

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 720**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/74** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**C12R 1/35** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2013 PCT/ES2013/070492**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009586**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2013 E 13766387 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2873733**

54 Título: **Vectores para la transformación de Mycoplasma hyopneumoniae, cepas transformadas de M. hyopneumoniae, y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**10.07.2012 EP 12382277**

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

**03.03.2020**

73 Titular/es:

**HIPRA SCIENTIFIC, S.L.U. (100.0%)  
Avenida La Selva, 135  
17170 Amer (Girona), ES**

72 Inventor/es:

**GONZALEZ GONZALEZ, LUIS;  
PIÑOL RIBAS, JAUME;  
MONTANE GIRALT, JORDI;  
CAMATS MALET, MARIA;  
QUEROL MURILLO, ENRIQUE y  
SITJA ARNAU, MARTA**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

ES 2 745 720 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**

5 Vectores para la transformación de *Mycoplasma hyopneumoniae*, cepas transformadas de *M. hyopneumoniae*, y uso de los mismos

**Campo técnico**

10 La presente invención está enmarcada en el campo del desarrollo de métodos y herramientas para la manipulación genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* con el fin de preparar cepas mutantes transformadas de dicha especie bacteriana que puedan emplearse como vacunas frente a enfermedades porcinas.

**Técnica antecedente**

15 En el campo veterinario, las enfermedades provocadas por microorganismos tales como bacterias, virus o parásitos provocan graves pérdidas económicas debido a la muerte de los animales, o a un bajo rendimiento en los procesos de crecimiento y engorde.

20 Una de las formas de proteger a los animales frente a futuras infecciones consiste en la administración de vacunas para generar una respuesta inmunológica en los mismos.

Las vacunas a base de microorganismos inactivados o microorganismos vivos atenuados han sido la base inmunológica principal para el control y la erradicación de la gran mayoría de enfermedades infecciosas hasta nuestros días.

25 Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos con estos tipos de vacunas, presentan problemas tales como la posible inversión a la virulencia de las vacunas atenuadas, la incapacidad de diferenciar animales vacunados de los animales infectados o la dificultad de conseguir una vacuna eficaz para todas las enfermedades.

30 El desarrollo de herramientas para la manipulación genética de microorganismos ha permitido habitualmente la preparación de vacunas más eficaces que las mencionadas anteriormente, tales como son, por ejemplo, las vacunas de subunidades, las vacunas vivas o inactivadas modificadas genéticamente, las vacunas marcadoras (DIVA) o vacunas de ADN.

35 No obstante, no todos los microorganismos que provocan enfermedades en el sector veterinario se pueden manipular genéticamente con la misma facilidad.

Entre los microorganismos que más problemas plantean para su manipulación genética se encuentran los micoplasmas.

40 Los micoplasmas pertenecen a la clase *Mollicutes*, un amplio grupo de microorganismos estrechamente relacionados con las bacterias grampositivas.

45 Los micoplasmas tienen genomas circulares pequeños, con tamaños generalmente inferiores a las 1.000 kb, con un número de genes comprendido entre 500 y 1000.

50 Este grupo de bacterias también carece de muchas de las rutas metabólicas que se encuentran habitualmente en todos los organismos vivos, probablemente fruto de su adaptación a un estilo de vida parasitario. En consecuencia, los micoplasmas son microorganismos fastidiosos, muy difíciles de cultivar tanto en medio líquido como en medio sólido.

55 Los micoplasmas incluyen *Mycoplasma hyopneumoniae* (en lo sucesivo en el presente documento, "*Mhyo*"), que es una bacteria responsable de grandes pérdidas económicas en la industria porcina. Aunque la mayoría de las infecciones por *Mhyo* no son graves, los animales infectados con *Mhyo* son susceptibles a infecciones secundarias del sistema respiratorio, que pueden reducir la tasa de aumento diario de peso o incluso causar la muerte.

60 *Mhyo* es el agente causal de la neumonía enzoótica porcina (en lo sucesivo en el presente documento "NEP"), una enfermedad respiratoria crónica muy extendida a nivel mundial. La enfermedad se caracteriza por una elevada morbilidad y una baja mortalidad. La prevalencia de la NEP es especialmente alta en cerdos de engorde y la gravedad de los signos clínicos depende de la cepa de *Mhyo* causante de la infección, de las condiciones ambientales, del estado sanitario de los animales y de la aparición de infecciones secundarias debidas a otros agentes patógenos. En algunos casos, la NEP cursa de modo subclínico sin signos clínicos evidentes. En los casos en los que no aparecen complicaciones, los animales muestran tos crónica no productiva asociada a una tasa reducida de aumento diario de peso, con la consiguiente reducción de la eficiencia de conversión alimenticia. Cuando se producen infecciones secundarias, los signos clínicos se hacen más evidentes, presentándose síntomas respiratorios agudos y pirexia, que incluso pueden ocasionar la muerte del animal. No obstante, incluso en ausencia de complicaciones por infecciones secundarias, la NEP provoca graves pérdidas económicas debido a la baja tasa

de conversión alimenticia y los costes derivados de la medicación. Una vez instaurada en una granja, la enfermedad se transmite horizontalmente a otros animales mediante los aerosoles generados por la tos y verticalmente desde las hembras reproductoras a los lechones.

- 5 Además de un cultivo problemático, la manipulación genética de los micoplasmas está dificultada por el escaso número de herramientas disponibles.

En el estado de la técnica se han descrito las dificultades de la manipulación genética de los micoplasmas, en particular de *Mhyo*.

- 10 En el artículo de Minion *et al.*, *The Genome Sequence of Mycoplasma hyopneumoniae Strain 232, the Agent of Swine Mycoplasmosis*, J. Bacteriol., 2004, 186(21), 7123-7133, se describe la secuencia del genoma de la cepa 232 de *Mhyo*. El autor manifiesta que *Mhyo* es un microorganismo con requisitos especiales de cultivo y que existe una falta de herramientas y protocolos para transformarlo.

- 15 En el marco del estudio de las modificaciones que se producen en *Mhyo* cuando se somete a un cambio de temperatura, en el artículo de Madsen *et al.*, *Transcriptional Profiling of Mycoplasma hyopneumoniae during Heat Shock Using Microarrays*, Infect. Immun., 2006, 74(1), 160-166, los autores manifiestan que, a pesar de la gran importancia que tiene *Mhyo* para la producción porcina, ha habido pocos estudios sobre los mecanismos moleculares potenciales de su patogénesis en respuesta a los cambios ambientales, y que esto es debido probablemente a su dificultad de crecimiento y a que se trata de un microorganismo resistente a la manipulación genética.

- 20 En el artículo de Pich *et al.*, *Comparative analysis of antibiotic resistance gene markers in Mycoplasma genitalium: application to studies of the minimal gene complement*, Microbiology, 2006, 152, 519-527, se describe la modificación genética de *Mycoplasma genitalium* con diferentes plásmidos por electroporación, pero no se hace referencia a *Mhyo*.

- 25 En la Tesis de B. Machado, *Construção de vetor oriC de Mycoplasma hyopneumoniae - uma ferramenta para estudos genéticos do agente da Pneumonia Enzóótica Suína*, Porto Alegre, 2007, se describe la transformación de la cepa 7448 de *Mhyo* con el plásmido replicativo pOSTM mediante electroporación. Para la construcción de este plásmido, se introdujeron en el vector pUC18 la región *oriC* de *Mhyo* y el casete de expresión que contiene el gen de resistencia a tetraciclina (*tetM*), controlado por el gen promotor de *Spiroplasma citri*. Si bien la parte experimental muestra la incorporación del plásmido mediante PCR y la resistencia al antibiótico conferida por dicho vector, en este trabajo no se aportan resultados concluyentes que demuestren que se hubiese producido realmente la incorporación del plásmido pOSTM en *Mhyo* de forma estable, ya que no se describe el aislamiento de los plásmidos de las cepas transformantes resistentes a la tetraciclina. Además, también se describe que las cepas transformantes tuvieron dificultades para crecer después de dos pases en un medio de selección. En consecuencia, estos resultados ponen de manifiesto que usando la transformación divulgada en el documento no se pudo introducir de forma estable una secuencia exógena de ADN en una cepa de *Mhyo*, ya que no se puede recuperar tras múltiples generaciones de la bacteria transformada.

- 30 A pesar de esta divulgación del año 2007, en estudios posteriores no se ha demostrado que se haya podido resolver el problema de la modificación genética de *Mhyo*.

- 35 En el informe de M. Calcutt sobre el proyecto *Development of genetic manipulation protocols for Mycoplasma hyopneumoniae clade of animal pathogens*, University of Missouri, correspondiente al período 01.10.2009 a 30.09.2010 (descargado de la página de internet <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/220630.html>, recuperado el 16.02.2012), se describe que los objetivos del proyecto residen en el desarrollo de una metodología para la manipulación genética de *Mhyo*. También se describe que se pretendía electrotransformar *Mhyo* con plásmidos que incluían el gen de resistencia a la tetraciclina. Sin embargo, los resultados procedentes del análisis de ADN realizado sobre las bacterias transformantes no fueron positivos, y condujeron a los autores a considerar que no se había producido la transformación. Tampoco se describen resultados sobre la expresión de dicho gen de resistencia.

- 40 En el artículo de Browning *et al.*, *Developing attenuated vaccines to control mycoplasmoses*, Microbiology Australia, 2011, 121-122, se describe el desarrollo de vacunas que contienen cepas de *Mycoplasma* sensibles a la temperatura que no crecen a la temperatura corporal del hospedador. Dichas cepas se obtuvieron por mutación química a partir de cepas de tipo silvestre. Los autores manifiestan que la manipulación genética dirigida en *Mhyo* y *M. synoviae* sigue siendo un reto y que no se había conseguido en dichas especies. La solicitud de patente internacional WO-A-2010/132932, del mismo grupo de trabajo, también se refiere a cepas de *Mhyo* sensibles a la temperatura.

- 45 En el artículo de Maboni *et al.*, *Mycoplasma hyopneumoniae Transcription Unit Organization: Genome Survey and Prediction*, DNA Research, 2011, 18, 413-422, se realizó una revisión comparativa del genoma de tres cepas de *Mhyo* (7448, J y 232) con la finalidad de identificar marcos abiertos de lectura. Los autores manifiestan que, a pesar

del desarrollo de la transformación artificial y de otras herramientas genéticas para algunas especies de *Mycoplasma*, estas metodologías todavía están pendientes de ser desarrolladas para *Mhyo*.

5 Por lo tanto, en el estado de la técnica no se han descrito métodos para la transformación de *Mhyo*, aunque ha habido diversos intentos infructuosos para llevarla a cabo.

10 Subsiste pues la necesidad de proporcionar un método para preparar cepas mutantes de *Mhyo* por medio de herramientas de ingeniería genética, y así proporcionar cepas mutantes adecuadas para la preparación de composiciones vacunales frente a la neumonía enzoótica porcina y, finalmente, en combinación con otros componentes antigénicos, para la prevención y/o tratamiento de otras enfermedades porcinas.

### Divulgación de la invención

15 El objeto de la presente invención es un método para preparar cepas mutantes de *Mhyo*.

Otro objeto de la invención es un vector plasmídico replicativo que se usa en dicho método.

Otro objeto de la invención es el uso de dicho vector para preparar cepas mutantes de *Mhyo*.

20 Otro objeto de la invención es una cepa mutante de *Mhyo* obtenible mediante dicho método.

Otro objeto de la invención es una cepa mutante de *Mhyo* que comprende una secuencia exógena de ADN.

25 Otro objeto de la invención es una cepa mutante de *Mhyo* que comprende el vector de la invención.

Otro objeto de la invención es una cepa de *Mhyo* transformada con el vector de la invención.

Otro objeto de la invención es la utilización de dicha cepa mutante como hospedador de expresión.

30 Otro objeto de la invención es una vacuna que comprende dicha cepa mutante.

Otro objeto de la invención es la utilización de la cepa mutante de *Mhyo* de la invención para la preparación de una vacuna.

35 Otro objeto de la invención es un kit de vacunación que comprende dicha cepa mutante.

Los autores de la presente invención han desarrollado un método para preparar cepas mutantes de *Mhyo* con el que, sorprendentemente, se pueden introducir de forma estable secuencias exógenas de ADN en el citoplasma o en el genoma de una cepa de *Mhyo*, y se expresa el contenido de esas secuencias.

40 Por la expresión "una secuencia de ADN exógena introducida de forma estable en el citoplasma o en el genoma de una cepa de *Mhyo*" se entiende que dicha secuencia no se pierde a lo largo de las generaciones sucesivas de la bacteria que se ha transformado con dicha secuencia exógena. Esta estabilidad implica que la secuencia exógena de ADN puede replicar en el interior de la bacteria transformada y en sus descendientes y que se puede recuperar después de múltiples generaciones de la bacteria transformada.

Con el método desarrollado se abre la puerta a modificar, por primera vez mediante herramientas de ingeniería genética, cepas de *Mhyo*.

50 Con dicho método se pueden preparar cepas mutantes de *Mhyo* que incluyen secuencias exógenas de ADN. Dichas cepas mutantes pueden presentar distintas características tales como, por ejemplo, expresar una proteína específica, o presentar un menor grado de virulencia con respecto a la cepa parental silvestre.

55 Dichas cepas mutantes se pueden emplear como vacunas, por ejemplo, vacunas vivas atenuadas, vacunas inactivadas, vacunas marcadoras, las cuales permiten diferenciar animales vacunados de animales infectados, o vacunas polivalentes frente a la neumonía enzoótica porcina y otra enfermedad adicional que puede afectar a los cerdos, tales como, por ejemplo, las infecciones provocadas por circovirus porcino de tipo 2 (CVP2).

60 El procedimiento de la invención ha permitido modificar genéticamente *Mhyo* por primera vez de forma estable, y con ello se ha conseguido, entre otras cosas, el uso de estas cepas transformadas como vector de expresión de secuencias exógenas de ADN como, por ejemplo, secuencias de nucleótidos que codifican proteínas de interés terapéutico o preventivo tales como la secuencia de la cápside del virus CVP2, entre otras. Mediante la tecnología divulgada en la presente invención, se han diseñado y preparado nuevos candidatos vacunales, que además son polivalentes ya que se pueden utilizar para prevenir diferentes enfermedades mediante la administración de una  
65 única cepa modificada con el procedimiento de la invención. En la presente descripción y en las reivindicaciones, las

formas en singular “un”, “una” y “el” o “la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5 Así mismo, en el contexto de la invención el término “secuencia” se refiere a una secuencia de ADN, excepto cuando se indica explícitamente que se refiere a una secuencia de aminoácidos.

### Descripción de los dibujos

#### Figura 1

10 En la figura 1 se muestra un diagrama de los plásmidos replicativos utilizados para modificar genéticamente *Mhyo* y conseguir la producción de proteínas recombinantes o transcritos antisentido. Se encuentran indicados mediante flechas los promotores, los genes y los sitios para enzimas de restricción usados durante las operaciones de clonación.

15 El plásmido pOG contiene los elementos necesarios para que este vector pueda replicarse en *Mhyo* a la vez que permite la selección de las células portadoras de dicho plásmido. Este plásmido tiene la región *oriC* de *Mhyo* (bases 2096 a 4043) y el gen marcador de resistencia a gentamicina (*aac*, bases 1 a 1816) bajo el control del promotor del gen de la proteína P97 de *Mhyo* (*pp97*, bases 1823 a 2087).

20 El plásmido pOGCRE se deriva directamente del plásmido pOG y además contiene el gen *cre* del fago P1 (bases 1 a 1032) bajo el control del promotor *pp97* (bases 1039-1303).

25 A diferencia de los plásmidos anteriores, el plásmido pOGA159 contiene el gen de resistencia a tetraciclina (*tetM*, bases 945 a 2883) bajo control del promotor *pp97* (bases 674-938). La región *oriC* de *Mhyo* está situada entre las bases 2901-4848. Finalmente, contiene un segmento del genoma de *Mhyo* correspondiente al extremo 5' del gen *tlyA* (*a159*, bases 4855 a 4980) orientado de forma inversa y bajo el control del promotor *pp97* (bases 4996-5260).

#### Figura 2

30 En la figura 2 se muestra un diagrama de los plásmidos replicativos utilizados para modificar genéticamente *Mhyo* y conseguir la producción de diferentes versiones recombinantes de la proteína de la cápside del virus CVP2. Se encuentran indicados mediante flechas los promotores, los genes y los sitios para enzimas de restricción usados durante las operaciones de clonación.

35 El plásmido pOGC contiene exactamente los mismos elementos que el plásmido pOG (Figura 1) y además incluye una copia adicional del promotor *pp97* (bases 7654-7918), que controla la expresión del gen sintético que codifica la cápside de circovirus incluido en la ORF2V2 (bases 6946-7647) de la cápside del virus CVP2. Este plásmido permite la expresión de la proteína de la cápside de CVP2 en el citoplasma de la célula portadora.

40 El plásmido pOGL contiene exactamente los mismos elementos que el plásmido pOG (Figura 1) y además incluye la secuencia promotora del gen de la proteína P46 de *Mhyo* (*pp46*: bases 8918-9181), que controla la expresión de una fusión del gen de la proteína de la cápside del virus CVP2 (ORF2) dentro del gen que codifica la proteína de membrana P46 de *Mhyo* (bases 8642-8917 y 6946-7930). Este plásmido produce una proteína híbrida que se caracteriza porque los aminoácidos 1 a 92 provienen del extremo N-terminal de la proteína P46, los aminoácidos 95 a 327 corresponden a la proteína de la cápside del virus CVP2 y los aminoácidos 330-656 provienen del extremo C-terminal de la proteína P46 de *Mhyo*.

45 El plásmido pOGT contiene exactamente los mismos elementos que el plásmido pOG (Figura 1) y además incluye la secuencia promotora *pp46* (bases 8905-9169), que controla la expresión de una fusión del gen de la proteína de la cápside del virus CVP2 (ORF2) en el extremo 3' del gen que codifica la proteína de membrana P46 de *Mhyo* (bases 7648-8904). Este plásmido produce una proteína híbrida que se caracteriza porque los aminoácidos 1 a 419 provienen de la proteína P46 y los aminoácidos 420 a 652 corresponden a la proteína de la cápside del virus CVP2, versión ORF2 (bases 6946-7647).

#### Figura 3

50 En la figura 3 se muestra un diagrama de los plásmidos portadores de minitransposones utilizados para obtener inserciones en el cromosoma de *Mhyo*. Se encuentran indicados mediante flechas los promotores, genes, dianas de enzimas de restricción usadas para la construcción de los plásmidos y otras secuencias de ADN importantes.

55 El plásmido pTC3 contiene los elementos necesarios para la obtención de cepas de *Mhyo* que portan inserciones de transposón. Este plásmido se ha construido sobre el esqueleto del plásmido pMTn4001. El primer elemento de este plásmido es el promotor *pp97* (bases 7-271), que controla la expresión de la transposasa del plásmido pMTn4001 (bases 284-1261). Las bases 1461-1486 y 3774-3799 corresponden a las repeticiones invertidas y se encuentran indicadas en el esquema como IRI e IRO, respectivamente. El último elemento de este plásmido corresponde al gen

marcador de resistencia a tetraciclina (bases 1761-3692), que también se encuentra bajo el control del promotor de la proteína P97 de *Mhyo* (1502-1766).

5 El plásmido pTC366 se deriva directamente del plásmido pTC3, y contiene las secuencias de *lox66* (sustrato de la recombinasa Cre, bases 1485-1518y 3762-3795) flanqueando el gen marcador de resistencia a tetraciclina *TetM* (bases 1791-3722).

10 El plásmido pTC3C se deriva directamente del plásmido pTC366, y contiene el gen que codifica la proteína de la cápside del virus CVP2 *ORF2V2* (bases 4078-4779) del virus CVP2, bajo control del promotor *pp97* (bases 3808-4071). Este plásmido promueve la síntesis de la proteína recombinante correspondiente a la proteína de la cápside de CVP2 en el citoplasma de la cepa de *Mhyo* transformada por dicho plásmido.

15 El plásmido pTC3L se deriva directamente del plásmido pTC366, y contiene una fusión del gen de la proteína de la cápside del virus CVP2 (*ORF2*) dentro del gen que codifica la proteína de membrana P46 de *Mhyo* (bases 4347-5045 y 4066-4340 y 5052-6036, respectivamente), bajo el control del promotor *pp46* (bases 3801-4065). Este plásmido estimula la síntesis de una proteína híbrida que se caracteriza porque los aminoácidos 1 a 92 provienen del extremo N-terminal de la proteína P46, los aminoácidos 95 a 327 corresponden a la proteína de la cápside del virus CVP2 y los aminoácidos 330-656 provienen del extremo C-terminal de la proteína P46 de *Mhyo*.

20 El plásmido pTC3T se deriva directamente del plásmido pTC366, y contiene una fusión entre el gen de la proteína de la cápside del virus CVP2 (*ORF2*) y el gen que codifica la proteína de membrana P46 de *Mhyo* (bases 5322-6031 y 4065-5321, respectivamente), bajo el control del promotor del gen que codifica la proteína P46 de *Mhyo* (bases 3801-4065). Este plásmido estimula la síntesis de una proteína híbrida que se caracteriza porque los aminoácidos 1 a 419 provienen de la proteína P46 y los aminoácidos 420 a 652 corresponden a la proteína de la cápside del virus CVP2.

#### Figura 4

30 En la figura 4 se muestra la estabilidad de los plásmidos replicativos y su utilidad en la producción de proteínas recombinantes.

35 Esta figura está dividida en 3 paneles. En el panel A se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % a la que se le ha aplicado un voltaje de 6 V/cm durante 2 horas. En el carril M se encuentra el marcador de peso molecular 1kb plus ladder (Invitrogen). En el carril 1 se encuentra el plásmido pOG aislado a partir *E. coli* X11-blue y digerido con la enzima de restricción *Scal*. En el carril 2 se encuentra un extracto de ADN total de la cepa 232POGc9 de *Mhyo* digerido con la enzima de restricción *Scal*. Las bandas esperadas del plásmido pOG digerido con la enzima de restricción *Scal* son de 3564 pb, 2225 pb y 1143 pb (Figura 4, Panel A). Mediante la comparación con el marcador de peso molecular y las bandas del plásmido aislado de *E. coli* X11-blue se confirma que el plásmido pOG se propaga de forma estable en la cepa 232POGc9. A la izquierda de la figura se encuentran indicadas las longitudes de los diferentes fragmentos del marcador de ADN de interés.

45 En el panel B se muestra una transferencia tipo Western de una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con muestras proteicas de diferentes cepas de *Mhyo* detectadas mediante un anticuerpo policlonal específico de la recombinasa Cre del bacteriófago P1. En el carril 1 se muestra un extracto proteico de la cepa 232POGCREc1, donde se observa la banda esperada de 39 kDa. En el carril 2 se muestra un extracto de la cepa 232 donde no se observa ninguna banda y en el carril M se encuentra el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Xtra (Biorad). A la derecha de la figura se muestran en kDa los pesos moleculares de interés. Estos resultados indican que el plásmido pOGCRE es capaz de producir la proteína Cre una vez transformado en la cepa 232 de *Mhyo*.

50 En el panel C se muestra una electroforesis en gel de agarosa en la que se analizan muestras de DNA de la cepa parental 6314 de *Mhyo* (carril 1) y de la cepa 6314pOGAc4, producto de la transformación de la cepa 6314 con el plásmido pOGA159 (carril 2). Las flechas indican la posición de las dos conformaciones adoptadas por el plásmido pOGA159 en la cepa mutante transformada de *Mhyo*.

#### Figura 5

60 En la figura 5 se muestra la recuperación de cepas de *Mhyo* portadoras de inserciones por transposón y la utilidad de las mismas en la producción de proteínas recombinantes.

65 Esta figura está dividida en 3 paneles. El panel A (carriles M y 1 a 4) muestra una electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % a la que se le ha aplicado un voltaje de 6 V/cm durante 2 horas, mientras que en la parte derecha del panel A (carriles 5 a 8) se muestra una transferencia tipo Southern de este mismo gel sobre una membrana de nylon. Las bandas observadas en la transferencia tipo Southern corresponden a las bandas reconocidas por una sonda diseñada frente a la secuencia de *TetM* bajo el control del promotor de la proteína P97 de *Mhyo*. En el carril M se encuentra el marcador de peso molecular 1kb Plus Ladder (Invitrogen). Los carriles 1 y 5 corresponden a una

extracción de ADN total proveniente de la cepa 232TC3hlyC digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. Los carriles 2 y 6 corresponden a una extracción de ADN total proveniente de la cepa 232 digerida con la enzima de restricción *EcoRI*. Los carriles 3 y 7 corresponden a una extracción de ADN total de la cepa 232TC3hlyC digerida con la enzima de restricción *EcoRV*. Los carriles 4 y 8 corresponden a una extracción de ADN total de la cepa 232 digerida con *EcoRV*. La banda de 6,3 kb en el carril 5 y la banda de 2 kb en el carril 7 demuestran la presencia del transposón que contiene la resistencia *TetM* bajo el promotor de la proteína P97 en el genoma de *Mhyo*, mientras que la ausencia de estas bandas en los carriles 6 y 8 corroboran estos resultados.

En el panel B se muestran los resultados de un ensayo de ELISA realizado con el kit INGEZIM PCV DAS (Ingenasa, España) con diferentes muestras proteicas de *Mhyo*. En la columna izquierda de la tabla se encuentra indicada la dilución utilizada en cada uno de los ensayos, mientras que en la fila superior se muestra la cepa analizada. Los resultados numéricos son los valores de la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm normalizada por la cantidad de proteína introducida en cada pocillo. Todas las cepas de *Mhyo* transformadas con los vectores pTC3C, pTC3L y pTC3T presentan una absorbancia claramente superior a la del control negativo, lo que indica que en cada una de estas cepas tiene lugar la expresión de la proteína recombinante de la cápside de CVP2.

En el panel C se muestra una transferencia tipo Western de una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con muestras proteicas de diferentes cepas de *Mhyo* detectadas mediante un anticuerpo monoclonal específico de la proteína de la cápside de CVP2. El carril 1 contiene un extracto proteico de la cepa 232Cc6 donde se observa la banda esperada de 28 kDa. El carril 2 contiene un extracto proteico de la cepa 232 donde no se observa ninguna banda. El carril 3 contiene una muestra proteica de la cápside de CVP2 suministrada como control positivo en el kit INGEZIM PCV DAS (Ingenasa, España), donde se observa la banda de 28 kDa esperada. El carril 4 contiene un extracto proteico de la cepa 6314 donde no se observa ninguna banda, mientras que en el carril 5 se encuentra el extracto proteico de la cepa 6314Cc1 donde se observa la banda esperada de 28 kDa, aunque con una intensidad más débil que las de los carriles 1 y 3. Estos resultados indican que tanto en la cepa 6314 como la 232, la inserción del transposón presente en el plásmido pTC3C en el genoma de *Mhyo* induce la expresión de la proteína de la cápside de CVP2, codificada por *ORF2v2*.

#### Figura 6

En la figura 6 se muestra la respuesta serológica frente a *Mhyo* obtenida con las vacunas experimentales, grupos 1 a 4 del Ejemplo 7.1. Los grupos 5 y 6 corresponden respectivamente al grupo control no vacunado, pero sí infectado y al grupo control no vacunado y no infectado.

En el eje de abscisas se encuentra el día del estudio en el que se efectuó el análisis, y en el de ordenadas se representa la relación S/P (formas sigladas de *sample/positive*, muestra/positivo) expresada en % medida por ELISA, como indicador de la respuesta de anticuerpos IgG frente a *Mhyo*.

El asterisco indica que la diferencia con relación al grupo control no vacunado, pero sí infectado, es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , de acuerdo con la prueba de la U de Mann-Whitney).

#### Figura 7

En la figura 7 se muestra la respuesta serológica a circovirus porcino (CVP2) obtenida con las vacunas experimentales, grupos 1 a 4 del Ejemplo 7.1. Los grupos 5 y 6 corresponden respectivamente al grupo control no vacunado, pero sí infectado y al grupo control no vacunado y no infectado.

En el eje de abscisas se encuentra el día del estudio en el que se efectuó el análisis, y en el de ordenadas se representa la relación S/P (muestra/positivo) expresada en % medida por ELISA, como indicador de la respuesta de anticuerpos IgG frente a CVP2.

El asterisco indica que la diferencia con relación al grupo control no vacunado, pero sí infectado, es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , de acuerdo con la prueba de ANOVA unidireccional).

#### Figura 8

En la figura 8 se muestra la carga vírica en suero en los grupos de tratamiento 1 a 4, y en los grupos control 5 y 6 del Ejemplo 7.1.

En el eje de abscisas se encuentra el día del estudio en el que se efectuó el análisis, y en el de ordenadas se representa el  $\log_{10}$  de la carga vírica de circovirus porcino de tipo 2 (CVP2) en suero expresada en copias/ml.

El asterisco indica que la diferencia con relación al grupo control (no vacunado e infectado) es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , de acuerdo con la prueba de la U de Mann-Whitney).

#### Figura 9

En la figura 9 se muestra la respuesta serológica a la infección por *Mhyo* de acuerdo con el Ejemplo 8.2. El grupo 1 corresponde a los animales infectados con la cepa mutante del Ejemplo 4.8, el grupo 2 a los animales infectados con la cepa parental silvestre y el grupo 3 es el grupo control no infectado.

5 En el eje de abscisas se encuentra el día del estudio en el que se efectuó el análisis, y en el de ordenadas se representa la relación S/P (muestra/positivo) expresada en % medida por ELISA, como indicador de la respuesta de anticuerpos IgG frente a *Mhyo*.

10 El asterisco indica que la diferencia con relación al grupo infectado con la cepa parental de tipo silvestre es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , de acuerdo con la prueba de ANOVA unidireccional).

#### Figura 10

15 En la figura 10 se muestra el porcentaje de animales positivos para *Mhyo* por PCR del Ejemplo 8.2. El grupo 1 corresponde a los animales infectados con la cepa mutante del Ejemplo 4.8, el grupo 2 a los animales infectados con la cepa parental de tipo silvestre y el grupo 3 es el grupo control no infectado.

20 En el eje de abscisas se encuentra el día del estudio en el que se efectuó el análisis así como el tipo de muestra analizada (nasal o bronquial), y en el de ordenadas se representa el porcentaje de animales positivos por PCR.

25 El asterisco indica que la diferencia con relación al grupo infectado con la cepa parental de tipo silvestre es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , de acuerdo con la prueba exacta de Fisher).

#### Figura 11

30 En la figura 11 se muestra la superficie media de pulmón afectada por lesiones atribuibles a una infección por *Mhyo* de acuerdo con el ensayo del Ejemplo 8.2. El grupo 1 corresponde a los animales infectados con la cepa mutante del Ejemplo 4.8, el grupo 2 a los animales infectados con la cepa parental de tipo silvestre y el grupo 3 es el grupo control no infectado.

35 En el eje de ordenadas se representa el valor medio de la superficie del pulmón afectada.

40 El asterisco indica que la diferencia con relación al grupo infectado con la cepa parental de tipo silvestre es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , de acuerdo con la prueba de la U de Mann-Whitney).

#### Figura 12

45 En la figura 12 se muestra la carga vírica en suero determinada en el grupo de tratamiento 1, y en los grupos control 2 y 3 del Ejemplo 7.2.

50 En el eje de abscisas se encuentra el día posinfección en el que se efectuó el análisis, y en el de ordenadas se representa el  $\log_{10}$  de la carga vírica de circovirus porcino de tipo 2 (CVP2) en suero expresada en copias/ml determinada mediante PCR cuantitativa.

#### Figura 13

55 En la figura 13 se muestra el porcentaje de animales que presentaban viremia por CVP2 en el grupo de tratamiento 1, y en los grupos control 2 y 3 del Ejemplo 7.2.

60 En el eje de abscisas se encuentra el día posinfección en el que se efectuó el análisis, y en el de ordenadas se representa el porcentaje de animales positivos.

#### Figura 14

65 En la figura 14 se muestra la mediana de superficie de pulmón afectada por lesiones compatibles con *Mhyo* expresada en porcentaje para el grupo de tratamiento 1, y para los grupos control 2 y 3 del Ejemplo 7.2, a los 28 días posinfección.

En el eje de abscisas se encuentra el grupo y en el de ordenadas está la mediana de superficie de pulmón afectada por lesiones compatibles con *Mhyo*.

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona las siguientes realizaciones como se definen en los puntos 1-15 a continuación:

65

- 1.- Un método para preparar una cepa mutante de *Mycoplasma hyopneumoniae*, caracterizado porque comprende la etapa de transformar una cepa de *M. hyopneumoniae* mediante el uso de un vector portador que comprende al menos una secuencia exógena de ADN, estando la secuencia bajo el control de una secuencia de ADN de una región promotora de *M. hyopneumoniae*,
- 5 donde el vector portador es un vector plasmídico replicativo que comprende:
- 1) una secuencia de ADN que comprende la región *oriC* de una cepa de *Mycoplasma sp.*, que es *Mycoplasma hyopneumoniae*, y
  - 2) una secuencia exógena de ADN que comprende un gen marcador, y opcionalmente, una secuencia exógena de ADN adicional, que está bajo el control de una secuencia de ADN de una región promotora de *Mhyo*,
- 10 donde la región promotora de *Mhyo* corresponde a un segmento de ADN que comprende entre 50 pares de bases y 300 pares de bases ubicadas en el lado 5' del gen de una proteína de *Mhyo* seleccionada del grupo formado por las proteínas P36, P46, P65, P76, P97, P102, P146 y P216,
- 15 donde la región promotora de *Mhyo* inicia o activa la transcripción de una secuencia de ADN de *Mhyo*, y donde la secuencia exógena de ADN se introduce de forma estable en el citosol o en el genoma de la cepa de *Mhyo*.
- 2.- El método de acuerdo con el punto 1, caracterizado porque la secuencia exógena de ADN se selecciona del grupo que comprende un gen de resistencia a un antibiótico, un gen que codifica una recombinasa, un gen que codifica una transposasa, una secuencia diana de transposasa, un fragmento de ADN de *Mhyo*, un gen que codifica un componente antigénico de un microorganismo que provoca enfermedades porcinas y combinaciones de los mismos.
- 20 3.- El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 o 2, caracterizado porque la secuencia exógena de ADN adicional se selecciona del grupo formado por la secuencia de ADN que codifica la proteína de la cápside del circovirus porcino de tipo 2 (CVP2) y la secuencia de ADN que codifica una proteína que comprende la proteína de la cápside del circovirus porcino de tipo 2 (CVP2) que porta adicionalmente los aminoácidos MetSerGlySer en el extremo N-terminal de dicha proteína, seleccionándose dicha secuencia exógena de ADN adicional que codifica la proteína de la cápside de CVP2 del grupo formado por la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5.
- 25 30 4.- El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, caracterizado porque la región promotora de *Mhyo* comprende la región promotora del gen de una proteína de *Mhyo* seleccionada del grupo formado por las proteínas P46 y P97.
- 35 5.- El método de acuerdo con el punto 4, caracterizado porque la región promotora de *Mhyo* comprende la región promotora del gen de la proteína P46 de *Mhyo*.
- 6.- El método de acuerdo con el punto 4, caracterizado porque la región promotora de *Mhyo* comprende la región promotora del gen de la proteína P97 de *Mhyo*.
- 40 7.- Un vector plasmídico replicativo, caracterizado porque comprende:
- 1) una secuencia de ADN que comprende la región *oriC* de una cepa de *Mycoplasma sp.*, que es *Mycoplasma hyopneumoniae*, y
  - 2) una secuencia exógena de ADN que comprende un gen marcador y, opcionalmente, una secuencia exógena de ADN adicional que está bajo el control de una secuencia de ADN de una región promotora de *Mhyo*,
- 45 donde la región promotora de *Mhyo* corresponde a un segmento de ADN que comprende entre 50 pares de bases y 300 pares de bases ubicadas en el lado 5' del gen de una proteína de *Mhyo* seleccionada del grupo formado por las proteínas P36, P46, P65, P76, P97, P102, P146 y P216,
- 50 donde la región promotora de *Mhyo* inicia o promueve la transcripción de una secuencia de ADN de *Mhyo*.
- 8.- El vector plasmídico replicativo de acuerdo con el punto 7, caracterizado porque la secuencia exógena de ADN adicional se selecciona del grupo formado por la secuencia que codifica la proteína de la cápside del circovirus porcino tipo 2 (CVP2) y la secuencia que codifica la proteína que comprende la proteína de la cápside del circovirus porcino tipo 2 (CVP2) que porta adicionalmente los aminoácidos MetSerGlySer en el extremo N-terminal de dicha proteína, seleccionándose dicha secuencia de ADN que codifica la proteína de la cápside del CVP2 del grupo formado por la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
- 55 60 9.- El vector plasmídico replicativo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 7 u 8, caracterizado porque la región promotora de *Mhyo* comprende la región promotora del gen de una proteína de *Mhyo* seleccionada del grupo formado por las proteínas P46 y P97.
- 10.- Una cepa mutante de *Mhyo*, caracterizada porque comprende el vector plasmídico replicativo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 7 a 9.
- 65

11.- Una vacuna para proteger a los cerdos frente a la neumonía enzoótica porcina provocada por *Mhyo*, y opcionalmente frente a otra enfermedad o afecciones patológicas adicionales que afectan a los cerdos, que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de la cepa mutante de *Mhyo* como se define en el punto 10.

5 12.- La vacuna de acuerdo con el punto 11, caracterizado porque la otra enfermedad o afecciones patológicas adicionales que afectan a los cerdos están provocadas por un microorganismo, que se selecciona del grupo formado por *Actinobacillus* sp., *Brachyspira* sp., *Pasteurella multocida*, *Salmonella* sp., *Streptococcus* sp., *Isospora* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira* sp., *Staphylococcus* sp., *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*,  
10 reproductivo porcino, virus de la gripe porcina, *virus de la gastroenteritis* transmisible, parvovirus porcino, virus de la encefalomiocarditis, coronavirus, rotavirus, circovirus porcino, agente del síndrome del fallo del desarrollo peridestete porcino, virus de la peste porcina clásica, virus de la peste porcina africana, calicivirus y torque teno virus (TTV).

13.- La vacuna de acuerdo con el punto 12, caracterizada porque la otra enfermedad o las afecciones patológicas  
15 adicionales que afectan a los cerdos están provocadas por circovirus porcino.

14.- La vacuna de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11 a 13, caracterizada porque comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante.

20 15.- Un kit de vacunación para vacunar cerdos frente a una infección o enfermedad provocada por *Mhyo*, y opcionalmente frente a otra enfermedad o afecciones patológicas provocadas por microorganismos que afectan a los cerdos, que comprende un recipiente que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de la cepa mutante como se define en el punto 10.

25 En el presente documento se divulga un método para preparar una cepa mutante de *Mycoplasma hyopneumoniae* que comprende la etapa de transformar una cepa de *M. hyopneumoniae* mediante el uso de un vector portador que comprende al menos una secuencia exógena de ADN, estando la secuencia bajo el control de una secuencia de ADN que tiene un grado de identidad al menos del 80 % con una región promotora de *M. hyopneumoniae*.

30 Mediante el método divulgado en el presente documento se puede obtener una cepa mutante de *Mhyo* que incorpora, de forma estable, en el citosol o en el genoma de la misma una secuencia exógena de ADN y que expresa el contenido de dicha secuencia.

35 El método puede adicionalmente comprender adicionalmente etapas que son típicas en los métodos para preparar cepas mutantes de bacterias, que son bien conocidos por el experto en la materia, y que no resultan esenciales para dicho método.

Así, el método comprende adicionalmente las etapas de:

40 a) construir un vector antes de la transferencia del vector a la bacteria en la etapa de transformación, y  
b) seleccionar las bacterias mutantes que se han transformado con la secuencia exógena de ADN después de la etapa de transformación.

45 La eficacia del método divulgado en el presente documento se determina mediante el aislamiento y la caracterización de las secuencias de ADN presentes en las cepas transformadas, así como, por ejemplo, mediante la comprobación de características genotípicas o fenotípicas de la cepa mutante o bien mediante la comprobación de la producción de las proteínas recombinantes por las mismas, tal como se describe más adelante en la sección de ejemplos.

50 Mediante el vector portador utilizado en el método de la invención se puede obtener una cepa mutante de *Mhyo* que incorpora, de forma estable, una secuencia exógena de ADN en el citosol o en el genoma de la misma y que expresa el contenido de dicha secuencia.

55 El vector portador se puede seleccionar del grupo formado por un vector plasmídico replicativo y un vector de transposón.

Preferentemente, el vector portador es un vector plasmídico replicativo.

60 En el contexto de la invención se entiende por "vector plasmídico replicativo" o "plásmido replicativo" un vector que porta secuencias de ADN que se replica como un elemento episómico en la bacteria hospedadora, donde un elemento episómico es una unidad extracromosómica autoreplicativa.

65 En el contexto de la invención, un vector plasmídico replicativo es el que permite incorporar de forma estable una secuencia exógena de ADN en el citosol de una bacteria *Mhyo* y, opcionalmente, expresar un ARN o una proteína codificada por dicha secuencia en el citosol de la bacteria.

El vector portador es un vector, preferentemente un plásmido, donde al menos una secuencia exógena de ADN comprendida en él, se incorpora por transposición en el genoma de la cepa de *Mhyo*. Esto significa que se transforma la cepa por el vector portador por transposición, de modo que se obtiene una cepa mutante de *Mhyo* que incorpora por transposición en el genoma una parte substancial del vector, que es la parte que se encuentra comprendida entre las secuencias de repeticiones invertidas denominadas IRI e IRO, y que comprende al menos una secuencia exógena de ADN. Dichas repeticiones invertidas son secuencias diana de transposasas.

Se entiende que un "vector de transposón" un vector que porta secuencias de ADN donde al menos una de ellas se incorpora al genoma del hospedador por transposición.

En el método divulgado en el presente documento, un vector de transposón es el que permite incorporar de forma estable una secuencia exógena de ADN en el genoma de una bacteria de *Mhyo*.

Dicha incorporación tiene lugar de forma aleatoria en el genoma de la bacteria. Por lo tanto, dependiendo del sitio concreto donde se produce dicha inserción, puede inactivarse alguno de los genes de la bacteria debido a que su secuencia queda interrumpida por la inserción del transposón. Si el gen inactivado está implicado en factores de virulencia de *Mhyo*, la cepa resultante puede ser utilizada para preparar una vacuna atenuada frente a la NEP y, además, permite la obtención de vacunas marcadoras frente a la NEP. Adicionalmente, y al igual que en el caso de los vectores replicativos, el transposón puede contener otros genes bajo el control de una región promotora de *Mhyo* para expresar proteínas recombinantes con diferentes funciones.

Al integrarse en el genoma la modificación genética llevada a cabo mediante el método divulgado en el presente documento, la cepa transformada es estable a lo largo de las siguientes generaciones.

#### Secuencia exógena de ADN

En el contexto de la invención, se entiende por "secuencia exógena de ADN" un fragmento de ADN que se introduce de forma estable en el citosol o en el genoma de la cepa de *Mhyo*.

Se ha descubierto que mediante el método de la invención se puede introducir de forma estable una secuencia exógena de ADN en una cepa de *Mhyo*, ya que dicha secuencia no se pierde a lo largo de las sucesivas generaciones de la bacteria que se ha transformado con dicha secuencia exógena. Esta estabilidad implica que la secuencia exógena de ADN puede replicarse en el interior de la bacteria transformada y en sus descendientes, y que se puede recuperar después de múltiples generaciones de la bacteria transformada.

La secuencia exógena de ADN puede ser muy diversa y tiene una definición amplia, como se expone a continuación.

En el contexto de la invención, dicha secuencia puede ser, por ejemplo, un gen marcador. Habitualmente, el vector que comprende la secuencia exógena de ADN comprende dicho marcador para poder seleccionar fácilmente las cepas mutantes que se han transformado. Dicho marcador genético puede ser, por ejemplo, un gen de resistencia a un antibiótico. Estos pueden incluir, por ejemplo, el gen *TetM*, que confiere resistencia a la tetraciclina procedente del plásmido pIVT-1, descrito en Dybvig *et al.*, J. Bacteriol, 2000, 182, 4343-4347, o el gen *aac(6)-aph(2)*, que confiere resistencia a antibióticos del tipo aminoglucósido tal como la gentamicina, por ejemplo, y que se encuentra descrito en Chow *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 2001, 45(10), 2691-2694. Preferentemente el gen de selección fenotípica es el gen *TetM*.

La secuencia exógena de ADN también puede ser un gen que codifica proteínas recombinantes tales como, por ejemplo, la recombinasa Cre del bacteriófago P1, o la transposasa del transposón Tn4001, o secuencias diana de transposasas tales como, por ejemplo, IRI o IRO.

La secuencia exógena de ADN también puede ser un gen que codifica una proteína recombinante de interés terapéutico o preventivo. Dicha proteína puede estar relacionada con factores de virulencia o determinantes antigénicos de microorganismos causantes de enfermedades en los cerdos, y es capaz de inducir o de contribuir a la inducción de una respuesta protectora frente a enfermedades o afecciones patológicas que pueden afectar a los cerdos. Preferentemente la secuencia exógena de ADN codifica una proteína recombinante que induce una respuesta protectora frente a enfermedades o afecciones patológicas que afectan a los cerdos provocadas por los microorganismos del grupo formado por *Actinobacillus* sp., *Brachyspira* sp., *Pasteurella multocida*, *Salmonella* sp., *Streptococcus* sp., *Isospora* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira* sp., *Staphylococcus* sp., *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium* sp., *Mycoplasma* sp., *Lawsonia intracellularis*, *Escherichia coli*, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, virus de la gripe porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, parvovirus porcino, virus de la encefalomiocarditis, coronavirus, rotavirus, el agente del síndrome del fallo del desarrollo peridestete porcino, virus de la peste porcina clásica, virus de la peste porcina africana, calicivirus, torque teno virus (TTV) y circovirus porcino. Entre ellos, por ejemplo, el gen que codifica la glucoproteína 5 (gp5) del virus respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), el gen que codifica la proteína de la cápside del circovirus porcino de tipo 2 (CVP2), el gen que codifica la glucoproteína E (gpE) del virus de la peste porcina clásica, el gen que codifica la

proteína sp1 del parvovirus porcino (PVP), el gen que codifica la toxina de *Pasteurella multocida*, el gen que codifica la dermonecrotina de *Bordetella bronchiseptica*, los genes que codifican las toxinas de *Clostridium* spp, *Escherichia coli* o *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Preferentemente, dicha proteína induce una respuesta protectora frente a las enfermedades mencionadas.

5 También se considera como secuencia exógena de ADN un fragmento de ADN procedente de *Mhyo*, opcionalmente reordenado o recombinado con otros fragmentos de ADN. Ejemplos de esta secuencia exógena de ADN son, por ejemplo, el origen de replicación *oriC* de *Mhyo*, una secuencia de ARN antisentido o el gen que codifica la proteína P97 o P46 de *Mhyo*, para aumentar la tasa de transcripción y traducción de dicho gen.

10 Preferentemente la secuencia exógena de ADN se selecciona del grupo que comprende un gen de resistencia a un antibiótico, un gen que codifica una recombinasa, un gen que codifica una transposasa, una secuencia diana de transposasa, un fragmento de ADN procedente de *Mhyo*, fragmento que preferentemente ha sido reordenado o ha recombinado con uno o varios fragmentos de ADN, un gen que codifica un componente antigénico de un microorganismo causante de enfermedades porcinas, y combinaciones de los mismos; más preferentemente es un gen marcador que confiere resistencia a un antibiótico, un gen que codifica un componente antigénico de un microorganismo causante de enfermedades porcinas, o combinaciones de los mismos; y aún más preferentemente es un gen de resistencia a un antibiótico combinado con un gen que codifica un componente antigénico de un microorganismo causante de enfermedades porcinas, preferentemente un gen que codifica la proteína de la cápside del circovirus porcino de tipo 2 (CVP2) y, opcionalmente, combinado con un gen que codifica una proteína de membrana de *Mhyo*, preferentemente la proteína P46 de *Mhyo*.

### **Región promotora de *Mhyo***

25 En el contexto de la invención, se entiende por “región promotora de *Mhyo*” una secuencia de ADN característica de *Mhyo* que inicia o promueve la transcripción de una secuencia de ADN de *Mhyo*.

30 La secuencia de ADN que inicia o promueve la transcripción de la secuencia exógena de ADN tiene un grado de identidad al menos del 80 %, preferentemente al menos del 85 %, más preferentemente al menos del 90 %, aún más preferentemente al menos del 95 %, más preferentemente al menos del 99 %, y aún más preferentemente del 100 % con una región promotora de *Mhyo*.

35 Preferentemente, la secuencia de ADN que inicia o promueve la transcripción de la secuencia exógena de ADN tiene un grado de identidad del 100 % con una región promotora de *Mhyo*.

Se entiende por región promotora una secuencia que, una vez identificada por la holoenzima de la ARN polimerasa, induce la síntesis de un ARN mensajero (transcrito) en la dirección de su extremo 3'. Normalmente se traduce este transcrito y produce una proteína con una función concreta, o bien da lugar a un ARN que interviene en la síntesis de proteínas o en la regulación de dicha actividad transcripcional.

40 El experto en la materia conoce el significado de la expresión “una región promotora” y que puede identificarla por métodos convencionales.

45 La región promotora de *Mhyo* corresponde a un segmento de ADN que comprende preferentemente al menos 50 pares de bases, preferentemente al menos 100 pares de bases, más preferentemente al menos 200 pares de bases, y aún más preferentemente entre 200 y 300 pares de bases, situados en el lado 5' de secuencias codificantes bien establecidas de *Mhyo*.

50 Como se describe en el presente documento, la secuencia de ADN que se usa como promotor en el método y en el vector portador de la invención tiene un grado de identidad del 100 % con una región promotora de *Mhyo*, que comprende al menos 50 pares de bases.

Más específicamente, la secuencia de ADN que se usa como promotor en el método y en el vector portador de la invención tiene un grado de identidad del 100 % con una región promotora de *Mhyo*, que comprende entre 200 y 300 pares de bases.

60 En el contexto de la invención, se entiende por “secuencias codificantes bien establecidas” aquellas secuencias de ADN que codifican proteínas de *Mhyo* o bien regiones transcripcionalmente activas del genoma de *Mhyo*, que dan lugar, por ejemplo, a un ARN que interviene en la síntesis de proteínas o en la regulación de la actividad transcripcional. Estas secuencias incluyen, por ejemplo, las proteínas de superficie P46, P65, P97 y P102, descritas en Minion *et al.*, J. Bacteriol., 2004, 186(21), 7123-7133; las adhesinas P76, P146, P216 o la proteína de membrana P95, descritas en Vasconcelos *et al.*, J. Bacteriol., 2005, 187(16), 5568-5577, o la proteína citosólica P36 descrita en Caron *et al.*, J. Clin. Microbiol., 2000, 38(4), 1390-1396, o ARN ribosómico.

65 Como se describe en el presente documento, la región promotora de *Mhyo* puede comprender la región promotora del gen de una proteína de *Mhyo* seleccionada del grupo formado por las proteínas P36, P46, P65, P76, P97, P102,

P146 y P216, más preferentemente las proteínas P46 y P97, aún más preferentemente se selecciona del grupo que comprende la región promotora del gen *mhj\_0194* de la cepa J de *Mhyo*, que codifica la proteína P97 y que corresponde a la secuencia de ADN comprendida entre las bases 214293 y 214557 de la cepa J de *Mhyo* (SEQ ID NO: 1), y la región promotora del gen *mhj\_0511* de la cepa J de *Mhyo* (SEQ ID NO: 2), que codifica la proteína P46 y que corresponde a la secuencia de ADN comprendida entre las bases 656451 y 656713 de la cepa J de *Mhyo* depositada en la base de datos GenBank con el número AE017243 y descrita en Vasconcelos *et al.*, mencionado anteriormente.

La región promotora de *Mhyo*, que controla las secuencias exógenas, puede ser la misma para todas las secuencias o puede ser distinta. Preferentemente es la misma.

Un experto en la materia puede identificar fácilmente una secuencia de ADN promotora seleccionando una secuencia de ADN que tiene un grado de identidad al menos del 80 %, más preferentemente al menos del 90 %, más preferentemente al menos del 95 %, aún más preferentemente al menos del 99 % y aún más preferentemente del 100 % con una región promotora de *Mhyo*, que comprende preferentemente al menos 50 pares de bases, preferentemente al menos 100 pares de bases, más preferentemente al menos 200 pares de bases y aún más preferentemente entre 200 y 300 pares de bases, situados en el lado 5' de secuencias codificantes bien establecidas de *Mhyo*, y llevar a cabo el método de la invención. Los métodos para identificar una secuencia de ADN promotora se describen, por ejemplo, en el manual de Sambrook y Russell, *Molecular Cloning* 3ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Nueva York (2001).

### **Vector plasmídico replicativo**

Es un objeto de la invención un vector plasmídico replicativo que comprende:

- 1) una secuencia de ADN que comprende la región *oriC* de una cepa de *Mycoplasma* sp., y
- 2) una secuencia exógena de ADN que comprende un gen marcador, y, opcionalmente, una secuencia exógena de ADN adicional, que están bajo control de una secuencia de ADN que tiene un grado de identidad al menos del 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % con una región promotora de *Mhyo*.

Como se describe en el presente documento, la secuencia de ADN que inicia o promueve la transcripción de la secuencia exógena de ADN puede comprender entre 200 y 300 pares de bases y tiene un grado de identidad del 100 % con una región promotora de *Mhyo*.

En el plásmido replicativo de la invención se usa preferentemente una región promotora de *Mhyo* seleccionada del grupo que comprende la región promotora del gen de la proteína P97 de *Mhyo*, y la región promotora del gen de la proteína P46 de *Mhyo*, preferentemente la región promotora de *Mhyo* comprende la región promotora del gen de la proteína P97 de *Mhyo*, o alternativamente la región promotora del gen de la proteína P46 de *Mhyo*, mencionados anteriormente.

La región promotora de *Mhyo*, que controla secuencias comprendidas en el plásmido replicativo, puede ser la misma para todas las secuencias o puede ser distinta. Preferentemente es la misma secuencia.

La región *oriC* permite al fragmento de ADN introducido replicar como un elemento episómico y mantener este fragmento de ADN de forma estable en la descendencia de la célula transformada, preferentemente manteniendo las condiciones de selección fenotípica.

En el vector plasmídico replicativo de la invención, la región *oriC* es la región *oriC* de una cepa de *Mycoplasma* sp.

En el contexto de la invención, se entiende por *Mycoplasma* sp. cualquier bacteria del género *Mycoplasma*, tales como, por ejemplo, *M. pneumoniae*, *M. hyopneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. pulmonis*, *M. capricolum*, *M. mycoides*, *M. ovipneumoniae*, *M. haemofelis*, *M. gallisepticum*, *M. laboratorium* o *M. bovis*, entre otras.

Preferentemente, la región *oriC* pertenece a una cepa de *Mhyo*, más preferentemente pertenece a la cepa J y más preferentemente comprende la secuencia de ADN comprendida entre las bases 897262 y 1802 de la cepa J de *Mhyo*.

El gen marcador, también denominado gen de selección fenotípica, permite seleccionar los clones que han incorporado el plásmido con la secuencia exógena de ADN, tal como se explica anteriormente.

Preferentemente, el vector comprende una secuencia exógena de ADN adicional. Mediante dicha secuencia exógena de ADN adicional se pueden obtener cepas mutantes de *Mhyo* que pueden utilizarse para preparar vacunas monovalentes o polivalentes, opcionalmente vacunas marcadoras, y también pueden expresar herramientas genéticas útiles para la posterior modificación de dichos mutantes tales como, por ejemplo, la recombinasa Cre del fago P1, la recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína represora de la tetraciclina (TetR), o pueden bloquear completa o parcialmente la traducción de un gen específico de *Mhyo*.

Las secuencias exógenas de ADN adicionales que se pueden incorporar al plásmido replicativo incluyen, por ejemplo, el gen *cre* ORF, que codifica la recombinasa Cre del fago P1.

5 La recombinasa Cre tiene la capacidad de separar regiones de ADN flanqueadas por secuencias del tipo *loxP*. De este modo, por ejemplo, si el plásmido replicativo incluye el gen *cre* ORF, y un gen de resistencia a un antibiótico flanqueado por secuencias del tipo *loxP*, por ejemplo, *lox66*, cuando se expresa la recombinasa Cre, se elimina la resistencia al antibiótico por parte de la bacteria transformada. En otras palabras, en etapas posteriores se puede eliminar el gen marcador. Este hecho resulta importante en el caso de preparar cepas mutantes de *Mhyo*  
10 transformadas que presentan una virulencia atenuada y que se usan para la preparación de vacunas vivas, en las cuáles la presencia de un gen de resistencia a un antibiótico no es una característica conveniente.

Preferentemente, el plásmido replicativo comprende además una secuencia exógena de ADN adicional que codifica una proteína recombinante de interés terapéutico o preventivo. Dicha proteína puede estar relacionada con factores de virulencia o determinantes antigénicos de microorganismos causantes de enfermedades en los cerdos, y es capaz de inducir o de contribuir a la inducción de una respuesta protectora frente a enfermedades o afecciones patológicas que pueden afectar a los cerdos provocadas por los microorganismos descritos anteriormente.

Preferentemente, el plásmido replicativo comprende al menos dos veces la secuencia exógena de ADN adicional que codifica la proteína recombinante de interés terapéutico o preventivo, preferentemente la comprende dos veces, y más preferentemente dos o tres veces. De este modo se introducen varias copias de la secuencia exógena de ADN adicional con lo que se incrementa el rendimiento de expresión de dicha proteína. La región promotora de *Mhyo*, que controla las secuencias comprendidas en el plásmido replicativo, puede ser la misma para todas las secuencias o puede ser distinta.

Más preferentemente, la secuencia exógena de ADN adicional se selecciona del grupo formado por la secuencia que codifica la proteína de la cápside del circovirus porcino de tipo 2 (CVP2) y la secuencia exógena de ADN que codifica una proteína que comprende la proteína de la cápside del circovirus porcino de tipo 2 (CVP2), que porta adicionalmente los aminoácidos MetSerGlySer en el extremo N-terminal de dicha proteína, donde dicha proteína de la cápside se encuentra descrita en la base de datos GenBank con el número de referencia AAC61864 (SEQ ID NO: 6).

Incluso más preferentemente, la secuencia exógena de ADN adicional codifica la proteína de la cápside de CVP2 utilizando el codón más frecuente en el genoma de *Mhyo* para cada uno de los aminoácidos correspondientes a dicha proteína seleccionada del grupo formado por la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

La SEQ ID NO: 3 tiene 699 pares de bases, la SEQ ID NO: 4 tiene 702 pares de bases y la SEQ ID NO: 5 tiene 992 pares de bases, una secuencia de ADN con una longitud sustancialmente mayor a las otras dos, porque también incorpora la región promotora del gen de la proteína P97, correspondiente a la secuencia de ADN comprendida entre las bases 214293 y 214557 de la cepa J de *Mhyo*, para así simplificar las etapas de clonación. En la presente descripción la SEQ ID NO: 5 también se denomina ORF2v2.

Preferentemente, la secuencia exógena de ADN adicional comprende el gen de la proteína de la cápside del virus CVP2 (ORF2) fusionado a la última base codificante del gen de una proteína de membrana de *Mhyo*, preferentemente, la proteína de membrana de *Mhyo* se selecciona del grupo que consiste en la proteína P46 y la proteína P97, más preferentemente es la proteína P46, más preferentemente bajo el control del promotor de los genes de las proteínas P46 o P97 de *Mhyo*, y aún más preferentemente bajo el promotor del gen de la proteína P46 de *Mhyo*.

50 En el caso de la proteína P46, la fusión tiene lugar en el extremo 3' del gen que codifica dicha proteína de membrana (bases 7648-8904). Este plásmido dirige la síntesis de una proteína híbrida que se caracteriza porque los aminoácidos 1 a 419 provienen de la proteína P46 y los aminoácidos 420 a 652 corresponden a la proteína de la cápside del virus CVP2, versión ORF2 (bases 6946-7647).

55 Preferentemente, la secuencia exógena de ADN adicional comprende el gen que codifica la proteína de la cápside de CVP2 insertado en la secuencia de ADN que codifica un bucle de una proteína de membrana de *Mhyo*, preferentemente la proteína de membrana de *Mhyo* se selecciona del grupo que consiste en la proteína P46 y la proteína P97, más preferentemente es la proteína P46, más preferentemente bajo el control del promotor de los genes de las proteínas P46 o P97 de *Mhyo*, y aún más preferentemente bajo el promotor del gen de la proteína P46 de *Mhyo*.  
60

En el caso de la proteína P46, el plásmido dirige la síntesis de una proteína híbrida que se caracteriza porque los aminoácidos 1 a 92 provienen del extremo N-terminal de la proteína P46, los aminoácidos 95 a 327 corresponden a la proteína de la cápside del virus CVP2 y los aminoácidos 330-656 provienen del extremo C-terminal de la proteína P46 de *Mhyo*.  
65

Los bucles se identifican en las secuencias de aminoácidos mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia, con los que es posible predecir su ubicación con una eficacia razonable.

5 Dichos bucles presentan, en general, una elevada flexibilidad y toleran bien la inserción de secuencias aminoacídicas procedentes de otras proteínas. Además, al quedar expuestos en la superficie de las bacterias, posibilitan la generación de una buena respuesta inmunogénica.

10 Preferentemente, el plásmido replicativo comprende una secuencia exógena de ADN adicional que es un gen de *Mhyo* orientado de forma inversa respecto a la región promotora de *Mhyo*, preferentemente el gen de *Mhyo* codifica un factor de virulencia de *Mhyo*, preferentemente bajo el control del promotor de la proteína P46 o la P97 de *Mhyo*, y aún más preferentemente bajo el promotor de la proteína P46 de *Mhyo*.

15 Dicha secuencia de ADN es capaz de producir un ARN antisentido que puede bloquear la traducción de dicho gen de *Mhyo*. En el caso de que se trate de un gen que codifica un factor de virulencia de *Mhyo*, la transformación puede reducir el grado de virulencia del microorganismo.

Más preferentemente, el plásmido replicativo comprende la secuencia comprendida entre las bases 194.535 y 194.654 del genoma de la cepa J de *Mhyo* orientada de forma inversa respecto a la región promotora de *Mhyo*.

20 Dicha secuencia produce un ARN antisentido que puede bloquear la traducción del gen *tlyA* de dicha cepa, que corresponde a una hemolisina de *Mhyo*.

25 En los Ejemplos se describe la preparación de los plásmidos pOG, pOGCRE, pOGA159, pOGC, pOGL y pOGT. El primero incorpora el gen *aac(6')-aph(2'')* que confiere resistencia a la gentamicina. El plásmido pOGCRE incorpora además el gen ORF *cre*, que codifica la recombinasa Cre del fago P1; el plásmido pOGA159 incorpora una secuencia inhibidora de la traducción del gen de la hemolisina a159 de *Mhyo*; mientras que los plásmidos pOGC, pOGL y pOGT incorporan además genes codificantes para diferentes versiones proteicas de la proteína de la cápside del circovirus porcino de tipo 2 (CVP2).

### 30 Vectores de transposición

En el presente documento se divulga un vector de transposición, específicamente un plásmido, que comprende:

- 35
- 1) una secuencia de ADN que codifica una transposasa,
  - 2) una secuencia exógena de ADN que comprende un gen marcador y,
  - 3) opcionalmente, una secuencia exógena de ADN adicional,

40 donde la secuencia de ADN que codifica una transposasa y al menos una de las secuencias exógenas de ADN están bajo control de una secuencia de ADN que tiene un grado de identidad al menos del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % con una región promotora de *Mhyo*.

La secuencia de ADN que inicia o promueve la transcripción de las secuencias de ADN puede comprender entre 200 y 300 pares de bases y tiene un grado de identidad del 100 % con una región promotora de *Mhyo*.

45 El gen que codifica una transposasa contiene una secuencia de ADN que codifica una enzima que se une a una secuencia concreta en el transposón y cataliza el movimiento de dicho transposón a otra parte del genoma. La selección del gen que codifica una transposasa no es crítica. Los genes que codifican una transposasa incluyen el transposón TN4001T incorporado en el plásmido pIVT-1, mencionado anteriormente, o el transposón Tn916 incorporado en el plásmido pAM120, descrito en, por ejemplo, Cao *et al.*, J. Bacteriol., 1994, 176(14), 4459-4462.

50 El gen marcador o gen de selección fenotípica puede ser un gen de resistencia a un antibiótico, tal como, por ejemplo, el gen *TetM* o el gen *aac(6')-aph(2'')*, mencionados anteriormente. Preferentemente el gen de selección fenotípica es el gen *TetM*.

55 El gen marcador se encuentra flanqueado por dos repeticiones invertidas, tales como las del transposón presente en el plásmido pIVT-1, mencionado anteriormente. Dichas secuencias son reconocidas por la transposasa, y sin las mismas el gen de selección fenotípica no podría movilizarse al cromosoma bacteriano y la modificación genética no se llevaría a cabo. Al integrarse en el genoma, la modificación genética se mantendrá de forma estable en las siguientes generaciones de la célula transformada.

60 Preferentemente las repeticiones invertidas tienen las secuencias SEQ ID NO: 7 para IRO y la SEQ ID NO: 8 para IRI.

En el vector de transposón se puede usar una región promotora de *Mhyo* seleccionada del grupo que comprende la región promotora del gen de la proteína P97 de *Mhyo*, y la región promotora del gen de la proteína P46 de *Mhyo*, como se describe anteriormente. La región promotora de *Mhyo* puede comprender la región promotora del gen de la proteína P97 de *Mhyo*, o alternativamente la región promotora del gen de la proteína P46 de *Mhyo*.

5 La región promotora de *Mhyo*, que controla las secuencias comprendidas en el vector de transposón, puede ser la misma para todas las secuencias o puede ser distinta. Preferentemente es la misma.

10 De forma similar a lo explicado en el caso de un plásmido replicativo, el vector de transposón puede comprender además una secuencia exógena de ADN adicional que codifica una proteína recombinante de interés. Dicha proteína es capaz de inducir o de contribuir a la inducción de una respuesta protectora frente a enfermedades o afecciones patológicas que pueden afectar a los cerdos.

15 El vector de transposón puede comprender al menos dos veces la secuencia exógena de ADN adicional que codifica la proteína recombinante de interés terapéutico o preventivo, preferentemente dos veces, y más preferentemente dos o tres veces. De este modo se introducen varias copias de la secuencia exógena de ADN adicional y se aumenta el rendimiento de expresión de la proteína. La región promotora de *Mhyo*, que controla las secuencias comprendidas en el vector de transposón, puede ser la misma para todas las secuencias o puede ser distinta.

20 La secuencia exógena de ADN adicional puede seleccionarse de la secuencia que codifica la proteína de la cápside del circovirus porcino (CVP2) y una secuencia exógena de ADN que codifica una proteína que comprende la proteína de la cápside del circovirus porcino (CVP2), que porta adicionalmente los aminoácidos MetSerGlySer en el extremo N-terminal de dicha proteína, donde la proteína de la cápside del circovirus porcino (CVP2) se describe en la base de datos GenBank con el número de referencia AAC61864 (SEQ ID NO: 6).

25 Preferentemente, la secuencia exógena de ADN adicional codifica la proteína de la cápside de CVP2 utilizando el codón más frecuente en el genoma de *Mhyo* para cada uno de los aminoácidos correspondientes a dicha proteína seleccionada entre el grupo formado por la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, donde cada una de las secuencias de ADN está bajo control de una región promotora de *Mhyo*. Se usa más preferentemente la SEQ ID NO: 5, que ya incluye la región promotora del gen que codifica la proteína P97 de *Mhyo*.

30 Preferentemente, la secuencia exógena de ADN adicional comprende la secuencia de ADN que codifica la proteína de la cápside de CVP2 fusionada a la última base codificante del gen de una proteína de membrana de *Mhyo*, preferentemente la proteína de membrana se selecciona del grupo que consiste en la proteína P46 y la proteína P97, más preferentemente es la proteína P46. La cepa transformada con este plásmido expresa la proteína de *Mhyo* en la que inmediatamente después de su último aminoácido se encuentran los aminoácidos correspondientes a la proteína de la cápside de CVP2, es decir, expresa una proteína híbrida formada por la proteína P46 o P97 de *Mhyo* y la proteína de la cápside de CVP2. Teniendo en cuenta que es una proteína de membrana, la cepa de *Mhyo* transformada con dicho plásmido expresa la fusión de ambas proteínas en la membrana de la bacteria. La proteína de la cápside de CVP2 se selecciona del grupo formado por la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, más preferentemente es la SEQ ID NO: 4. Preferentemente la región promotora de *Mhyo* es la región promotora del gen que codifica la proteína P46 o la P97 de *Mhyo*, y aún más preferentemente el promotor de la proteína P46 de *Mhyo*.

45 Preferentemente, la secuencia de ADN adicional comprende el gen que codifica la proteína de la cápside de CVP2 insertado en la secuencia de ADN que codifica un bucle de una proteína de membrana de *Mhyo*, preferentemente la proteína de membrana se selecciona del grupo que consiste en la proteína P46 y la proteína P97, más preferentemente es la proteína P46. La cepa transformada con este plásmido expresa la proteína de la cápside de CVP2 insertada entre la proteína P46 o P97 de *Mhyo*, es decir, expresa una proteína híbrida formada por la proteína P46 o P97 de *Mhyo* y la proteína de la cápside de CVP2. La proteína de la cápside de CVP2 se selecciona del grupo formado por la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, más preferentemente es la SEQ ID NO: 3.

Preferentemente, la proteína de la cápside de CVP2 se encuentra insertada entre los aminoácidos 92 y 93 de la proteína P46.

55 Los siguientes vectores de transposón, en particular plásmidos, son especialmente preferentes:

1) Un vector que comprende la secuencia de ADN que codifica una transposasa, preferentemente el transposón TN4001T, una secuencia de ADN que codifica un gen marcador, preferentemente el gen *tetM*, opcionalmente flanqueada por secuencias tipo *loxP*, y una secuencia de ADN que codifica la proteína de la cápside de CVP2, preferentemente definida por la SEQ ID NO: 5, donde cada una de las secuencias de ADN están bajo control de una región promotora de *Mhyo* seleccionada entre la región promotora de la proteína P97 o de la proteína P46 de *Mhyo*, preferentemente la región promotora de la proteína P97. Un ejemplo de este tipo de plásmido es el denominado pTC3C, y descrito en el apartado de Ejemplos.

65 2) Un vector que comprende la secuencia de ADN que codifica una transposasa, preferentemente el transposón TN4001T, una secuencia de ADN que codifica un gen marcador, preferentemente el gen *tetM*, opcionalmente

flanqueada por secuencias *loxP*, y una secuencia de ADN que codifica la proteína de la cápside de CVP2, preferentemente definida por la SEQ ID NO: 4, que se encuentra fusionada a la última base codificante del gen de una proteína de membrana de *Mhyo*, preferentemente la proteína de membrana se selecciona del grupo que consiste en la proteína P46 y la proteína P97, más preferentemente es la proteína P46, donde cada una de las secuencias de ADN están bajo el control de una región promotora de *Mhyo* seleccionada entre la región promotora de la proteína P97 o de la P46 de *Mhyo*, preferentemente la región promotora de la proteína P46. Un ejemplo de este tipo de plásmido es el denominado pTC3T, y descrito en el apartado de Ejemplos.

- 3) Un vector que comprende la secuencia de ADN que codifica una transposasa, preferentemente el transposón TN40017, una secuencia de ADN que codifica un gen marcador, preferentemente el gen *tetM*, opcionalmente flanqueada por secuencias tipo *loxP*, y una secuencia de ADN que codifica la proteína de la cápside de CVP2, preferentemente definida por la SEQ ID NO: 3, que se encuentra fusionada en un bucle de una proteína de membrana de *Mhyo*, preferentemente la proteína de membrana se selecciona del grupo que consiste en la proteína P46 y la proteína P97, más preferentemente es la proteína P46, preferentemente insertada entre los aminoácidos 92 y 93 de la proteína P46, donde cada una de las secuencias de ADN están bajo control de una región promotora de *Mhyo* seleccionada entre la región promotora de la proteína P97 o de la proteína P46 de *Mhyo*, preferentemente la región promotora de la proteína P46. Un ejemplo de este tipo de plásmido es el denominado pTC3L, y descrito en el apartado de Ejemplos.

En estos tres vectores preferentes, el grupo de secuencias exógenas de ADN, a excepción de las secuencias codificantes para la transposasa, se encuentra flanqueado por dos repeticiones invertidas que permiten la incorporación de dicho grupo al genoma de la bacteria de *Mhyo* a transformar. Preferentemente, las repeticiones invertidas tienen las secuencias SEQ ID NO: 7 para IRO y SEQ ID NO: 8 para IRI.

Otro objeto de la invención es el uso del vector plasmídico replicativo para preparar una cepa mutante de *Mhyo*.

#### **Cepa de *Mhyo***

En el método de la invención puede emplearse cualquier cepa de *Mhyo*, es decir, la cepa se puede seleccionar, entre otras, de cepas de campo, cepas de Colección (por ejemplo, la cepa J o la cepa 232) o cepas modificadas genéticamente.

La cepa de *Mhyo* adecuada para aplicar el método de la invención se puede aislar de casos clínicos o subclínicos, de acuerdo con los métodos habituales usados por el experto en la materia, o se puede seleccionar de las cepas que están depositadas en Colecciones de Cultivos Tipo. En los casos clínicos la cepa presenta la patología propia de la NEP, mientras que en los casos subclínicos la cepa se encuentra colonizando las mucosas del animal, pero no presenta patología. La cepa de *Mhyo* que se puede usar para aplicar el método de la invención puede presentar diversos grados de virulencia. En el método de la invención se usa preferentemente una cepa virulenta o una cepa que exprese los principales determinantes inmunogénicos de *Mhyo*. Las cepas que se pueden usar en el método de la invención incluyen la cepa 232, cuyo genoma se describe en el artículo de Minion *et al.*, J. Bacteriol., 2004, 186(21), 7123-7133 y se recogió en la base de datos GenBank con el número AE017332; la cepa J, cuyo genoma se describe en el artículo de Vasconcelos *et al.*, J. Bacteriol., 2005, 187(16), 5568-5577, y se recogió en la base de datos GenBank con el número AE017243, o una cepa de tipo silvestre tal como 6314, que corresponde a un aislado virulento de *Mhyo* que pertenece a Laboratorios Hipra, S.A. (Amer- Girona-España).

#### **Transformación de la cepa**

En el contexto de la invención, la expresión "transformar una cepa de *Mhyo*" tiene el significado habitual que entiende un experto en biología molecular, y se refiere a un método mediante el cual una bacteria, en este caso una bacteria *Mhyo*, incorpora una secuencia exógena de ADN y dicha secuencia realiza una función específica.

Las funciones que puede realizar la secuencia exógena de ADN incorporada en la bacteria de *Mhyo* incluyen, por ejemplo, la transcripción de un ARN, la expresión de una proteína, la recombinación con otras secuencias de ADN o la interrupción de la secuencia codificante de un gen en el genoma del organismo hospedador.

El método de transformación es uno de los tres métodos por medio de los cuáles se puede introducir una secuencia exógena de ADN en una bacteria. Los otros dos son la conjugación, que consiste en la transferencia de material genético entre dos bacterias en contacto directo, y la transducción, que consiste en la inyección de una secuencia exógena de ADN en la bacteria mediante un virus bacteriófago.

En el método de la invención, la transformación de una bacteria se puede llevar a cabo mediante tratamientos bioquímicos conocidos por el experto en la materia tales como, por ejemplo, la incubación de las bacterias en presencia de una sal que contiene iones divalentes tales como, por ejemplo, el cloruro cálcico o el fosfato cálcico, la exposición a una mezcla de polietilenglicol, la incubación en presencia de alcohol polivinílico, el uso de liposomas en los que la secuencia exógena de ADN se encuentra recubierta con un lípido, la transfección mediada por el

dietilaminoetildextrano, o mediante tratamientos físicos como la electroporación, también denominada electrotransformación, o la biolística.

5 En el método de la invención, la bacteria se transforma preferentemente incubando las bacterias en presencia de una sal que contiene iones divalentes, por exposición a una mezcla de polietilenglicol, o sometiéndola a electroporación; y más preferentemente se lleva a cabo por electroporación.

10 La electroporación es un método bien conocido por el experto en la materia, cuyo protocolo experimental se describe, por ejemplo, en el manual Sambrook y Russell, mencionado anteriormente.

10 En el proceso de electroporación, una suspensión de las bacterias en un tampón de electroporación que comprende el vector portador de la secuencia exógena de ADN se somete a un pulso eléctrico que provoca un cambio en la estructura de la membrana de la bacteria para facilitar la entrada de dicha secuencia al interior de la misma.

15 El tampón de electroporación puede ser, por ejemplo, un tampón de pH 7,2 formado por sacarosa y ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperacinaetanosulfónico (HEPES), si bien se puede usar cualquier tampón adecuado para electroporación, bien conocido por el experto en la materia, tales como los descritos en el manual de Sambrook y Russell, mencionado anteriormente.

20 El vector portador, que porta la secuencia exógena de ADN, se usa generalmente a una concentración comprendida entre 0,1 y 5 µg/ml, preferentemente entre 0,5 y 2 µg/ml. Como vehículo de dicho vector portador se usa habitualmente un tampón de electroporación.

25 La suspensión de bacterias comprende generalmente entre  $10^6$  y  $10^{12}$  ufc/ml.

30 La electroporación se puede realizar generalmente a un voltaje comprendido entre 1 y 3 kV, una resistencia comprendida entre 75 y 300 Ω y una capacitancia comprendida entre 10 y 40 µF. En el método de la invención, la electroporación se realiza preferentemente a un voltaje comprendido entre 2 y 3 kV, una resistencia comprendida entre 100 y 175 Ω, y una capacitancia comprendida entre 20 y 30 µF.

35 Preferentemente, antes de realizar la electroporación, la suspensión de bacterias *Mhyo* se somete a una incubación en un tampón de electroporación con un agente quelante de iones divalentes. Si bien dicha etapa no resulta fundamental en el método de la invención, se ha observado que la misma aumenta significativamente la eficacia de la transformación.

40 Los agentes quelantes que pueden usarse para dicha incubación incluyen, por ejemplo, ácidos aminocarboxílicos tales como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido nitrilotriacético (NTA), el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o sus sales alcalinas; ácidos hidroxicarboxílicos tales como el ácido cítrico, el ácido glucónico o sus sales alcalinas; ácidos fosfónicos, tales como el ácido 2-aminoetilfosfónico, el ácido 1-hidroxiethyliden-1,1-difosfónico (HEDP), el ácido amino tris(metilenfosfónico) (ATMP), el ácido etilendiamina tetra(metilenfosfónico) (EDTMP) o sus sales alcalinas. Preferentemente, el agente quelante es EDTA.

45 Una vez realizada la electroporación, es decir, una vez emitido el pulso eléctrico, preferentemente la suspensión de bacterias se incuba con una cantidad adicional del vector portador que comprende la secuencia exógena de ADN.

Habitualmente, se usa la misma cantidad de vector portador que se añade antes de efectuar el pulso eléctrico.

50 Dicha incubación se realiza incubando la suspensión de bacterias y el vector portador con hielo durante un período inferior aproximadamente a 1 hora, y a continuación manteniéndola durante un período comprendido entre 2 y 5 horas a una temperatura de 37 °C y en una atmósfera con un 5 % de anhídrido carbónico.

55 Más preferentemente, antes de realizar la electroporación, la suspensión de bacterias *Mhyo* se somete a una incubación en un tampón de electroporación con un agente quelante de iones divalentes, y después de la electroporación, la suspensión de bacterias se incuba con una cantidad adicional del vector portador que comprende la secuencia exógena de ADN.

60 Como se describe en el presente documento, la transformación puede llevarse a cabo mediante el uso de un vector plasmídico replicativo o mediante el uso de un vector, preferentemente un plásmido, donde al menos una parte del mismo se incorpora por transposición.

65 Por lo tanto, la transformación de la cepa de *Mhyo* de acuerdo con el método de la invención permite obtener una cepa de *Mhyo* que comprende al menos una secuencia exógena de ADN insertada en su genoma, si la transformación ha tenido lugar mediante transposición, o que contiene dicho fragmento de ADN en un vector extracromosómico (o elemento episómico) que replica de forma autónoma y estable en *Mhyo*, si la transformación se ha realizado mediante vectores plasmídicos replicativos.

**Obtención de cepas mutantes**

Es un objeto de la invención una cepa mutante de *Mhyo* obtenible mediante el método de la invención.

5 Otro objeto de la invención es una cepa mutante de *Mhyo* que comprende al menos una secuencia exógena de ADN incorporada de forma estable en el genoma o en el citosol de la misma. Preferentemente la secuencia exógena de ADN puede estar controlada por una secuencia de ADN que tiene un grado de identidad al menos del 80 %, preferentemente al menos del 85 %, más preferentemente al menos del 90 %, aún más preferentemente al menos del 95 %, más preferentemente al menos del 99 % y aún más preferentemente del 100 % con una región promotora  
10 de *Mhyo*. La secuencia exógena de ADN está comprendida en el vector plasmídico replicativo de la invención.

La secuencia exógena de ADN puede estar comprendida entre las repeticiones de secuencia invertidas IRI e IRO del vector de transposón de la presente divulgación.

15 La cepa mutante de *Mhyo* de la invención comprende el vector plasmídico replicativo de la invención. Cuando se usa un vector plasmídico replicativo, la cepa mutante de *Mhyo* comprende dicho vector en el citosol de la misma. En el caso de usar un vector de transposón, la cepa mutante de *Mhyo* incorpora una parte substancial del vector, que es la parte que se encuentra comprendida entre las repeticiones de secuencias invertidas IRI e IRO, y que comprende al menos una secuencia exógena de ADN.  
20

Otro objeto de la invención es una cepa de *Mhyo* transformada con el vector portador de la invención.

En el contexto de la invención se entiende por “cepa mutante de *Mycoplasma hyopneumoniae*” una cepa de *Mhyo* que se ha modificado genéticamente mediante la utilización de herramientas de ingeniería genética.  
25

Mediante el método de la invención se puede obtener una cepa mutante de *Mhyo* que incorpora de forma estable una secuencia exógena de ADN que es funcional en dicha cepa mutante.

En el contexto de la invención, se entiende que una secuencia exógena de ADN es funcional en una cepa mutante de *Mhyo* cuando, por ejemplo, expresa la proteína codificada por dicha secuencia, transcribe un ARN o modifica genéticamente dicha cepa.  
30

En el método de la invención para obtener cepas de *Mhyo* transformadas, el material de partida es preferentemente un cultivo de *Mhyo* en fase de crecimiento exponencial.  
35

Dicho cultivo se obtiene preferentemente usando un medio de cultivo que comprende medio FriisHS (suero de caballo, extracto de levadura, infusión de caldo de corazón, solución salina equilibrada de Hank y caldo PPLO (del inglés, *Pleuro-Pneumonia Like Organisms*, organismo de tipo pleuroneumonía)).

40 El cultivo se mantiene preferentemente entre 48 y 144 horas a una temperatura de aproximadamente 37 °C con agitación entre 100 y 200 rpm hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial.

A continuación, se aíslan las bacterias, preferentemente por centrifugación, y se someten al método de transformación.  
45

Tras la transformación, la suspensión de bacterias se extiende preferentemente en placas de medio FriisHS complementado con agar y el antibiótico de selección deseado.

Las colonias transformadas que muestran resistencia al antibiótico del medio se pueden recuperar después de 2 o 3 semanas de incubación a una temperatura de 37 °C y en una atmósfera con un 5 % de anhídrido carbónico. A continuación, dichas colonias transformadas se inoculan preferentemente en medio FriisHS complementado con el antibiótico de selección, y tras aproximadamente 10 o 20 días se procede al estudio del genotipo y/o fenotipo de los mutantes obtenidos, mediante la obtención de sus extractos proteicos o de ADN genómico, por métodos bien conocidos por el experto en la materia.  
50  
55

Mediante el método de la invención se pueden obtener cepas mutantes de *Mhyo* transformadas que expresan una proteína recombinante.

Preferentemente, la cepa mutante de *Mhyo* de la invención expresa el contenido codificado por la secuencia exógena de ADN, por ejemplo, una proteína. La secuencia exógena de ADN puede ser, por ejemplo, la proteína de la cápside del circovirus (CVP2), o una proteína de *Mhyo*, por ejemplo, la proteína P46, para conseguir una sobreexpresión de la misma. Ejemplos de ellas son las cepas 232Cc6, 6314Cc1, 232Lc2 y 232Tc2, que incorporan la secuencia exógena de ADN en el genoma de la bacteria.  
60

65 En el presente documento se divulga la cepa mutante de *Mhyo* depositada por Laboratorios Hipra, S.A. (Amer, Girona, España) en Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,

Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania) con el número de referencia DSM 26027 el 29 de mayo de 2012. Dicha cepa, denominada 232Cc6, incorpora el transposón presente en el plásmido pTC3C en la cepa 232 de *Mhyo*. Esta cepa expresa la proteína de la cápside de CVP2 en el citoplasma y en unas cantidades que pueden detectarse por transferencia tipo Western y ensayo de ELISA.

5 En el presente documento se divulga la cepa mutante de *Mhyo* depositada por Laboratorios Hipra, S.A. (Amer, Girona, España) en Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania) con el número de referencia DSM 26020 el 29 de mayo de 2012. Dicha cepa, denominada 6314Cc1, incorpora el transposón presente en el plásmido pTC3C en la cepa de tipo silvestre 6314 de *Mhyo*. Esta cepa expresa la proteína de la cápside de CVP2 en el citoplasma y en unas cantidades que pueden detectarse por transferencia tipo Western y ensayo de ELISA.

15 En el presente documento se divulga la cepa mutante de *Mhyo* depositada por Laboratorios Hipra S.A. (Amer, Girona, España) en Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania) con el número de referencia DSM 26033 el 29 de mayo de 2012. Dicha cepa, denominada 232Lc2, incorpora el transposón presente en el plásmido pTC3L en la cepa de tipo silvestre 232 de *Mhyo*. Esta cepa expresa la proteína de la cápside de CVP2 en unas cantidades que pueden detectarse por ensayo de ELISA.

20 En el presente documento se divulga la cepa mutante de *Mhyo* depositada por Laboratorios Hipra, S.A. (Amer, Girona, España) en Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania) con el número de referencia DSM 26034 el 29 de mayo de 2012. Dicha cepa, denominada 232Tc2, incorpora el transposón presente en el plásmido pTC3T en la cepa de tipo silvestre 232 de *Mhyo*. Esta cepa expresa la proteína de la cápside de CVP2 en unas cantidades que pueden detectarse por ensayo de ELISA.

Las cepas siguientes también expresan la proteína codificada por la secuencia exógena de ADN, en este caso incorporada en el citosol de la bacteria como un elemento episómico:

- 30 - la cepa de *Mhyo* transformada 232POGc9 que incorpora el plásmido replicativo pOG en la cepa de tipo silvestre 232 de *Mhyo*. Dicha incorporación se ha detectado por digestión del ADN total de esta cepa de *Mhyo* con enzimas de restricción y analizando los fragmentos resultantes por electroforesis de gel de agarosa.
- 35 - la cepa de *Mhyo* transformada 232POGCREc1 que incorpora el plásmido replicativo pOGCRE en la cepa de tipo silvestre 232 de *Mhyo*. La expresión de la recombinasa Cre se detecta mediante transferencia tipo Western e inmunodetección.

Mediante el método divulgado en el presente documento se pueden obtener cepas mutantes de *Mhyo* en las que la secuencia exógena de ADN incorporada por transposición produce un ARN antisentido que puede bloquear la traducción de un gen responsable de la virulencia de dicha cepa, por ejemplo, un gen que corresponde a una hemolisina de *Mhyo*.

Preferentemente, la cepa mutante de *Mhyo* incorpora una secuencia exógena de ADN en el genoma o en el citosol de modo que dicha cepa produce un ARN antisentido con respecto a un gen responsable de la virulencia de dicha cepa.

Mediante el método divulgado en el presente documento se pueden obtener cepas mutantes de *Mhyo* en las que la secuencia exógena de ADN incorporada por transposición en el genoma de la cepa, interrumpe un gen que codifica un factor de virulencia de *Mhyo*, y presentan una virulencia atenuada.

50 Además se divulga en el presente documento una cepa mutante de *Mhyo* que incorpora una secuencia exógena de ADN que interrumpe un gen que codifica un factor de virulencia de *Mhyo*, por ejemplo una hemolisina. Un ejemplo es la cepa denominada 232TC3hlyC.

Las cepas mutantes que portan un gen interrumpido que codifica un factor de virulencia de *Mhyo* se pueden seleccionar mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia, tal como es la secuenciación del genoma de dichos mutantes.

60 En el presente documento se divulga la cepa mutante de *Mhyo* depositada por Laboratorios Hipra, S.A. (Amer, Girona, España) en Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania) con el número de referencia DSM 26049 el 29 de mayo de 2012. Dicha cepa, denominada 232TC3hlyC, incorpora el transposón presente en el plásmido TC3 en la cepa de tipo silvestre 232 de *Mhyo*. Esta cepa presenta una interrupción del ORF que codifica el factor de virulencia hlyC de *Mhyo*, por lo que es buena candidata para utilizarse como una cepa vacunal atenuada. La inserción en el genoma se detecta mediante transferencia tipo Southern y por secuenciación directa.

65

A partir de la información contenida en la presente descripción, el experto en la materia puede preparar otras cepas de *Mhyo* usando el método de la invención y seleccionando otras secuencias exógenas de ADN distintas a las descritas específicamente.

5 Es un objeto de la invención la utilización de una cepa mutante de *Mhyo* que comprende una secuencia exógena de ADN en el citosol o en el genoma de la misma como hospedador para su expresión. La secuencia exógena de ADN puede codificar proteínas recombinantes o para otras secuencias de interés tal como se ha explicado en la presente descripción.

10 Se puede observar que mediante el método de la invención se pueden obtener cepas mutantes de *Mhyo* con características muy diversas, de modo que el experto en la materia tiene a su disposición un método para modificar genéticamente cepas de *Mhyo* y obtener cepas que presenten diversas funcionalidades.

15 Los ejemplos 5 y 6 muestran que las cepas mutantes de *Mhyo* obtenidas de acuerdo con el método divulgado sorprendentemente incorporan de forma estable la secuencia exógena de ADN incluida en el vector portador y expresan el contenido de la misma tal como, por ejemplo, mediante la producción de proteínas recombinantes.

20 La cepa obtenida mediante el método de la invención puede atenuarse o inactivarse mediante procedimientos convencionales bien conocidos por el experto en la materia. De este modo puede usarse para la preparación de vacunas. Preferentemente, se usa en forma inactivada.

25 Mediante el método de la invención se obtienen nuevas cepas de *Mhyo*, hasta ahora no divulgadas. Sus características permiten preparar nuevas vacunas frente a *Mhyo* y al mismo tiempo, frente a otros patógenos del cerdo. Es decir, las cepas mutantes de la invención permiten preparar vacunas polivalentes mediante el uso de una única cepa transformada de acuerdo con el método de la invención.

### Vacunas

30 Es un objeto de la invención una vacuna para la protección de cerdos frente a la neumonía enzoótica porcina provocada por *Mhyo*, y opcionalmente frente a otra enfermedad o afecciones patológicas provocadas por microorganismos que afectan a los cerdos, que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de la cepa mutante de *Mhyo* de la invención.

35 Preferentemente, la vacuna comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un agente adyuvante.

En la vacuna de la invención la cepa se encuentra en forma inactivada o atenuada, preferentemente inactivada.

40 Una vacuna inactivada se puede obtener mediante la inactivación de un patógeno, en este caso una bacteria, habitualmente mediante el uso de calor, compuestos químicos tales como formaldehído, BEI (etileneimina binaria) o tensioactivos, de fuerza mecánica usando un homogeneizador, etc. La inactivación del agente patógeno puede conducir al mantenimiento de la estructura del mismo, pero sin capacidad de replicarse, o a la destrucción o disgregación de la estructura. En el contexto de la invención, la expresión "vacuna inactivada" incluye una composición que comprende las bacterias inactivadas, pero que mantienen su estructura, así como una composición en la que la estructura de las bacterias se ha destruido o disgregado.

50 Otro objeto de la invención es el uso de la cepa mutante de *Mhyo* de la invención para la preparación de una vacuna frente a la neumonía enzoótica porcina provocada por *Mhyo*, y opcionalmente frente a otra enfermedad o afecciones patológicas adicionales que afectan a los cerdos.

55 La expresión "inmunológicamente eficaz" significa que la cantidad de bacterias administradas en el proceso de vacunación es suficiente para inducir en el hospedador una respuesta inmunológica eficaz frente a una infección por formas virulentas de *Mhyo* y, en el caso en que la cepa de *Mhyo* transformada exprese una proteína recombinante que es capaz de inducir o de contribuir a la inducción de una respuesta protectora frente a enfermedades o afecciones patológicas que pueden afectar a los cerdos, también es suficiente para inducir en el hospedador una respuesta inmunológica eficaz frente a una infección provocada por dicho microorganismo.

60 Preferentemente, la vacuna está dirigida a conferir protección a cerdos frente a enfermedades o afecciones patológicas tales como, por ejemplo, las provocadas por los microorganismos *Actinobacillus* sp., *Brachyspira* sp., *Pasteurella multocida*, *Salmonella* sp., *Streptococcus* sp., *Isospora* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira* sp., *Staphylococcus* sp., *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium* sp., *Mycoplasma* sp., *Lawsonia intracellularis*, *Escherichia coli*, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, virus de la gripe porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, parvovirus porcino, virus de la encefalomiocarditis, coronavirus, rotavirus, circovirus porcino, el agente del síndrome del fallo del desarrollo peridestete porcino, virus de la peste porcina clásica, virus de la peste porcina africana, calicivirus y torque teno virus (TTV).

Más preferentemente, la enfermedad adicional es la conocida como EACVP (enfermedades asociadas a circovirus porcino) provocada por circovirus porcino (CVP2), ya sea se presente como único agente o con la presencia de otros patógenos o microorganismos asociados.

5 La vacuna de la invención también puede combinarse, en un único recipiente o en recipientes distintos, con una vacuna o composición antigénica adicional. Preferentemente, la vacuna o composición antigénica adicional está dirigida a conferir protección a cerdos frente a enfermedades o afecciones patológicas tales como, por ejemplo, las provocadas por los microorganismos *Actinobacillus* sp., *Brachyspira* sp., *Pasteurella multocida*, *Salmonella* sp., *Streptococcus* sp., *Isospora* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira* sp., *Staphylococcus* sp., *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium* sp., *Mycoplasma* sp., *Lawsonia intracellularis*, *Escherichia coli*, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, virus de la gripe porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, parvovirus porcino, virus de la encefalomiocarditis, coronavirus, rotavirus, circovirus porcino, el agente del síndrome del fallo del desarrollo peridestete porcino, virus de la peste porcina clásica, virus de la peste porcina africana, calicivirus y torque teno virus (TTV).

15 La vacuna de la invención comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de bacterias de una cepa inactivada o viva de *Mhyo* que se puede obtener de acuerdo con el método descrito en la presente invención.

20 Es conocido que la dosis a emplear depende de la edad y del peso del animal a vacunar y de la vía de administración.

Generalmente, las dosis adecuadas se encuentran comprendidas en el intervalo de entre  $10^3$  y  $10^{10}$  unidades de cambio de color (ucc), preferentemente entre  $10^6$  y  $10^{10}$  ucc, y más preferentemente entre  $10^8$  y  $10^9$  ucc.

25 Los animales pueden vacunarse en cualquier tiempo adecuado. Preferentemente, se administra una dosis de la vacuna de la invención entre la primera y las 12 semanas de edad, y más preferentemente la vacuna se administra comenzando a las 3 semanas de edad. En casos concretos puede ser necesaria la administración de dosis complementarias para conseguir una protección satisfactoria. En estas circunstancias se administra preferentemente una segunda dosis entre 1 y 5 semanas después de la primera dosis, más preferentemente después de 3 semanas desde la primera dosis. Preferentemente, la vacuna es una vacuna de administración única.

35 La vacuna de la invención está destinada a la especie porcina, incluyendo entre otros cerdos, verracos, cerdas y lechones, de cualquier edad o en cualquier fase de su ciclo productivo; preferentemente está destinada a cerdos en fase de engorde y más preferentemente a cerdos de 1 a 12 semanas de vida.

La vacuna puede administrarse por vía intranasal, intradérmica, mucosa o submucosa, subcutánea, mediante aerosol, intramuscular u oral. Preferentemente se administra por vía intradérmica o intramuscular.

40 Dicha vacuna puede prepararse de acuerdo con los métodos habituales empleados por el experto en la materia para la preparación de formulaciones farmacéuticas adecuadas para las diferentes formas de administración, tal como se describe por ejemplo en el manual *Remington The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 2000 [ISBN: 0-683-306472].

45 Normalmente, las vacunas se preparan como vacunas para inyección en forma de soluciones, emulsiones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar en una forma sólida adecuada para disolverla o suspenderla en un vehículo líquido antes de la inyección.

50 El volumen típico de una dosis de una vacuna inyectable se encuentra entre 0,1 ml y 5 ml, preferentemente entre 0,15 ml y 3 ml, y más preferentemente entre 0,2 ml y 2 ml. Habitualmente, en la administración por vía intradérmica, se usan entre 0,1 ml y 0,5 ml, preferentemente entre 0,15 ml y 0,4 ml, y más preferentemente 0,2 ml. En la administración intramuscular, generalmente se usan entre 0,5 ml y 5 ml, preferentemente entre 1 ml y 3 ml, y más preferentemente entre 1 ml y 2 ml.

55 Para inmunizar un animal con la vacuna de la invención, la cepa mutante de *Mhyo* habitualmente se mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Entre los vehículos líquidos que se pueden emplear para preparar la vacuna se encuentra, por ejemplo, el agua, la solución salina con una concentración fisiológica de sal o el líquido de cultivo en el que se cultivan las bacterias.

60 Adicionalmente, si se desea, el vehículo puede contener sustancias auxiliares o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como, por ejemplo, agentes humectantes, agentes dispersantes, agentes emulsionantes, agentes tampón (por ejemplo, el tampón fosfato), agentes estabilizantes tales como hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, sacarosa, manitol, sorbitol, almidón o dextranos) o proteínas (por ejemplo, albúmina, caseína, suero bovino o leche desnatada).

65

Las características físicoquímicas de los excipientes, así como el nombre de los productos comerciales bajo los que se comercializan, se pueden encontrar en el libro R.C. Rowe *et al.*, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4ª edición, Pharmaceutical Press, Londres, 2003 [ISBN: 0-85369-472-9].

- 5 Opcionalmente, también se pueden incorporar adyuvantes a la vacuna para potenciar la eficacia de la misma. Preferentemente, la vacuna de la invención comprende además un adyuvante.

10 Los adyuvantes son estimulantes inespecíficos del sistema inmunitario, que aumentan la respuesta inmunológica del hospedador frente al patógeno invasor. Ejemplos de adyuvantes son: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, óxido de aluminio, vitamina E, escualeno, aceite vegetal, saponinas, ginseng, cimosano, glucanos, dimetilaminoetil-dextrano, dextranos, polímeros no iónicos en bloque, poliacrilato (carbómero), adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto, muramildipéptidos, emulsiones del tipo W/O (agua/aceite), (O/W aceite/agua), W/OW, y mezclas de los mismos.

15 Preferentemente, la vacuna es una vacuna de inyección y comprende la cepa mutante de la invención inactivada por un tensioactivo no iónico. Preferentemente, se usa un tensioactivo no iónico seleccionado del grupo formado por alquifenoles etoxilados, ésteres de sorbitán etoxilados, alcoholes grasos etoxilados, ácidos grasos etoxilados, alcanolamidas de ácidos grasos, alcanolamidas de ácidos grasos etoxiladas, aminas grasas etoxiladas, óxidos de aminas grasas, óxidos de amidoaminas grasas, glicéridos de ácidos grasos, ésteres de sacarosa, alquilpoliglicósidos, copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno, y alcoholes grasos etoxilados y propoxilados; más preferentemente se selecciona de alquifenoles etoxilados y ésteres de sorbitán etoxilados, y aún más preferentemente es un alquilfenol etoxilado tal como, por ejemplo, Triton® X-100, comercializado por la compañía Dow.

25 Más preferentemente, la vacuna es una vacuna de inyección y comprende la cepa mutante de la invención inactivada por un tensioactivo no iónico y como adyuvante una emulsión del tipo A/G/A tal como, por ejemplo, el producto Montanide® ISA 201, comercializado por la compañía SEPPIC (Francia).

30 Preferentemente, la vacuna puede comprender la cepa de la invención en forma liofilizada. El proceso de liofilización se lleva a cabo mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia.

#### **Kit de vacunación**

35 El objeto de la presente invención también incluye un kit de vacunación para vacunar cerdos frente a una infección o enfermedad provocada por *Mhyo* y, opcionalmente, frente a otra enfermedad o afecciones patológicas provocadas por microorganismos que afectan a los cerdos.

40 Dicho kit de vacunación comprende un recipiente que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de la cepa mutante de la invención o una vacuna de la invención.

45 El kit de vacunación divulgado en el presente documento puede comprender una combinación de la vacuna de la invención con una composición antigénica adicional, que se encuentran contenidos en un único recipiente o en recipientes distintos. Dicha composición antigénica adicional está dirigida a conferir protección a cerdos frente a enfermedades o afecciones patológicas tales como las mencionadas anteriormente en la sección Vacunas.

50 La aplicación industrial de la invención se desprende claramente de la descripción. Debe destacarse que la NEP es una enfermedad respiratoria crónica de distribución mundial responsable de grandes pérdidas económicas en la industria porcina y que la posibilidad de modificar genéticamente de forma dirigida y estable cepas de *Mhyo* permite la preparación de vacunas con unas propiedades superiores a las bacterinas convencionales. Mediante el método de la invención se pueden preparar, por ejemplo, cepas mutantes de *Mhyo* atenuadas, cepas mutantes que sobreexpresan un factor de virulencia específico, cepas que inhiben un factor de virulencia específico o cepas que expresen además componentes antigénicos de microorganismos responsables de enfermedades que afectan a los cerdos, que resultan adecuadas para la preparación de vacunas eficaces frente a la NEP y frente a otras patologías porcinas.

55 La modificación genética dirigida de *Mhyo* de forma estable y dirigida por primera vez, ha permitido a los inventores, entre otras cosas, poder utilizar estas cepas transformadas como vector de expresión de secuencias exógenas de ADN, como por ejemplo secuencias nucleotídicas que codifican proteínas de interés terapéutico o preventivo, tales como la proteína de la cápsida de CVP2, entre otras. Mediante la tecnología divulgada en la presente invención, se han diseñado y preparado nuevos candidatos vacunales polivalentes que pueden utilizarse para prevenir diferentes enfermedades al mismo tiempo mediante la administración de una única cepa.

60 **Ensayo para la producción de proteínas recombinantes por parte de cepas transformadas de *Mhyo* de acuerdo con el método de la invención**

65

Para identificar la presencia de la proteína expresada por la secuencia exógena de ADN en las cepas mutantes de *Mhyo* de la invención, se puede emplear el método de ELISA.

5 En particular, para detectar la presencia de la proteína de la cápside de CVP2 y cuantificarla en las cepas de *Mhyo* obtenidas, se utilizó un kit comercial que permite detectar y estimar de forma aproximada la cantidad de dicho antígeno mediante inmunodetección en placa (ELISA).

10 Los extractos proteicos se obtuvieron después de concentrarlos en cultivos en fase exponencial de cada cepa y de lisar las células obtenidas.

Los resultados fueron positivos, lo que indicó que en todas las cepas y plásmidos ensayados se expresan las proteínas codificadas por ORF2 u ORF2v2 en mayor o menor cantidad (Figura 5B).

15 Las cepas con la versión procedente del plásmido pTC3C también se analizaron mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida y transferencia tipo Western (Figura 5C). Se detectaron bandas del mismo peso molecular que la proteína de la cápside de CVP2.

20 Se puede observar que en los geles de electroforesis no aparecieron bandas de degradación proteolítica, un problema que surge de forma habitual en la expresión recombinante de proteínas.

A tal fin, la proteína de la cápside de CVP2 expresada de forma recombinante en *Mhyo* puede ser un buen antígeno para la formulación de una vacuna polivalente. Así mismo, *Mhyo* resulta ser un buen hospedador para la producción recombinante de proteínas.

## 25 **Ensayos de vacunación**

Se probó la eficacia de las vacunas que contenían cepas mutantes de *Mhyo* obtenidas de acuerdo con el método de la invención, donde dichas cepas comprendían la secuencia exógena de ADN que codifica la proteína de la cápside de CVP2 en el genoma de la bacteria, y expresaban dicha proteína en el citosol de la bacteria.

30 Con este fin, se probaron vacunas que contenían las cepas 6314Cc1 o 232Cc6, y los animales se vacunaron con una única dosis o se revacunaron con una segunda dosis, como se describe en la sección Ejemplos.

35 Adicionalmente, se incorporaron al estudio dos grupos de animales: un grupo no vacunado e infectado (grupo 5), y un grupo no vacunado y no infectado (grupo 6).

Las respuestas que se valoraron fueron: la respuesta inmunológica frente a *Mhyo*, la respuesta inmunológica frente a CVP2 y la carga de ADN vírico de CVP2 en el suero de los animales.

40 Al observar los resultados de los ensayos de vacunación realizados con las vacunas que comprenden cepas mutantes de *Mhyo* obtenidas de acuerdo con el método de la invención mostrados en las Figuras, 6, 7 y 8, se puede concluir que las cepas de *Mhyo* transformadas que expresan la proteína de la cápside de CVP2, generan una respuesta inmunológica significativa frente a *Mhyo* y, sorprendentemente, también frente a CVP2, reduciendo significativamente la carga vírica de CVP2 de modo que se pueden emplear en vacunas frente a infecciones provocadas por *Mhyo* y por CVP2 al mismo tiempo.

50 También se probó una vacuna que contiene una cepa mutante de *Mhyo* obtenida de acuerdo con un método divulgado en el presente documento, frente a una infección por CVP2 y *Mhyo*, donde tal cepa comprendía la secuencia exógena de ADN que codifica la proteína de la cápside de CVP2 en el genoma de la bacteria y expresaba tal proteína en el citosol de la bacteria.

Se probó una vacuna que contenía la cepa 6314Cc1, los animales se vacunaron con una única dosis y se expusieron a un aislado de CVP2 y a una cepa patógena de *Mhyo*, como se describe en los Ejemplos.

55 Adicionalmente, se incorporaron al estudio dos grupos de animales: un grupo no vacunado e infectado (grupo 2), y un grupo no vacunado y no infectado (grupo 3).

60 Las respuestas que se valoraron fueron: la respuesta inmunológica frente a *Mhyo*, la respuesta inmunológica frente a CVP2, la carga de ADN vírico de CVP2 en el suero de los animales y las lesiones compatibles con *Mhyo* en los pulmones de los animales.

65 Se observó que la cepa de *Mhyo* modificada genéticamente de acuerdo con un método divulgado en el presente documento, que expresa la proteína de la cápside de CVP2, genera una reducción significativa de la carga de ADN vírico de CVP2 y de las lesiones compatibles con *Mhyo* en los pulmones de los animales en comparación con los animales no vacunados.

También se probó una vacuna que contenía una cepa mutante de *Mhyo* obtenida de acuerdo con el método de la invención, donde dicha cepas comprendía un vector plasmídico replicativo que comprendía la secuencia exógena de ADN que codifica la proteína de la cápside de CVP2, y expresaba tal proteína en el citosol de la bacteria. Igualmente que en los ensayos anteriores, se observó que la cepa de *Mhyo* modificada genéticamente de acuerdo con el método de la invención mediante plásmidos replicativos, que expresa la proteína de la cápside de CVP2, genera una reducción significativa de la carga vírica de CVP2.

#### **Análisis del grado de atenuación de las cepas mutantes**

Los mutantes obtenidos al poner en práctica un método divulgado en el presente documento para transformar cepas de *Mhyo* incluían la cepa 232TC3hlyC, que contenía el plásmido pTC3 incorporado por transposición en la región del genoma que codifica un factor de virulencia de *Mhyo*: la hemolisina C, codificada por el gen *hlyC*.

Para valorar el grado de atenuación de dicha cepa, se seleccionaron cerdos de 8 semanas de edad y se distribuyeron en dos grupos de 8 animales por grupo. El primer grupo se infectó por vía intratraqueal con una dosis de la cepa 232TC3hlyC y el segundo grupo con una dosis de la cepa de tipo silvestre de *Mhyo* antes de ser modificada, la cepa 232 de *Mhyo*.

A los 28 días de la infección, los animales se sacrificaron y se observó que en la zona nasal no se había producido colonización en ninguno de los dos grupos de animales, mientras que el 25 % de los animales del grupo infectado con la cepa de tipo silvestre presentaba colonización en los bronquios.

Ninguno de los animales infectados con la cepa de *Mhyo* transformada presentó colonización en los bronquios.

Por lo tanto, la cepa de *Mhyo* transformada 232TC3hlyC presenta una atenuación con relación a la cepa parental de tipo silvestre, y como tal puede utilizarse como una candidata vacunal en una vacuna viva atenuada.

Mediante el método de la invención se obtuvo la cepa mutante de *Mhyo* 6314POGAc4. Dicha cepa mutante inhibe la expresión del gen de la hemolisina 159 de *Mhyo*, ya que la secuencia exógena de ADN incorporada mediante un plásmido replicativo (pOGA159) produjo un ARN antisentido correspondiente a un gen que codifica una hemolisina de *Mhyo*. Cuando los animales se infectaron con esta cepa, se observó que presentaba una atenuación con respecto a la cepa parental de tipo silvestre. Dicha cepa mutante se caracterizaba por una capacidad reducida para colonizar las vías respiratorias altas y bajas, así como por una capacidad reducida para provocar lesiones características de NEP.

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar al experto en la materia una explicación suficientemente clara y completa de la presente invención, pero no deben ser considerados como limitantes de los aspectos esenciales del objeto de la misma expuestos en las secciones anteriores de la presente descripción.

#### **Ejemplos**

Las técnicas y métodos de ADN recombinante aplicados a continuación están descritos detalladamente en los manuales de Sambrook y Russell, *Molecular Cloning* 3ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Nueva York 5 (2001) y de Ausubel *et al.*, *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1998).

La cepa de *E. coli* XL1-blue (Stratagene) se ha utilizado como hospedadora de los vectores basados en los plásmidos pMTn4001 o pBluescript II SK.

Todas las secuencias de ADN descritas en las construcciones de los plásmidos que se describen en esta sección provienen de la secuencia depositada con número AE017243 en la base de datos GenBank, siempre que no se indique lo contrario. Esta secuencia genómica corresponde a la de la cepa J de *Mhyo* descrita por Vasconcelos *et al.*, J. Bacteriol., 2005, 187(16), 5568-5577.

Todas las secuencias oligonucleotídicas descritas a continuación están escritas en sentido 5' a 3' a menos que se indique lo contrario. En todas las reacciones de PCR se utilizó la termopolimerasa Phusion (Finnzymes), que tiene actividad de corrección de errores.

Las secuencias oligonucleotídicas que aparecen subrayadas indican la presencia de un sitio para enzima de restricción que se especifica en el nombre de cada una de las secuencias.

#### **Ejemplo 1.- Elección de una cepa de *Mhyo***

Las cepas de tipo silvestre de *Mhyo* utilizadas han sido la 6314, que corresponde a un aislado virulento de *Mhyo* de Laboratorios Hipra S.A. (Amer-Girona-España) y la 232 procedente de Iowa State University (Ames-Iowa-EE.UU.).

**Ejemplo 2.- Construcción de plásmidos replicativos****Ejemplo 2.1.- Construcción del plásmido replicativo pOG**

Para obtener un plásmido replicativo en *Mhyo* se introdujo en un plásmido pBluescript II SK la región *oriC* de *Mhyo* amplificada mediante PCR. Para esta amplificación se utilizaron los oligonucleótidos 5OriCNotI (ATG CGC GGC CGC TTA TTT ATC AGA AAC AGT TAG) (SEQ ID NO: 9) y 3OriCXbaI (AGT CGG GCC CAG CTT GCG CAT CAT TGG ATG ATG GAT TC) (SEQ ID NO: 10) y como molde se usó ADN genómico de la cepa J de *Mhyo*. El fragmento de 1,96 kb obtenido se digirió posteriormente con las enzimas de restricción *NotI* y *XbaI*. Por otra parte, se amplificó por PCR el gen de resistencia a gentamicina (*aac(6')-aph(2'')*) mediante los oligonucleótidos 5GmORF (ACT GGG ATC CAT GAA TAT AGT TGA AA ATG) (SEQ ID NO: 11) y 3GmApa (GGA TGG GCC CAG CTT GCG CAT CAT TGG) (SEQ ID NO: 12), y usando el plásmido pIV-T como molde. El producto de PCR de 1,8 kb se digirió posteriormente con las enzimas de restricción correspondientes. La región promotora del gen de la proteína P97 se amplificó por PCR mediante los oligonucleótidos 5'p97XbaI (G ATC TCT AGA TCG AGG AAG ACT GAT TAG AAA TTT AGA ACT) (SEQ ID NO: 13) y 3'p97BamHI (GAT CGG ATC CAC TCA TAT TTT AAA CCT CAA TTA T) (SEQ ID NO: 14) usando ADN de la cepa J de *Mhyo* como molde. El producto de PCR (266 pb) se digirió posteriormente con las enzimas de restricción correspondientes. Finalmente, los tres fragmentos obtenidos se ligaron en el plásmido pBluescript II SK previamente digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*, y la mezcla de ligación se transformó en células de *Escherichia coli* XL1-blue. Entre las colonias resultantes de la transformación se identificaron las portadoras de la construcción deseada mediante análisis de patrones de restricción y secuenciación. Se seleccionó uno de los clones positivos para las etapas posteriores y se lo nombró pOG (Figura 1).

**Ejemplo 2.2.- Construcción del plásmido replicativo pOGCRE**

El plásmido replicativo pOGCRE se obtuvo digiriendo el plásmido pOG con las enzimas de restricción *BamHI* y *Apal*, y recuperando un fragmento de 5,1 kb. Por otra parte, el gen de resistencia a gentamicina (*aac(6')-aph(2'')*) se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pIV-T utilizando los oligonucleótidos 5GmORF y 3GmORFSpel (ACT GAC TAG TAG CTT GCG CAT CAT TGG) (SEQ ID NO: 15) obteniéndose un fragmento de 1,8 kb que se digirió posteriormente con las enzimas de restricción *BamHI* y *Spel*. El gen correspondiente a la recombinasa Cre se amplificó mediante PCR utilizando como molde el plásmido pSH62 (Euroscarf) y los oligonucleótidos 5CreBglII (ATG CAG ATC TAT GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA CCA AAA TTT G) (SEQ ID NO: 16) y 3CreApal (ATG CGG GCC CTTA ATC GCC ATC TTC CAG CAG GCG CAC) (SEQ ID NO: 17). El producto de PCR (1,0 kb) se escindió con las enzimas *BglII* y *Apal*. Por último, el plásmido pOG se digirió nuevamente, esta vez con las enzimas de restricción *BamHI* y *XbaI*, y se recuperó una banda de 266 pb correspondiente al promotor del gen de la proteína P97. Los cuatro fragmentos obtenidos se ligaron mediante T4 ADN ligasa y la reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* XL1-blue. Entre las colonias resultantes de la transformación se identificaron las portadoras de la construcción deseada mediante análisis de patrones de restricción. Se seleccionó uno de los clones positivos para las etapas posteriores y se lo nombró pOGCRE (Figura 1).

**Ejemplo 2.3.- Construcción del plásmido replicativo pOGC**

Para obtener el plásmido pOGC, el plásmido pBluescript II SK se digirió con la enzima *NotI* y una vez purificado se desfosforiló con la enzima fosfatasa alcalina. En paralelo, se obtuvo un fragmento de 992 pb por digestión del gen sintético ORF2v2 (SEQ ID NO: 5) con las enzimas de restricción *Spel* y *NotI*. Utilizando como molde el plásmido pOGCRE se amplificó un segmento de ADN con los oligonucleótidos 3gmORFSpel y 5OriCNotI mediante PCR, y una vez purificados se digirió el producto de PCR con las enzimas *Spel* y *NotI*. Los tres fragmentos obtenidos se ligaron mediante T4 ADN ligasa y la reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* XL1-blue. Los clones positivos se identificaron mediante mapeo de restricción y secuenciación (Figura 2).

**Ejemplo 2.4.- Construcción del plásmido replicativo pOGL**

Para obtener el plásmido pOGL, el plásmido pOGC se digirió con las enzimas *NotI* y *Spel* y se recuperaron las bandas de 2,8 kb y de 4 kb. El fragmento de ADN correspondiente a la banda de 2,8 kb se desfosforiló con fosfatasa alcalina. En paralelo, se obtuvo un fragmento de 2,25 kb por digestión del plásmido pTC3L (véase el Ejemplo 3.4) con las enzimas de restricción *Spel* y *NotI*. Los tres fragmentos obtenidos se ligaron mediante T4 ADN ligasa y la reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* XL1-blue. Los clones positivos se identificaron mediante mapeo de restricción y secuenciación (Figura 2).

**Ejemplo 2.5.- Construcción del plásmido replicativo pOGT**

Para obtener el plásmido pOGT, el plásmido pOGC se digirió con las enzimas *NotI* y *Spel* y se recuperaron las bandas de 2,8 kb y de 4 kb. El fragmento de ADN correspondiente a la banda de 2,8 kb se desfosforiló con fosfatasa alcalina. En paralelo, se obtuvo un fragmento de 2,23 kb de la digestión del plásmido pTC3T (véase el Ejemplo 3.5) con las enzimas de restricción *Spel* y *NotI*. Los tres fragmentos obtenidos se ligaron mediante T4 ADN ligasa y la reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* XL1-blue. Los clones positivos se identificaron mediante mapeo de restricción y secuenciación (Figura 2).

**Ejemplo 2.6.- Construcción del plásmido replicativo pOGA159**

El plásmido replicativo pOGA159 se construyó en dos etapas de clonación consecutivas. Mediante una reacción de PCR con los oligonucleótidos 5'p97Apal y 3TetMClal (TGT TAT CGA TACC GTC GAT GCA CCT CGA GCT AAG TTA TTT TAT TG) (SEQ ID NO: 18) y utilizando como molde el plásmido pMTn4001, se amplificó un fragmento de 2,2 kb correspondiente al promotor del gen de la proteína P97. Este producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *Clal* y *Apal*. Por otro lado, y utilizando como molde el plásmido pOG, se amplificó un fragmento de 1,9 kb con los oligonucleótidos 5OriCClal (AGA CAT CGA AAG CTT GAT TAT GCT GAT TGC ATT CTT TCA ATT TG) (SEQ ID NO: 19) y 5OriCEcoRI (AGA GGA AT CC GAT TTA TTT ATC AGA AAC AGT TAG TCT TTT CC) (SEQ ID NO: 20) correspondiente al *oriC* de *Mhyo*. Este producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Clal*. Posteriormente se amplificó mediante PCR un fragmento de 316 pb correspondiente al promotor del gen de la proteína P97, con los oligonucleótidos 5Xbalpp97 (AGA CTC TAG AAC TAG TGG ATC CCC CGG GCC CCT CGA GGA AGA CTG ATT AGA AAT TTA G) (SEQ ID NO: 21) y 3EcoRIpp97 (AGA CGA ATT CGA ATT CCT GCA GGG ATC CAC TCA TAT TTT AAA CCT C ) (SEQ ID NO: 22). Una vez purificado, este fragmento se digirió con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. La última etapa de este primer procedimiento de clonación consistió en digerir el plásmido pBluescript II SK con las enzimas de restricción *XbaI* y *Apal*. Estos 4 fragmentos de ADN se ligaron mediante T4 ADN ligasa y la reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* XL1-blue. Entre las colonias resultantes de la transformación se identificaron las colonias portadoras de la construcción deseada mediante análisis de patrones de restricción. El nuevo plásmido así obtenido se digirió con la enzima de restricción *EcoRI*. Por último se amplificó por PCR el ADN diseñado para el silenciamiento, con los oligonucleótidos 5ahlycEcoRI (CAT CGA ATT CAC GAA TTA GTG ATT CTG CCT TTT C) (SEQ ID NO: 23) y 3ahlycEcoRI (CAT CGA ATT CAT TAA AGT TGA TTC GGT GTT TAA TC) (SEQ ID NO: 24). Una vez digerido con la enzima de restricción *EcoRI* y desfosforilado mediante fosfatasa alcalina, los fragmentos de ADN obtenidos se ligaron mediante T4 ADN ligasa y la reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* XL1-blue. Entre las colonias resultantes de la transformación se identificaron las colonias portadoras de la construcción deseada mediante secuenciación (Figura 1).

**Ejemplo 3.- Construcción de plásmidos para la transformación por transposición****Ejemplo 3.1.- Construcción del plásmido pTC3 para la transformación por transposición**

El plásmido pMTn4001 (Pich *et al.*, Microbiology 152:519-527 (2006)) se amplificó por PCR con los oligonucleótidos 5pMTn4001PstI (CAT GCT GCA GCC CGG GGG ATC CAC TAG TTC TAG AG) (SEQ ID NO: 25) y 3pMTn4001 (GTA CCC AAT TCG CCC TAT AGT GAG TCG) (SEQ ID NO: 26). El oligonucleótido 3pMTn4001 se fosforiló en su extremo 5'. El producto de esta reacción de PCR (2,98 kb) se digirió con la enzima de restricción *PstI*. Por otra parte, el promotor del gen de la proteína P97 se amplificó mediante PCR con los oligonucleótidos 5'p97 (TCG AGG AAG ACT GAT TAA AAA TTT AGA ACT) (SEQ ID NO: 27) y 3'p97BamHI utilizando como molde ADN de la cepa J de *Mhyo*. Este producto de PCR (280 pb) se digirió con la enzima de restricción *BamHI* y se desfosforiló con fosfatasa alcalina. El mismo promotor también se amplificó mediante una segunda pareja de oligonucleótidos: 5'p97Apal (GAT CGG GCC CTC GAG GAA GAC TGA TTA GAA ATT TAG AAC T) (SEQ ID NO: 28) y 3'p97BamHI, y digirió con las enzimas de restricción *Apal* y *BamHI*. El gen de la transposasa se amplificó mediante PCR utilizando como molde el plásmido pMTn4001 y los oligonucleótidos 5'TnpBamHI (GAT CGG ATC CAT GAC CCA AGT ACA TTT TAC ACT GAA AAG) (SEQ ID NO: 29) y 3'TnpApal (GAT CCT CGA GGG GGG GCC CTT TTA CAC AAT TAT ACG GAC) (SEQ ID NO: 30). La banda de 978 pb obtenida se digirió posteriormente con las enzimas de restricción *BamHI* y *Apal*. Por último, el fragmento correspondiente a la resistencia a tetraciclina *tetM* se amplificó a partir del plásmido pMTnTetM438 (Pich *et al.*, Microbiology 152:519-527 (2006)) utilizando los oligonucleótidos 5'TetMBamHI (GAT CGG ATC CAT GAA AAT TAT TAA TAT TGG AGT T) (SEQ ID NO: 31) y 3' TetMPstI (GAT CGC TGC AGG AAT TCG ATA TCA AGC TTA TCG ATA CCG TCG ATG CAC CT) (SEQ ID NO: 32). El fragmento de 1,9 kb obtenido se digirió con las enzimas de restricción *Sall* y *BamHI* y se desfosforiló con fosfatasa alcalina. Los cinco fragmentos resultante se ligaron mediante T4 ADN ligasa y la reacción de ligación se transformó en células de *E. coli* XL1-blue. Entre las colonias resultantes de la transformación se identificaron las colonias portadoras de la construcción deseada mediante análisis de patrones de restricción y secuenciación. Se seleccionó uno de los clones positivos para las etapas posteriores y se lo nombró pTC3 (Figura 3).

**Ejemplo 3.2.- Construcción del plásmido pTC366 para la transformación por transposición**

Este plásmido procede directamente de pTC3 por la inclusión de dos secuencias *lox66* de 34 pb (ATA ACT TCG TAT AGC ATA CAT TAT ACG AAC GGT A) (SEQ ID NO: 33) flanqueando el gen de resistencia a tetraciclina. Para tal fin, la secuencia del gen TetMp97 de resistencia a tetraciclina del plásmido TC3 se amplificó por PCR con los oligonucleótidos 5loxp66Tetp97 (GAT TAA GGG CCC ATA ACT TCG TAT AGG ATA CTT TAT ACG AAG TTA TGT CGA CCC CCT CGA GGA AGA CTG) (SEQ ID NO: 34) y 3loxp66Tetp97 (GGG ACT AGT TAC GGT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TCT GCA GGA TAT CAA GCT TAT CGA TAC CGT CG) (SEQ ID NO: 35) obteniéndose un fragmento de PCR de 2,2 kb que se digirió con las enzimas de restricción *Apal* y *SpeI*. En paralelo, el plásmido TC3 se digirió con las mismas enzimas de restricción y se recuperó la banda de 4,4 kb. Los dos fragmentos se ligaron utilizando T4 ADN ligasa y la mezcla de ligación se transformó en células de *E. coli* XL1-blue. Entre las colonias resultantes de la transformación se identificó por secuenciación un clon positivo que había incorporado la secuencias *lox66* correctamente y que se denominó pTC366 (Figura 3).

**Ejemplo 3.3.- Construcción del plásmido pTC3C para la transformación por transposición**

5 Para obtener el plásmido pTC3C, el plásmido pTC366 se digirió con las enzimas *SpeI* y *NotI*. En este plásmido se clonó un fragmento de 992 pb procedente de la digestión el gen sintético ORF2v2 (SEQ ID NO: 5) con las mismas enzimas de restricción. Los clones positivos se identificaron mediante mapeo de restricción (Figura 3).

**Ejemplo 3.4.- Construcción del plásmido pTC3L para la transformación por transposición**

10 Mediante una reacción de PCR con los oligonucleótidos P46CtFdHindIII (GTG TAA GCT TAA AAA CCA GGA TGC ACA AAA TAA C) (SEQ ID NO: 36) y P46CtRv-NotI (TGT TGC GGC CGC TTT AGG CAT CAG GAT TAT CAA C) (SEQ ID NO: 37) y utilizando como molde ADN genómico de la cepa 232, se amplificó un fragmento de 1,0 kb correspondiente al extremo 3' del gen de la proteína P46. Este producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *HindIII* y *NotI*. Por otro lado, y utilizando como molde el mismo ADN genómico, se amplificó un fragmento de 276 pb con los oligonucleótidos P46NtFdSpeI (AGA CAC TAG TTT GAA TTT GTA TTT TCC ATA ATC) (SEQ ID NO: 38) y P46NtRvBamHI (AGA GGG ATC CTG TAA TTG TTG AAG TTG CTG CCT) (SEQ ID NO: 39). Este fragmento, que corresponde al promotor y al extremo 5' del gen de la proteína P46 se digirió posteriormente con las enzimas de restricción *SpeI* y *BamHI*. Por último, y utilizando como molde el plásmido pTC3C junto a los oligonucleótidos CircRv-NotI (TGT TGC GGC CGC TTA TGG TTC TAA TGG TGG ATC) (SEQ ID NO: 40) y Circ2Fd-BamHI (GTG TGG ATC CAT GAC ATA TCC AAG AAG AAG AT) (SEQ ID NO: 41) se amplificó el gen correspondiente a la proteína de la cápside de CVP2. Este fragmento de ADN de 712 pb se digirió a continuación con las enzimas de restricción *NotI* y *BamHI*. Todos los fragmentos obtenidos se clonaron en el plásmido pTC366 previamente digerido con las enzimas *SpeI* y *NotI*. Los clones positivos se identificaron mediante mapeo de restricción (Figura 3).

**Ejemplo 3.5.- Construcción del plásmido pTC3T para la transformación por transposición**

30 En este ejemplo, se utilizaron los oligonucleótidos P46NtFdSpeI y P46CIRCRv (ATC TTC TTC TTG GAT ATG TCA TGG CAT CAG GAT TAT CAA CAT TA) (SEQ ID NO: 42) para la amplificación por PCR de la región promotora y el extremo 5' de la región codificante del gen de la proteína P46 a partir de ADN genómico de la cepa 232. La banda obtenida de 1,25 kb se escindió con la enzima de restricción *SpeI*. En paralelo se realizó una segunda reacción de PCR con los oligonucleótidos P46CIRCFd (TAA TGT TGA TAA TCC TGA TGC CAT GAC ATA TCC AAG AAG AAG AT) (SEQ ID NO: 43) y CircRv-NotI sobre pTC3C, obteniendo un fragmento de ADN de 732 pb. Mediante una reacción de PCR recombinante en la que se utilizaron como molde los fragmentos anteriores y los oligonucleótidos P46NtFdSpeI y CircRv-NotI, se obtuvo un fragmento de 2,2 kb. Este fragmento se digirió con las enzimas de restricción *SpeI* y *NotI*, y se ligó con el plásmido pTC366 previamente digerido con las enzimas *SpeI* y *NotI*. Los clones positivos se identificaron mediante mapeo de restricción y secuenciación (Figura 3)

**Ejemplo 4.- Obtención de bacterias transformantes**

40 Todos los productos y reactivos utilizados en este método se esterilizaron mediante autoclavado, filtración o irradiación. El material de partida fue un cultivo de *Mhyo* en fase de crecimiento exponencial. Esta fase de crecimiento se obtiene preferentemente utilizando una dilución 1/100 del inóculo y dejando crecer el cultivo durante unas 48-144 horas en medio FriisHS (suero de caballo irradiado al 20 % (v/v) , extracto de levadura al 2,4 % (v/v), rojo de fenol al 0,1 % (v/v), "solución salina equilibrada de Hanks" al 0,4 % , "infusión de caldo de corazón" al 0,058 % (p/v), PPLO 0,054 % (p/v) y ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml). Una vez obtenidos unos 40 ml de cultivo de *Mhyo* en fase estacionaria se pipeteó 10 veces el contenido de los matraces de cultivo para separar las células y después se filtró el cultivo con un filtro de 0,45 µm para acabar de separar las mismas. Posteriormente, las células se centrifugaron durante 20 minutos a 20.000xg, se resuspendieron en tampón de electroporación (Sacarosa 272 mM, Hepes 200 mM pH 7,2) complementado con EDTA 1 mM y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Pasados los 10 minutos de incubación con EDTA se repitió la centrifugación a 20.000xg durante 20 minutos y las células se resuspendieron en un volumen de entre 100 y 300 µl de tampón de electroporación. En una cubeta de electroporación de 0,2 cm se añadieron 20 µg de plásmido, previamente disuelto en tampón de electroporación a una concentración de entre 0,5 y 2 µg.ml<sup>-1</sup> y la suspensión de células hasta un volumen final de 100 µl. En el momento de realizar la electroporación, las variables del electroporador se ajustaron a un voltaje de 2,5 kV, una resistencia entre 100 y 175 Ω y capacitancia de 25 µF. Los valores típicos obtenidos de "constante de tiempo" fueron de entre 2,3 y 3 ms. Una vez emitido el pulso eléctrico se añadieron 900 µl de medio FriisFBS (exactamente la misma formulación que el medio FriisHS, pero sustituyendo el suero de caballo por suero bovino fetal) y 20 µg adicionales de plásmido. La suspensión resultante se incubó durante 20 minutos en hielo y posteriormente 3 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 3 horas, la suspensión obtenida se distribuyó (unos 200 µl por placa) en placas de FriisHS complementado con agar de bajo punto de fusión al 0,7 % (p/v) y el antibiótico de selección deseado (tetraciclina 0,5 µg/ml y/o gentamicina 10 µg/ml).

65 Al cabo de 2 o 3 semanas de incubación a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % se recuperaron las colonias transformantes en las placas de Friis HS y se inocularon en matraces de 50 ml que contenían 10 ml de medio FriisHS complementado con el antibiótico selectivo a las concentraciones indicadas anteriormente. Una vez que el medio cambió de color (entre

10 y 20 días después de una incubación a 37 °C y 150 rpm) se realizaron estudios genotípicos y/o fenotípicos de los mutantes obtenidos, mediante la obtención de extractos proteicos o de los ADN genómicos como cualquier experto en la materia conoce.

#### 5 **Ejemplos 4.1. a 4.8. - Obtención de cepas mutantes de *Mhyo* transformadas**

Siguiendo sustancialmente el método descrito en el Ejemplo 4, se prepararon las cepas mutantes de *Mhyo* transformadas que se muestran en la Tabla I, usando los plásmidos que también se enumeran en la misma tabla.  
Tabla I

10

Ejemplo	Plásmido	Cepa parental	Cepa mutante transformada
4.1	pTC3C	232	232Cc6
4.2	pTC3C	6314	6314Cc1
4.3	pTC3L	232	232Lc2
4.4	pTC3T	232	232Tc2
4.5	pTC3	232	232TC3hlyC
4.6	pOG	232	232POGc9
4.7	pOGCRE	232	232POGCREc1
4.8	pOGA159	6314	6314POGAc4

Las cepas mutantes mostradas en la tabla se seleccionaron de los diferentes mutantes que se obtuvieron en la transformación llevada a cabo como se describe en el presente documento. Estas cepas se utilizaron en diferentes ensayos de vacunación y de grado de atenuación.

15

#### **Ejemplo 5.- Análisis de las cepas mutantes obtenidas por transformación con plásmidos replicativos**

##### **Ejemplo 5.1.- Análisis de las cepas mutantes obtenidas por transformación con el plásmido replicativo pOG**

20 Se empleó la cepa transformada en el Ejemplo 4.6, 232POGc9, para confirmar la presencia del plásmido en las células recuperadas de la transformación de las placas de agar de Friis y cultivadas en medio FriisHS con gentamicina 10 µg/ml.

25 Para tal fin, se realizó una extracción del ADN total de las mismas. El ADN obtenido se digirió con la enzima de restricción *ScaI*, que en este caso da lugar a la aparición de bandas fácilmente distinguibles en un gel de agarosa (Figura 4A).

30 La aparición de las bandas correspondientes al plásmido que destacan claramente sobre el fondo de ADN genómico, indica que el clon analizado contiene el plásmido y que este replica de forma estable para dar lugar a 25-30 copias de plásmido por célula.

El análisis de los resultados demuestra que los plásmidos replicativos de la invención se propagan de forma estable a la descendencia de las bacterias transformadas.

##### **Ejemplo 5.2.- Análisis de las cepas mutantes obtenidas por transformación con el plásmido replicativo pOGCRE**

La cepa transformada en el Ejemplo 4.7, 232POGCREc1, incluye el gen que codifica la proteína Cre.

40 Para comprobar si la introducción de genes heterólogos mediante plásmidos replicativos daba lugar a la expresión de las proteínas correspondientes en *Mhyo* de forma detectable, se analizó una extracción proteica total de los clones recuperados en los ensayos de transformación con el plásmido pOGCRE mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante y posteriormente se realizó una transferencia tipo Western para detectar por métodos inmunológicos la presencia de la recombinasa Cre (Figura 4B).

45

En este caso, la proteína Cre se detectó únicamente en la cepa que se había transformado con el plásmido pOGCRE, demostrando de esta manera la utilidad de los plásmidos replicativos para la expresión heteróloga de proteínas en *Mhyo*.

##### **Ejemplo 5.3.- Análisis de las cepas mutantes obtenidas por transformación con el plásmido replicativo pOGA159**

La cepa transformada en el Ejemplo 4.8, 6314pOGAc4, se empleó para confirmar la presencia del plásmido en las células recuperadas de la transformación de las placas de agar de Friis y cultivadas en medio FriisHS con

tetraciclina a 0,5 µg/ml. Para este fin, se purificó ADN total de las células. El ADN obtenido se analizó mediante un gel de agarosa, que en este caso da como resultado la aparición de bandas fácilmente distinguibles cuando se las compara con una preparación de DNA obtenida a partir de la cepa parental 6314 (Figura 4C).

## 5 **Ejemplo 6.- Análisis de las cepas mutantes obtenidas por transformación mediante transposición**

### **Ejemplo 6.1.- Análisis de las cepas mutantes obtenidas por transformación mediante transposición del plásmido pTC3**

10 Se analizaron distintos clones transformantes obtenidos por electroporación con el plásmido TC3, tanto por transferencia tipo Southern como por secuenciación directa del ADN genómico, para demostrar que los mutantes resistentes a tetraciclina eran el resultado de la presencia de una inserción de transposón en el cromosoma bacteriano.

15 Para asegurar que todos los clones obtenidos portaban una única inserción de transposón y que estas inserciones no se volvían a movilizar después de varias generaciones, se realizó una transferencia tipo Southern del ADN genómico de un clon obtenido mediante el plásmido pTC3 nombrado 232TC3hlyC. Este clon se nombró así ya que los resultados de secuenciación indicaron que el transposón se había insertado en la secuencia codificante del gen *hlyC* (base 843448 del genoma de la cepa 232, GenBank AE017332.1). Para tal fin, se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRV* tanto el ADN genómico de la cepa 232 como el de la cepa 232TC3hlyC. Se separaron los fragmentos resultantes en un gel de agarosa al 0,7 % y se transfirió a una membrana de nylon. Se generó una sonda con los oligonucleótidos SondaTet-5 (ATG AGT GGA TCC ATG AAA ATT ATT AAT ATT G) (SEQ ID NO: 44) y SondaTet-3 (CTA AGT TAT TTT ATT GAA CAT ATA TCG TAC TTT ATC) (SEQ ID NO: 45), mediante una reacción de PCR con dUTP marcado con digoxigenina utilizando como molde el plásmido pTC3. La sonda reconoce la secuencia del gen *TetM* de resistencia a tetraciclina, de forma que en el transferencia tipo Southern se detectaron las regiones del genoma donde se había producido la inserción del transposón (Figura 5A). El número y el tamaño de las bandas coincidían con los esperados teóricamente, indicando que los mutantes obtenidos por este método y tales vectores presentan una única copia de la inserción de transposón y que dicha inserción se mantiene estable después de varias generaciones.

### 30 **Ejemplo 6.2.- Análisis de las cepas mutantes obtenidas por transformación mediante transposición de los plásmidos pTC3C, pTC3L y pTC3T**

35 Se seleccionaron varios mutantes originados por cada transposón y se nombraron 6314Cc1, 232Cc6, 232Lc2, 232Tc2. Como se ha mencionado anteriormente se seleccionaron dos mutantes con el plásmido diseñado para expresión citosólica (uno para la cepa 6314, el 6314Cc1 y otro para la cepa 232, el 232Cc6) mientras que las versiones diseñadas para emplazarse en membrana sólo se han ejemplificado en la cepa 232, tal como el mutante procedente del plásmido pTC3L, el 232Lc2 y el mutante procedente del pTC3T, el 232Tc2.

40 Los puntos de inserción de los transposones de las versiones citosólicas (pTC3C) en el cromosoma bacteriano se determinaron por secuenciación directa del ADN genómico. Con respecto al genoma de la cepa 232 (GenBank AE017332.1), el transposón en el clon 6314Cc1 se insertó en la base 224547 mientras que el transposón en el clon 232Cc6 se insertó en la base 569253.

45 Para identificar la presencia de la proteína de la cápside de CVP2 y cuantificarla en las cepas de *Mhyo* obtenidas (232Lc2, 232Cc6, 232Tc2 y 6314Cc1), se utilizó un kit comercial (Ingenasa) que permite detectar y cuantificar dicho antígeno mediante inmunodetección en placa (ELISA). Los extractos proteicos se obtuvieron después de concentrar 100x los cultivos en fase exponencial de cada cepa y lisando las células obtenidas en PBS y Triton® X-100 a una concentración final del 0,1 % (v/v). Los resultados fueron positivos, indicando que todas las cepas y plásmidos probados expresan las proteínas codificadas por ORF2 u ORF2v2 en mayor o menor cantidad (Figura 5B).

50 Las cepas con la versión procedente del plásmido pTC3C también se analizaron mediante electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida y transferencia tipo Western (Figura 5C). Se detectaron bandas del mismo peso molecular que la proteína de la cápside de CVP2. De forma interesante, no apareció una banda de degradación proteolítica, un problema común en la expresión recombinante de proteínas. Todo ello sugiere que la proteína de cápside de CVP2 expresada de forma recombinante en *Mhyo* puede ser un buen antígeno para la formulación de una vacuna polivalente. Así mismo, se confirma que *Mhyo* es un buen hospedador para la expresión de proteínas recombinantes.

## 60 **Ejemplo 7.- Ensayos de vacunación**

### **Ejemplo 7.1.- Vacunación y exposición a CVP2**

65 Se analizó la eficacia de vacunas que contenían cepas de *Mhyo* transformadas preparadas como se describe en el presente documento, donde dichas cepas expresaban la proteína de la cápside del circovirus CVP2 en su citosol, y los animales se expusieron a una cepa patógena de CVP2.

Las respuestas que se valoraron fueron la respuesta inmunológica frente a *Mhyo* y frente a CVP2 determinadas mediante ELISA, y la carga de ADN vírico de CVP2 en el suero de los animales.

5 Para la prueba se seleccionaron 72 cerdos de 28 días de edad, que se distribuyeron al azar en 6 grupos de 12 animales cada grupo.

10 Dicha eficacia se analizó de acuerdo con un diseño factorial 2<sup>2</sup> con cuatro grupos de animales, en el cual los factores a valorar eran las cepas de *Mhyo* transformadas y el régimen de vacunación. Para este fin, se probaron vacunas que contenían las cepas 6314Cc1 o 232Cc6, y los animales se vacunaron siguiendo un régimen de dosis única o de revacunación con una dosis adicional.

Los grupos de ensayo realizados se muestran en la Tabla II:

Tabla II

Grupo	Revacunación	Cepa
1	No	6314Cc1
2	Sí	6314Cc1
3	No	232Cc6
4	Sí	232Cc6

15 Adicionalmente, se incorporaron al estudio dos grupos de animales: un grupo no vacunado, pero sí infectado (grupo 5), y un grupo no vacunado y no infectado (grupo 6).

20 Las vacunas comprendían las cepas mutantes de *Mhyo* inactivadas mediante un tensioactivo no iónico y una emulsión del tipo A/G/A como adyuvante, y se administraron por vía intramuscular en el cuello del animal.

25 El régimen de vacunación consistió en administrar una dosis de 2 ml de vacuna en el día 0 del estudio a todos los animales que no formaban parte de los grupos de control, y se revacunó a la mitad de los animales a los 14 días de la primera dosis.

Los animales de los grupos 5 y 6 recibieron 2 ml de PBS como placebo tanto el primer día como a los 14 días.

30 Para preparar los antígenos para las vacunas, las cepas de *Mhyo* transformadas se cultivaron en medio Friis con tetraciclina 0,5 µg/ml a una temperatura de 37 °C, en agitación entre 100 y 200 rpm hasta que se observó un cambio de color debido a un cambio en el pH del medio de cultivo.

35 Los cultivos se centrifugaron y se lavaron dos veces con PBS para obtener un cultivo concentrado 30 veces. El antígeno correspondiente a la cepa de *Mhyo* transformada 6314Cc1 presentó un título de 9,2 unidades de cambio de color/ml (UCC/ml log<sub>10</sub>) y el antígeno correspondiente a la cepa de *Mhyo* transformada 232Cc6 presentó un título de 9,45 UCC/ml log<sub>10</sub>. La producción de la proteína de la cápside de CVP2 se confirmó mediante ELISA (Ingezim PCV DAS, Ingenasa, España). La proteína total de cada antígeno fue respectivamente de 373 mg/l y 350,2 mg/l, determinado por el método del Azul de Coomassie.

40 Los antígenos se inactivaron con un tensioactivo no iónico y se usó como adyuvante una emulsión del tipo A/G/A tal como, por ejemplo, el producto Montanide® ISA 201 (SEPPIC, Francia), en una proporción 50:50 peso/peso.

45 Se recogieron muestras de sangre de los animales el día antes de la vacunación (día -1), el día 13 (el día anterior a la revacunación), el día 27 (anterior a la infección) y a los días 7, 14, y 21 después de la infección, que corresponden respectivamente a los días 35, 42 y 49 del estudio.

Se obtuvo suero para determinar la respuesta inmunológica frente a CVP2 mediante el kit CVP2 Antibody ELISA test (Biocheck, Países Bajos) y frente a *Mhyo* mediante CIVTEST SUIS Myo (Hipra, Girona-Amer, España), y también para el análisis de viremia por CVP2.

50 Las muestras de suero se obtuvieron los días -1, 13 y 27 y se analizaron por PCR convencional, tal como se describe en, por ejemplo, Quintana *et al.*, Veterinary Record, 2001, 149, 357-361, ya que se esperaba que fuesen negativos, mientras que las muestras recogidas los días 7 y 14 después de la infección se analizaron por PCR cuantitativa, como se describe en, por ejemplo, Olvera *et al.*, J. Virol. Meth., 2004, 117, 75-80.

55 Los animales de los grupos 1 a 5 se infectaron por vía intranasal con 2 ml (5,66 DICC<sub>50</sub>/ml log<sub>10</sub>) de una cepa de tipo silvestre virulenta de CVP2 (CVP2 Sp-107-54-13, Fort *et al.*, Vet. Immunol. Immunopathol., 2010, 137, 226-234) 28 días después de la administración de la primera dosis de la vacuna. Los animales del grupo 6 recibieron 2 ml de PBS por vía intranasal como placebo. Los animales fueron sacrificados el día 49 del estudio, esto es, 21 días después de la infección.

60

Durante el ensayo de infección-vacunación aleatorizado y con enmascaramiento completo, los animales se instalaron en habitaciones con nivel 3 de bioseguridad. El grupo 6 se colocó en una habitación separada para evitar infecciones cruzadas y, por tanto, fue el único grupo que permaneció sin enmascaramiento para el personal encargado del cuidado de los animales.

5 Teniendo en cuenta que los animales presentaban anticuerpos maternos frente a CVP2, los grupos se trataron en bloques con relación a este parámetro, para evitar diferencias iniciales entre los grupos.

10 El parámetro principal para la evaluación de la eficacia de la infección por CVP2 fue la reducción de la viremia por CVP2 determinada por PCR cuantitativa.

El parámetro principal para determinar la eficacia con relación a *Mhyo*, fue la seroconversión analizada por ELISA.

15 La respuesta serológica frente a *Mhyo* se muestra en la Figura 6. Las cuatro vacunas experimentales promovieron una seroconversión significativa en comparación con los grupos no vacunados (grupos 5 y 6) a partir del día 13 del estudio en adelante.

20 Después de la infección por CVP2, los grupos vacunados mostraron en el día 14 después de la infección una respuesta inmunológica mayor con relación al grupo no vacunado, pero sí infectado y, con excepción del grupo 4, también en el día 21 después de la infección.

El grupo no vacunado y no infectado presentó la disminución normal de los anticuerpos maternos frente a CVP2, con una diferencia significativa con el grupo no vacunado e infectado en el día 21 después de la infección.

25 No se observaron signos clínicos asociados a las infecciones por CVP2. Normalmente, los modelos de prueba de CVP2 son modelos subclínicos, y el parámetro clave para determinar la eficacia de la vacuna es la reducción de la viremia.

30 Todos los animales fueron negativos con respecto a CVP2, de acuerdo con el análisis realizado por PCR convencional antes de la infección. La Figura 8 muestra las copias genómicas de CVP2 que se cuantificaron en tiempo real por PCR a los 7 y a los 14 días después de la infección. No se detectaron copias genómicas de CVP2 en las muestras de suero del grupo no vacunado y no infectado.

35 El día 14 después de la infección la viremia por CVP2 fue significativamente inferior en los grupos vacunados en comparación con el grupo no vacunado, pero sí infectado.

40 Los resultados de este estudio indican que las cepas de *Mhyo* transformadas por los medios como se describe en el presente documento y que expresan la proteína de la cápside de CVP2 generan al mismo tiempo una respuesta inmunológica significativa frente a *Mhyo* y a circovirus porcino de tipo 2 (CVP2).

La respuesta inmunológica diferencial frente a CVP2 en los animales vacunados fue clara en el día 14 después de la infección, una vez que la infección por CVP2 se había establecido, tal como se deduce de la viremia por CVP2 que se observa en el grupo no vacunado e infectado (grupo 5).

45 La presencia de anticuerpos maternos frente a CVP2 impidió la evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna en ausencia de una infección experimental, a diferencia de lo que sucedió con *Mhyo*.

50 Al no poderse reproducir en un modelo experimental los signos clínicos correspondientes a lesiones macroscópicas debidas a la infección por CVP2, el resultado de la infección por CVP2 fue valorado en términos de viremia por PCR cuantitativa y la eficacia de la vacuna se demostró mediante la reducción de la viremia. Esta reducción se observó para las cuatro vacunas de prueba a los 14 días después de la infección, una vez que la viremia alcanza su nivel más alto.

55 Por lo tanto, las cepas de *Mhyo* transformadas que expresan la proteína de la cápside de CVP2 se pueden usar en vacunas frente a infecciones provocadas por *Mhyo* y por circovirus porcino de tipo 2 (CVP2) al mismo tiempo.

#### **Ejemplo 7.2.- Vacunación e infección con CVP2 y *Mhyo***

60 Se analizó la eficacia de una vacuna que contenía una cepa de *Mhyo* transformada preparada como se describe en el presente documento, donde dicha cepa expresaba la proteína de la cápside del circovirus CVP2 en su citosol. Los animales se expusieron a cepas patógenas de CVP2 y *Mhyo*.

Las respuestas que se valoraron fueron la carga de ADN vírico de CVP2 en el suero de los animales, el número de animales con viremia por CVP2 y las lesiones compatibles con *Mhyo* en los pulmones de los animales.

65

Para la prueba se seleccionaron 36 cerdos de 28 días de edad, que se distribuyeron al azar en 3 grupos de 12 animales cada uno.

5 Dicha eficacia se analizó con una vacuna que contenía la cepa 6314Cc1. Los animales del grupo 1 se vacunaron siguiendo un régimen de dosis única. Adicionalmente, se incorporaron al estudio dos grupos de animales: un grupo no vacunado, pero sí infectado (grupo 2), y un grupo no vacunado y no infectado (grupo 3).

10 La vacuna comprendía la cepa mutante de *Mhyo* inactivada mediante un tensioactivo no iónico y una emulsión del tipo A/G/A como adyuvante, y se administró por vía intramuscular en el cuello de los animales.

El régimen de vacunación consistió en la administración de una dosis de 2 ml de vacuna en el día 0 del estudio a todos los animales que no formaban parte de los grupos de control.

15 Los animales de los grupos 2 y 3 recibieron 2 ml de PBS como placebo.

Para preparar los antígenos de la vacuna, la cepa de *Mhyo* transformada se cultivó en medio Friis con tetraciclina 0,5 µg/ml a una temperatura de 37 °C y en agitación entre 100 y 200 rpm hasta que se observó un cambio de color debido a un cambio en el pH del medio de cultivo.

20 Los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron en PBS para obtener un cultivo concentrado 25 veces. El antígeno correspondiente a la cepa de *Mhyo* transformada 6314Cc1 tenía un título de 9,325 unidades de cambio de color/ml (UCC/ml log<sub>10</sub>). La producción de la proteína de la cápside de CVP2 se confirmó mediante ELISA (Ingezim PCV DAS, Ingenasa, España).

25 Los antígenos se inactivaron con un tensioactivo no iónico y como adyuvante se usó una emulsión del tipo A/G/A, por ejemplo el producto Montanide® ISA 201 (SEPPIC, Francia), en una proporción 50:50 en peso/peso.

30 Se recogieron muestras de sangre de los animales el día antes de la vacunación (día -1), a los días 13, 21 y 27 después de la vacunación, y a los días 7, 14, 21 y 28 después de la infección, que corresponden respectivamente a los días 35, 42, 49 y 56 del estudio.

Se obtuvo suero para determinar la viremia por CVP2 utilizando PCR cuantitativa, como se describe en, por ejemplo, Olvera *et al.*, citado anteriormente.

35 Los animales de los grupos 1 y 2 se infectaron por vía intranasal con 2 ml/animal (5,33 DICC<sub>50</sub>/ml log<sub>10</sub>) de una cepa de tipo silvestre virulenta de CVP2 (CVP2 Sp-107-54-13, Fort *et al.*, Vet. Immunol. Immunopathol., 2010, 137, 226-234) y con 10 ml/animal por vía intratraqueal con la cepa patógena de *Mhyo* 3371 (7,325 UCC/ml log<sub>10</sub>) a los 28 días después de la administración de la vacuna. Los animales del grupo 3 recibieron 2 ml de PBS por vía intranasal y 10 ml de PBS/animal por vía intratraqueal como placebo. Los animales se sacrificaron el día 56 del estudio, es decir, 40 28 días después de la infección, momento en el que se valoró la presencia de lesiones compatibles con *Mhyo* en los pulmones de los animales.

45 Durante el ensayo de infección-vacunación aleatorizado y con enmascaramiento completo, los animales se instalaron en habitaciones con el nivel 3 de bioseguridad. El grupo 3 se instaló en una habitación separada para evitar infecciones cruzadas y, por lo tanto, fue el único grupo que permaneció sin enmascaramiento para el personal encargado del cuidado de los animales.

50 Teniendo en cuenta que los animales tenían anticuerpos maternos anti- CVP2, los grupos se trataron en bloques con relación a este parámetro, para evitar diferencias iniciales entre los grupos.

El parámetro principal para la evaluación de la eficacia de la infección por CVP2 fue la reducción de la viremia por CVP2 determinada por PCR cuantitativa. El parámetro principal para determinar la eficacia con respecto a *Mhyo* fue la superficie pulmonar afectada por lesiones compatibles con *Mhyo*.

55 Todos los animales fueron negativos con respecto a CVP2 de acuerdo con el análisis realizado por PCR convencional antes de la infección experimental. La Figura 12 muestra las copias genómicas de CVP2 que se cuantificaron en tiempo real por PCR a los 7, 14, 21 y 28 días después de la infección. No se detectaron copias genómicas de CVP2 en las muestras de suero del grupo no vacunado y no infectado. Los días 14 y 21 después de la infección, la viremia por CVP2 fue significativamente inferior en el grupo vacunado en comparación con el grupo 60 no vacunado, pero sí infectado.

En la figura 13 se muestran los mismos resultados expresados como porcentaje de animales con viremia (positivos en la PCR cuantitativa).

En la figura 14 se muestra la mediana del porcentaje de superficie pulmonar afectada por lesiones compatibles con *Mhyo*. Se observó que la superficie pulmonar afectada en los animales vacunados era significativamente inferior a la de los animales no vacunados, pero sí infectados (grupo 2).

- 5 Los resultados de este estudio permitieron concluir que la cepa de *Mhyo* genéticamente modificada como se describe en el presente documento y que expresaba la proteína de la cápside de CVP2 generó al mismo tiempo una reducción significativa de la viremia por CVP2 y de las lesiones compatibles con *Mhyo*, en comparación con los animales no vacunados.
- 10 En consecuencia, las cepas de *Mhyo* transformadas que expresan la proteína de la cápside de CVP2 pueden utilizarse en vacunas frente a infecciones provocadas por *Mhyo* y por circovirus porcino de tipo 2 (CVP2) al mismo tiempo.

#### **Ejemplo 8.- Pruebas del grado de atenuación de las cepas mutantes transformadas**

##### **Ejemplo 8.1.- Análisis del grado de atenuación de una cepa mutante transformada que porta la inserción de transposón en el gen de la hemolisina C de *Mhyo***

20 En este ensayo se determinó el grado de atenuación de una cepa mutante de *Mhyo* obtenida por transposición mediante la valoración de la capacidad de dicha cepa para colonizar las vías respiratorias altas y bajas de un cerdo.

La cepa mutante probada, 232TC3hlyC, obtenida en el Ejemplo 4.5, presenta la inserción de transposón en el gen de la hemolisina C de *Mhyo* (*hlyC*).

- 25 Se seleccionaron cerdos de 8 semanas de edad, se distribuyeron al azar en 2 grupos de 8 animales cada uno, y cada grupo se mantuvo en habitaciones separadas para evitar infecciones cruzadas.

30 Los animales se sedaron antes de ser sometidos a la infección. Un grupo de animales se infectó por vía intratraqueal en el día 0, con 10 ml de la cepa mutante 232TC3hlyC, y el otro grupo con 10 ml de la cepa parental 232 de *Mhyo*. Los inóculos tenían un título de 7 UCC/ml log<sub>10</sub>. Los animales se sacrificaron en el día 28 del estudio.

Se recogieron muestras nasales los días -1 (día anterior a la infección), 8, 15, 21 y 28 para realizar un análisis de *Mhyo* por PCR anidada.

- 35 Se recogieron muestras bronquiales el día 28 de los animales sacrificados para realizar un análisis de *Mhyo* también por PCR anidada.

40 No se detectaron animales que portaran ADN genómico de *Mhyo* en las muestras nasales recogidas durante todo el tiempo que duró el estudio. Sin embargo, la cepa de tipo silvestre 232 de *Mhyo* se detectó en el 25 % de las muestras bronquiales de los animales, mientras que para la cepa mutante transformada fue del 0 %.

Este resultado sugiere que la cepa mutante 232TC3hlyC muestra un comportamiento atenuado en comparación con la cepa parental de la que proviene, con relación a la colonización de las vías respiratorias bajas; por lo tanto puede utilizarse como candidata atenuada en una vacuna frente a *Mhyo*.

##### **Ejemplo 8.2.- Análisis del grado de atenuación de una cepa mutante transformada que presenta inhibición de la expresión del gen de la hemolisina 159 de *Mhyo***

50 En otra prueba se determinó el grado de atenuación de la cepa 6314POGAc4, obtenida en el Ejemplo 4.8, que presenta inhibición de la expresión del gen de la hemolisina 159 de *Mhyo*.

Se seleccionaron cerdos de 8 semanas de edad, se distribuyeron al azar en 3 grupos de 8 animales cada uno y se mantuvieron en habitaciones separadas para evitar infecciones cruzadas.

- 55 El día 0 de la prueba, a los animales del grupo 1 se le inoculó por vía intratraqueal 10 ml de la cepa 6314POGAc4 con una concentración de 8 UCC/ml log<sub>10</sub>, y a los animales del grupo 2 se les administró la misma cantidad de la cepa parental de tipo silvestre 6314. Los animales se sedaron antes de ser sometidos a la infección. El grupo 3 fue el grupo control no infectado. Los animales se sacrificaron el día 28 del estudio.

60 Se recogieron muestras de sangre el día anterior a la infección (día -1) y en los días 15 y 28. Se analizó la serología de *Mhyo* mediante el CIVTEST SUIS *Mhyo* (Hipra-Amer-Girona-España). Se recogieron muestras nasales los días -1, 8, 15, 21 y 28 para realizar un análisis de *Mhyo* por PCR anidada.

65 Se recogieron muestras bronquiales el día 28 de los animales sacrificados para realizar un análisis de *Mhyo* también por PCR anidada.

Se puntuaron las lesiones pulmonares macroscópicas de bronconeumonía catarral compatible con una infección por *Mhyo*. Cada lóbulo pulmonar se puntuó entre 0 y 5 de acuerdo con la proporción de tejido con lesiones provocadas por *Mhyo*.

5 La contribución de cada lóbulo pulmonar a la superficie total del pulmón afectada se calculó aplicando el método descrito en Christensen *et al.*, *Diseases of the respiratory system*. En: *Diseases of Swine*. 8ª Edición. Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W.L. y Taylor D.J. Iowa State University Press, Ames (IA) 1999, página 914.

10 La Figura 9 muestra la respuesta serológica frente a la infección por *Mhyo*. Se puede observar que solamente la cepa parental de tipo silvestre (grupo 2) presentó seroconversión a los 28 días después de la infección, con una diferencia significativa con respecto al grupo 1, infectado con la cepa mutante transformada 6314POGAc4, y al grupo control.

15 La Figura 10 muestra que *Mhyo* solamente se detectó en las muestras nasales del grupo 2 a los 21 y 28 días después de la infección. En los 8 animales del grupo 2 se detectó *Mhyo* en las muestras bronquiales recogidas el día 28, mientras que el número fue significativamente inferior en el grupo al que se le administró la cepa mutante transformada de la invención.

20 En la Figura 11 se puede observar que las lesiones pulmonares macroscópicas provocadas por *Mhyo* fueron significativamente mayores en el grupo 2, infectado con la cepa parental de tipo silvestre, mientras que los animales infectados con la cepa mutante de la invención presentaron lesiones más pequeñas, comparables a las observadas en el grupo no infectado.

25 Por lo tanto, se puede concluir que la cepa mutante transformada de la invención analizada en este ejemplo muestra una capacidad reducida para colonizar las vías respiratorias altas y bajas y también una capacidad reducida para provocar lesiones pulmonares asociadas a la NEP.

30 Todo ello sugiere que dicha cepa mutante transformada puede usarse para preparar vacunas atenuadas frente a NEP y patologías asociadas a *Mhyo*.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> HIPRA SCIENTIFIC, S.L.U.

35 <120> Cepas mutantes de of *Mycoplasma hyopneumoniae*

<130> 102310PEP757L

40 <140> EP12382277.7

<141> 10-07-2012

<160> 45

45 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 265

<212> ADN

50 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 1

**gaagactgat tagaaattta gaactattca aatctttcaa aaaagtggcc taaaaacaat 60**

**gataaaaaaa tttccaaact tttttgttgc aaaaaaaaaa aaaaaaagta taattttaat 120**

**tgtacaagtt aaataaattt ttcaattatc tttttttatt ttgcaaaact tttaaaaaaa 180**

**ttagatatct aaattatatt atatgattga gaaaatgaaa aatttatttc ctagaaccaa 240**

**gataattgag gtttaaaata tgagt 265**

<210> 2

55 <211> 263

<212> ADN

ES 2 745 720 T3

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 2

ttgaatttgt attttccata atctaaaatt ttacattttt ttataacaat ttttaaaaat 60  
 taccctttaa tttatagtat ttttttattt tttagtctaa attataaaat tatcttgaat 120  
 tttatttgaa tttttataat ttagtactaa aaaatacaaa tattttttcc tattctaaga 180  
 aaaattcatt ttttaaaaaa aattgatttt tatagtataa tttatttgta taattgaatt 240  
 aacttgattt gaaaggaac aaa 263

5

<210> 3

<211> 699

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> gen sintético

<400> 3

atgacatatc caagaagaag atatagaaga agaagacata gaccaagatc acatttagga 60  
 caaattttta gaagaagacc atgattagtt catccaagac atagatatag atgaagaaga 120  
 aaaaatggaa tttttaatac aagattatca agaacatttg gatatacagt taaaagaaca 180  
 acagttacaa caccatcatg agcagttgat atgatgagat ttaaattga tgattttggt 240  
 ccaccaggag gaggaacaaa taaaatttca attccatttg aatattatag aattagaaaa 300  
 gttaaagttg aattttgacc atgttcacca attacacaag gagatagagg agttggatca 360  
 acagcagtta ttttagatga taattttggt acaaaagcaa cagcattaac atatgatcca 420  
 tatgttaatt attcacaaag acatacaatt ccacaacat tttcatatca ttcaagatat 480  
 tttacaccaa aaccagtttt agattcaaca attgattatt ttcaaccaa taataaaaga 540  
 aatcaattat gattaagatt acaaacatca ggaaatggtg atcatggttg attaggaaca 600  
 gcatttgaaa attcaaaata tgatcaagat tataatatta gagttacaat gtatgttcaa 660  
 tttagagaat ttaatttaaa agatccacca ttagaacca 699

15

<210> 4

<211> 702

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> gen sintético

25

<400> 4



ES 2 745 720 T3

<212> PRT

<213> Circovirus porcino de tipo 2 (CVP2)

<400> 6

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg  
 1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro  
 20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Arg Thr Thr Val Thr Thr  
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Lys Ile Asp Asp Phe Val  
 65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr  
 85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr  
 100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn  
 115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr  
 130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr  
 145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro  
 165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Gly Asn  
 180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp  
 195 200 205

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe  
 210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro  
 225 230

5

# ES 2 745 720 T3

5	<210> 7 <211> 26 <212> ADN <213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
	<400> 7 <b>gataaagtcc gtataattgt gtaaaa</b>	26
10	<210> 8 <211> 26 <212> ADN <213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
15	<400> 8 <b>ttttacacaa ttatacggac tttatc</b>	26
20	<210> 9 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador	
	<400> 9 <b>atgcgcggcc gcttatttat cagaaacagt tag</b>	33
30	<210> 10 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
	<400> 10 <b>agtggggccc agcttgcgca tcattggatg atggattc</b>	38
40	<210> 11 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<400> 11 <b>actgggatcc atgaatatag ttgaaaatg</b>	29
50	<210> 12 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador	
	<400> 12 <b>ggatgggccc agcttgcgca tcattgg</b>	27
60	<210> 13	

ES 2 745 720 T3

	<211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> cebador	
	<400> 13 <b>gatctctaga tcgaggaaga ctgattagaa atttagaact</b>	<b>40</b>
10	<210> 14 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
	<400> 14 <b>gatcggatcc actcatattt taaacctcaa ttat</b>	<b>34</b>
20	<210> 15 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador	
30	<400> 15 <b>actgactagt agcttgcgca tcattgg</b>	<b>27</b>
35	<210> 16 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 16 <b>atgcagatct atgtccaatt tactgaccgt acacccaaat ttg</b>	<b>43</b>
45	<210> 17 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
	<400> 17 <b>atgctggccc ttaatcgcca tcttccagca ggcgcac</b>	<b>37</b>
55	<210> 18 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador	
	<400> 18	

	<b>tgttatcgat accgtcgatg cacctcgagc taagttattt tattg</b>	<b>45</b>
	<210> 19	
	<211> 44	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 19	
	<b>agacatcgaa agcttgatta tgctgattgc attctttcaa ttg</b>	<b>44</b>
	<210> 20	
15	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> cebador	
	<400> 20	
	<b>agaggaatcc gatttattta tcagaaacag ttagtctttt cc</b>	<b>42</b>
25	<210> 21	
	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador	
	<400> 21	
	<b>agactctaga actagtggat cccccgggcc cctcgaggaa gactgattag aaatttag</b>	<b>58</b>
35	<210> 22	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 22	
	<b>agacgaattc gaattcctgc agggatccac tcatatttta aacctc</b>	<b>46</b>
45	<210> 23	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 23	
55	<b>catcgaattc acgaattagt gattctgcct tttc</b>	<b>34</b>
	<210> 24	
	<211> 35	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	

ES 2 745 720 T3

	<400> 24 <b>catogaattc attaaagttg attcgggtgtt taatc</b>	35
5	<210> 25 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 25 <b>catgctgcag cccgggggat ccactagttc tagag</b>	35
15	<210> 26 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 26 <b>gtaccaatt cgccttatag tgagtcg</b>	27
25	<210> 27 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 27 <b>tcgaggaaga ctgattagaa atttagaact</b>	30
35	<210> 28 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador	
	<400> 28 <b>gatcgggccc tcgaggaaga ctgattagaa atttagaact</b>	40
45	<210> 29 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
	<400> 29 <b>gatcgggatcc atgaccaag tacattttac actgaaaag</b>	39
55	<210> 30 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador	

ES 2 745 720 T3

	<400> 30 <b>gacccctcgag ggggggcct ttacacaat taccggac</b>	39
5	<210> 31 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 31 <b>gacggatcc atgaaaatta ttaatttgg agtt</b>	34
15	<210> 32 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 32 <b>gacgctgca ggaattcgat atcaagctta tcgataccgt cgatgcacct</b>	50
30	<210> 33 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
35	<400> 33 <b>ataacttctg atagcataca ttatcgaac ggta</b>	34
40	<210> 34 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
45	<400> 34 <b>gattaagggc ccataacttc gtataggata ctttatacga agttatgtcg accccctoga</b>	60
	<b>ggaagactg</b>	69
50	<210> 35 <211> 74 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
55	<400> 35 <b>gggactagtt acggttcgt taatgtatgc taccgaagt tatctgcagg atatcaagct</b>	60
	<b>tatcgatacc gtcg</b>	74
	<210> 36	

ES 2 745 720 T3

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

5

<220>  
 <223> cebador

<400> 36  
**gtgtaagctt aaaaaccagg atgcacaaaa taac** 34

10

<210> 37  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> cebador

<400> 37  
**tgttgcggcc gctttaggca tcaggattat caac** 34

20

<210> 38  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> cebador

30

<400> 38  
**agacactagt ttgaatttgt attttocata atc** 33

35

<210> 39  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> cebador

<400> 39  
**agagggatcc tgtaattggt gaagttgctg cct** 33

45

<210> 40  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> cebador  
 <400> 40  
**tgttgcggcc gcttatgggt ctaatgggtg atc** 33

55

<210> 41  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> cebador

<400> 41

	<b>gtgtggatcc atgacatatc caagaagaag a</b>	<b>31</b>
5	<210> 42 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 42 <b>atcttcttct tggatatgtc atggcatcag gattatcaac atta</b>	<b>44</b>
15	<210> 43 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 43 <b>taatgttgat aatcctgatg ccatgacata tccaagaaga agat</b>	<b>44</b>
25	<210> 44 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 44 <b>atgagtggat ccatgaaaat tattaatatt g</b>	<b>31</b>
35	<210> 45 <211> 36 <212> ADN <213> <i>Enterococcus faecalis</i>	
40	<400> 45 <b>ctaagttatt ttattgaaca tatatcgtac tttatc</b>	<b>36</b>

## REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una cepa mutante de *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhyo*), caracterizado porque comprende la etapa de transformar una cepa de *M. hyopneumoniae* mediante el uso de un vector portador que  
 5 comprende al menos una secuencia exógena de ADN, estando la secuencia bajo el control de una secuencia de ADN de una región promotora de *M. hyopneumoniae*,  
 donde el vector portador es un vector plasmídico replicativo que comprende:  
 1) una secuencia de ADN que comprende la región *oriC* de una cepa de *Mycoplasma* sp., la cual es *Mycoplasma hyopneumoniae*, y  
 10 2) una secuencia exógena de ADN que comprende un gen marcador y, opcionalmente, una secuencia exógena de ADN adicional, que están bajo control de una secuencia de ADN de una región promotora de *Mhyo*,  
 donde la región promotora de *Mhyo* corresponde a un segmento de ADN que comprende entre 50 pares de bases y 300 pares de bases ubicadas en el lado 5' del gen de una proteína de *Mhyo* seleccionada del grupo formado por las  
 15 proteínas P36, P46, P65, P76, P97, P102, P146 y P216,  
 donde la región promotora de *Mhyo* inicia o promueve la transcripción de una secuencia de ADN de *Mhyo*, y  
 donde la secuencia exógena de ADN se introduce de forma estable en el citosol o en el genoma de la cepa de *Mhyo*.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia exógena de ADN se selecciona  
 20 del grupo que comprende un gen de resistencia a un antibiótico, un gen que codifica una recombinasa, un gen que codifica una transposasa, una secuencia diana de transposasa, un fragmento de ADN procedente de *Mhyo*, un gen que codifica un componente antigénico de un microorganismo que provoca enfermedades porcinas, y combinaciones de los mismos.
3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la secuencia  
 25 exógena de ADN adicional se selecciona del grupo formado por la secuencia de ADN que codifica la proteína de la cápside del circovirus porcino de tipo 2 (CVP2) y la secuencia de ADN que codifica una proteína que comprende la proteína de la cápside del circovirus porcino de tipo 2 (CVP2) que porta adicionalmente los aminoácidos MetSerGlySer en el extremo N-terminal de dicha proteína, codificando dicha secuencia exógena de ADN adicional la  
 30 proteína de la cápside de CVP2 que se selecciona del grupo formado por la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la región promotora  
 35 de *Mhyo* comprende la región promotora del gen de una proteína de *Mhyo* seleccionada del grupo formado por las proteínas P46 y P97.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque la región promotora de *Mhyo* comprende la  
 región promotora del gen de la proteína P46 de *Mhyo*.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque la región promotora de *Mhyo* comprende la  
 40 región promotora del gen de la proteína P97 de *Mhyo*.
7. Un vector plasmídico replicativo, caracterizado porque comprende:  
 1) una secuencia de ADN que comprende la región *oriC* de una cepa de *Mycoplasma* sp., que es *Mycoplasma*  
 45 *hyopneumoniae*, y  
 2) una secuencia exógena de ADN que comprende un gen marcador y, opcionalmente, una secuencia exógena de ADN adicional que está bajo el control de una secuencia de ADN de una región promotora de *Mhyo*,  
 donde la región promotora de *Mhyo* corresponde a un segmento de ADN que comprende entre 50 pares de bases y 300 pares de bases ubicadas en el lado 5' del gen de una proteína de *Mhyo* seleccionada del grupo formado por las  
 50 proteínas P36, P46, P65, P76, P97, P102, P146 y P216, y  
 donde la región promotora de *Mhyo* inicia o promueve la transcripción de una secuencia de ADN de *Mhyo*.
8. El vector plasmídico replicativo de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque la secuencia exógena de  
 ADN adicional se selecciona del grupo formado por la secuencia que codifica la proteína de la cápside del circovirus  
 55 porcino tipo 2 (CVP2) y la secuencia que codifica una proteína que comprende la proteína de la cápside del circovirus porcino tipo 2 (CVP2) que porta adicionalmente los aminoácidos MetSerGlySer en el extremo N-terminal de dicha proteína, seleccionándose dicha secuencia de ADN que codifica la proteína de la cápside del CVP2 del grupo formado por la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
9. El vector plasmídico replicativo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado porque  
 60 la región promotora de *Mhyo* comprende la región promotora del gen de una proteína de *Mhyo* seleccionada del grupo formado por las proteínas P46 y P97.

10. Una cepa mutante de *Mhyo*, caracterizada porque comprende el vector plasmídico replicativo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 5 11. Una vacuna para proteger a los cerdos frente a la neumonía enzoótica porcina provocada por *Mhyo*, y opcionalmente frente a otra enfermedad o afecciones patológicas adicionales que afectan a los cerdos, que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de la cepa mutante de *Mhyo* como se define en la reivindicación 10.
- 10 12. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizada porque la otra enfermedad o las afecciones patológicas adicionales que afectan a los cerdos están provocadas por un microorganismo, que se selecciona del grupo formado por *Actinobacillus* sp., *Brachyspira* sp., *Pasteurella multocida*, *Salmonella* sp., *Streptococcus* sp., *Isospora* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira* sp., *Staphylococcus* sp., *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium* sp., *Mycoplasma* sp., *Lawsonia intracellularis*, *Escherichia coli*, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, virus de la gripe porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, parvovirus porcino, virus de la encefalomiocarditis, coronavirus, rotavirus, circovirus porcino, agente del síndrome del fallo del desarrollo peridestete porcino, virus de la peste porcina clásica, virus de la peste porcina africana, calicivirus y torque teno virus (TTV).
- 15 13. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizada porque la otra enfermedad o las afecciones patológicas adicionales que afectan a los cerdos están provocadas por circovirus porcino.
- 20 14. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizada porque comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante.
- 25 15. Un kit de vacunación para vacunar cerdos frente a una infección o enfermedad provocada por *Mhyo* y opcionalmente frente a otra enfermedad o afecciones patológicas provocadas por microorganismos que afectan a los cerdos, que comprende un recipiente que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de la cepa mutante como se define en la reivindicación 10.

FIGURA 1

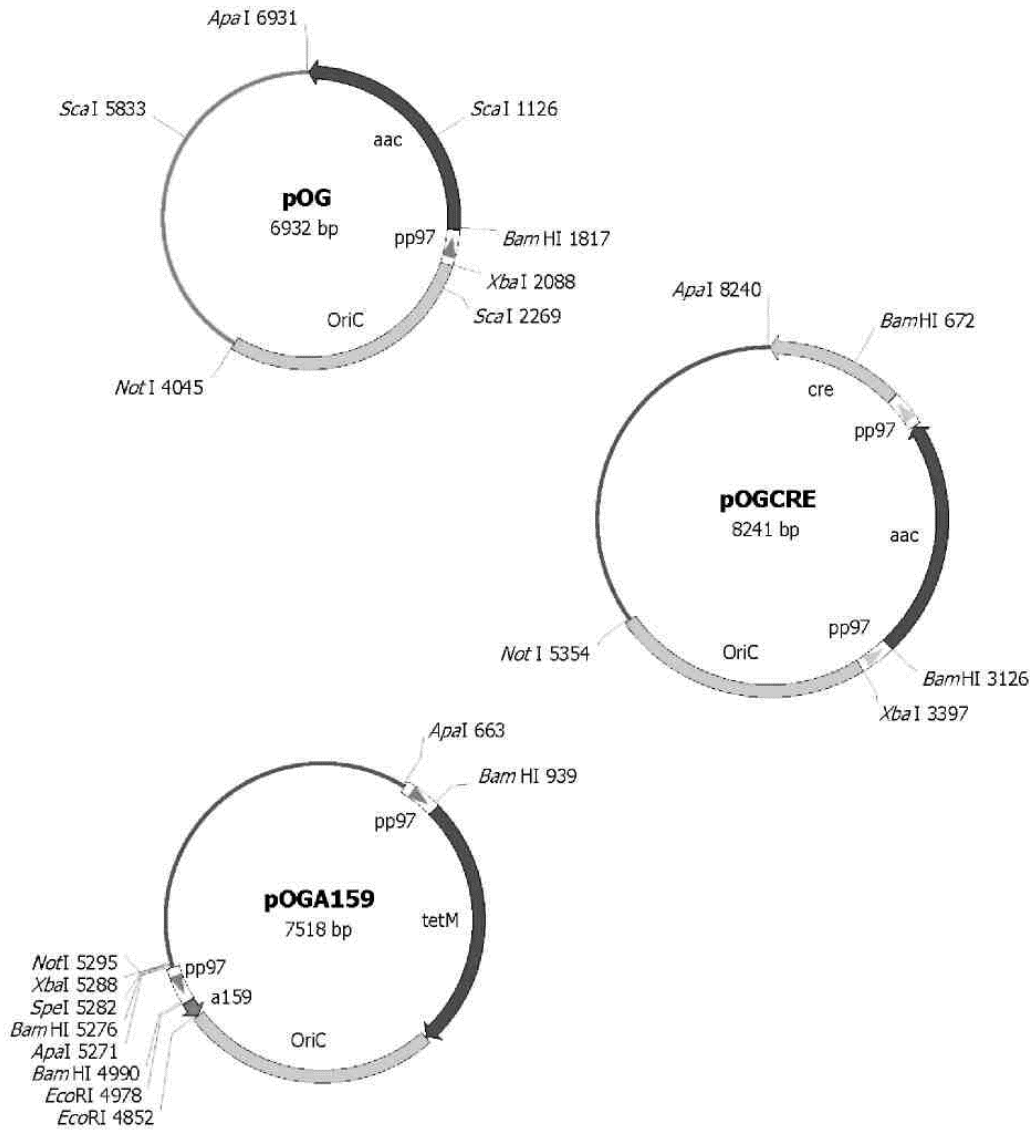


FIGURA 2

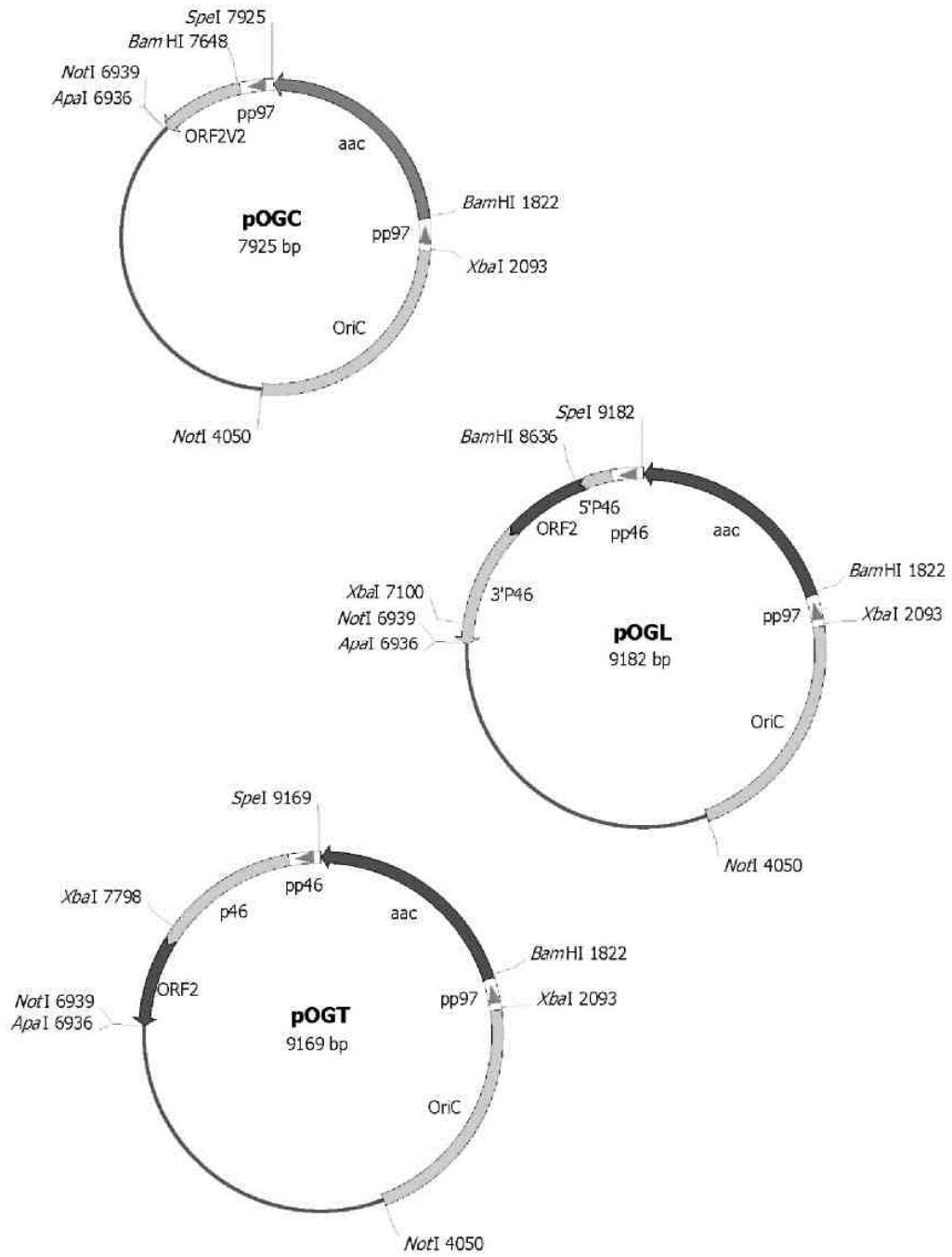


FIGURA 3

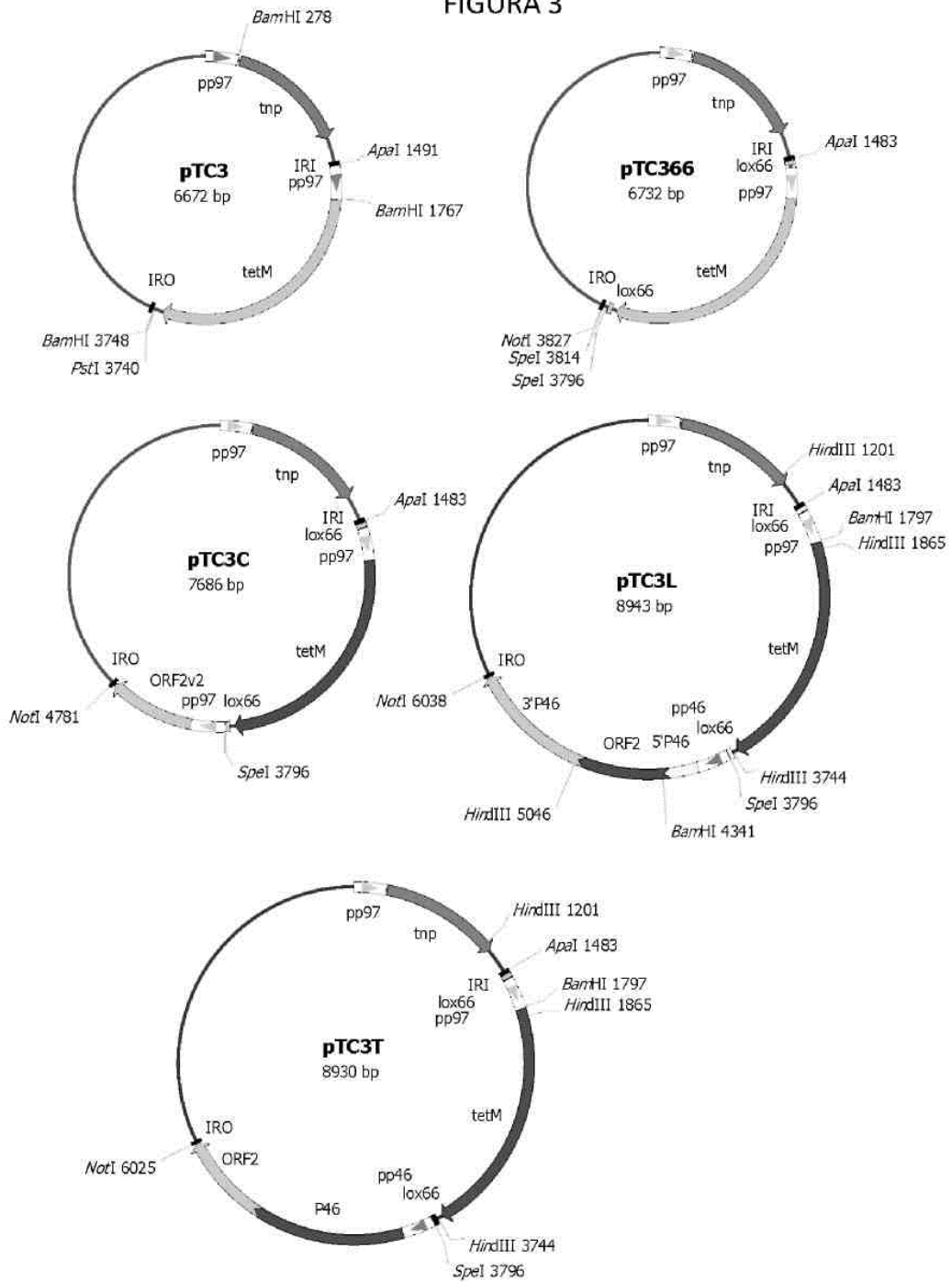
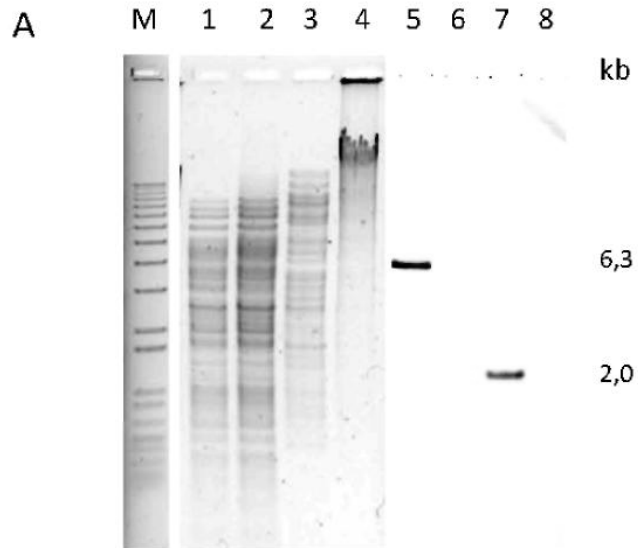




FIGURA 5



**B**

	6314Cc1	232Cc6	232Lc2	232Tc2	C+	C-
Dilución 1/2	-	-	1,147		1,479	0,109
Dilución 1/25	-	-	0,19	1,672		
Dilución 1/50	-	-	-	-		
Dilución 1/100	-	-	-	0,612		
Dilución 1/250	0,753	0,154	-	-		
Dilución 1/500	0,123	0,079	-	-		

**C**

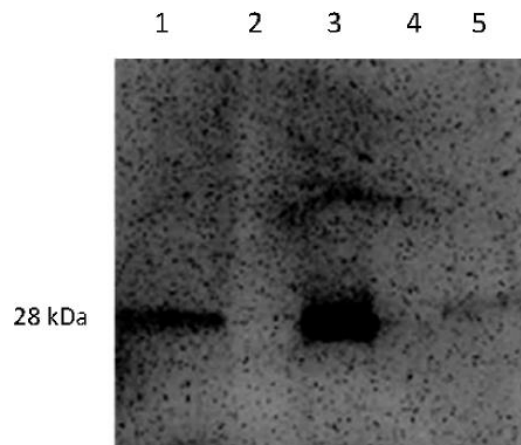


FIGURA 6

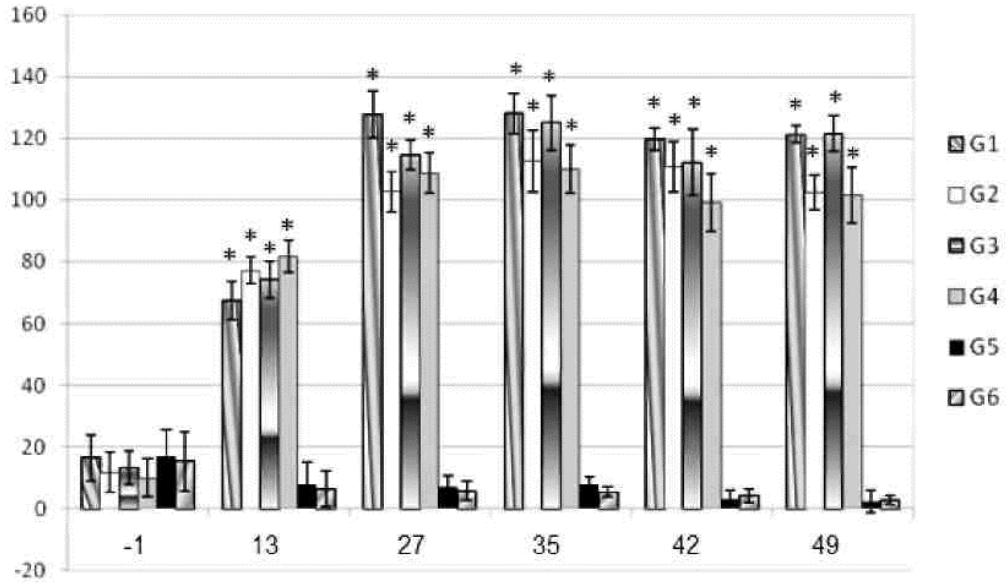


FIGURA 7

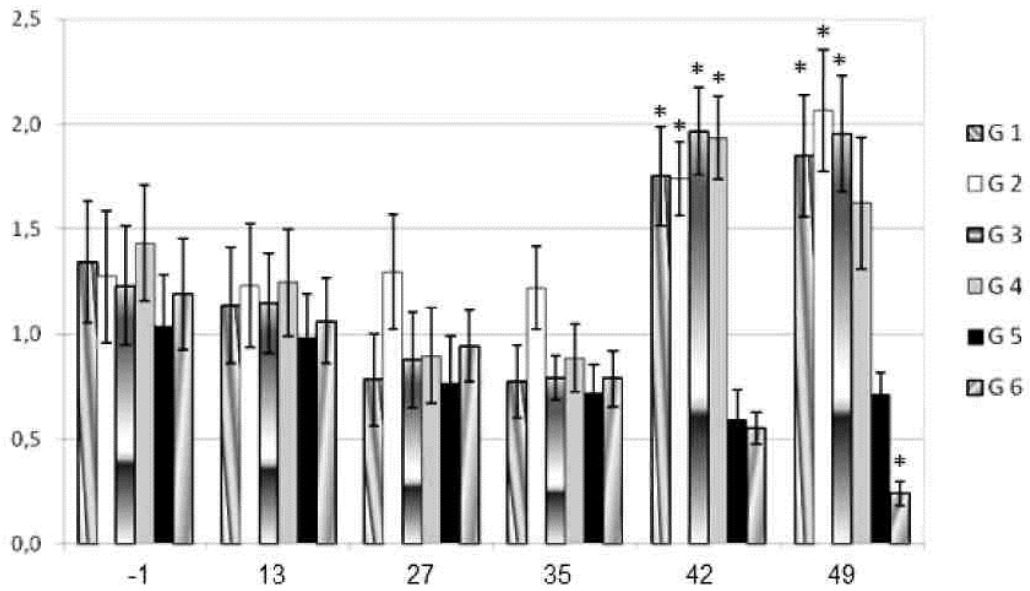


FIGURA 8

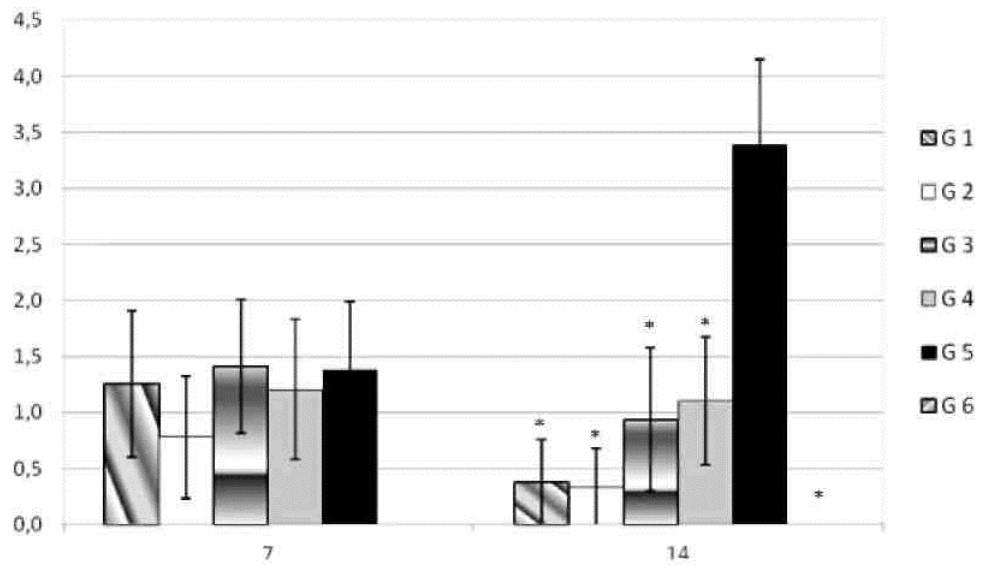


FIGURA 9

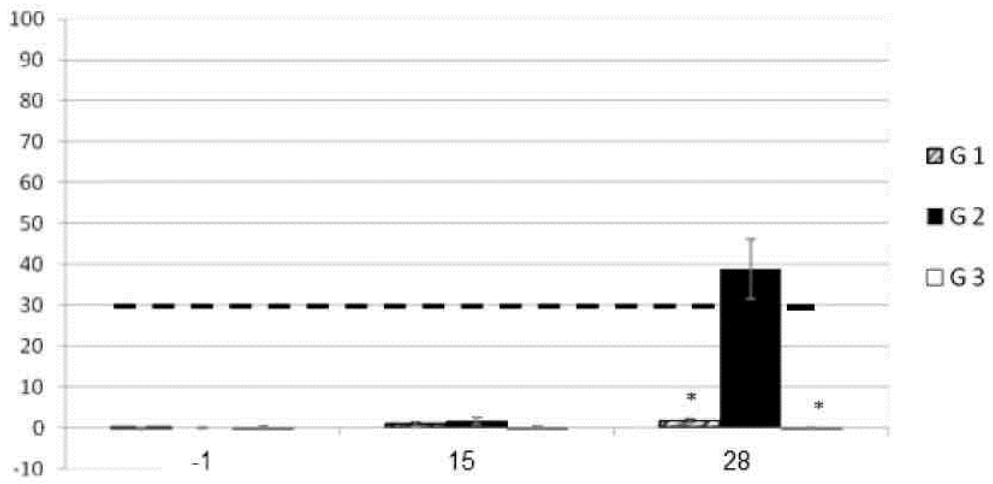


FIGURA 10

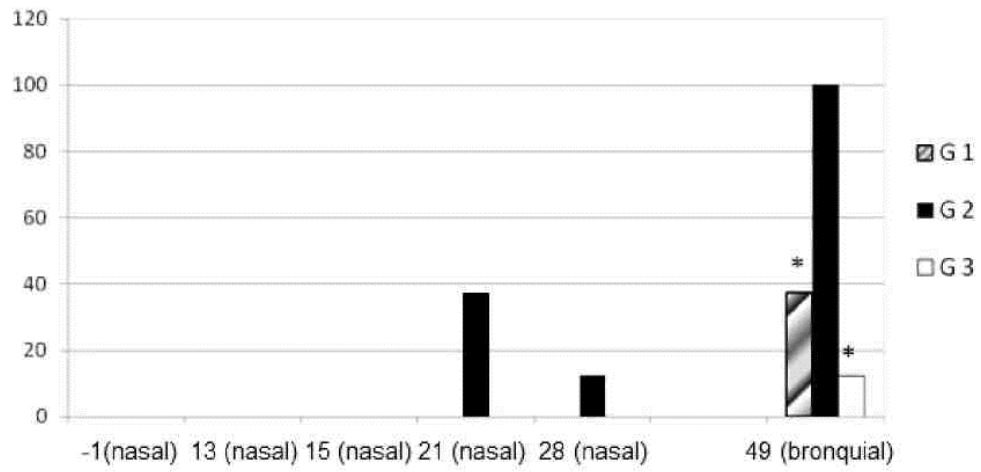


FIGURA 11

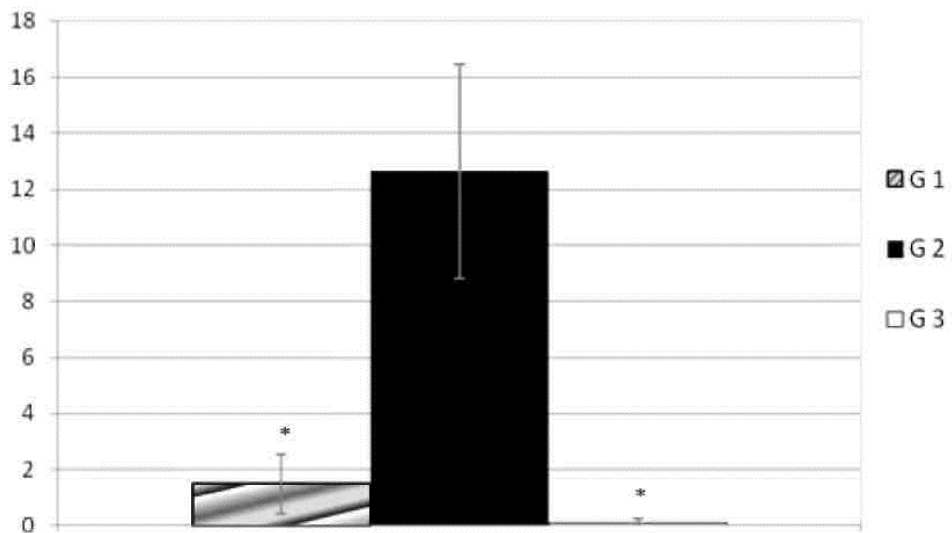


FIGURA 12

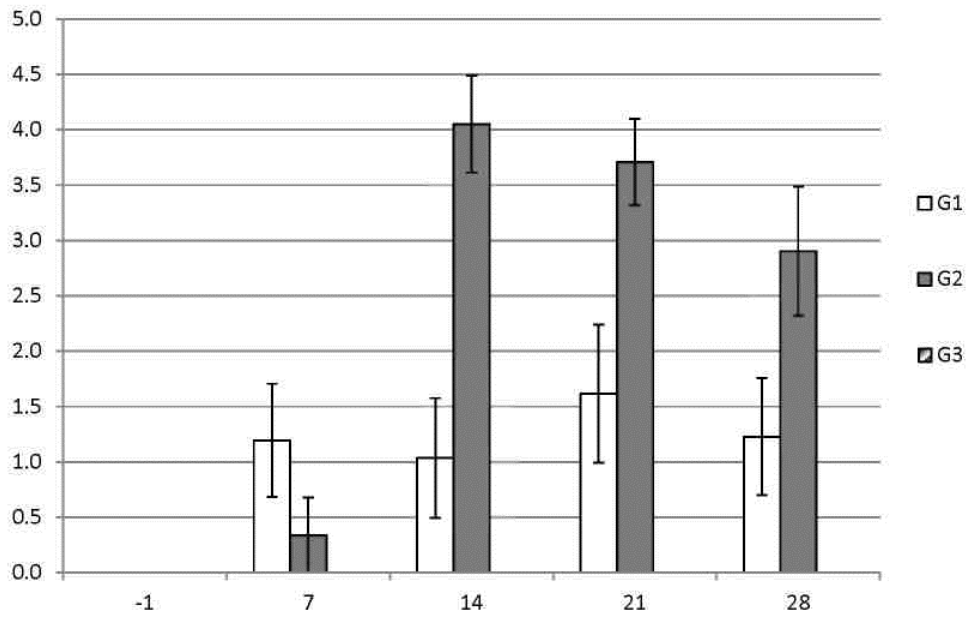


FIGURA 13

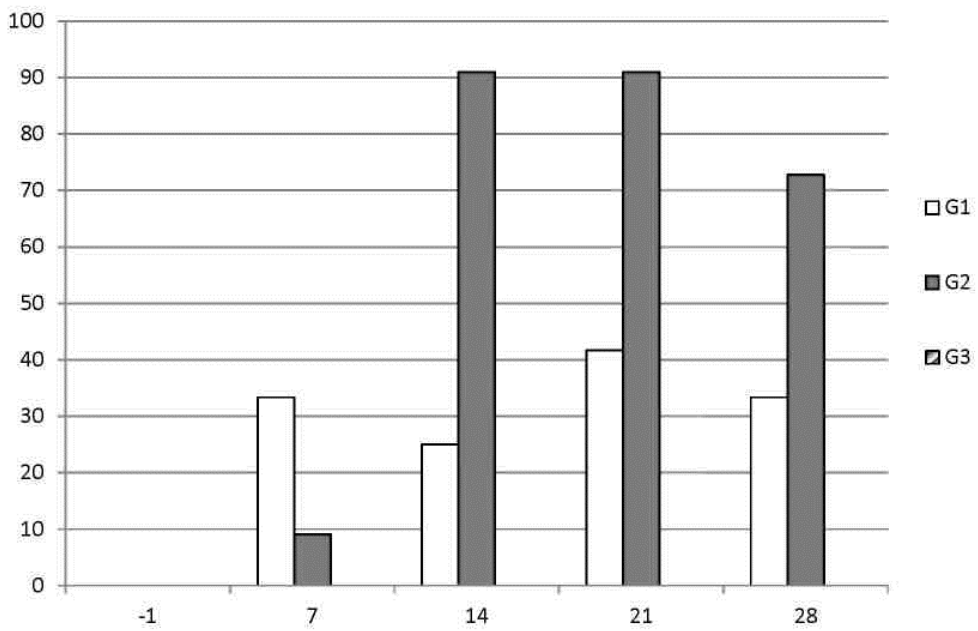


FIGURA 14

