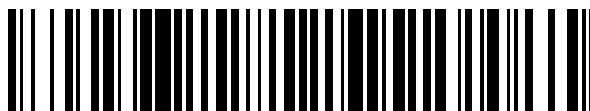


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 000**

51 Int. Cl.:

C07K 14/30 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2013** **PCT/CN2013/087599**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015** **WO15074213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2013** **E 13897752 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018** **EP 3072523**

54 Título: **Composición para prevenir y curar una infección por micoplasma**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
24.05.2019

73 Titular/es:

**AGRICULTURAL TECHNOLOGY RESEARCH
INSTITUTE (100.0%)
No. 1, Ln. 51, Dahu Road Xiangshan District
Hsinchu City 300, TW**

72 Inventor/es:

**LIN, JIUNN-HORNG;
WANG, JYH-PERNG;
CHEN, ZENG-WENG;
FANG, CHIEN-YU;
HSIEH, MING-WEI y
YANG, PING-CHENG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 714 000 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

Composición para prevenir y curar una infección por micoplasma

5 Antecedentes

Campo técnico

10 La presente divulgación se refiere a una vacuna contra *Mycoplasma* spp.; en especial, a una vacuna de subunidades contra *Mycoplasma* spp.

Descripción de la técnica anterior

15 *Mycoplasma* spp. es conocida en la actualidad como la bacteria más pequeña capaz de autorreplicarse fuera de las células hospedadoras. Aunque la neumonía enzoótica porcina no causaría la muerte porcina, reducirá la eficacia de la alimentación y causará retraso en el crecimiento, inflamación e inmunosupresión, además de hacer que los cerdos sean más vulnerables a una infección de otros patógenos, convirtiéndose, por tanto, en un daño económico para la industria.

20 Hasta el momento, la neumonía enzoótica porcina se evita mediante tres estrategias principales, que incluyen: la administración de medicamentos, la gestión del medio ambiente y la vacunación. Viendo la mala eficacia de prevención de los antibióticos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, la administración de medicamentos solo se puede usar con fines de tratamiento, y es difícil satisfacer las necesidades de prevención. Además, considerando que el abuso de fármacos puede conducir a una mayor infección causada por bacterias resistentes a los fármacos, 25 la administración de medicamentos requiere planes cautelosos, y existen muchas limitaciones.

La gestión del medio ambiente constituye la base de la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. Un buen saneamiento y manejo porcino sería útil para reducir la aparición de infecciones. Por otro lado, la prevención podría ser más integral a través de la vacunación.

30 Las vacunas convencionales en el campo usan bacterias inactivas/muertas como el principio activo de las mismas. Sin embargo, el precio de las vacunas convencionales es demasiado alto, porque *Mycoplasma* spp. es una bacteria exigente, y es difícil de cultivar en el laboratorio. Para reducir el coste de las vacunas de *Mycoplasma* spp., los científicos intentan desarrollar de manera continua vacunas de diferentes tipos, tales como: (1) vacunas atenuadas; 35 (2) vacunas de vectores; (3) vacunas de subunidades y (4) vacunas de ADN. Entre ellas, las vacunas de subunidades muestran el mayor potencial debido a las ventajas de facilidad de producción y a la alta seguridad.

Hasta la fecha, hay varias posibles proteínas candidatas que se podrían usar para las vacunas de *M. hyopneumoniae*; sin embargo, no hay ningún informe adicional que verifique las proteínas adecuadas para las vacunas de *M. hyopneumoniae*.

Sumario

45 A la vista de lo anterior, uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar antígenos adecuados para su uso en vacunas contra *Mycoplasma* spp., produciendo así nuevas vacunas contra *Mycoplasma* spp. para reducir el coste de la prevención.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una combinación de antígenos que sea adecuada para su uso en vacunas contra *Mycoplasma* spp. y, por lo tanto, proporcionar vacunas de subunidades con mejor rendimiento; 50 por lo tanto, habría más opciones para las tareas de prevención.

La presente descripción proporciona una proteína para la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp., que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 01, la SEQ ID NO: 02 o una de sus combinaciones.

55 La presente invención proporciona una composición para la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp., como se desvela en la reivindicación 1. Otras realizaciones preferidas se definen en las subreivindicaciones dependientes. Preferentemente, dicho aditivo farmacéuticamente aceptable es un disolvente, un estabilizante, un diluyente, un conservante, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente isotónico, un agente retardador de la absorción o una combinación de los mismos.

60 La presente descripción describe además una composición para la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp., que comprende: un principio activo, que tiene al menos dos proteínas seleccionadas de un grupo que consiste en P46, Tuf, MHP30 y NrdFC; y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

65 Dicho principio activo es P46, Tuf, MHP30 y NrdFC.

Dicho principio activo tiene al menos dos secuencias de aminoácidos seleccionadas de un grupo que consiste en la SEQ ID NO: 01, la SEQ ID NO: 02, la SEQ ID NO: 03 y la SEQ ID NO: 04.

5 Dicho principio activo tiene secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 01, la SEQ ID NO: 02, la SEQ ID NO: 03 y la SEQ ID NO: 04.

Dicho principio activo es de una concentración de 20 a 2.000 µg/ml basado en el volumen total de dicha composición.

10 Dicho adyuvante farmacéuticamente aceptable es un adyuvante completo de Freund, un adyuvante incompleto de Freund, un gel de alúmina, un tensioactivo, un adyuvante polianiónico, un péptido, una emulsión de aceite o una combinación de los mismos.

15 Preferentemente, la composición de la invención comprende además un aditivo farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente, dicho aditivo farmacéuticamente aceptable es un disolvente, un estabilizante, un diluyente, un conservante, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente isotónico, un agente retardador de la absorción o una combinación de los mismos.

20 La presente invención también proporciona un vector de expresión como se define en la reivindicación 8. La descripción desvela además un vector de expresión para la preparación del principio activo mencionado anteriormente; en la que dicho vector de expresión comprende un plásmido; en el que dicho plásmido comprende: una secuencia de nucleótidos que comprende al menos una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en la SEQ ID NO: 05, la SEQ ID NO: 06, la SEQ ID NO: 07 y la SEQ ID NO: 08; un gen que codifica una pareja de fusión,
25 seleccionado de un grupo que consiste en MsyB de *E. coli*, YjgD de *E. coli*, GroS17 de *E. coli*, GroES de *Bacillus subtilis*, TrxA de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, SUMO de *S. cerevisiae* y Vgb de *Vitreoscilla* spp.; y un elemento regulador.

30 Preferentemente, dicho elemento regulador comprende un promotor y un sitio de unión al ribosoma.

Preferentemente, dicho plásmido es pET-MSY, pET-YjgD, pET-GroS17, pET-GroES, pET-TrxA, pET-SUMO o pET-Vgb también se desvelan en la presente descripción.

35 En cuanto a dicho vector de expresión, siempre que, cuando dicha secuencia de nucleótidos es al menos una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en la SEQ ID NO: 05, la SEQ ID NO: 06 y la SEQ ID NO: 08, dicho gen que codifica una pareja de fusión es MsyB de *E. coli*.

40 En cuanto a dicho vector de expresión, siempre que, cuando dicha secuencia de nucleótidos es la SEQ ID NO: 07, dicho gen que codifica una pareja de fusión se selecciona de un grupo que consiste en YjgD de *E. coli*, GroS17 de *E. coli*, GroES de *Bacillus subtilis*, TrxA de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, SUMO de *S. cerevisiae* y Vgb de *Vitreoscilla* spp.

Dicho vector de expresión se aplica para su uso en un sistema de expresión génica de *E. coli*.

45 La presente invención proporciona además un método para la preparación de antígeno soluble como se define en la reivindicación 11. Por otra parte, la descripción desvela un método para la preparación de antígeno soluble, que comprende usar el vector de expresión; en el que dicho antígeno es P46, Tuf, MHP30 o NrdFC.

50 En resumen, la presente invención se refiere a antígenos, composición y vector de expresión para la preparación de dicho antígeno para la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. La presente divulgación no solo proporciona nuevas opciones para tareas de prevención, sino que también demuestra que una vacuna de subunidades "combinada" de la combinación de al menos dos antígenos (es decir, que tiene al menos dos antígenos como principios activos) puede mejorar la inducción inmunitaria. Por otra parte, la presente invención enseña algunas parejas de fusión que son particularmente adecuadas para ayudar a la expresión de los antígenos
55 mencionados anteriormente en un sistema de expresión de modo que sean favorables para aumentar la capacidad de producción de la preparación de las vacunas necesarias.

Breve descripción de los dibujos

60 La Figura 1 es el resultado de una electroforesis de proteínas, que muestra que varias parejas de fusión tienen diferentes efectos sobre la solubilidad de MHP30 preparada. Línea M: marcador proteico (escalera de proteína pretratada PageRuler™; Fermentas, EE. UU.); Línea 1: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-YjgD-MHP30), proteína soluble; Línea 2: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-SUMO-MHP30), proteína soluble; Línea 3: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-GroS17-MHP30), proteína soluble; Línea 4: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-GroES-MHP30), proteína soluble;
65 Línea 5: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-D-MHP30), proteína soluble; Línea 6: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-MsyB-MHP30), proteína soluble; Línea 7: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-Vgb-MHP30), proteína soluble; Línea 8: BL21 de

E. coli (DE3) (pET-TrxA-MHP30), proteína soluble.

La Figura 2 es el resultado de una electroforesis de proteínas, que muestra que las diversas parejas de fusión tienen diferentes efectos sobre la solubilidad de P46, NrdFC y Tuf preparada. Línea M: marcador proteico (escalera de proteína pretratada PageRuler™; Fermentas, EE. UU.); Línea 1: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-D-P46M), proteína soluble; Línea 2: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-D-P46M), proteína insoluble; Línea 3: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-D-NrdFC), proteína soluble; Línea 4: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-D-NrdFC), proteína insoluble; Línea 5: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-D-Tuf), proteína soluble; Línea 6: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-D-Tuf), proteína insoluble; Línea 7: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-MsyB-P46M), proteína soluble; Línea 8: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-MsyB-P46M), proteína insoluble; Línea 9: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-MsyB-NrdFC), proteína soluble; Línea 10: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-MsyB-NrdFC), proteína insoluble; Línea 11: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-MsyB-Tuf), proteína soluble; Línea 12: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-MsyB-Tuf), proteína insoluble.

La Figura 3 es el resultado de una electroforesis de proteínas, que muestra la purificación de las presentes proteínas recombinantes MHP30, P46, NrdFC y Tuf. Línea M: marcador proteico (escalera de proteína pretratada PageRuler™; Fermentas, EE. UU.); Línea 1: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-YjgD-MHP30), proteína soluble; Línea 2: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-MsyB-P46M), proteína soluble; Línea 3: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-MsyB-NrdFC), proteína soluble; Línea 4: BL21 de *E. coli* (DE3) (pET-MsyB-Tuf), proteína soluble; Línea 5: proteína de fusión MHP30 purificada; Línea 6: proteína de fusión P46 purificada; Línea 7: proteína de fusión NrdFC purificada; Línea 8: proteína de fusión Tuf purificada.

La Figura 4 muestra el resultado del ensayo de transferencia Western, que muestra que el antisuero de los ratones identificó el lisado celular total de *M. hyopneumoniae*.

La Figura 5 muestra el resultado del ensayo ELISA, que muestra los resultados de los experimentos de exposición inmunitaria realizados en la Realización 7 de la presente invención.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a antígenos, composición y vector de expresión para la preparación de dicho antígeno para la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. Específicamente, la presente invención demuestra el efecto antigénico de P46 y Tuf para preparar la composición para la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. Además, la presente descripción también demuestra una vacuna de subunidades "combinada" de la combinación de al menos dos de P46, Tuf, MHP30 y NrdFC como principios activos que pueden mejorar la inducción inmunitaria.

Por otro lado, la presente descripción describe parejas de fusión, que son particularmente adecuadas para preparar P46, Tuf, MHP30 y NrdFC de alta solubilidad (es decir, hidrosolubilidad). Mediante el uso de las parejas de fusión mencionadas anteriormente, se puede reducir significativamente el tiempo y el coste necesarios para la preparación de vacunas.

En un aspecto de la presente invención, se describe una composición para la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp., que comprende: un primer principio activo, que comprende una proteína de P46, Tuf, o una combinación de los mismos; y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. En una realización alternativa, dicha composición puede comprender además un segundo principio activo. Dicho segundo principio activo comprende una proteína MHP30, NrdFC o una combinación de las mismas.

En otro aspecto, se describe una composición para la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp., que comprende: un principio activo, que tiene al menos dos proteínas seleccionadas de un grupo que consiste en P46, Tuf, MHP30 y NrdFC; y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En una realización alternativa de la presente invención, dicha P46 se corresponde con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 01; dicha Tuf se corresponde con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 02; dicha MHP30 se corresponde con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 03; dicha NrdFC se corresponde con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 04. Los expertos en la materia pueden entender fácilmente que, mientras no se interfiera el determinante antigénico formado mediante el plegamiento de un péptido de dicha secuencia de aminoácidos, dicho principio activo puede ser una proteína de fusión con al menos dos de dichas secuencias.

Normalmente, la combinación de dos o más antígenos en una sola vacuna no siempre es favorable para la inducción inmunitaria de la vacuna. De hecho, la combinación de dos o más antígenos en una sola vacuna puede causar una situación no deseada en la que la inducción inmunitaria de los dos o más antígenos entre en conflicto entre sí y, por lo tanto, se reduzca. Además, desde la perspectiva económica, incluso si no están en conflicto entre sí, si la inducción inmunitaria de los dos o más antígenos no presenta un efecto sinérgico, sería inútil combinar dos o más antígenos en una sola vacuna. Las investigaciones de la presente invención demostraron que P46, Tuf, MHP30 y NrdFC mostraron una mejor inducción inmunitaria mientras se usaban en combinación. Por lo tanto, en una realización alternativa, dicho principio activo de la presente composición comprende dos cualquiera o más de las proteínas mencionadas anteriormente; es decir, la vacuna combinada de la presente invención.

La concentración de dicho/s principio/s activo/s en la presente composición es de 20 a 2.000 µg/ml basada en el

volumen total de dicha composición. En una realización preferible de la presente invención, un principio activo de la presente composición es de una concentración de 20 a 500 µg/ml basada en el volumen total de dicha composición. En una realización alternativa de la presente invención, la presente composición contiene al menos una de dichas proteínas como principios activos; en la que la concentración total de esos principios activos es de 20 a 1.000 µg/ml, de 20 a 1.500 µg/ml o de 20 a 2.000 µg/ml basado en el volumen total de dicha composición.

Dicho adyuvante farmacéuticamente aceptable se usa para mejorar el efecto inmunitario de dicho principio activo, para estabilizar dicho principio activo y/o para aumentar la seguridad de las vacunas. Dicho adyuvante farmacéuticamente aceptable de la presente invención incluye, pero sin limitación: un adyuvante completo de Freund, un adyuvante incompleto de Freund, un gel de alúmina, un tensioactivo, un adyuvante polianiónico, un péptido, una emulsión de aceite o una combinación de los mismos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector de expresión. Específicamente, dicho vector de expresión se usa para un sistema de expresión de *E. coli*. En otras palabras, dicho vector de expresión puede traducirse en un péptido de secuencia de aminoácidos de la proteína deseada, y el péptido puede plegarse formando el principio activo deseado requerido para la presente composición. Sin embargo, según el espíritu de la presente invención, los expertos en la materia pueden referirse a la divulgación de la presente invención y realizar las modificaciones correspondientes para que quepan en varios sistemas de expresión, sin que dejen de pertenecer al alcance de la presente invención (por ejemplo, modificando las secuencias para corresponder a diferente uso de codones).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar una proteína para la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. usando dicho vector de expresión. Las proteínas preparadas por los vectores de expresión convencionales en el campo normalmente tienen el inconveniente de la insolubilidad; por lo tanto, es necesario tratar y resolver el producto purificado mediante urea y clorhidrato de guanidinio. Sin embargo, esos tratamientos no solo aumentan el coste de producción, sino que también provocan la desnaturalización de las proteínas, por lo que, a veces, se necesita un replegamiento de las proteínas desnaturalizadas para recuperar su función antigénica. Si bien existe cierta posibilidad de que el proceso de replegamiento falle, se podría reducir el efecto antigénico de esas proteínas. A la luz de la insuficiencia de la preparación convencional mencionada anteriormente, el presente método tiene fuerza para emparejar la pareja de fusión que es particularmente adecuada con el fin de proporcionar una excelente solubilidad a las proteínas mencionadas anteriormente para la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. Por lo tanto, se puede ahorrar en costes de producción, se pueden simplificar los procedimientos de preparación y se puede mejorar la eficacia de las proteínas producidas por ser los principios activos de las vacunas.

En una realización alternativa de la presente invención, dicho vector de expresión comprende un plásmido. dicho plásmido comprende: una secuencia de nucleótidos, un gen que codifica una pareja de fusión y un elemento regulador. Dicha secuencia de nucleótidos comprende al menos una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en la SEQ ID NO: 05, la SEQ ID NO: 06, la SEQ ID NO: 07 y la SEQ ID NO: 08, que corresponden respectivamente a P46, Tuf, MHP30 y NrdFC.

En una realización alternativa, siempre que el funcionamiento del sistema de expresión génica no se vea obstaculizado, y la producción de dicha secuencia de nucleótidos y el plegamiento de la secuencia de aminoácidos consecuente de la misma no se vean interferidos, dicho plásmido puede comprender dos o más de dichas secuencias de nucleótidos.

Dicho gen que codifica una pareja de fusión se selecciona de un grupo que consiste en MsyB de *E. coli*, YjgD de *E. coli*, GroS17 de *E. coli*, GroES de *Bacillus subtilis*, TrxA de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, SUMO de *S. cerevisiae* y Vgb de *Vitreoscilla* spp.

Dicho elemento regulador se refiere a un elemento requerido para iniciar la transcripción y la traducción en el sistema de expresión. Dicho elemento regulador comprenderá al menos un promotor y un sitio de unión al ribosoma. Preferentemente, dicho elemento regulador puede comprender además: un operador, una secuencia potenciadora, o una combinación de los mismos.

Los siguientes ejemplos mencionan los ensayos y experimentos de la presente invención con el fin de explicar con más detalle las características y ventajas de la presente invención. Se debe tener en cuenta que los siguientes ejemplos son ilustrativos, y que no se deben usar para limitar el alcance de las reivindicaciones de la presente invención.

Ejemplo 1: Cepas y cultivo de las mismas.

Los presentes investigaciones identificaron que hay siete clases de *Mycoplasma* spp. aisladas de cerdos: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyopharyngis*, *Mycoplasma suis*, y *Mycoplasma bovigenitalium* (Gourlay et al., 1978; Blank et al., 1996; Assuncao et al., 2005). Entre ellas, *Mycoplasma hyopneumoniae* es el principal patógeno que causa la neumonía por

micoplasma porcina. La tasa de infección está entre el 25 % y el 93 %. Por lo tanto, la presente investigación usó *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mycoplasma hyopneumoniae*, PRIT-5) como la fuente del gen del antígeno. Además, la presente investigación usó JM109 de *Escherichia coli* como hospedador para la clonación de genes y BL21 de *Escherichia coli* (DE3) como hospedador para la expresión de proteínas.

M. hyopneumoniae se cultivó usando medio de Friis (Friis *et al.*, 1975). Las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) se cultivaron usando medio de LB (Luria-Bertani). La cantidad adecuada de antibiótico y/o el 1,5 % de agar para preparar medio sólido se añadieron opcionalmente de acuerdo con las condiciones del experimento.

Ejemplo 2: Clonación del gen del antígeno de *M. hyopneumoniae*

Se diseñaron cebadores específicos para diferentes genes de antígeno (Tabla 1). Se usó el genoma de *M. hyopneumoniae* se usó como molde y se realizó la amplificación usando los cebadores mencionados anteriormente. Los detalles de la amplificación de genes y la clonación se describen en los siguientes párrafos:

Tabla 1: Conjuntos de cebadores para amplificar los genes deseados.

Genes deseados	Secuencia del cebador (de 5' a 3')
MHP30	MHP30F (SEQ ID NO 09): GATATAGGATCCGCAAAATTAGACGATAATCTTCAGTATTCA MHP30R (SEQ ID NO 10): CAATATGTCGACTTAATTTTACCTTGTTTTTAATGATTTCGTC
P46	P46F (SEQ ID NO 11): GATATAGGATCCATGAAAAAATGCTTAGAAAAAATTCTTG P46R (SEQ ID NO 12): CAATATGTCGACTTAGGCATCAGGATTATCAACATTAGC
NrdFC	NrdCF (SEQ ID NO 13): GGATATAGGATCCGATCTATTATATAAACTAATTGAATTAGAAAAAGATTATC NrdCR (SEQ ID NO 14): CAATATGTCGACTTAAACTCCCAATCTTCATCTTCG
Tuf	TufF (SEQ ID NO 15): GATATAGGATCCATGGCAGTTGTTAAACGACAGGAAAA TufR (SEQ ID NO 16): CAATATGTCGACTTATTTAATAATTTTCGGTAACTGTTCCGGCA
*GGATCC: Sitio de corte de <i>Bam</i> HI; GTCGAC: Sitio de corte de <i>Sal</i> I	

1. Extracción del genoma de *M. hyopneumoniae*.

La extracción del genoma de *M. hyopneumoniae* se realizó mediante el uso del kit de purificación de ADN (Tissue & Cell Genomic DNA Purification kit; GeneMark, Taiwán). En primer lugar, se llevaron a centrifugación 4,5 ml de caldo (5.870 ×g, 5 min) en tubos para desechar el sobrenadante y recoger el sedimento. Después, se añadieron 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y 200 µl de reactivo de extracción para reaccionar a 56 °C durante 3 horas. Se mezclaron el sedimento y los reactivos anteriormente mencionados boca abajo o agitando el tubo cada 5 minutos durante el período para asegurarse de que estaban bien mezclados.

Tras la reacción con el reactivo de extracción, la solución se volvió transparente cuando el sedimento se digirió por completo. Luego se añadieron 200 µl de reactivo de unión para reaccionar a 70 °C durante 10 minutos. Después de eso, se añadieron 200 µl de etanol absoluto al tubo y se mezclaron. Se movió todo el contenido del tubo a una columna de centrifugación y se colocó la columna de centrifugación en un tubo de recolección. Tras la centrifugación (17.970 ×g) durante 2 minutos, se desechó el efluente y se añadieron 700 µl de solución de lavado a la columna de centrifugación. Tras otra centrifugación (17.970 ×g) durante 2 minutos, se desechó el efluente y se repitió el procedimiento mencionado anteriormente. Finalmente, se sometió el tubo a centrifugación (17.970 ×g) durante 5 minutos para eliminar el etanol residual. Después, se colocó la columna de centrifugación en un tubo estéril y se añadió una cantidad adecuada de agua estéril para eluir el ADN.

La concentración de ADN genómico de *M. hyopneumoniae* purificado se determinó usando el kit de ensayo de alta sensibilidad de ADNbc Quant-iT™ (Invitrogen, Madison, EE.UU.) y el fluorómetro Qubit (Invitrogen, Madison, Estados Unidos). La operación es: se mezcla el reactivo Quant-iT y tampón Quant-iT a una proporción de 1:200, obteniéndose una solución de trabajo. Se mezclaron 190 µl de solución de trabajo y 10 µl de la muestra patrón, y se colocaron a temperatura ambiente durante 2 minutos. Después, se representó una curva patrón. Después de eso, se mezclaron 2 µl de muestra y 198 µl de solución de trabajo, se colocaron durante 2 minutos y se detectaron con un fluorómetro Qubit para determinar la concentración del ADN genómico. La fórmula de cálculo de la concentración (ng/µl) fue: Valor medido × 100.

2. Amplificación de los genes deseados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se usó ADN genómico de *M. hyopneumoniae* como molde y los cebadores diseñados para el gen P46, el gen Tuf, el gen MHP30 y el gen NrdFC se usaron, respectivamente, para la reacción de PCR. Cada cebador usado y las condiciones para la reacción de PCR se mostraron en la siguiente Tabla 2 (las secuencias de los cebadores se enumeraron en la Tabla 1 anterior). 50 µl de mezcla de PCR contenían 1 × Tampón de PCR B de GDP-HiFi, 200 µM de mezcla de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, tampón de amplificación 1 µM, 200 ng de ADN genómico de *M. hyopneumoniae* y 1 U de ADN polimerasa de GDP-HiFi. Tras la reacción de PCR, se realizó la electroforesis en gel

para confirmar la existencia del fragmento de ADN amplificado del tamaño esperado.

Tabla 2: Condiciones de PCR y conjuntos de cebadores

Genes deseados	Conjunto de cebadores	Condiciones
MHP30	MHP30F MHP30R	98 °C durante 5 minutos (un ciclo); 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 30 segundos (35 ciclos); 68 °C durante 5 minutos (un ciclo).
P46	P46F P46R	98 °C durante 5 minutos (un ciclo); 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 45 segundos (35 ciclos); 68 °C durante 5 minutos (un ciclo).
NrdFC	NrdCF NrdCR	98 °C durante 5 minutos (un ciclo); 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 30 segundos (35 ciclos); 68 °C durante 5 minutos (un ciclo).
Tuf	TufF TufR	98 °C durante 5 minutos (un ciclo); 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 45 segundos (35 ciclos); 68 °C durante 5 minutos (un ciclo).

5 3. Recogida del producto de la PCR y su clonación.

La recogida de los productos de PCR se realizó usando el kit de sistema de limpieza PCR-M™ (GeneMark, Taiwán; los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el manual de instrucciones, y no se reitera en el presente documento). Después, se realizó la clonación usando el kit de clonación para PCR CloneJET. Los experimentos de clonación se realizaron de acuerdo con el manual de instrucciones, que se describe brevemente a continuación. En primer lugar, se mezcló el producto de PCR recogido con los reactivos y la ADN ligasa del kit para realizar la reacción de ligadura a 22 °C durante 30 minutos. A continuación, se transformó la mezcla de ligadura en la cepa ECOSTM 9-5 de *E. coli* (Yeastern, Taiwán). Las condiciones de transformación se consultaron en el manual. Se transfirieron las bacterias transformadas a 1 ml de medio de recuperación de SOC y se cultivaron a 37 °C con agitación a 250 rpm. Se colocó una cantidad apropiada de caldo en placas de medio sólido LB con ampicilina (100 µg/ml) y las placas se cultivaron a 37 °C durante 16 horas. Después de eso, se realizó una PCR de colonias para seleccionar las cepas cuya transformación tuvo éxito. La PCR de las colonias se realizó según las siguientes etapas. En primer lugar, se preparó un tubo que contenía una mezcla de PCR de 50 µl de mezcla maestra de PCR 2><Taq (Genomics, Taiwán), 0,5 µl de cebador directo para amplificar el gen deseado, 0,5 µl de cebador inverso para amplificar el gen deseado y 49 µl de agua estéril. Tras la mezcla, la mezcla de PCR se distribuyó a varios tubos de PCR (10 µl/tubo). Las colonias de las placas mencionadas anteriormente se recogieron al azar en los tubos de PCR respectivamente para la reacción de PCR. Las condiciones de la reacción de PCR son: 95 °C durante 5 minutos (un ciclo); 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante X minutos (25 ciclos); 72 °C durante 7 minutos (un ciclo); en las que la "X" dependió del tiempo de extensión requerido por la ADN polimerasa, y se ajustó de acuerdo con el tamaño del fragmento que se iba a amplificar. La tasa de extensión de la ADN polimerasa de Taq es de 1 kb/min; por lo tanto, si el fragmento que se iba a amplificar tenía un tamaño de aproximadamente 1 kb, la "X" se establecería como 1 minuto. Tras la reacción, se realizó una electroforesis en gel para confirmar los resultados de la PCR. Para aquellas cepas de transformación que se confirmaron con éxito, tenían ADN insertado en sus plásmidos recombinantes, los plásmidos se extrajeron para la secuenciación del ADN. Los plásmidos que tenían el gen MHP30, el gen P46, el gen NrdFC y el gen Tuf se denominaron respectivamente pJET-MHP30, pJET-P46, pJET-NrdFC y pJET-Tuf.

Los resultados de la secuenciación de ADN mostraron que P46 colonizado en la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos y una secuencia de nucleótidos como la SEQ ID NO 01 y SEQ ID NO 05, respectivamente. Tuf tiene una secuencia de aminoácidos y una secuencia de nucleótidos como la SEQ ID NO 02 y SEQ ID NO 06 respectivamente. MHP30 tiene una secuencia de aminoácidos y una secuencia de nucleótidos como la SEC ID NO 03 y la SEC ID NO 07 respectivamente. NrdFC tiene una secuencia de aminoácidos y una secuencia de nucleótidos como la SEQ ID NO 04 y SEQ ID NO 08, respectivamente.

40 Ejemplo 3: Mutación puntual y clonación del gen P46.

P46 tiene tres codones TGA. El codón TGA se tradujo como triptófano en *Mycoplasma* spp., pero como codón de parada en *E. coli*. Para evitar un fallo en el uso del sistema de expresión de *E. coli* para producir toda la proteína deseada, se debe realizar una mutación puntual en el codón TGA del gen P46 para reemplazarlos como TGG, que es traducido por *E. coli* como triptófano.

El principio para el diseño de cebadores mutacionales para la mutación puntual es que el punto de mutación se encontrará en la zona central del cebador, y que la Tf de los cebadores debe ser superior a 78 °C. La Tf de los cebadores puede calcularse mediante la fórmula proporcionada por Invitrogene: $Tf = 81,5 + 0,41 (\% \text{ de GC}) - 675/N - \% \text{ de desapareamiento}$. "% de GC" representa el porcentaje de G y C del cebador en cuestión; "N" representa la longitud del cebador en cuestión; "% de desapareamiento" representa el porcentaje de la base que se va a mutar del cebador en cuestión. Los cebadores usados para la mutación puntual del gen P46 se enumeraron en la siguiente

Tabla 3, incluyendo P46F/P46M2, P46M1/P46M4, P46M3/P46M6 y P46M5/P46R.

Tabla 3: Cebadores usados para la mutación puntual del gen P46	
Genes deseados	Secuencia del cebador (de 5' a 3')
P46F	SEQ ID NO 11: GATATAGGATCCATGAAAAAATGCTTAGAAAAAATTCTTG
P46M2	SEQ ID NO 17: CTCTTTGGGCACTAATCCATCGAGGATTATCCGG
P46M1	SEQ ID NO 18: CCGGATAATCCTCGATGGATTAGTGCCCAAAGAG
P46M4	SEQ ID NO 19: ATTAGCTTGCTGAGTGAGCCAGTTATTTTGTGCATCC
P46M3	SEQ ID NO 20: GGATGCACAAAATAACTGGCTCACTCAGCAAGCTAAT
P46M6	SEQ ID NO 21: CGGCAGTTCCATAATTCCATCCTGGGACATAAAC
P46M5	SEQ ID NO 22: GTTTATGTCCCAGGATGGAATTATGGAAGTCCG
P46R	SEQ ID NO 12: CAATATGTCGACTTAGGCATCAGGATTATCAACATTAGC

5 Los 50 µl de mezcla de PCR contenían 1 × Tampón de PCR B de GDP-HiFi, 200 µM de mezcla de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, tampón de amplificación 1 µM, 100 ng de pJET-P46 y 1 U de ADN polimerasa de GDP-HiFi. Las condiciones de la PCR fueron: 98 °C durante 2 minutos (un ciclo); 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 45 segundos (35 ciclos); 68 °C durante 5 minutos (un ciclo). Tras la reacción de PCR, se realizó la electroforesis en gel para confirmar la existencia del fragmento de ADN amplificado del tamaño esperado.

10 Los productos de PCR se recogieron usando el kit de sistema de extracción en gel Gel-M™ y los experimentos se realizaron de acuerdo con el manual. Después, los cuatro productos de PCR recogidos se usaron como los moldes para la amplificación de los genes con el conjunto de cebadores P46F/P46R. Las condiciones de la PCR fueron: 98 °C durante 2 minutos (un ciclo); 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 15 45 segundos (35 ciclos); 68 °C durante 5 minutos (un ciclo). Después de eso, se puede obtener la longitud completa del gen P46 sometido a mutación puntual. Los productos de PCR se recogieron mediante el uso del kit de sistema de limpieza PCR-M™ (GeneMark, Taiwán). Y la clonación del gen de mutación se realizó con el kit de clonación para PCR CloneJET. Para aquellas cepas de transformación que se confirmaron, mediante PCR de colonias, se logró insertar el ADN en sus plásmidos recombinantes, los plásmidos se extrajeron para la secuenciación del ADN. 20 El plásmido que tenía el gen P46 mutado se denominó pJET-P46M.

Ejemplo 4: Establecimiento del presente vector de expresión de antígeno de *M. hyopneumoniae*.

25 Los plásmidos que tenían varias parejas de fusión se usaron como estructura principal para el establecimiento del vector de expresión de antígeno de *M. hyopneumoniae*. Los genes de parejas de fusión usados fueron MsyB de *E. coli*, YjgD de *E. coli*, el péptido parcial de GroS que contiene 17 aminoácidos (GroS17) de *E. coli*, GroES de *Bacillus subtilis*, TrxA de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, SUMO de *S. cerevisiae*, Proteína D del bacteriófago phiX174 y Vgb de *Vitreoscilla* spp. El establecimiento se realizó de la siguiente manera:

30 1. El establecimiento del vector de expresión de MHP30.

El corte de pJET-MHP30 con *Bam*HI y *Sall* y el fragmento de ADN resultante se ligó en un plásmido de expresión de fusión previamente cortado por las mismas enzimas de restricción. El producto de ligadura se transformó luego en ECOS 9-5 de *E. coli*. Las cepas de transformación se seleccionaron mediante PCR de colonias y se confirmó si 35 había fragmentos de ADN del tamaño esperado mediante el uso de electroforesis de ADN. Para aquellas cepas de transformación que se confirmaron con éxito, tenían ADN insertado en sus plásmidos recombinantes, los plásmidos se extrajeron para la secuenciación del ADN. Los plásmidos que tienen la secuencia de ADN correcta se denominaron respectivamente pET-MSY-MHP30, pET-YjgD-MHP30, pET-GroS17-MHP30, pET-GroES-MHP30, pET-TrxA-MHP30, pET-SUMO-MHP30, pET-D-MHP30 y pET-Vgb-MHP30.

40 2. El establecimiento del vector de expresión de P46.

El corte de pJET-P46M con *Bam*HI y *Sall* y los siguientes experimentos se realizaron refiriéndose a las etapas de establecimiento mencionadas anteriormente del vector de expresión de MHP30. Los plásmidos que tenían la 45 secuencia de ADN correcta se denominaron respectivamente pET-D-P46M y pET-MSY-P46M.

3. El establecimiento del vector de expresión de NrdFC.

El corte de pJET-NrdFC con *Bam*HI y *Sall* y los siguientes experimentos se realizaron refiriéndose a las etapas de establecimiento mencionadas anteriormente del vector de expresión de MHP30. Los plásmidos que tenían la 50 secuencia de ADN correcta se denominaron respectivamente pET-D-NrdFC y pET-MSY-NrdFC.

4. El establecimiento del vector de expresión de Tuf.

55 El corte de pJET-Tuf con *Bam*HI y *Sall* y los siguientes experimentos se realizaron refiriéndose a las etapas de establecimiento mencionadas anteriormente del vector de expresión de MHP30. Los plásmidos que tienen la

secuencia de ADN correcta se denominaron respectivamente pET-D-Tuf y pET-MSY-Tuf.

Ejemplo 5: Expresión de antígenos de *M. hyopneumoniae* recombinantes y purificación de los mismos.

Respecto a la expresión de los antígenos deseados

Los vectores de expresión de antígeno se transformaron en BL21 de *E. coli* (DE3). Se seleccionó una colonia individual y se inoculó en medio LB que contenía kanamicina a una concentración final de 30 µg/ml, y se cultivó en condiciones de 37 °C y 180 rpm durante la noche. A continuación, se inoculó el caldo en medio LB recién preparado (que contenía kanamicina de concentración final de 30 µg/ml) en una proporción de 1:100 y en condiciones de cultivo de 37 °C y 180 rpm hasta que el valor de DO₆₀₀ del mismo alcanzó aproximadamente 0,6-0,8. Se añadió 0,1 mM de IPTG para inducir la expresión de la proteína deseada durante 4 horas. Después, se colocó el caldo bajo centrifugación (10.000 ×g, 10 minutos, 4 °C) y se recogió el sedimento. Después de eso, se separaron la porción soluble y la porción insoluble del mismo usando el kit de extracción de proteínas bacterianas Easy-Lyse (Epicenter, EE.UU.). La electroforesis de proteínas se realizó para observar la solubilidad de los antígenos recombinantes producidos.

Las Figuras 1 y 2 mostraron respectivamente diferente solubilidad de MHP30 tras usar varias parejas de fusión en la expresión; y diferente solubilidad de P46, NrdFC y Tuf tras usar varias parejas de fusión en la expresión. Los resultados indicaron que el uso de YjgD, SUMO, GroS17, GroES, Vgb o TrxA como pareja de fusión puede aumentar la solubilidad de MHP30. Por otro lado, el uso de MsyB como pareja de fusión puede proporcionar una solubilidad excelente de P46, NrdFC y Tuf.

Respecto a la purificación de los antígenos deseados

Aprovechando el hecho de que el marcador de Hig N' de la proteína recombinante puede formar enlace covalente coordinado con los iones de níquel o de cobalto, se usó cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) para la purificación de proteínas. El protocolo de purificación de proteínas se consultó en el QIA expressionist™ (cuarta edición, Qiagen). El sedimento se suspendió en tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) y se rompió mediante un homogenizador. Después, se realizó una centrifugación, y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante recogido se introdujo en una columna de resina (1 ml de Ni-NTA) en la que se uniría el antígeno recombinante. Después de eso, se añadieron 15 ml de tampón de lavado (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8,0) para lavar la resina dentro de la columna con el fin de eliminar la unión inespecífica de proteínas. Finalmente, se introdujeron 20 ml de tampón de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0) para eluir los antígenos en la resina. El tampón de elución contenía una alta concentración de imidazol para competir por el sitio de unión en la resina con las proteínas recombinantes, de modo que las proteínas recombinantes se pudieran lavar de la resina. El resultado de la purificación se observó mediante electroforesis de proteínas. De acuerdo con la Figura 3, se mostró claramente que el marcador de His marcado en N' de los presentes antígenos recombinantes fue favorable para purificar los presentes antígenos recombinantes mediante IMAC.

Ejemplo 6: Ensayos con antisueros de ratones.

En este ejemplo, se usaron ratones BALB/c hembra de 5 semanas (Centro Nacional de Animales de Laboratorio). Los ratones se mantuvieron en una sala convencional para animales con aire acondicionado, y se recibieron comida y agua limpia. La exposición inmunitaria se realizó tras criar a los ratones durante 7 días. Se mezclaron los antígenos recombinantes purificados en los ejemplos mencionados anteriormente con adyuvante como una mezcla (adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund) a través de un conector de tres vías, y se inyectaron por vía subcutánea a los ratones. La primera inyección fue una formulación de adyuvante completo de Freund. Tras 7 días de la primera inyección, los ratones recibieron por inyección una formulación de adyuvante incompleto de Freund dos veces en un intervalo de 7 días. Tras 7 días a partir de la segunda inyección, se extrajo sangre de la órbita ocular de los ratones.

Se colocaron las muestras de sangre recogidas en la temperatura ambiente durante 1 hora y se colocaron a 4 °C durante la noche para dejar que la sangre se coagulara. Después, las muestras se sometieron a centrifugación (5.000 ×g) durante 30 minutos, obteniéndose el suero, que contenía un anticuerpo específico contra el antígeno recombinante.

A continuación, se usó el suero obtenido contra el lisado celular total de *M. hyopneumoniae*. El protocolo experimental fue: suspender PRIT-5 de *M. hyopneumoniae* en el tampón SET (glucosa 50 mM, HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) y añadir 5 x tampón de muestra (Tris-HCl 312,5 mM (pH 6,8), glicerol al 50 %, SDS al 10 %, azul de bromofenol al 0,05 %); calentar la muestra a 100 °C durante 5 minutos tras mezclar bien la muestra con el tampón mencionado anteriormente. Después, se realizó la electroforesis de proteínas. El gel, tras la electroforesis de proteínas, se sumergió en un tampón de transferencia (base Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 10 % (v/v), pH 8,3). Se enjuagó la membrana de PVDF del tamaño adecuado con metanol durante unos segundos, se lavó con agua desionizada y luego se sumergió en tampón de transferencia. Tras sumergir el gel y la membrana de PVDF en

tampón de transferencia durante 15 minutos, se colocaron por orden un papel de filtro, el gel, la membrana de PVDF y otro papel de filtro en una Celda de Transferencia Semiseca Trans-Blot SD para realizar la transferencia bajo un suministro eléctrico adecuado. Tras realizar la transferencia, la membrana de PVDF se sumergió en 20 ml de tampón de bloque (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, leche desnatada al 5 %, pH 7,4) a temperatura ambiente durante 1 hora, y se añadieron 10 µl de antígeno recombinante en (dilución x2.000). Tras agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, se desechó el tampón de bloqueo y la membrana de PVDF se realizó mediante 20 ml de tampón TBST (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05 %, pH 7,4) tres veces (5 minutos por cada uno). Luego se añadieron 20 ml de tampón de bloqueo y 4 µl de IgG anti-ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (H + L), y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eso, se lavó la membrana de PVDF con tampón de TBST tres veces y se añadió reactivo NBT/BCIP para la detección.

El resultado mostró que la mezcla del presente antígeno recombinante y adyuvante adecuado hizo inducir anticuerpos contra el antígeno en los ratones. Es decir, las presentes proteínas tenían potencial para ser inmunógenas (Figura 4).

Ejemplo 7: Pruebas inmunológicas y de exposición en cerdos.

1. Preparación de las vacunas.

Se mezclaron uno más de los antígenos recombinantes purificados de los ejemplos anteriormente mencionados con un adyuvante, obteniéndose las vacunas de subunidades o vacunas combinadas deseadas. La dosis de cada vacuna preparada fue de 2 ml, que contenía 200 µg de cada tipo de las presentes proteínas añadidas.

2. Pruebas inmunológicas porcinas.

Las vacunas de subunidades o vacunas combinadas anteriormente mencionadas se usaron para las pruebas inmunológicas porcinas. Se adquirieron cerdos SPF de 2 semanas de la granja de cerdos SPF de la segunda generación del Animal Technology Institute Taiwán. Todos los cerdos se mantuvieron y se alimentaron por igual en la granja de cerdos SPF.

Las vacunas (2 ml) se inyectaron por vía intramuscular a los cerdos cuando alcanzaron la edad de 21 días, y se extrajo sangre a los 21, 42, 70 y 98 días para aislar el suero. Se usó el kit de ensayos de anticuerpos de *Mycoplasma* spp. (IDEXX) para analizar los anticuerpos séricos recogidos. La operación fue la siguiente. En primer lugar, se mezclaron suavemente 10 µl de suero con 390 µl de diluyentes de muestra, obteniéndose una mezcla. Se añadieron 100 µl de la mezcla a los pocillos de una placa de 96 pocillos, que ya tenían antígeno de *Mycoplasma* spp. en el interior. Además, se añadieron 100 µl de suero positivo y de suero negativo a diferentes pocillos de la placa como controles. La placa se colocó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, se desechó el líquido de la placa y se añadieron 350 µl de tampón de lavado tres veces para el lavado. Luego se añadieron 350 µl de peroxidasa de rábano picante marcada con anticuerpos anti-porcinos a la placa, y la placa se colocó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eso, se desechó el líquido de la placa y se añadieron 350 µl de tampón de lavado tres veces para el lavado. Se añadieron 100 µl de solución de sustrato TMB a la placa, y la placa se colocó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, se añadieron 100 µl de tampón de detención para terminar la reacción de color. Finalmente, se evaluó la absorbancia de cada pocillo a 650 nm por un lector ELISA para el cálculo del valor S/P. Valor S/P = (absorbancia de DO₆₅₀ del grupo de ensayo - absorbancia de DO₆₅₀ del grupo de control negativo)/(absorbancia de DO₆₅₀ del grupo de control positivo - absorbancia de DO₆₅₀ del grupo de control negativo). Cuanto mayor sea el valor S/P, más anticuerpos contra las proteínas de *M. hyopneumoniae*. Los resultados del experimento mostraron que los antígenos presentes eran capaces de inducir una respuesta inmunitaria; en los que la vacuna de P46 y la vacuna combinada (contenía los cuatro antígenos en una vacuna: P46, Tuf, MHP30 y NrdFC) mostraron el mejor efecto de inducción, y la respuesta inmunitaria inducida se pudo mantener hasta la edad de 14 semanas (Figura 5).

3. Ensayos de exposición porcinos.

La vacuna de MH-PRIT-5 Bayovac® preparada usando PRIT-5 de *M. hyopneumoniae* se usó en este experimento como control para evaluar la eficacia inmunitaria de la presente vacuna de subunidades y vacuna combinada. Se adquirieron cerdos SPF de 4 semanas de la granja de cerdos SPF de la segunda generación del Animal Technology Institute Taiwán. Todos los cerdos se mantuvieron y se alimentaron por igual en la granja de cerdos SPF.

El caldo bacteriano de *M. hyopneumoniae* usado para los ensayos de exposición fue preparado mediante: se recogió un tejido pulmonar porcino (de aproximadamente 3 × 3 cm²) infectado por *M. hyopneumoniae*, y se trituró en 20 ml de medio de Friis. Tras la centrifugación (148,8 ×g) durante 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio para la centrifugación (7.870 ×g) durante otros 40 minutos. Después, se desechó el sobrenadante y se volvió a suspender la precipitación con 6 ml de medio de Friis, obteniéndose una suspensión. Después de eso, se filtró la suspensión secuencialmente con filtros de 5 µm y 0,45 µm, obteniéndose el caldo bacteriano de exposición necesario para este experimento.

Las vacunas (2 ml) se inyectaron por vía intramuscular a los cerdos cuando alcanzaron la edad de 35 días. Se realizó otra inyección a la edad de 49 días de la misma manera. A la edad de 63 días, los cerdos inmunizados se anestesiaron y se expusieron administrando el caldo bacteriano de exposición (5 ml) a través de la tráquea. Tras 28 días a partir del día de la prueba, se sacrificaron los cerdos y se extrajeron los pulmones para evaluar el efecto inmunitario. La evaluación del efecto inmunitario se realizó de acuerdo con los siguientes criterios: se puntuó con 10 puntos uno cualquiera de los lóbulos superiores intermedios y lóbulos superiores de cualquier lado del pulmón en los que se observó un rasgo patológico; Se puntuaron con 5 puntos cualquiera de los lóbulos superiores intermedios y lóbulos diafragmáticos de cualquier lado del pulmón en los que se observó un rasgo patológico. La puntuación total fue de 55 puntos. Los registros de las observaciones se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Evaluación de la lesión pulmonar en los ensayos de exposición

Antígeno/s	Punto de la lesión pulmonar
MHP30	27
P46	25
NrdFC	26
Tuf	23
MHP30+NrdFC+P46+Tuf	17
Vacuna de PRIT-5 (control positivo)	23
No se usó vacuna (control negativo)	30

De acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 4, es evidente que las vacunas de subunidades de la presente invención fueron capaces de proporcionar efectos inmunitarios equivalentes a los de la vacuna convencional (MH-PRIT-5 de Bayovac®). Además, la vacuna combinada (contenía los cuatro antígenos en una vacuna: P46, Tuf, MHP30 y NrdFC) presentó un efecto inmunitario significativamente mejor que la vacuna convencional. En resumen, las presentes proteínas son, de hecho, adecuadas para su aplicación como principios activos de vacunas, y esas proteínas presentaron un efecto sinérgico mientras se usaban en combinación como vacuna combinada.

Los expertos en la materia pueden entender fácilmente las posibles modificaciones basándose en la divulgación de la presente invención sin apartarse del alcance de la misma. Por lo tanto, los ejemplos anteriores no se usarán para limitar la presente invención, sino que pretenden cubrir cualquier posible modificación dentro del alcance de la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones que se citan a continuación.

Listado de secuencias

<110> INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE TECNOLOGÍA AGRÍCOLA

<120> Composición para prevenir una infección por *Mycoplasma* spp.

<130>

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 419

<212> PRT

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 1

ES 2 714 000 T3

Met	Lys	Lys	Met	Leu	Arg	Lys	Lys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Ala	Ile	Tyr	1	5	10	15
Ala	Thr	Ser	Leu	Ala	Ser	Ile	Ile	Ala	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Cys	Gly	20	25	30	
Gln	Thr	Glu	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Asp	Ser	Lys	Pro	Gln	Ala	Glu	Thr	35	40	45	
Leu	Lys	His	Lys	Val	Ser	Asn	Asp	Ser	Ile	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Asp	50	55	60	
Pro	Asp	Asn	Pro	Arg	Trp	Ile	Ser	Ala	Gln	Arg	Asp	Ile	Ile	Ser	Tyr	65	70	75	80
Val	Asp	Glu	Thr	Glu	Ala	Ala	Thr	Ser	Thr	Ile	Thr	Lys	Asn	Gln	Asp	85	90	95	
Ala	Gln	Asn	Asn	Trp	Leu	Thr	Gln	Gln	Ala	Asn	Leu	Ser	Pro	Ala	Pro	100	105	110	
Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Asn	Gly	Ser	Gly	Val	Gly	Thr	Ala	115	120	125	
Val	Asn	Thr	Ile	Ala	Asp	Lys	Gly	Ile	Pro	Ile	Val	Ala	Tyr	Asp	Arg	130	135	140	
Leu	Ile	Thr	Gly	Ser	Asp	Lys	Tyr	Asp	Trp	Tyr	Val	Ser	Phe	Asp	Asn	145	150	155	160
Glu	Lys	Val	Gly	Glu	Leu	Gln	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	165	170	175	

ES 2 714 000 T3

Gly Lys Glu Asp Gly Ala Phe Asp Ser Ile Asp Gln Met Asn Glu Tyr
 180 185 190
 Leu Lys Ser His Met Pro Gln Glu Thr Ile Ser Phe Tyr Thr Ile Ala
 195 200 205
 Gly Ser Gln Asp Asp Asn Asn Ser Gln Tyr Phe Tyr Asn Gly Ala Met
 210 215 220
 Lys Val Leu Lys Glu Leu Met Lys Asn Ser Gln Asn Lys Ile Ile Asp
 225 230 235 240
 Leu Ser Pro Glu Gly Glu Asn Ala Val Tyr Val Pro Gly Trp Asn Tyr
 245 250 255
 Gly Thr Ala Gly Gln Arg Ile Gln Ser Phe Leu Thr Ile Asn Lys Asp
 260 265 270
 Pro Ala Gly Gly Asn Lys Ile Lys Ala Val Gly Ser Lys Pro Ala Ser
 275 280 285
 Ile Phe Lys Gly Phe Leu Ala Pro Asn Asp Gly Met Ala Glu Gln Ala
 290 295 300
 Ile Thr Lys Leu Lys Leu Glu Gly Phe Asp Thr Gln Lys Ile Phe Val
 305 310 315 320
 Thr Gly Gln Asp Tyr Asn Asp Lys Ala Lys Thr Phe Ile Lys Asp Gly
 325 330 335
 Asp Gln Asn Met Thr Ile Tyr Lys Pro Asp Lys Val Leu Gly Lys Val
 340 345 350
 Ala Val Glu Val Leu Arg Val Leu Ile Ala Lys Lys Asn Lys Ala Ser
 355 360 365
 Arg Ser Glu Val Glu Asn Glu Leu Lys Ala Lys Leu Pro Asn Ile Ser
 370 375 380
 Phe Lys Tyr Asp Asn Gln Thr Tyr Lys Val Gln Asp Lys Asn Ile Asn
 385 390 395 400
 Thr Ile Leu Val Ser Pro Val Ile Val Thr Lys Ala Asn Val Asp Asn
 405 410 415

Pro Asp Ala

<210> 2

<211> 402

<212> PRT

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

ES 2 714 000 T3

<400> 2

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

ES 2 714 000 T3

Val Phe Thr Ile Thr Gly Arg Gly Thr Val Ala Thr Gly Lys Val Glu
 225 230 235 240

Arg Gly Gln Val Lys Leu Asn Glu Glu Val Glu Ile Val Gly Tyr Arg
 245 250 255

Glu Glu Pro Lys Lys Thr Val Ile Thr Gly Ile Glu Met Phe Asn Lys
 260 265 270

Asn Leu Gln Thr Ala Met Ala Gly Asp Asn Ala Gly Val Leu Leu Arg
 275 280 285

Gly Val Asp Arg Lys Asp Ile Glu Arg Gly Gln Val Ile Ala Lys Pro
 290 295 300

Lys Thr Ile Ile Pro His Thr Lys Phe Lys Ala Ala Ile Tyr Ala Leu
 305 310 315 320

Lys Lys Glu Glu Gly Gly Arg His Thr Pro Phe Phe Lys Asn Tyr Lys
 325 330 335

Pro Gln Phe Tyr Phe Arg Thr Thr Asp Val Thr Gly Gly Ile Glu Phe
 340 345 350

Glu Pro Gly Arg Glu Met Val Ile Pro Gly Asp Asn Val Asp Leu Thr
 355 360 365

Val Glu Leu Ile Ala Pro Ile Ala Val Glu Gln Gly Thr Lys Phe Ser
 370 375 380

Ile Arg Glu Gly Gly Arg Thr Val Gly Ala Gly Thr Val Thr Glu Ile
 385 390 395 400

Ile Lys

- 5 <210> 3
- <211>282
- <212> PRT
- <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

- 10 <400> 3

Ala Lys Leu Asp Asp Asn Leu Gln Tyr Ser Phe Glu Ala Ile Lys Lys
 1 5 10 15

Gly Glu Thr Thr Lys Glu Gly Lys Arg Glu Glu Val Asp Lys Lys Val
 20 25 30

ES 2 714 000 T3

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

ES 2 714 000 T3

<210> 4
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

5
 <400> 4

```

Asp Leu Leu Tyr Lys Leu Ile Glu Leu Glu Lys Asp Tyr Leu Tyr Asp
1           5           10           15

Leu Tyr Ser Glu Val Gly Leu Ala Glu Ser Ala Ile Lys Phe Ser Ile
          20           25           30

Tyr Asn Ala Gly Lys Phe Leu Gln Asn Leu Gly Tyr Asp Ser Pro Phe
          35           40           45

Ser Lys Glu Glu Thr Glu Ile Glu Pro Glu Ile Phe Ser Gln Leu Ser
          50           55           60

Ala Arg Ala Asp Glu Asn His Asp Phe Phe Ser Gly Asn Gly Ser Ser
65           70           75           80

Tyr Val Met Ala Leu Ala Glu Glu Thr Glu Asp Glu Asp Trp Glu Phe
          85           90           95
  
```

10
 <210> 5
 <211> 1260
 <212> ADN
 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

15
 <400> 5

```

atgaaaaaaaa tgcttagaaa aaaattcttg tattcatcag ctatttatgc aacttcgctt      60
gcatcaatta ttgcatttgt tgcagcaggt tgtggacaga cagaatcagg ttcgacttca      120
gattctaaac cacaagccga gactctaaaa cataaagtaa gtaatgattc tattcgaata      180
gcactaaccg atccggataa tcctcgatga attagtgcc aaagagatat tatttcttat      240
gttgatgaaa cagaggcagc aacttcaaca attacaaaa accaggatgc acaaaataac      300
tgactcactc agcaagctaa ttttaagtcca gcgcaaaaag gatttattat tgcccctgaa      360
aatggaagtg gagttggaac tgctgttaat acaattgctg ataaaggaat tccgattgtt      420
gcctatgata gactaattac tggatctgat aaatatgatt ggtatgtttc ttttgataat      480
gaaaaagttg gtgaattaca aggtctttca cttgctgcgg gtctattagg aaaggaagat      540
ggtgcttttg attcaattga tcaaatgaat gaatatctaa aatcacatat gccccaagag      600
acaatttctt ttataacaat cgcggttcc caagatgata ataactccca atatttttat      660
aatggtgcaa tgaaagtact taaagaatta atgaaaaatt cgcaaaataa aataattgat      720
  
```

ES 2 714 000 T3

ttatctcctg aaggcgaaaa tgctgtttat gtcccaggat gaaattatgg aactgccggt	780
caaagaatcc aatcttttct aacaattaac aaagatccag caggtggtaa taaaatcaaa	840
gctgttggtt caaaaccagc ttctattttc aaaggatttc ttgccccaaa tgatggaatg	900
gccgaacaag caatcaccaa attaaaactt gaaggatttg atacccaaaa aatctttgta	960
actggtcaag attataatga taaagccaaa acttttatca aagacggcga tcaaaatatg	1020
acaatttata aacctgataa agtttttagga aaagttgctg ttgaagttct tcgggtttta	1080
attgcaaaga aaaataaagc atctagatca gaagtcgaaa acgaactaaa agcaaagcta	1140
ccaaatattt catttaata tgataatcaa acatataaag tacaagataa aaatattaat	1200
acaatttttag taagtccagt aattggttaca aaagctaatag ttgataatcc tgatgcctaa	1260

<210> 6
 <211> 1209
 <212> ADN
 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*
 <400> 6

5

ES 2 714 000 T3

atggcagttg ttaaaacgac aggaaaaaaa gactttgatc gttccaaaga acatattaat	60
attggaacaa ttggtcatgt tgaccatgga aaaacaacac taacagcagc aatttcaact	120
gttttgcaa aaagaggact cgcggaggca aaggattatg cctcaattga tgcagctcct	180
gaagaaaaag cacgaggaat tacaattaat accgcccata ttgaatatag cactgacaaa	240
cggcactatg cccatgttga ttgcccaggt catgccgatt atataaaaaa tatgatcacc	300
ggagcggccc aaatggatgg agcaatttta gtggttgacag caaccgatgg cccaatgcct	360
caaactcgtg aacacatttt attatcaaaa caagttggtg tccccaaaat ggttggtttc	420
cttaataaaa ttgacttact tgaaggcgaa gaagaaatgg ttgatttagt tgaggtcgaa	480
attcggaac ttctttcttc ttatgatttt gatggcgata atactccaat tattcgggga	540
tctgctcgtg gggcccttga aggaaaacct gaatgggagg caaaagtact tgaattgatg	600
gacgcagttg attccttatat tgactcacct gttcgggaaa tggataaacc ctttttgatg	660
gccgttgagg atgtttttac aattacagga cgtggaaccg tagcaacggg aaaagttgaa	720
agaggtcaag ttaaaactaa cgaagaagtg gaaattgtgg gttatcgca agaacctaaa	780
aagaccgtaa tcaccggaat tgaaatgttt aataaaaatc ttcaaactgc gatggctggg	840
gataatgccg gtgttctcct acgtggagta gatcgaaaag atatcgaacg tggtcaggtt	900
attgcaaaac caaaaacaat tataccgcat acaaaattta aagctgcaat ttatgccctt	960
aaaaaagaag aaggcggaag gcatacacca tttttcaaaa attataaacc acaattttat	1020
tttcgaacta ccgatgtaac aggcggaatc gagtttgaac caggtcgca gatggtaatt	1080
ccgggggata atgttgatct taccgttgaa ttaattgccc caattgccgt tgagcagggga	1140
accaaattct cgatccgaga aggtggtaga accgtgggtg ccggaacagt taccgaaatt	1200
attaaataa	1209

<210> 7
 <211> 849
 <212> ADN
 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*
 <400> 7

ES 2 714 000 T3

gcaaaattag acgataatct tcagtattca tttgaagcta tcaaaaaagg ggaaactaca 60
aaagaaggta aaagagaaga agtagataaa aaagttaagg aattagataa taaaataaaa 120
ggtatattgc ctacgcccc agcgggctaaa ccagaagcag caaaaccagt agcgggctaaa 180
ccagaagcag caaaaccagt agcgggctaaa cctgaagcag caaaaccagt agcgggctaaa 240
cctgaagcag caaaaccagt tgcgggctaaa cctgaagcag caaaaccagt tgcgggctaaa 300
cctgaagcag caaaaccagt tgcagctaaa cctgaagcag caaaaccagt tgctactaat 360
actggctttt cacttcaaaa taaacccaaa gaagactatt tcccaatggc ttttagttat 420
aaattagaat atactgacga aaataaatta agcccaaaaa caccggaaat taatgtattt 480
ttagaactag ttcaccaaag cgagtatgaa gaacaaaaaa taataaagga actagacaaa 540
actgttttaa atcttcaata tcaattccag gaagtcaagg tagctagtga tcaatatcag 600
aaacttagcc acccaatgat gaccgaggga tcttcaaadc aaggtaaaaa agcagaggga 660
gctcctaacc aagggaaaaa agcagaggga gctcctaacc aagggaaaaa agcagaggga 720
gctcctagtc aagggaaaaa agccgaagga acttctaacc aacaaagccc aactaccgaa 780
ttaactaatt accttcctga cttaggtaaa aaaattgacg aaatcattaa aaaacaaggt 840
aaaaattaa 849

<210> 8
<211> 291
<212> ADN
<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*
<400> 8

gatctattat ataaactaat tgaattagaa aaagattatc tctatgattt atattctgaa 60
gttggacttg ctgaatcagc aataaaattt agcatttata atgccgggaa attcttgcaa 120
aatctaggat atgattcacc tttttcaaaa gaggaaccg aaattgaacc tgaaattttt 180
agtcaattat cggtcagc tgatgaaat catgactttt tttcaggaaa tggctcttct 240
tatgtaatgg cgcttgctga agaaaccgaa gatgaagatt gggagtttta a 291

<210> 9
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CEBADOR

<400> 9
gatataggat cgcaaaatt agacgataat cttcagtatt ca 42

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

<220>
<223> CEBADOR
<400> 10
caatatgtcg acttaatttt tacctgtttt ttaagtatt tcgtc 45

ES 2 714 000 T3

5	<210> 11 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
10	<400> 11 gatataggat ccatgaaaaa aatgcttaga aaaaaattct tg	42
15	<210> 12 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
20	<400> 12 caatatgtcg acttaggcag caggattatc aacattagc	39
25	<210> 13 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
30	<400> 13 gatataggat ccatctatt atataaacta attgaattag aaaaagatta tc	52
35	<210> 14 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
40	<400> 14 caatatgtcg acttaaaact ccaatcttc atcttcg	37
45	<210> 15 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
50	<400> 15 gatataggat ccatggcagt tgtaaaacg acaggaaaa	39
55	<210> 16 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
60	<400> 16 caatatgtcg acttatttaa taatttcggt aactgtccg gca	43

ES 2 714 000 T3

5	<210> 17 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
10	<400> 17 ctctttgggc actaatccat cgaggattat ccgg	34
15	<210> 18 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
20	<400> 18 ccggataatc ctcgatggat tagtgcccaa agag	34
25	<210> 19 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
30	<400> 19 attagcttgc tgagtgagcc agttatttg tgcattc	37
35	<210> 20 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
40	<400> 20 ggatgcacaa aataactggc tcactcagca agctaatt	37
45	<210> 21 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
50	<400> 21 cggcagttcc ataattccat cctgggacat aaac	34
55	<210> 22 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> CEBADOR	
60	<400> 22 gtttatgtcc caggatggaa ttatggaact gccg	34
65		

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp., que comprende:
 - 5 un primer principio activo, que comprende Tuf, que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 02; y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
 2. La composición para su uso en la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un segundo principio activo que comprende una proteína de P46, MHP30,
10 NrdFC o una combinación de las mismas; en donde dicha P46 tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 01; dicha MHP30 tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 03; dicha NrdFC tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 04.
 3. La composición para su uso en la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho primer principio activo y/o dicho segundo principio activo son independientemente
15 de una concentración de 20 a 2.000 µg/ml basada en el volumen total de dicha composición.
 4. La composición para su uso en la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho adyuvante farmacéuticamente aceptable es un adyuvante completo de Freund, un
20 adyuvante incompleto de Freund, un gel de alúmina, un tensioactivo, un adyuvante polianiónico, un péptido, una emulsión de aceite o una combinación de los mismos.
 5. La composición para su uso en la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un aditivo farmacéuticamente aceptable.
25
 6. La composición para su uso en la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho aditivo farmacéuticamente aceptable es un disolvente, un estabilizante, un diluyente, un conservante, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente isotónico, un agente retardador de la absorción o una combinación de los mismos.
30
 7. La composición para su uso en la prevención de una infección por *Mycoplasma* spp. de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha composición comprende P46, Tuf, MHP30 y NrdFC.
 8. Un vector de expresión que comprende un plásmido; en el que dicho plásmido comprende:
35 una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 06; un gen que codifica una pareja de fusión, en el que dicha pareja de fusión es MsyB de *E. coli*; y un elemento regulador.
 9. El vector de expresión de la reivindicación 8, en el que dicho elemento regulador comprende un promotor y un
40 sitio de unión al ribosoma.
 10. El vector de expresión de la reivindicación 8, en el que dicho plásmido es pET-MSY-Tuf.
 - 45 11. El vector de expresión de la reivindicación 8, que es para un sistema de expresión de genes de *E. coli*.
 12. Un método para preparar un antígeno soluble, que comprende usar dicho vector de expresión de la reivindicación 8; en donde dicho antígeno es Tuf.

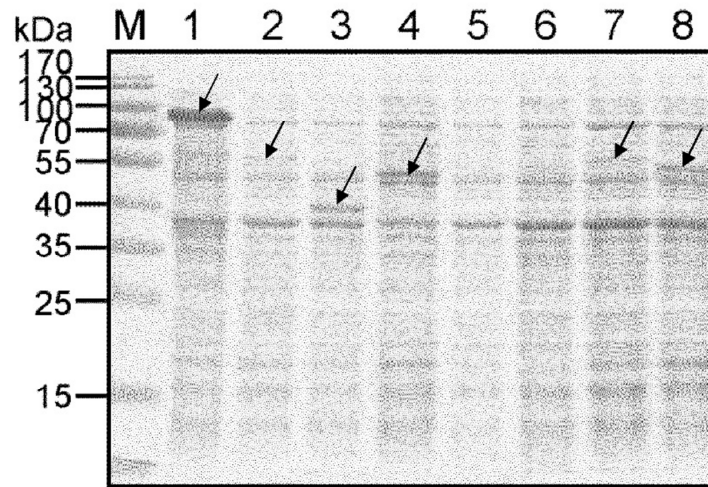


Figura 1

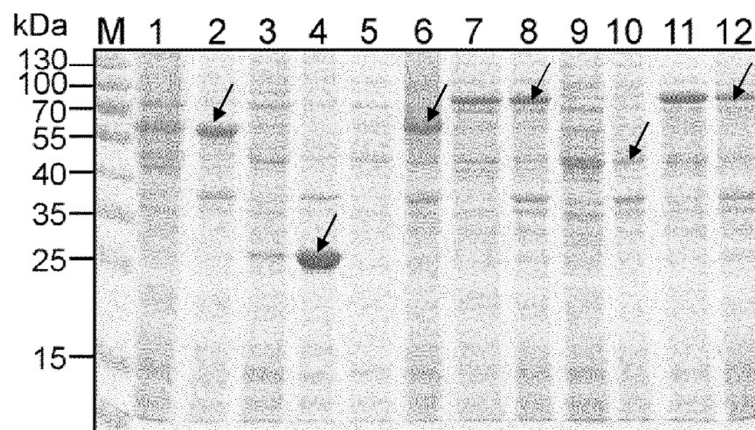


Figura 2

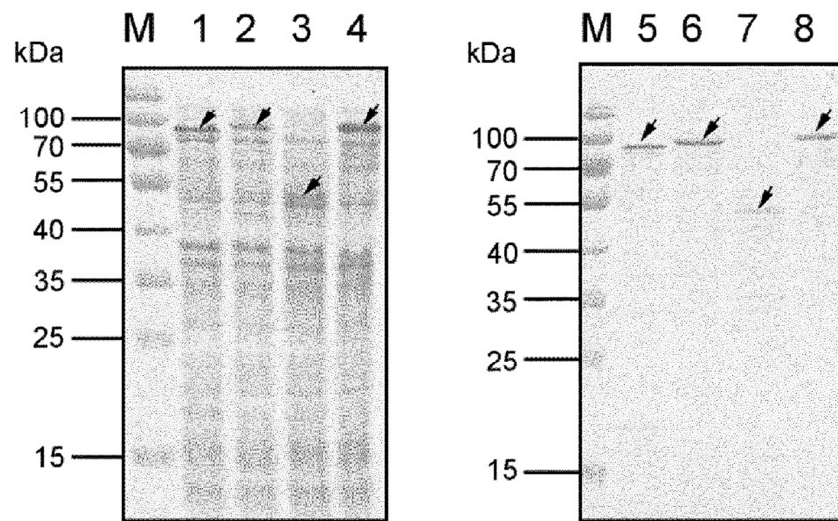


Figura 3

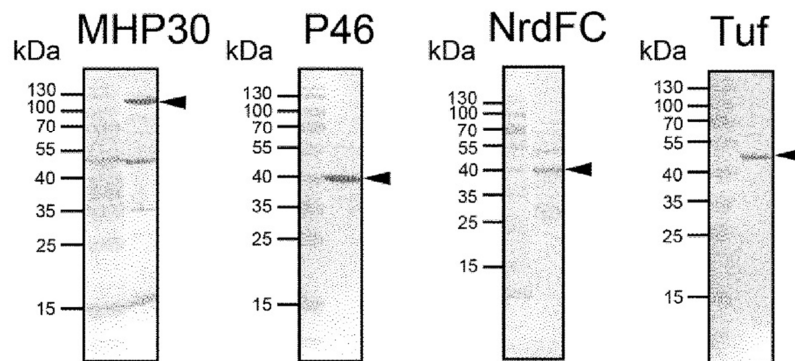


Figura 4

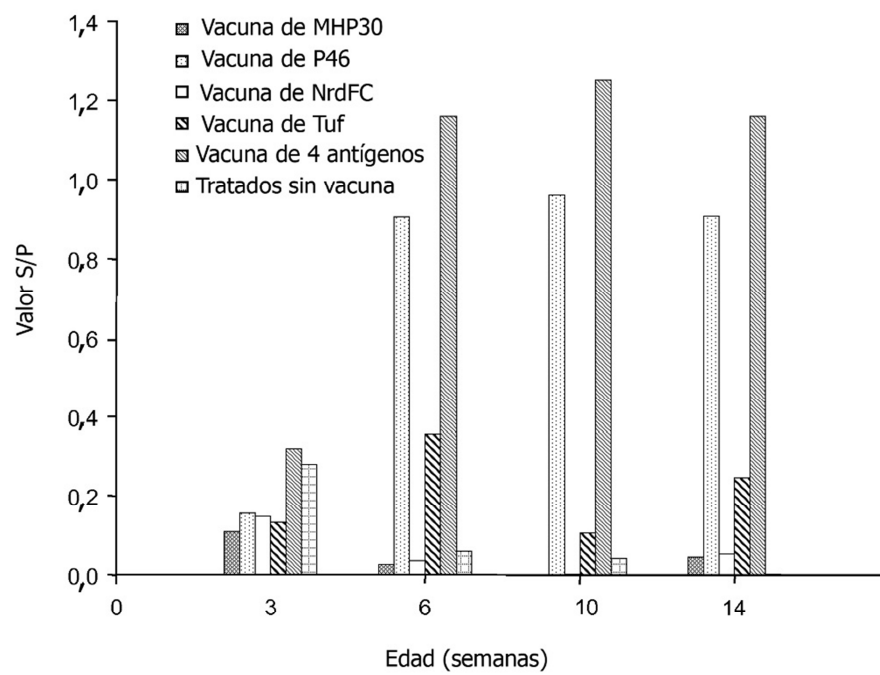


Figura 5