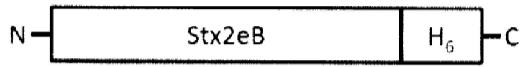
<400> 36

agaaggagat ataccatgga ctgtgcgaaa ggcaaaatcg aatttagcaa atacaatgaa	60
gataatacgt ttacggtgaa agtgtcgggt cgtgaatact ggaccaaccg ttggaatctg	120
cagccgctgc tgcagtctgc gcaactgacc ggtatgaccg tcacgattat ctcgaacacg	180
tgcagctctg gcagcggttt tgcccaagtt aaattcaatc tgggaaggccc ggggccgggc	240
catcaccatc accatcacga actgggcggt ggcggtagtg gcggtggcgg ttccggcggt	300
ggcggttcag aagaagatcc gtgcgaatgt aaatccattg tgaaatttca gaccaaagtt	360
gaagaactga tcaacacgct gcaacaaaaa ctggaagcgg tggcgaaacg cattgaagca	420
ctggaaaaca aaatcatcta actcgagcac caccaccacc accactgaga tcc	473

REIVINDICACIONES

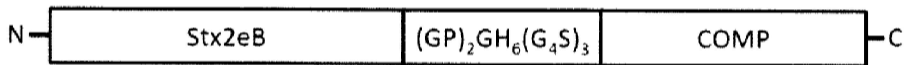
1. Una proteína de fusión en la que están unidos un polipéptido que consiste en una unidad formadora de superhélice de la proteína oligomérica de la matriz de cartílago (COMP) y una subunidad B de la toxina Shiga Shx2e (Stx2eB).
- 5 2. La proteína de fusión descrita en la reivindicación 1, que tiene una secuencia enlazadora y/o una secuencia de etiqueta entre el polipéptido y la Stx2eB.
3. La proteína de fusión descrita en la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína COMP es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:27 o la SEQ ID NO:28 o un polipéptido que tiene una homología de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % o más preferentemente al menos el 95 % con dichas secuencias.
- 10 4. La proteína de fusión descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la Stx2eB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:20, la SEQ ID NO:22 o la SEQ ID NO:24 o un polipéptido que tiene una homología de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % o más preferentemente al menos el 95 % con dichas secuencias.
- 15 5. Un multímero de proteína de fusión, en el que la proteína de fusión descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 está multimerizada.
6. Un fragmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 7. Un vector de expresión recombinante que comprende el fragmento de ácido nucleico descrito en la reivindicación 6.
8. Una célula huésped que comprende el fragmento de ácido nucleico descrito en la reivindicación 6 o el vector de expresión recombinante descrito en la reivindicación 7.
9. Una vacuna contra la enfermedad de edema porcino que comprende la proteína de fusión descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el multímero de proteína de fusión descrito en la reivindicación 5 como principio activo.
- 25 10. Una vacuna de ADN contra la enfermedad de edema porcino que comprende el fragmento de ácido nucleico descrito en la reivindicación 6 o el vector de expresión recombinante descrito en la reivindicación 7 como principio activo.
- 30 11. Un kit para medir la cantidad de anticuerpos contra la Stx2eB en una muestra, que comprende la proteína de fusión descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el multímero de proteína de fusión descrito en la reivindicación 5.
- 35 12. Un procedimiento de producción de un multímero de proteína de fusión, que comprende un procedimiento de expresar una proteína de fusión en la que un polipéptido que tiene una unidad formadora de superhélice de la proteína oligomérica de la matriz de cartílago (COMP) y una subunidad B de la toxina Shiga Stx2e (Stx2eB) se unen en un huésped y a continuación replegar la proteína de fusión, en el que la proteína de fusión tiene preferentemente un espaciador entre el polipéptido y la Stx2eB.
- 40 13. El procedimiento de producción descrito en la reivindicación 12, en la que la proteína COMP es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:27 o la SEQ ID NO:28 o un polipéptido que tiene una homología de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % o más preferentemente al menos el 95 % con dichas secuencias.
- 45 14. El procedimiento de producción descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, en la que la Stx2eB es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:20, la SEQ ID NO:22 o la SEQ ID NO:24 o un polipéptido que tiene una homología de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % o más preferentemente al menos el 95 % con dichas secuencias.
15. Una proteína de fusión como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un multímero de proteína de fusión como se describe en la reivindicación 5 o un fragmento de ácido nucleico como se describe en la reivindicación 6 o un vector de expresión recombinante como se describe en la reivindicación 7 para su uso en un procedimiento para prevenir la enfermedad de edema porcino.

Fig.1



N: extremo amino C: extremo carboxilo H₆: etiqueta de His

Fig.2



**N: extremo amino C: extremo carboxilo (GP)₂GH₆(G₄S)₃: enlazador
COMP: dominio formador de pentámero de proteína oligomérica de la matriz del cartílago**

Fig.3

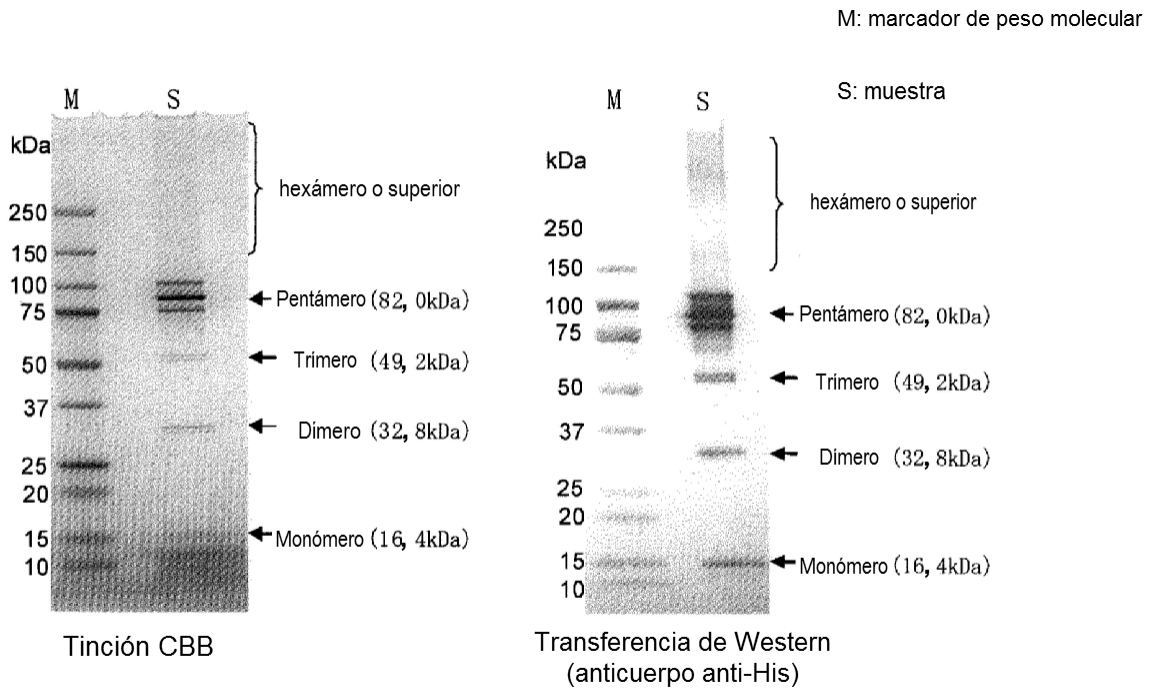
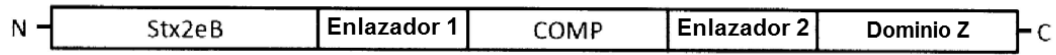


Fig.4



**N: extremo amino C: extremo carboxilo Enlazador 1: $(GP)_2GH_6(G_4S)_3$
 COMP: dominio formador de pentámero de proteína oligomérica de la matriz del cartilago
 Enlazador 2: $(GP)_2G_4SH_6G_4S(GP)_2$ Dominio Z: dominio z de unión a inmunoglobulina**

Fig.5

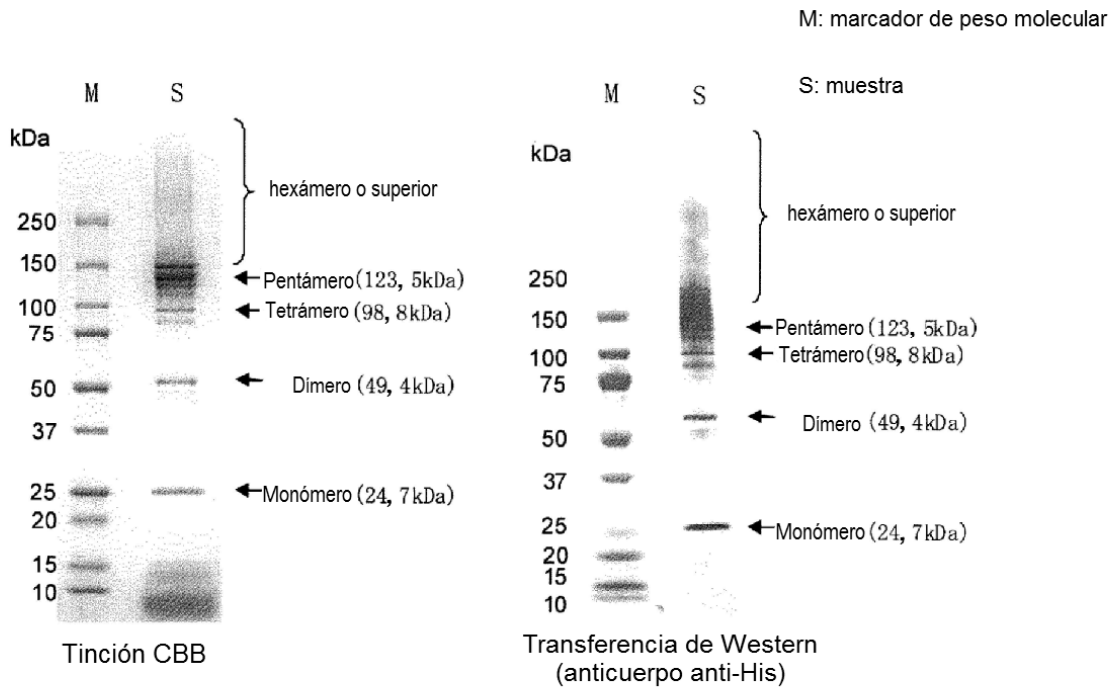
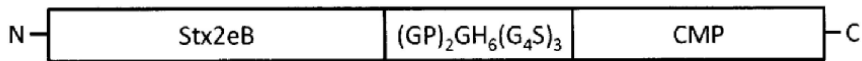


Fig.6



**N: extremo amino C: extremo carboxilo $(GP)_2GH_6(G_4S)_3$: enlazador
 CMP: dominio formador de trímero de proteína de la matriz del cartilago**

Fig.7

M: marcador de peso molecular
NR: sin replegamiento
(cuerpo de inclusión solubilizado en SDS al 1%)
AR: después del replegamiento

