



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 466**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 14/30 (2006.01)

A61K 31/711 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00308421 .7**

86 Fecha de presentación : **26.09.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1090995**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2001**

54 Título: **Antígeno *mhp3* de *Mycoplasma hyopneumoniae*, gen que lo codifica y uso del mismo.**

30 Prioridad: **29.09.1999 US 156602**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **Pfizer Products Inc.**
Eastern Point Road
Groton, Connecticut 06340, US

72 Inventor/es: **King, Kendall Wayne;**
Madura, Rebecca Anne y
Rosey, Everett Lee

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Antígeno *mhp3* de *Mycoplasma hyopneumoniae*, gen que lo codifica y uso del mismo.

5 **Campo de la invención**

El gen *mhp3* codifica una proteína de *Mycoplasma hyopneumoniae*. La presente invención se refiere a nucleótidos y proteínas de *mhp3*. La presente invención se refiere además a nuevos antígenos de apoproteínas codificados por *mhp3* y su uso en vacunas para prevenir y tratar enfermedades causadas por infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*, y procedimientos para la producción recombinante de dichos antígenos.

Antecedentes de la invención

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyopneumoniae*) es un patógeno bacteriano que causa neumonía micoplasmal enzoótica del cerdo. La neumonía micoplasmal enzoótica es una enfermedad crónica que da como resultado una mala transformación de la comida, crecimiento atrofiado y predisposición a infecciones pulmonares secundarias. *M. hyopneumoniae* se transmite fácilmente a través de las secreciones del tracto respiratorio, y es altamente prevalente en granjas de cerdos. Aproximadamente un 99% de los rebaños de los cerdos de los Estados Unidos están infectados, costando a la industria porcina aproximadamente 300 millones de \$ anuales de acuerdo con una estimación de 1991.

No existen ensayos simples para la detección de *M. hyopneumoniae*, ni existen medidas eficaces contra la infección. El ensayo para la detección de *M. hyopneumoniae* se dificulta por la reactividad cruzada de los anticuerpos dirigidos contra *M. hyopneumoniae* con otras especies de micoplasmas porcinos. El campo de la vacuna en su mayor parte ha dependido de membranas adyuvantes ó preparaciones de células enteras de *M. hyopneumoniae* que no han provocado respuestas inmunes significativas. Además, la clonación y la expresión recombinante de los genes de *M. hyopneumoniae* han fallado en la producción de proteínas que sean suficientemente protectoras para su uso comercial en vacunas.

Debido a la falta de vacunas adecuadas, la neumonía micoplasmal enzoótica ha sido en gran medida contenida por la detección temprana y aislamiento de los animales infectados. El tratamiento de animales infectados con *M. hyopneumoniae* con antibióticos ha alcanzado un éxito limitado en la restricción de la evolución de la infección.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de encontrar medio de prevenir la expansión de esta enfermedad, a través de la prevención de la infección ó de su cura. Un enfoque de la prevención es la inmunización. La capacidad de producir grandes cantidades de proteínas o péptidos de *M. hyopneumoniae* antigénicos *in vitro* para su uso en formulaciones de vacunas produciría por lo tanto un gran avance en el desarrollo de vacunas preventivas.

La Publicación de Patente Internacional WO 96/28472 identifica seis especies de antígenos de proteína de *M. hyopneumoniae* con unos pesos moleculares de 46-48, 52-54, 60-64, 72-75, 90-94 y 110-114 kilodaltons, y describe las secuencias parciales de proteínas de los antígenos de 52-54, 60-64 y 72-75 kilodaltons y las secuencias en toda su longitud de nucleótidos y aminoácidos del antígeno de 46-48 kilodaltons. El antígeno de 46-48 kilodaltons, al cual nos referiremos en lo sucesivo como P46, corresponde al antígeno de 44 kilodalton de la Patente de Estados Unidos N°: 5.252.328 de Faulds y a un antígeno de 48 kilodaltons descrito por Lee (Lee y col., 1996, J. Chromatogr. A. 737:273-279), como se determina en la base de la descripción de Fauld y Lee de las secuencias peptídicas parciales. El gen que codifica P46, es decir, *p46*, fue clonado también por Futo y col., (1995; J. Bacteriol 177:1915-1917). Más tarde, mismo grupo mostró que la expresión *in vitro* del producto del gen era útil en el diagnóstico de las respuestas de los anticuerpos a infecciones de *M. hyopneumoniae* sin reactividad cruzada con otras especies de *Mycoplasma* (Futo y col., 1995, J. Clin. Microbiol. 33:680-683). Las secuencias y los usos diagnósticos del gen *p46* descrito por Futo y col., se describen además en la Publicación de Patente Europea N°: 0 475 185 A1.

La secuencia peptídica parcial del antígeno de 60-64 kilodaltons del documento WO 96/28472 tiene una homología significativa con una proteína llamada P102 (véase a continuación). Además, el antígeno tiene una homología significativa con un antígeno de 64 kilodaltons descrito por Faulds (patente de Estados Unidos N°: 5.252.328).

El antígeno de 72-75 kilodaltons del documento WO 96/28472 corresponde a una proteína de 65 kilodaltons descrita por Wise y Kim (1987, J. Bacteriol., 169:5546-5555 y Patente de Estados Unidos N°: 5.788.962) y nos referiremos a ella en lo sucesivo como P65.

El antígeno de 52-54 kilodaltons, al cual nos referiremos en lo sucesivo como Mhp3, puede corresponder a la proteína integral de membrana de 50 kilodaltons descrita por Wise y Kim (1987, J. Bacteriol., 169:5546-5555) y/o a las especies de proteínas de 52 kilodaltons descritas por Faulds (Patente de Estados Unidos N°: 5.252.328). Al antígeno de 52-54 kilodaltons nos referiremos en lo sucesivo como MHP3. El documento WO 96/28472 describe la secuencia del extremo amino terminal de la proteína madura y de un fragmento interno de bromuro de cianógeno.

El antígeno de 90-94 kilodaltons del documento WO 96/28472 puede corresponder a la adhesina *p97* como se describe por Hdu y col., lo cual se describe a continuación.

El documento WO 96/28472 describe además los resultados de los ensayos de las vacunas que usan el antígeno de 60-64 kilodaltons, P46 ó una combinación de P65 y Mhp3. Las vacunaciones provocaron una protección significativa frente a la infección de *M. hyopneumoniae*.

Existen múltiples informes concernientes a proteínas externas de la membrana de *M. hyopneumoniae* en la bibliografía científica y de patentes. Por ejemplo, Wise y Kim (1987, J. Bacteriol., 169:5546-5555) informan de que existen cuatro especies de proteínas integrales de membrana en *M. hyopneumoniae*, llamadas p70, p65 (P65, *supra*), p50 y p44, y que las tres últimas se modifican por lípidos unidos covalentemente e inducen una respuesta inmune humoral fuerte. Los efectos protectores de la respuesta inmune no se investigaron. El gen que codifica la proteína p65 se clonó, y sus secuencias y usos, por ejemplo en vacunas y diagnósticos se describen en la Patente de Estados Unidos N°: 5.728.962.

La Publicación de Patente Internacional WO 91/15593 describe 5 proteínas de *M. hyopneumoniae* de pesos moleculares aparentes de 105, 90, 85, 70 y 43 kilodaltons. Se proporcionó una secuencia completa en longitud del gen que codifica la proteína de 85 kilodalton (proteína C), así como la secuencia parcial de nucleótidos que codifican las otras cuatro proteínas. Los ensayos de vacunas que usan la proteína C proporcionaron a los animales de ensayo protección "significativa" contra *M. hyopneumoniae*.

La Patente de Estados Unidos N°: 5.252.328 de Faulds describe las secuencias amino terminales de proteínas inmunorreactivas de *M. hyopneumoniae*, cuyos pesos moleculares son 36, 41, 44, 48, 64, 68, 74,5, 79, 88,5, 96 y 121 kilodaltons. Otras proteínas identificadas en base a la movilidad electroforética pero para las que no se describieron las secuencias de proteínas tenían unos pesos moleculares aparentes de 22,5, 34 y 53 kilodaltons. Mientras que la Patente de Estados Unidos N°: 5.252.328 proponía el uso de estas proteínas en formulaciones de vacunas, no se ha informado de resultados de pruebas con vacunas.

La Publicación de Patente Internacional WO 95/09870 describe procedimientos bioquímicos para la purificación de adhesinas de *M. hyopneumoniae*, las proteínas integrales de membrana micoplasmiales responsables de la adhesión a los cilios del epitelio respiratorio superior del huésped. El documento WO 95/09870 propone también ensayos y usos para estas proteínas, por ejemplo en vacunas y diagnósticos. Sin embargo, no se había informado de clonaciones de genes de adhesión hasta que se clonó un gen llamado p97 y su producto, en lo sucesivo "P97", mostró que juega un papel en la capacidad del organismo de unirse a células ciliadas dentro del tracto respiratorio de cerdos infectados con *M. hyopneumoniae* (Hsu y col., 1997, J. Bacteriol. 179:1317-1323). Un artículo de investigación de King y col., (1997; Vaccine 15:25-35) describe a Mhp1, una adhesina de 124 kilodaltons que es una variante de tipo de P97. Sin embargo, los intentos de vacunar cerdos contra *M. hyopneumoniae* usando una proteína de fusión GST-Mhp1 no dieron como resultado una protección estadísticamente significativa contra la neumonía micoplasmal enzoótica. Wilton y col., (1998, Microbiology 144:1931-1943) identificaron una variante de 94 kilodaltons de P97. Además, el gen p97 demostró ser parte de un operón que codifica también una segunda proteína, llamada P102, de un peso molecular predicho de aproximadamente 102 kilodaltons (Hsu y col., 1998, Gene 214:13-23). Minion y Hsu sugieren el uso de P102 en vacunas en la publicación de patente internacional WO 99/26664 pero no informan de pruebas con vacunas.

Sumario de la invención

La presente invención abarca nucleótidos y proteínas del gen *mhp3* de *M. hyopneumoniae*. La presente invención abarca también nuevos antígenos de apoproteínas codificados por el gen *mhp3* para su uso en vacunas para prevenir y tratar enfermedades causadas por la infección con *M. hyopneumoniae*. Se proporcionan además procedimientos para la producción recombinante de apo-Mhp3.

La invención proporciona una formulación de vacuna que comprende un polipéptido antigénico ó inmunogénico que comprende al menos los aminoácidos 1-30 de una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID N°: 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, el polipéptido antigénico ó inmunogénico se expresa como una proteína de fusión a tiorredoxina, preferiblemente por clonación en el vector de expresión pBAD/tioTOPO, y por *E. coli* de la cepa BL21. En una realización altamente preferida, la vacuna comprende además al menos un polipéptido seleccionado entre un grupo constituido por P46, P65, P97 y P102 de *M. hyopneumoniae* y fragmentos, variantes y derivados de los mismos.

La invención proporciona un uso de un polipéptido antigénico ó inmunogénico que comprende al menos los aminoácidos 1-30 de una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID N°: 4 en la que el polipéptido no tiene una cisteína acilada con ácido graso seguida de la secuencia de aminoácidos Trp Asp Lys Glu y no tiene una homoserina lactona C-terminal, en la fabricación de una formulación de vacuna para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno en un animal, causado por infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*. En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos es como se muestra en la SEC ID N°: 4. En otra realización preferida, el animal es un cerdo.

La invención proporciona además kits para la detección de *M. hyopneumoniae*. En una realización, el kit proporciona reactivos para la detección de anticuerpos circulantes contra la proteína Mhp3 de *M. hyopneumoniae*.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un alineamiento de secuencia Clustal W (1.7) entre Mhp3 de *M. hyopneumoniae* (SEC ID N°: 2) y Ag234-5 (SEC ID N°: 41), del que se pensaba originalmente que se originaba de *M. arginini* pero luego se demostró que se obtenía de *M. hyorhinis*. La identidad de los aminoácidos se representa por asteriscos (*), las sustituciones altamente conservativas se indican por dos puntos (:), y las sustituciones conservativas por puntos (.). En conjunto, las dos proteínas comparten un 36,2% de la identidad de los aminoácidos.

La Fig. 2 es una transferencia Western que demuestra la reactividad de anticuerpos de un cerdo expuesto experimentalmente a *M. hyopneumoniae* contra extractos de proteínas de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* o *M. mycoides*, o contra Mhp3 recombinante purificada.

Abreviaturas y definiciones

La abreviatura M., cuando precede al nombre de una especie, se refiere al género *Mycoplasma*.

La expresión “mhp3 recombinante” se refiere a un ácido nucleico que codifica el antígeno Mhp3 en el código genético universal. “mhp3 de *M. hyopneumoniae*” se refiere a un ácido nucleico que codifica el antígeno Mhp3 en el código genético de *M. hyopneumoniae*. En *M. hyopneumoniae*, el codón TGA indica un resto de triptófano en lugar de un codón de parada transcripcional. Por lo tanto, el gen recombinante *mhp3* difiere del mhp3 de *M. hyopneumoniae* al tener codones TGG en vez de codones TGA.

El término “Mhp3” se refiere a una proteína codificada por un gen *mhp3*.

El término “apoproteína” indica una proteína a la que le falta un resto de lípido, por ejemplo por delección o mutación del aminoácido que funcionaría como aceptor de dicho resto lípido.

El término “ORF” indica “marco de lectura abierto”, es decir, la región codificante de un gen.

El “porcentaje de identidad de secuencia” para ácidos nucleicos y polipéptidos se determina por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, donde el alineamiento óptimo proporciona el más alto orden de apareamiento y puede introducir adiciones o delecciones a la secuencia prueba o referencia. El porcentaje de identidad se determina calculando el porcentaje de aminoácidos que son idénticos en la secuencia de ensayo y de referencia en una posición dada. El alineamiento de secuencia y el porcentaje de identidad óptimos pueden determinarse manualmente, o más preferiblemente por un algoritmo de ordenador que incluye aunque no está limitado a TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, GAP, BESTFIT, y CLUSTALW (Altschul y col., 1990, J. Mol. Biol. 215 (3):403-10; Pearson y Lipman, 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-8; Thompson, y col., 1994, Nucleic Acids Res. 22(22):4673-80; Devereux y col., 1984, Nuc. Acids. Res. 12:387-395; Higgins, y col., 1996, Methods Enzymol 266:383-402). Preferiblemente, se usa el NCBI Blast Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ajustado a los parámetros por defecto para determinar el porcentaje de identidad de secuencia.

El término heterólogo, cuando se usa en este documento para describir un promotor, indica que el promotor es no nativo al marco de lectura abierto cuya expresión controla.

La expresión “proteína aislada” indica una composición de proteínas en la cual la proteína aislada comprende al menos un 50% del peso. Más preferiblemente, la composición comprende aproximadamente un 95%, y lo más preferible un 99% en peso de la proteína aislada.

La expresión “recuperado en una forma soluble” indica que una proteína o polipéptido se recupera del citoplasma de la célula que expresa dicha proteína o polipéptido.

La expresión “recuperado en una forma insoluble” indica que una proteína o polipéptido se recupera de cuerpos de inclusión presentes en la célula que expresa dicha proteína o polipéptido.

La expresión “funcionalmente equivalente”, como se utiliza en este documento, se refiere a una proteína capaz de ser reconocida por un anticuerpo específico a Mhp3, que es una proteína capaz de provocar una respuesta inmunológica sustancialmente similar a la proteína Mhp3 endógena. Por lo tanto, un anticuerpo cultivado contra una proteína funcionalmente equivalente también reconocerá a Mhp3.

El término “inmunogenicidad” se refiere a la capacidad de una proteína o polipéptido de provocar una respuesta inmune dirigida específicamente contra la proteína o polipéptido.

El término “antigenicidad” se refiere a la capacidad de una proteína o polipéptido de unirse inmunoespecíficamente por un anticuerpo a la proteína o polipéptido.

El término “protección” o “protector”, como se usa en este documento con respecto a una vacuna, significa que la vacuna previene o reduce los síntomas de una enfermedad causada por el organismo del cual se obtiene el antígeno(s) usado(s) en la vacuna.

El término “anticuerpo”, como se usa en este documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser una mezcla policlonal ó monoclonal. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas obtenidas de las fuentes naturales ó de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden existir en diversas formas, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab', F(ab')₂, así como en cadenas sencillas. Se pueden usar también anticuerpos de cadena sencilla, en los cuales los genes de cadena pesada y cadena ligera se combinan en una secuencia de código sencillo.

La expresión “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de nucleótido de *mhp3* ó polipéptido Mhp3 suficiente para provocar una respuesta inmune en el sujeto al cual se administra. La respuesta inmune puede comprender, sin limitación, inducción de inmunidad celular y/ó humoral.

La expresión “tratar ó prevenir la infección por *M. hyopneumoniae*” significa inhibir la replicación de las bacterias de *M. hyopneumoniae*, inhibir la transmisión de *M. hyopneumoniae*, ó prevenir que *M. hyopneumoniae* se establezca por si misma en el huésped, y aliviar los síntomas causados por la infección de *M. hyopneumoniae*. El tratamiento se considera terapéutico si hay una reducción en la carga bacteriana, disminución en las infecciones pulmonares y/ó incremento en la toma de comida y/ó crecimiento.

La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un medio vehículo que no impide la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo, es químicamente inerte y no tóxico para el sujeto al cual se administra.

La expresión “agente terapéutico” se refiere a cualquier molécula, compuesto ó tratamiento, preferiblemente un antibacteriano, que ayuda en el tratamiento de una infección bacteriana ó de la enfermedad causada por ella.

Descripción detallada de la invención

Como se describe en este documento, se ha descubierto u caracterizado un gen de *M. hyopneumoniae* que codifica Mhp3, que se cree que está unida a la membrana de *M. hyopneumoniae* en virtud de una cadena de lípidos unidos covalentemente a la proteína. La invención proporciona medios recombinantes de expresión de proteínas Mhp3 que carecen de una señal de secuencia y la necesaria señal para la modificación lipídica, por lo tanto permiten un rendimiento eficaz y alto en la expresión de Mhp3 para su uso en vacunas y tratamientos contra enfermedades causadas por infección con *M. hyopneumoniae*.

La presente invención por lo tanto abarca las proteínas codificadas por y las secuencias de nucleótidos de *M. hyopneumoniae mhp3*. La invención además abarca ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas en el código genético universal que son adecuados para la expresión de dichas proteínas en huéspedes eubacterianos y eucariotas, tales como *E. coli* y baculovirus respectivamente.

La invención además abarca proteínas que tienen una secuencia que comprende al menos los aminoácidos 1-30 de la SEC ID N°: 4 y los ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas en el código genético universal.

La invención abarca además formulaciones de vacunas que comprenden a las proteínas Mhp3. En ciertas realizaciones, las formulaciones de vacunas comprenden proteínas aisladas seleccionadas entre el grupo constituido por P46, P65, P97 y P102 y fragmentos, variantes y derivados de los mismos.

Para claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones que describen ó ilustran ciertas características, realizaciones ó aplicaciones de la invención.

Secuencias de nucleótidos de *mhp3*

La presente invención abarca las secuencias de nucleótidos del gen *mhp3* e incluye aquellas secuencias de nucleótidos que codifican variantes de especies de Mhp3 como pueden encontrarse en otras especies de *M. hyopneumoniae*. Una realización preferida de la invención abarca las secuencias de nucleótidos que codifican una forma amino truncada de la proteína Mhp3 que no está modificada por la adición covalente de cadenas de ácidos grasos y no se sitúa por lo tanto en la membrana. En un modo de la realización preferida de la invención, la delección 5' de *mhp3* correspondiente al extremo amino de Mhp3 abarca las secuencias de nucleótidos que codifican los aminoácidos 2-29 de Mhp3. En otros modos de la realización, la delección 5' corresponde a los primeros 30, 31-32 ó 33-40 aminoácidos.

La invención proporciona además un ADN que codifica en el código genético universal una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-30 de la SEC ID N°: 4, ó su complemento. La invención proporciona además ADN que tiene la secuencia de la SEC ID N°: 3.

Se proporciona un ácido nucleico que es hibridable con un ácido nucleico *mhp3* (por ejemplo, que tiene una secuencia como se muestra en la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 ó SEC ID N°: 5) ó con su complemento, ó con un ácido nucleico que codifica un derivado de *mhp3* ó análogo, ó con su complemento, en condiciones de baja rigurosidad. A modo de ejemplo y no de limitación, los procedimientos que utilizan dichos condiciones de baja rigurosidad para regiones de hibridación por encima de 90 nucleótidos son como siguen (véase también Shilo y Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6789-6792). Los filtros que contienen ADN se pretratan durante 6 h á 40°C en una solución que contiene formamida al 35%, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,1%, Ficoll al 0,1%, BSA

al 1% y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las hibridaciones se realizan en la misma solución con las siguientes modificaciones: PVP al 0,02%, Ficoli al 0,02%, BSA al 0,2%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón, 10% (peso/volumen) de sulfato de dextrano, y se usa una sonda 5-20 X 10⁶ cpm etiquetada con ³²P. Los filtros se incuban en la mezcla de hibridación durante 18-20 h a 40°C, y después se lavan durante 1 h a 55°C en una solución que contiene 2X SSC, Tris HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1%. La solución de lavado se reemplaza con solución fresca y se incuba adicionalmente durante 1,5 h a 60°C. Los filtros se transfieren en seco y se exponen para autorradiografía. Si es necesario, los filtros se lavan una tercera vez a 65-68°C y se reexponen a la película. Pueden usarse otras condiciones de baja rigurosidad que son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, las que se emplean para hibridaciones de especies cruzadas).

Se proporciona un ácido nucleico que es hibridable con un ácido nucleico *mhp3*, ó su complemento, en condiciones de alta rigurosidad. A modo de ejemplo y no de limitación, los procedimientos que usan dichas condiciones de alta rigurosidad para regiones de hibridación por encima de 90 nucleótidos son como sigue. Se realiza la prehibridación de los filtros que contienen ADN durante 8 h por la noche a 65°C en un tampón compuesto de 6X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, PVP al 0,02%, Ficoli al 0,02%, BSA al 0,02% y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Los filtros se hibridan durante 48 h a 65°C en mezcla de prehibridación que contiene 100 µg/ml de ADN de esperma desnaturalizado y una sonda 5-20 X 10⁶ cpm etiquetada con ³²P. El lavado de los filtros se hace a 37°C durante 1 h en una solución que contiene 2X SSC, PVP al 0,01%, Ficoll al 0,01% y BSA al 0,01%. A esto le sigue un lavado en 0,1X SSC a 50°C durante 45 min antes de la autorradiografía.

Otras condiciones de alta rigurosidad que pueden usarse dependen de la naturaleza del ácido nucleico (por ejemplo, longitud, contenido en GC, etc.) y del propósito de la hibridación (detección, amplificación, etc.) y son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la hibridación rigurosa de un oligonucleótido de aproximadamente 15-40 bases con una secuencia complementaria en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se hace en las siguientes condiciones: una concentración salina de 50 mM de KCl, una concentración de tampón de 10 mM de Tris-HCl, una concentración de Mg²⁺ de 1,5 mM, un pH de 7-7,5 una temperatura de templado de 55-60°C.

Se proporciona un ácido nucleico que es hibridable con un ácido nucleico *mhp3*, ó su complemento, en condiciones de rigurosidad moderada. La selección de las condiciones apropiadas para dichas rigurosidades se conoce bien en la técnica. (Véase por ejemplo Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; véase también Ausubel y col., eds., en Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, © 1987-1997, Current Protocols, © 1994-1997 John Wiley e Hijos, Inc).

Se proporcionan además ácidos nucleicos que codifican derivados y análogos de proteínas codificadas por *mhp3*, y ácidos nucleicos antisentido de *mhp3*. Al ser aparentemente fácil, como se usa en este documento, puede construirse un "ácido nucleico que codifica un fragmento ó porción de una proteína codificada por *mhp3*" refiriéndonos a un ácido nucleico que codifica sólo el citado fragmento ó porción de la proteína codificada por *mhp3* y no las otras porciones contiguas de la proteína codificada por *mhp3* como una secuencia continua.

Después de la hibridación, las condiciones de lavado son como sigue. Cada membrana se lava dos veces durante 30 minutos a 45°C en 40 mM de fosfato de sodio, pH 7,2, SDS al 5%, EDTA 1 mM, albúmina de suero bovino al 0,5%, seguido de cuatro lavados cada uno durante 30 minutos en fosfato de sodio, pH 7,2, SDS al 1%, EDTA 1 mM y posteriormente cada membrana se trata de forma diferente como se describe a continuación para condiciones de baja, media ó alta rigurosidad. Para hibridación de baja rigurosidad, las membranas no se lavan más. Para hibridación de rigurosidad media, las membranas se lavan además cuatro veces cada uno durante 30 minutos en 40 mM de fosfato de sodio, pH 7,2, SDS al 1%, EDTA 1 mM a 55°C. Para hibridación de alta rigurosidad, siguiendo los lavados para baja rigurosidad, las membranas se lavan además 4 veces cada uno durante 30 minutos en 40 mM de fosfato de sodio, pH 7,2 SDS al 1%, EDTA 1 mM a 55°C, seguido de cuatro lavados cada uno durante 30 minutos en fosfato de sodio, pH 7,2, SDS 1%, EDTA 1 mM a 65°C.

Proteínas y polipéptidos codificados por mhp3

La presente invención proporciona proteínas Mhp3 recombinantes. En una realización, la proteína tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-30 de la SEC ID N°:4 y no está covalentemente unida a un resto de ácido graso. En una realización más, la proteína es una proteína aislada. La presente invención proporciona también composiciones que comprenden dichas proteínas Mhp3. En ciertas realizaciones específicas, las composiciones comprenden una proteína Mhp3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, ó una proteína Mhp3 y un adyuvante. En otra realización específica, la composición comprende al menos otra proteína de *M. hyopneumoniae* tal como, pero sin limitación, P46, P65, P97 ó P102. En otra realización, la composición comprende una proteína Mhp3 y al menos otro polipéptido inmunogénico ó antigénico que no es una M., preferiblemente un polipéptido viral, bacteriano, o parasitario. Dicha composición es beneficiosa como una vacuna de combinación.

Además, las proteínas Mhp3 de la presente invención para uso en preparaciones de vacunas son sustancialmente puras y homogéneas. Se pueden usar procedimientos bien conocidos por los especialistas en la técnica para determinar la pureza de las proteínas y la homogeneidad, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra, seguido de visualización de una banda de polipéptido sencilla en un gel de tinción. Puede determinarse una mayor resolución usando HPLC ú otro procedimiento similar bien conocido en la técnica.

La presente invención abarca polipéptidos que son típicamente purificados de células huéspedes que expresan secuencias de nucleótidos recombinantes que codifican estas proteínas. Dicha purificación de proteínas puede efectuarse por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. En una realización, la proteína Mhp3 de la presente invención se expresa como una proteína de fusión, por ejemplo con tiorredoxina. La proteína de fusión recombinante resultante puede purificarse por cromatografía de afinidad. En una modo de la realización, la proteína Mhp3 se corta de un resto heterólogo, dando como resultado una muestra de proteína Mhp3 sustancialmente pura. Pueden usarse otros procedimientos, véase por ejemplo, las técnicas descritas en "Methods in Enzymology", 1990, Academic Press, Inc, San Diego, "Protein Purification: Principles and Practice", 1982, Springer-Verlag, New York.

10 *Sistemas de expresión*

La presente invención abarca sistemas de expresión, vectores de expresión eucarióticos y procarióticos, que pueden usarse para expresar ambas formas truncada y de longitud completa de la proteína *mhp3*.

- 15 En una realización preferida de la invención, el ácido nucleico tiene la secuencia de la SEC ID N°: 3 y codifica una proteína de la SEC ID N°: 4, que incluye los restos 30-444 de la SEC ID N°: 2. Los codones TGA de *M. hyopneumoniae* se han cambiado a codones TGG.

Pueden utilizarse diversos sistemas de vectores para expresar las secuencias de proteínas antigénicas de la invención. Dichos sistemas de expresión del huésped representan vehículos por los cuales las secuencias codificantes de interés se pueden producir y posteriormente purificar, pero también representa células que pueden, cuando se transfieren ó transfectan con las secuencias de nucleótidos codificantes apropiadas, exhibir los productos del gen *mhp3* de la invención *in situ*. Esto incluye aunque sin limitación microorganismos tales como bacterias (por ejemplo *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido ó vectores de expresión de ADN de cósmido que contengan secuencias codificantes de *mhp3*; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de productos del gen *mhp3*; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes, (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de *mhp3*; sistemas de células de plantas infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) ó transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de *mhp3*; ó sistemas de células de mamíferos (por ejemplo COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores obtenidos del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor metalotionina) o de virus de mamíferos (por ejemplo el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia).

En una realización preferida, el sistema de expresión es un sistema bacteriano. Se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso destinado al producto de *mhp3* que es expresado. Por ejemplo, cuando se produce una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de Mhp3 o para cultivar anticuerpos para Mhp3, por ejemplo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Preferiblemente, los vectores contienen promotores que dirigen expresión del gen inducible. Vectores adecuados incluyen, aunque sin limitación, el vector de expresión pUR278 de *E. coli* (Ruther y col., 1983, EMBO J. 2:1791), en el cual las secuencias codificantes de *mhp3* pueden estar ligadas individualmente dentro del vector en fase con la región codificante lac Z de forma que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985 Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264:5503-5509); vectores pET (Studier y Moffatt, 1986, J. Mol. Biol. 189:113; Rosenberg y col., 1987, Gene 56:125-135; los vectores están disponibles de Novagen, Madison, Wisconsin), en los que la secuencia codificante de *mhp3* pueden usarse en marco a una secuencia que codifica múltiples restos de histidina (por ejemplo, seis); vectores pBAD (Guzman y col., 1995, J. Bact. 177:4121-4130) que usándolos pueden expresarse bajo el control de una proteína inducible por arabinosa. Pueden usarse también vectores pGEX (Promega Corporation) para expresar polipéptidos exteriores como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de células lisadas por adsorción a perlas de glutatión-agarosa seguido por elusión en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir trombina ó sitios de corte de la proteasa factor Xa para que el producto génico objetivo clonado pueda ser liberado del resto GST. Las secuencias *mhp3* pueden clonarse en un vector de expresión λ y expresarse en tipos bacterianos λ -. En un modo preferido de la realización, el tipo bacteriano es LW14, que contiene un represor λ sensible a la temperatura, por lo que la expresión de esa proteína de un vector λ se reprime a 30°C pero se activa a 42°C. En una realización altamente preferida, la proteína Mhp3 se expresa como una proteína de fusión a tiorredoxina, que promueve la solubilidad de proteínas que normalmente son insolubles. Una proteína de fusión tiorredoxina-Mhp3 se expresa preferiblemente ligando una secuencia codificante de Mhp3 dentro del vector pBAD pBAD/tioTOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California). En un modo altamente preferido de la realización, la proteína de fusión tiorredoxina-Mhp3 se expresa en *E. coli* de la cepa BL21. Otros vectores que se pueden usar son conocidos por los especialistas en la técnica.

Anticuerpos Mhp3

- 65 De acuerdo con la invención, las proteínas codificadas por *mhp3* y sus derivados y análogos pueden usarse como inmunoagentes para generar anticuerpos que unen inmuno-específicamente dichos inmunoagentes.

Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales de Mhp3. Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos huéspedes animales por inyección con la proteína Mhp3 nativa, ó una versión sintética, ó derivados de los mismos, incluyendo aunque sin limitación conejos, ratones, ratas, etc. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies huéspedes (véase, por ejemplo, los usados para la preparación de vacunas).

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra secuencias de proteínas codificadas por mhp3 ó análogos de los mismos, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas. Por ejemplo, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Köhler y Milstein, (Köhler y Milstein 1975, Nature 256:495-497), así como la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor y col., 1983, Immunology Today 4:72), y la técnica hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc, pp. 77-96). En una realización adicional de la invención, se pueden producir anticuerpos monoclonales en animales libres de gérmenes utilizando una tecnología reciente (véase por ejemplo PCT/Us90/02545). De acuerdo con la invención, los anticuerpos humanos pueden usarse y obtenerse usando hibridomas humanos (Cole y col., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030) ó transformando células B humanas con el virus EBV *in vitro* (Cole y col., 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pages, 77-96). De echo, de acuerdo a la invención, se pueden usar las técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos” (Morrison y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:6851-6855; Neuberger y col., 1984, Nature 312:604-608; Takeda y col., 1985, Nature 314:452-454) empalmando los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica para una proteína codificada por mhp3 junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada; dichos anticuerpos están dentro del alcance de esta invención.

De acuerdo a la invención, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos de productos del gen *mhp3*. Una realización adicional de la invención utiliza las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión Fab’ (Huse y col., 1989, Science 246:1275-1281) para permitir una rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para proteínas codificadas por *mhp3*, derivados y análogos.

Se pueden generar fragmentos de anticuerpos que contienen el idiotipo de la molécula por técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen aunque sin limitación el fragmento F(ab’)₂ que puede producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, los fragmentos Fab que pueden generarse por reducción de los puentes disulfuro del fragmento F(ab’)₂, los fragmentos Fab que pueden generarse por tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaina y un agente reductor, y los fragmentos Fv.

En la producción de anticuerpos, la exploración de los anticuerpos deseados puede lograrse por técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente asociado a enzimas ó ELISA). Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconozcan un dominio específico de una proteína codificada por *mhp3*, se pueden ensayar hibridomas generados por un producto que se una a un fragmento de Mhp3 que contiene tal dominio. Para la selección de un anticuerpo que se una específicamente a un primer homólogo Mhp3 pero no se una específicamente con un homólogo Mhp3 diferente, se pueden seleccionar basándose en la unión positiva al primer homólogo Mhp3 y a la carencia de unión con el segundo homólogo Mhp3.

Se proporcionan también anticuerpos específicos para un dominio de una proteína codificada por *mhp3*. También se proporcionan anticuerpos específicos de un epítope de una proteína codificada por *mhp3*.

Los anticuerpos precedentes se pueden usar en procedimientos conocidos en la técnica relativos a la localización y actividad de las secuencias de las proteínas codificadas por *mhp3* de la invención, por ejemplo, midiendo niveles de las mismas en muestras fisiológicas apropiadas, en procedimientos de diagnóstico, inmunoterapia, etc.

50 *Kits de mhp3*

La invención proporciona además kits para la detección de *M. hyopneumoniae*. En una realización, el kit proporciona reactivos para la detección de anticuerpos circulantes contra proteínas Mhp3 de *M. hyopneumoniae*. En ciertas realizaciones, el kit comprende una declaración que indica que el kit es útil para el diagnóstico de la infección de *M. hyopneumoniae*. Mínimamente, el kit comprende en al menos un recipiente una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-30 de la SEC ID N°: 4. En un modo de la realización, el kit comprende además un anticuerpo secundario anti-cerdo. En un modo preferido de la realización, el anticuerpo secundario está conjugado con una enzima que cataliza una reacción colorimétrica, tal como la fosfatasa alcalina ó la peroxidasa de rábano rusticano. En un modo más de la realización, el kit comprende además reactivos para un ensayo colorimétrico.

Formulaciones de vacunas y procedimientos de administración

Ya que el antígeno de la proteína Mhp3 de la presente invención puede producirse en grandes cantidades, el antígeno producido y purificado de este modo tiene uso en preparaciones de vacunas. La proteína Mhp3 tiene también utilidad en inmunoensayos, por ejemplo para detectar o medir en una muestra de fluido corporal de un animal de ensayo

vacunado ó potencialmente infectado la presencia de anticuerpos contra el antígeno, y por lo tanto para controlar la respuesta inmune y/ó para diagnosticar la infección del animal.

La preparación de vacunas que contienen un polipéptido inmunogénico como ingrediente activo es conocido por los especialistas en la técnica.

Determinación de la eficacia de la vacuna

La inmunopotencia del antígeno Mhp3 puede determinarse por control de la respuesta inmune en animales de ensayo siguiendo la inmunización con el antígeno Mhp3, sólo ó en combinación con al menos otro polipéptido, o por uso de cualquier inmunoensayo conocido en la técnica. En una realización preferida, dicho otro polipéptido se selecciona entre un grupo constituido por proteínas de *M. hyopneumoniae* P46, P65, P97 y P102. La generación de inmunidad humoral (anticuerpo) y/ó mediada por células puede tomarse como una indicación de respuesta inmune.

Los procedimientos para introducir la vacuna pueden incluir la vía oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal y cualquier otra vía convencional de inmunización. La respuesta inmune de los sujetos de ensayo puede analizarse por varias aproximaciones tales como: la reactividad del suero inmune resultante con el antígeno Mhp3, como se ensaya por técnicas conocidas, por ejemplo ensayo inmunoabsorbente (ELISA), inmunotransferencias, radioinmunoprecipitaciones, etc, ó en el caso donde al antígeno Mhp3 muestra antigenicidad ó inmunogenicidad, por protección del huésped inmunizado contra la infección por *M. hyopneumoniae* y/ó atenuación de los síntomas debidos a la infección por *M. hyopneumoniae* en el huésped inmunizado.

Formulaciones de vacunas

Las vacunas de la invención comprenden Mhp3 recombinantes y/ó fragmentos, variantes y derivados de los mismos. En ciertas realizaciones, las vacunas de la invención comprenden Mhp3 y al menos otro polipéptido de *M. hyopneumoniae* antigénico. Polipéptidos antigénicos adecuados para su uso en combinación con Mhp3 incluyen aunque sin limitación las proteínas P46, P65, P97 y P102 y/ó fragmentos, variantes y derivados de dichos polipéptidos. Los polipéptidos no Mhp3 de las vacunas, tales como las proteínas P46, P65, P97 y P102 y sus fragmentos, variantes y derivados pueden purificarse de cultivos de *M. hyopneumoniae* ó expresarse de forma recombinante.

Las preparaciones adecuadas de dichas vacunas incluyen inyectables, en soluciones líquidas ó suspensiones; formas sólidas adecuadas para solución en ó suspensión en líquido previamente a la inyección se pueden preparar también. La preparación puede estar también emulsionada. Los ingredientes inmunogénicos activos están a menudo mezclados con adyuvantes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo.

Ejemplos de adyuvantes eficaces incluyen, aunque sin limitación, hidróxido de aluminio, *N*-acetil-muramyl-*L*-treonina-*D*-isoglutamina (thr-MDP), *N*-acetil-nor-muramyl-*L*-alanil-*D*-isoglutamina, *N*-acetilmuramyl-*L*-alanil-*D*-isoglutamil-*L*-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicerol-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina.

La eficacia de un adyuvante puede determinarse por medida de la inducción de anticuerpos dirigidos contra un polipéptido inmunogénico que contiene un epítipo de polipéptido Mhp3, los anticuerpos resultantes de la administración de este polipéptido en vacunas que están también constituidas por diversos adyuvantes.

Los polipéptidos pueden formularse en la vacuna como formas neutras ó salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas por grupos amino libres del péptido) y las que están formadas pro ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico ó fosfórico, ó ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, málico y similares. Las sales formadas por grupos carboxilo libres pueden obtenerse también de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férricos, y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares.

Se pueden usar muchos procedimientos para introducir las formulaciones de la vacuna de la invención; éstas incluyen, aunque sin limitación la ruta oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intranasal y escarificación (rascando las capas superiores de la piel, por ejemplo con una aguja bifurcada).

El sujeto al que se le administra la vacuna es preferiblemente un animal, más preferiblemente un cerdo.

Las formulaciones de la vacuna de la invención comprenden una cantidad inmunizante eficaz de la proteína Mhp3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las preparaciones de vacunas comprenden una cantidad inmunizante eficaz de uno ó mas antígenos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen aunque sin limitación solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, tampón acuoso isotónico estéril y combinaciones de los mismos. Un ejemplo de dicho vehículo aceptable es un medio de cultivo fisiológicamente equilibrado que contiene uno ó más agentes estabilizantes tales como proteínas hidrolizadas estabilizadas, lactosa, etc. El vehículo es preferiblemente estéril. La formulación debe ajustarse al modo de administración.

ES 2 267 466 T3

En una realización específica, se proporciona un polipéptido Mhp3 liofilizado de la invención en un primer recipiente; un segundo recipiente comprende diluyente constituido por una solución acuosa de glicerina al 50%, fenol al 0,25% y un antiséptico (por ejemplo, verde brillante al 0,005%).

El uso de antígenos purificados como preparaciones de vacunas puede realizarse por procedimientos convencionales. Por ejemplo, la(s) proteína(s) purificada debe ajustarse a una concentración apropiada, formulada con cualquier adyuvante de vacuna adecuado y se empaqueta para su uso. Los adyuvantes adecuados incluyen, aunque sin limitación: geles minerales, por ejemplo hidróxido de aluminio; sustancias tensioactivas tales como lisolecitina; glicósidos, por ejemplo derivados de saponina tales como Quil A; polioles plurónicos; polianiones; polímeros bloqueantes no iónicos, por ejemplo Pluronic F-127 (B.A.S.F., USA); péptidos; aceites minerales, por ejemplo Montanide ISA-50 (Seppic, Paris, France), emulsiones aceitosas, por ejemplo una emulsión de aceite mineral tal como BayolF/Arlacel A y agua, ó una emulsión de aceite vegetal, agua y un emulsionante como lecitina; alumbre y MDP. El inmunoagente puede incorporarse también dentro de liposomas, ó conjugarse con polisacáridos y/ó otros polímeros para su uso en una formulación de vacuna. En casos donde el antígeno recombinante es un hapteno, es decir, una molécula que es antigénica de modo que puede reaccionar selectivamente con anticuerpos afines, pero no inmunogénica de modo que no puede provocar una respuesta inmune, el hapteno puede estar unido covalentemente a un vehículo ó molécula inmunogénica, por ejemplo una proteína grande tal como seroalbúmina conferirá inmunogenicidad al hapteno emparejado a él. El vehículo de hapteno puede formularse para su uso como una vacuna.

Las dosis eficaces (cantidades inmunizantes) de las vacunas de la invención pueden también extrapolarse de curvas de respuesta de dosis obtenidas de sistemas de ensayo modelo.

La invención proporciona también un envase ó kit farmacéutico que comprende uno ó más recipientes que comprenden uno ó más ingredientes de las formulaciones de vacunas de la invención.

La presente invención proporciona por lo tanto un procedimiento de inmunización de un animal, ó tratamiento ó prevención de diversas enfermedades ó trastornos en un animal, que comprende administrar al animal una dosis inmunizante eficaz de una vacuna de la presente invención.

30 *Uso de anticuerpos generados por las vacunas de la invención*

Los anticuerpos generados contra el antígeno por inmunización con las proteínas Mhp3 de la presente invención tienen también usos potenciales en inmunoensayos de diagnóstico, inmunoterapia pasiva y generación de anticuerpos antiidiotípicos.

Los anticuerpos generados se pueden aislar por técnicas convencionales conocidas en la técnica (por ejemplo, cromatografía de inmunoafinidad, centrifugado, precipitación, etc.) y se usan en ensayos de inmunodiagnóstico. Los anticuerpos se pueden usar también para controlar el tratamiento y/ó progresión de la enfermedad. Se puede usar cualquier sistema de inmunoensayo conocido en la técnica, tales como aquellos enumerados anteriormente, para este propósito, incluyendo, aunque sin limitación, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo usando técnicas tales como radioinmunoensayo, ELISA (ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima), inmunoensayos "sandwich", reacciones de precipitación, reacciones de precipitación en gel de difusión, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación complementaria, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de la proteína A y ensayos de inmunolectroforesis, por nombrar sólo unos pocos.

Las formulaciones de vacunas de la presente invención pueden usarse también para producir anticuerpos para su uso en inmunoterapia pasiva, en la que se logra la protección a corto plazo de un huésped por administración de anticuerpos preformados dirigidos contra un organismo heterólogo.

En procedimientos de inmunización, la cantidad de inmunoagente a usar y el programa de inmunización se determinará por un médico especialista en la técnica y se administrará en referencia a la respuesta inmune y los títulos de anticuerpo del sujeto.

55 *Envasado*

Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un envase ó aparato dispensador que puede contener una ó más formas de unidades de dosificación que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender por ejemplo un papel plástico o de metal, tal como un envase de ampolla. El envase ó aparato dispensador puede acompañarse de instrucciones para la administración. Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéuticamente aceptable se pueden preparar también y colocarse en un recipiente adecuado, y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada.

Ejemplos

65 *Aislamiento de ADN cromosómico de M. hyopneumoniae*

Se aisló ADN genómico de *M. hyopneumoniae* por el procedimiento de Dybing y Alderete (Plasmid, 20:33-41; 1988), en el que las células se recogen por centrifugado (10 min. a 6000g a 4°C), se suspenden en solución salina

tamponada con fosfato y se lisan por adición de un volumen de 0,1 de dodecil sulfato sódico al 10%. El lisado se extrae con una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1) saturado con Tris-HCl. La fase acuosa se extrae con cloroformo, los ácidos nucleicos precipitan por adición de un volumen de 0,1 de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol enfriado con hielo. Después de la incubación a -20°C durante 1 h, el ácido nucleico se recupera por centrifugado durante 10 min. en una microcentrífuga. Los ácidos nucleicos se resuspenden en agua que contiene 20 µg de ARNasa A/ml, y las muestras se almacenan a -20°C.

Clonación molecular de *mhp3* de *M. hyopneumoniae*

Los cebadores de oligonucleótidos degenerados KWK40, KWK41, KWK42, KWK43, KWK42RC Y KWK43RC (SEC ID N°: 10-15) se diseñaron y sintetizaron (Genosys Biotechnologies, Inc, The Woodlands, Tx) basándose en secuencias de aminoácidos parciales previamente identificadas (SEC ID N°: 7-9) de *Mhp3* (publicación internacional de patente WO 96/28472). Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con varias combinaciones de estos cebadores en un volumen de reacción de 50 µL que contiene 1x tampón PCR (Perkin Elmer; Foster City, CA), 2,0 mM MgCl₂, 1 µM de cada cebador, 400 µM de cada deoxi-NTP, y 2,5 U de AmpliTaq Gold (Perkin Elmer). Las condiciones de la amplificación estaban constituidas por desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), templado (56°C, 1 min) y polimerización (72°C, 1 min). Usando los cebadores KWK41 (SEC ID N°: 11) y KWK42RC (SEC ID N°: 14), se amplificó un fragmento de aproximadamente 250 pb de longitud, usando 410 ng de ADN cromosómico tipo 232 de *M. hyopneumoniae* (pasaje n=5). El fragmento se subclonó dentro del sitio de clonación TA de pCR2.1-TOPO (Invitrogen; Carlsbad, CA); el producto ligado se transformó en células TOP10 de *E. coli* (Invitrogen). La clonación se confirmó por secuenciación de terminación de la cadena de dideoxinucleótidos (Advanced Genetic Analysis Center; St. Paul, MN). y por digestión con endonucleasa de restricción seguido de electroforesis en gel de agarosa.

Se usó la PCR inversa, un procedimiento para amplificar secuencias flanqueantes a una región núcleo del ADN (Ochman, H., Medhora, M.M., Garza, D., y Hartl, D.L. 1990. En "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications". Academic Press, San Diego, CA) para clonar los extremos 5' y 3' restantes del gen que codifica a *Mhp3*. Se generaron conjuntos de fragmentos de ADN cromosómico de la cepa 232 (pasaje n=5) de *M. hyopneumoniae* por digestión sencilla de ADN no cortado con las siguientes endonucleasas de restricción: *AluI*, *BamHI*, *EcoRV*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HincII*, *HindIII*, *NdeI*, *PvuI*, *Sau3AI*, *SpeI*, *SspI*, *XbaI*. Después de la digestión, los fragmentos se circularizaron por ligamiento y se sometieron a PCR usando cebadores de oligonucleótidos RAC3 (SEC ID N°: 16) y RAC4 (SEC ID N°: 17) que se diseñaron basándose en la secuencia del fragmento de 250 pb descrito anteriormente. La amplificación con estos cebadores se realizó como sigue: desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), templado (55°C, 1 min) y polimerización (72°C, 2 min). El conjunto de ADN cromosómico digerido con *SspI* produjo un fragmento de aproximadamente 600 pb, que se subclonó en pCR2.1-TOPO. El análisis de la secuencia del fragmento clonado identificó el extremo 5' del gen. Se diseñaron los oligonucleótidos RAC7 (SEC ID N°: 18) y RAC8 (SEC ID N°: 19) basándose en esta secuencia para obtener más secuencias correspondientes al extremo 3' de *mhp3*. Las condiciones de amplificación con estos cebadores consistieron en desnaturalización a 94°C durante 9 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 sec), templado (50°C, 30 sec) y polimerización (72°C, 1 min). Cuando se usó el conjunto de ADN digerido por *SpeI* como plantilla, se amplificaron múltiples productos (de 250 pb a 1 kb); la mezcla de fragmentos se clonó en pCR2.1-TOPO. El análisis de la secuencia del fragmento clonado largo (1,2 kb) proporcionó datos adicionales de la secuencia 3'. De estos datos, se diseñaron los oligonucleótidos RAC12 (SEC ID N°: 20) y RAC15 (SEC ID N°: 23) y se sintetizaron para usarse en amplificación por PCR usando el conjunto de ADN digerido por *HindIII* como plantilla. Los parámetros consistieron en desnaturalización a 94°C durante 9 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 sec), templado (55°C, 30 sec) y polimerización (72°C, 2 min), más una etapa de polimerización final a 72°C durante 7 min. Se amplificó un fragmento de aproximadamente 600 pb de longitud, se clonó en pCR2.1-TOPO y se secuenció. Los datos obtenidos proporcionaron secuencias 3' adicionales dentro del gen que codifica *Mhp3*. Se realizó una amplificación por PCR más con RAC12 (SEC ID N°: 20) y RAC15 (SEC ID N°: 23) usando como plantilla el conjunto de ADN digerido por *HincII*. Las condiciones de la amplificación fueron desnaturalización a 94°C durante 9 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), templado (55°C, 1min) y polimerización (72°C, 3 min), más una etapa de polimerización final (72°C, 7 min). Se amplificó un fragmento de 700 pb aproximadamente y se clonó en pCR2.1-TOPO. La secuenciación del fragmento generó nuevos datos de la secuencia 3', incluyendo la que codifica el extremo carboxilo del polipéptido.

Los resultados de la secuenciación preliminar descrita anteriormente se usaron para diseñar cebadores de oligonucleótidos para la amplificación específica del gen *mhp3* directamente del ADN cromosómico tipo 232 de pasaje bajo (n=4) de *M. hyopneumoniae*. Estos productos se secuenciaron directamente en un intento de evitar la introducción de secuencias artefacto debido a posibles mutaciones que pueden surgir durante la amplificación por PCR y las etapas de clonado subsiguientes.

Se usaron oligonucleótidos sintéticos que flanquean al gen *mhp3* para amplificar específicamente el marco de lectura abierto (ORF) de ADN cromosómico. Las amplificaciones por PCR se realizaron por triplicado y contenían 1 µM de cada cebador *Mhp3*-U1 (SEC ID N°: 31) y *Mhp3*-D (SEC ID N°: 33), 360 ng de ADN cromosómico purificado, 1x de tampón PC2 (Ab Peptides, Inc; St Louis, MO), 200 µM de cada dNTP, 7,5 U de Klen Taq1 (Ab Peptides, Inc) y 0,15 U de polimerasa termoestable *Pfu* clonada (Stratagene; La Jolla, CA) en un volumen de muestra final de 50 µL. Las condiciones de la amplificación consistieron en desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 sec), templado (55°C, 30 sec), y polimerización (72°C; 3 min, 45 sec), más una extensión

final a 72°C durante 7 min. Después de la amplificación, la muestra triplicada se puso en común y el producto específico se purificó por extracción con cromatografía de centrifugado (QIAquick™ PCR purification Kit, Qiagen; Santa Clarita, CA). La mezcla conjunta se secuenció luego por análisis directo usando reacciones de terminación de tinción dideoxi en un secuenciador de ADN automático ABI (Lark Technologies Inc., Houston, TX).

Los cebadores de oligonucleótidos sintéticos (SEC ID N°: 16-28,31 y 33) se usaron para secuenciar ambas cadenas de ADN de los productos amplificados del tipo 232 de *M. hyopneumoniae*. La secuencia de nucleótidos del gen *mhp3* y la proteína Mhp3 deducida codificada en esta región se presentan en la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, respectivamente.

El ORF de *mhp3* se extiende desde los nucleótidos 97-1452 de la SEC ID N°:1, y codifica una proteína de 451 aminoácidos (SEC ID N°: 2) teniendo un peso molecular teórico de 49.775 daltons. El polipéptido codificado contendría 8 restos de triptófano, 7 de los cuales se codifican por el codón TGA (UGA en el ARNm), conocido por especificar la adición de este aminoácido en muchas especies de micoplasma (Dybing, K., 1990. Ann. Rev. Microbiol. 44:81-104; Yamao, F., Muto, A., Kawauchi, Y., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2306-2309). El extremo amino de la proteína codificada parece tener propiedades características de una secuencia señal procariótica (von Heijne, G., 1985. J. Mol. Biol. 184:99-105; Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., y von Heijne, G., 1997. Protein Engineering, 10:1-6), aunque el sitio preciso de corte no se conoce actualmente. El resto de cisteína de la posición 29 de la proteína codificada (SEC ID N°: 2) se cree que se modifica siguiendo un procedimiento de adición de un ácido graso unido a sulfhidrilo para convertir Mhp3 en una lipoproteína (Razin, S., Yogeve, D., y Naot, Y. 1998. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:1094-1156).

Cuando se comparó el ORF de *mhp3* con bases de datos de nucleótidos y proteínas existentes usando los programas de la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (BLAST) (Altschul, SF., Gish, W., Miller, W., Myers, EW., Lipman, D.J., 1990. J. Mol. Biol. 215:403-410), la entrada con la que compartía la mayor homología fue con la proteína Ag 234-5 de *M. arginini* (GenBank No de acceso . D16674). Cuando se alinearon estos dos polipéptidos usando CLUSTAL W (Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson, T.J., 1994. Nucl. Acids Res., 22:4673-4680), existía una identidad del 36,2% en la secuencia de aminoácidos entre las proteínas Mhp3 y Ag 234-5 (Fig 1). Aunque el gen que codifica Ag 234-5 se identificó originalmente como presente en *M. arginini* (Ushio, S., Iwaki, K., Taniai, M., Ohta, T., Fukufa, S., Sugimura, K., y Kurimoto, M., 1995. Microbiol. Immunol. 39:395-400), las pruebas recientes han revelado que este gen se obtuvo realmente de *M. hyorhinis* (Droesse, M., Wise, K.S. 1998. Abstract E20, 12th International Organisation of Mycoplasma Conference, Sydney, AU). En esos estudios, se concluyó que Ag 234-5 no se conserva entre otros micoplasmas, incluyendo *M. hyopneumoniae*, como se determina por PCR, hibridación de transferencia Southern y análisis de transferencia Western.

Usando el programa STEMLOOP del grupo de computación genética de la Universidad de Wisconsin (Devereux, J., Haeberti, P., y Smithies, O., 1984. Nuc. Acids Res. 12:387-395), se identificó una secuencia cadena abajo del ORF de *mhp3*, específicamente los nucleótidos 1519-1550 de la SEC ID N°:1, los cuales pueden formar potencialmente una estructura de stemloop. Puede estar formado por 14 bases invertidas repetidas separadas por un lazo de 4 bases. La existencia real y función potencial de esta estructura es desconocida actualmente.

También se codifica un ORF adicional por el fragmento representado en la SEC ID N°: 5. Este ORF está presente en la cadena opuesta del gen *mhp3* y se extiende del nucleótido 602 al nucleótido 1 de la SEC ID N°:1. Este ORF predicho codifica una proteína de al menos 200 aminoácidos, designada por "ORF1" y se presenta como SEC ID N°: 6, que tiene un peso molecular teórico de 22.528 daltons. El hecho de que el ORF continúe a través del final del fragmento de ADN (SEC ID N°: 1) y permanezca abierto sugiere que la masa real del polipéptido codificado es posiblemente mayor de 22.528 daltons. Aunque Mhp3 y "ORF1" están codificados en cadenas opuestas, la tercera base de cada codón (la posición "oscilante") es común entre ellos. Por lo tanto, la base oscilante en cualquier codón de aminoácidos particular en "ORF1" está compartida por la cadena opuesta que codifica un aminoácido particular en el gen Mhp3. Esta disposición única de secuencias codificantes compartida por dos proteínas debería, en teoría, minimizar el impacto de la deriva genética en las posiciones oscilantes de los codones para Mhp3 y "ORF1" y maximizar la conservación de ambas proteínas codificadas.

Preparación de materiales de plásmidos y depósito

El fragmento del gen *mhp3* se preparó para depósito con la Colección americana de cultivos tipo (ATCC). La muestra puesta en común resultante de las reacciones de PCR triplicadas empleando cebadores 5' y 3' específicos Mhp3-U1 (SEC ID N°: 31) y Mhp3-D (SEC ID N°: 33) como se describe anteriormente, se aisló por extracción con cromatografía de centrifugado (QIAquick™) y se insertó en el sitio de clonación TA de pCR2.1-TOPO. Las reacciones de extensión de secuencia sencilla utilizando cebadores de secuenciación específicos de vector confirmaron los puntos finales de la amplificación del fragmento de 1.692 pares de bases, y describieron que el gen que codifica Mhp3 estaba en la orientación opuesta en relación al promotor de lactosa. Esta construcción de plásmido se denominó como pER427 y se introdujo dentro de células *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La cadena resultante se denominó por Pz427.

Mutagénesis dirigida de sitio del gen *mhp3*

La preparación del ADN que codifica Mhp3 para la expresión en *E. coli* requirió la modificación del gen *mhp3* de *M. hyopneumoniae* por supresión de la secuencia que codifica los sitios supuestos guía y de unión del ácido graso,

cisteína 29 y la conversión de 6 codones TGA a codones TGG. Se diseñaron los cebadores de oligonucleótidos RAC 23 (SEC ID N°: 29) y RAC 24 (SEC ID N°: 30), usados para la amplificación del gen carente de la secuencia que codifica el péptido señal. Las condiciones para la amplificación de ese fragmento de ADN cromosómico tipo 232 (pasaje n=5) de *M. hyopneumoniae* fueron desnaturalización a 94°C durante 9 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), templado (50°C, 1 min) y polimerización (72°C, 2 min) más una etapa de polimerización final (72°C, 7 min). El fragmento amplificado se clonó en pCR2.1-TOPO; la confirmación de la clonación fue por secuenciación y digestión con endonucleasa de restricción seguido de electroforesis en gel. La secuencia del extremo 5' del fragmento clonado codifica restos de metionina iniciadora, luego un resto de triptófano, que es el aminoácido que sigue al resto de cisteína en la posición 29 del polipéptido codificado (véase SEC ID N°: 30, y dio como resultado el extremo carboxilo en 7 aminoácidos del polipéptido de tipo salvaje, Ile-Thr-Asp-Ile-Asn-Lys-Asn (SEC ID N°: 2), siendo reemplazada por la secuencia Asn-Tyr-Arg-Tyr. Los oligonucleótidos RAC 23 (SEC ID N°: 29) y RAC 24 (SEC ID N°: 30) contenían sitios de restricción sintéticos *NdeI* y *XbaI*, respectivamente, cerca de sus extremos 5', para facilitar la clonación del gen dentro de diversos plásmidos. Se añadieron también nucleótidos adicionales (6 para RAC 23 (SEC ID N°:29); 7 para RAC 24 (SEC ID N°:30)) en los extremos 5' de cada cebador para facilitar el corte por las respectivas enzimas de restricción.

Una vez que se eliminó la secuencia codificante del péptido señal, permanecían seis codones internos TGA en el gen. Para posibilitar la expresión del polipéptido de longitud completa en *E. coli*, éstos se convirtieron en codones TGG por mutagénesis *in vitro* dirigida por oligonucleótidos. El plásmido pCR2.1-TOPO:*mhp3* se transformó en *E. coli* tipo CJ236 (*duf ung*). La adición del fago ayudante R408 a las células que contienen el plásmido llevó a la producción de partículas del fago que tenían ADN de cadena sencilla (ss) conteniendo uracilo. Estas partículas se aislaron, y el ADNss se purificó por extracción y precipitación. La mutagénesis se realizó usando este ADN como plantilla, los oligonucleótidos Mhp3-2M, Mhp3-3M, Mhp3-4M, Mhp3-5M, Mhp3-6M, Mhp3-7M (SEC ID N°:35-40), y reactivos del MutaGene System (BioRad Laboratories, Hercules, CA). El ADNss, los oligonucleótidos y el tampón de templado se mezclaron y calentaron a 70°C, luego se dejó enfriar a 30°C por encima de un periodo de 1 h. La síntesis de la cadena complementaria se realizó añadiendo ADN ligasa T4, ADN polimerasa T7, y tampón de síntesis. La mezcla se incubó en hielo durante 5 min, después a temperatura ambiente durante 5 min, seguido de 37°C durante 30 min. La moléculas resultantes de ADN de doble hebra se transformaron en células DH5 α UltraComp (Gibco; Gaithersburg, MD). Los clones se propagaron y detectaron para las mutaciones deseadas por secuenciación. Todas las mutaciones (TGA>TGG) se confirmaron de esta manera. Además, ocurrió una transición A>G inadvertidamente en el nucleótido 388 del gen de tipo silvestre (SEC ID N°: 1) en virtud de la secuencia del oligonucleótido Mhp3-2M (SEC ID N°: 35). Esto dio como resultado la alteración del resto codificado de serina (AGT) a glicina (GGT) en el resto de aminoácido 98 del tipo salvaje de Mhp3 (SEC ID N°: 2).

El gen *mhp3* recombinante (con ó sin la transición inadvertida A>G descrita anteriormente) que resultó de los cambios anteriores se muestra en la SEC ID N°: 3, y el marco de lectura abierto codificada por dicho gen *mhp3* recombinante se muestra en la SEC ID N°: 4.

Clonación del gen *mhp3* recombinante en Vectores de Expresión y cepas de huéspedes de expresión

Para el propósito de expresión de proteínas recombinantes, el gen *mhp3* mutado carente de la secuencia codificante del péptido señal (SEC ID N°: 3) se clonó en el plásmido de expresión pBAD/ThioTOPO (Invitrogen); esta construcción se transformó directamente en el huésped de expresión *E. coli* BL21. SE identificó un clon que contenía el plásmido apropiado.

Expresión de proteína Mhp3 recombinante

Se descongeló y sembró una solución madre de trabajo de la *E. coli* BL21 transformada que expresa la fusión tiorredoxina-Mhp3 a una dilución de 1:5.000 en medio definido RWLDM/D, que contiene los siguiente: K₂HPO₄ (6 g/l), KH₂PO₄ (3 g/l), (NH₄)SO₄ (5 g/l), NaCl (2 g/l), 0,2 ml CaCl₂ (15 g/l), 0,4 ml FeCl₃ 6H₂O (5 g/l), 0,4 ml MgSO₄ 7H₂O (480 g/l), ZnCl₂ (6,5 g/l), MnSO₄ H₂O (12 g/l), Na₂MoO₄ 2H₂O (5 g/l), CuSO₄ (1,5 g/l), CoCl₂ 6H₂O (2 g/l), H₃BO₃ (0,5 g/l), y 37% HCl (5 ml/L.) Se añadió también carbenicilina a una concentración de 125 μ g/mL. El cultivo creció en condiciones de alimentado-discontinuo (50% de dextrosa) en un fermentador con un volumen de trabajo de 5 litros BioFlow 3000 (New Brunswick Scientific; Edison, NJ) a 37°C hasta que A₆₂₅ fue de 10-20.

Las células húmedas de *E. coli* BL21 transformada que expresa la Mhp3-tiorredoxina recombinante del fermentador de 5 litros se recolectó por centrifugado y se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato. Las células se lisaron mecánicamente. Siguiendo a la centrifugado, se descartó el sedimento. El sobrenadante se pasó sobre una columna de intercambio iónico, y se eluyó usando un gradiente de NaCl. Las fracciones que contienen la proteína de fusión se juntaron, se dializaron para eliminar el NaCl y se esterilizaron por filtración usando un filtro de 0,2 μ m. Esta preparación se usa para las pruebas de vacunación.

Caracterización inmunológica de Mhp3 recombinante

La concentración de proteína de la Mhp3-tiorredoxina recombinante preparada como se describe anteriormente se determinó usando un kit de ensayo de proteína BCA (Pierce). En resumen, cada muestra se diluyó 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80 en agua destilada y desionizada estéril (ddH₂O). BSA (patrón de proteína) se diluyó a concentraciones en un intervalo de 200 a 800 μ g/ml. Se añadió un volumen de 20 μ l de muestra ó patrón a pocillos triplicados de una placa

ES 2 267 466 T3

de microtitulación de 96 pocillos y se añadió a cada pocillo 200 μ l de Reactivo B diluido 1/50 en Reactivo A. La placa se incubó a 37°C durante 30 min. La absorbancia de la muestra se determinó a 560 nm. La concentración de proteína de cada muestra se calculó por extrapolación usando la curva patrón de BSA.

Se resuspendieron alícuotas de Mhp3 recombinante (la carga de proteína era variable) y células bacterianas completas lisadas de *M. hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma mycoides* subespecie *mycoides* a un volumen final de 10 μ l, y se añadió 10 μ l de tampón de muestra reductor 2x (Owl Scientific). Las muestras se calentaron durante 10 min a 100°C, y el volumen entero se cargó en pocillos separados de un gel de Tris-glicina al 10% de 10 pocillos y 1,5 mm de ancho. Se incluyeron marcadores de amplio intervalo de peso molecular, no teñidos (Novex).

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana PVDF (Owl Scientific) a 100 mA constante durante 1 h. La transferencia se incubó en tampón bloqueante consistente en 5% de leche desnatada en polvo y Tween 20 al 0,5% en TBS (TBST) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación delicada. Se eliminó el tampón bloqueante y la membrana se lavó 1 vez durante 5 min con TBST. El anticuerpo primario se obtuvo de un cerdo siguiendo la estimulación experimental con la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*. Se añadió suero diluido a la membrana, seguido de 1 h de incubación a temperatura ambiente. Se diluyó el anticuerpo de Proteína G conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce), se añadió a la membrana lavada y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La membrana se lavó con TBST, y se añadió a la membrana el sustrato BCIP/NBT (Kirkegaard and Perry Laboratories) y se incubó hasta que se desarrolló una reacción de color adecuada. La membrana se aclaró después con agua para parar la reacción, y se secó a temperatura ambiente.

El suero del cerdo estimulado experimentalmente con *M. hyopneumoniae* reconoció la Mhp3 expresada de forma recombinante y purificada (Fig. 2), al ser identificada una banda de 60 kDa. Esto sugiere que la proteína recombinante expresa epítopes que son reconocidos por anticuerpos generados por exposición del cerdo a organismo de *M. hyopneumoniae* de células enteras.

Estudio animal para analizar la eficacia de Mhp3 recombinante como un candidato de vacuna

Se obtienen cerdos híbridos sanos (de aproximadamente 12 a 16 días de edad) sin una historia de vacunación previa contra *M. hyopneumoniae* ó enfermedad causada por *M. hyopneumoniae*. Los animales se asignan aleatoriamente por camadas en grupos. Se deja a los cerdos aclimatarse durante un mínimo de cinco días previamente a la iniciación del estudio.

Los animales se vacunan con 1 ml de la vacuna experimental apropiada por vía intramuscular (IM; músculo izquierdo del cuello) en el día "0", cuando los cerdos tienen aproximadamente de 19 a 23 días de edad. Aproximadamente a las dos ó tres semanas siguientes a la primera vacunación los cerdos reciben una segunda dosis de 1 ml (IM; músculo derecho del cuello) de la vacuna experimental apropiada. Todos los cerdos se observan estrechamente (durante más de 1 hora ó como justificado) para detectar cualquier síntoma post-vacunación tales como vómitos, depresión, diarrea, ataxia-descoordinación, respiración aumentada ó temblores.

Aproximadamente a las dos ó cuatro semanas siguientes a la segunda vacunación, los cerdos se estimulan intranasalmente con 1 ml/orificio nasal de un cultivo homogéneo vivo y virulento para el pulmón de *M. hyopneumoniae* cepa 232 que contiene aproximadamente 5,0 X 10⁶ unidades cambiantes de color/ml (CCU/ml).

A todos los animales estimulados se les hace una necropsia aproximadamente a las 4 semanas siguientes a la estimulación. Se retiran los pulmones y se evalúan cuidadosamente en busca de lesiones características atribuibles a infección por *M. hyopneumoniae*. Los resultados de lesiones de pulmón individuales se determinarán por análisis de imagen. Se puede obtener de cada animal estimulado una muestra parcial de tejido de pulmón para aislamiento bacteriano (CCU/g de tejido), histopatología e IFA.

Depósito de microorganismos

Las siguientes cepas de microorganismos se depositaron la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA el 9 de Septiembre de 1999 y se le ha asignado el número de acceso indicado a continuación. El depositante fue Pfizer Inc, cuya dirección registrada es 235 East 42nd Street, New York, New York 10017m United States.

Microorganismo

Número de acceso

Pz427

PTA-634

La presente invención no está limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas en el documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de aquéllas descritas en el documento se harán aparentes para aquéllos especialistas en la técnica de la descripción precedente y los dibujos acompañantes. Dichos modificaciones están destinadas a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos 1-30 de la SEC ID N°: 4, en la que dicha proteína no tiene una cisteína acilada con un ácido graso seguido de la secuencia de aminoácidos Trp Asp Lys Glu, y no tiene una homoserina lactona C-terminal.

2. Una proteína de la reivindicación 1 y una secuencia de aminoácido que comprende la SEC ID N°: 4.

3. La proteína de la reivindicación 1 o reivindicación 2 que es una proteína aislada.

4. La proteína de la reivindicación 1 o reivindicación 2 que es una proteína de fusión.

5. La proteína de la reivindicación 4, en la que la proteína de fusión es una proteína de fusión con tiorredoxina.

6. Una composición que comprende la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. La composición de la reivindicación 6, que además comprende un adyuvante.

8. La composición de la reivindicación 6 ó 7, que además comprende al menos un polipéptido seleccionado entre el grupo constituido por P46, P65, P97 y P102 de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

9. Una proteína inmunogénica que tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en la SEC ID N°: 4, en la que la proteína inmunogénica no tiene una cisteína acilada con un ácido graso seguido de la secuencia de aminoácidos Trp Asp Lys Glu, y no tiene una homoserina lactona C-terminal.

10. Uso de una proteína como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la fabricación de una formulación de vacuna para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en un animal causada por infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*.

11. El uso de la reivindicación 10, en el que dicho animal es un cerdo.

12. Un ADN que codifica en el código universal una proteína como se reivindica en la reivindicación 1, ó su complemento.

13. El ADN de la reivindicación 12 unido de forma operativa a un promotor heterólogo.

14. El ADN de la reivindicación 13 que además comprende un origen de replicación activo en una célula procariota.

15. El ADN de la reivindicación 14 que además comprende un origen de replicación activo en una célula eucariota.

16. Una célula huésped que comprende el ADN aislado de la reivindicación 13.

17. La célula huésped de la reivindicación 16, en la que dicha célula es *E. coli* BL21 y dicho ADN es el vector de expresión pBAD/Thio-TOPO.

18. Un procedimiento para la producción de la proteína de la reivindicación 2, comprendiendo dicho procedimiento (i) el crecimiento de las células de la reivindicación 16 ó 17 en condiciones en las que dicha proteína se expresa, y (ii) recuperación de dicha proteína.

19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicha proteína se recupera en una forma soluble.

20. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicha proteína se recupera en una forma insoluble.

21. Uso del ADN de la reivindicación 12 en la fabricación de una formulación de vacuna para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en un animal causado por infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*.

22. Uso de la reivindicación 21 en el que dicho animal es un cerdo.

23. Un kit adecuado para diagnóstico de la infección con *M. hyopneumoniae* que comprende en al menos un recipiente una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una proteína como se define en la reivindicación 1.

24. El kit de la reivindicación 23, que además comprende un anticuerpo secundario anti-cerdo.

25. El kit de la reivindicación 24, en el que el anticuerpo secundario está conjugado con una enzima que cataliza una reacción colorimétrica.

ES 2 267 466 T3

26. El kit de la reivindicación 25, donde la enzima se selecciona entre el grupo consistente en fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano rústico.

27. El kit de la reivindicación 25, que además comprende reactivos para un ensayo colorimétrico.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

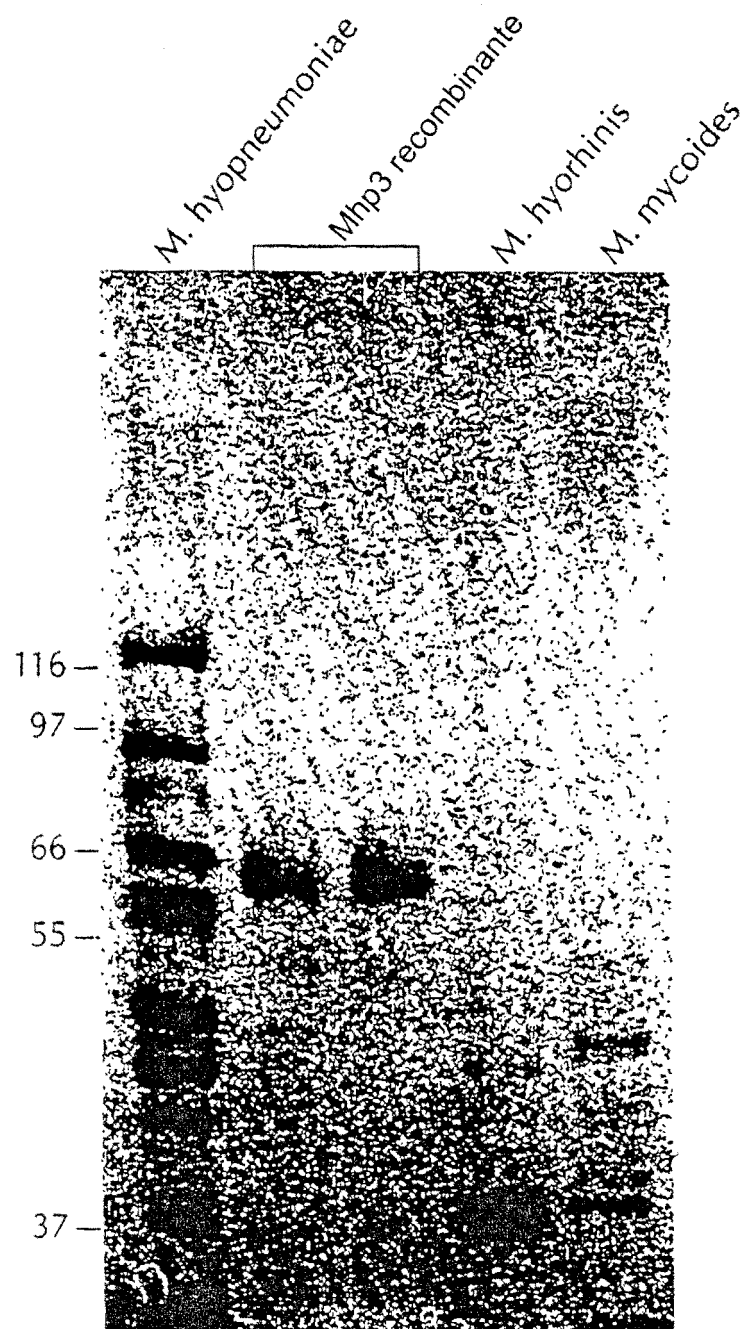
60

65

FIG. 1

Mhp3	MKKKIKWNKFLGLVFLPLSAIATISAGCWDKETKEEKSAQNQNKQITDVSKI SGLVNE	60
Ag234-5	--MNEFKKSLFLTGITISTVASVATFVS-CG--ETDKEGK-----IIRIFDNSFVK--D--	46
	::* . : : * : : : : : * : * * * * : * * * * :	
Mhp3	RKSEIMAAKADANKHFGLNMAIVTAGGTVNDNSFNQSSWEAIO---QLGALTGGEITSV	116
Ag234-5	RQ-----AEIEKAKNFDFNTVLLTAGGTVDQKSFNQSIWEAVLEHYDQIEKTTNLDREVSVQ	101
	*: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Mhp3	DSS-TAELEGKYSSLANTNKNVWVLSGFQHGDAFTRWLKIPE-NKQ---LFTEKNIIIL	170
Ag234-5	ETNNQSELIGKYKNFLNGKNVWILTGFQCGQEFKFLKQTDNSGKKYSDLLAEKKVIV	161
	::: * * * * : * * * * : * * * * : * : : * * : * : * * : * * :	
Mhp3	GIDWTDT---ENVIPTRYINLTYTEEAGWLAGYANASFLAKKFPSPDPTKRSAIVIGGG	227
Ag234-5	AVDWDLSKEDKDLIKAGHFISLLYKTEEAGFIAGYASSKFLAYKFPNDEAKRTIAPGGGG	221
	::* * : : : * : * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * : * * :	
Mhp3	ISPAVTDFAIAGYLAGIKAWNKNLNSDKKTKITTDKIEINLGFVDVQDTSTKERLEQIASDKK	287
Ag234-5	HGAGVTDFAIAGFLAGIAKYNNNDNPTAKVTISDNNINIDTGFI SNDK-TATFINGIVNKS-	279
	... * * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * :	
Mhp3	PSTLLAVAGPLTEIFSDIIANQND--RYLIGVDTDQSLVYTKTKNKFFTSILKNLGYSVF	345
Ag234-5	-SLVLPVAGSLTSSVVDAIKKSNKDTKYLIGVDTDQSKIFSPAT-VFFTSIEKHLGRIT	337
	* : * * * * . * * : * * : * * * * * * * : : : * * * * * * : * * :	
Mhp3	SVLSDLYTKKNSRNLAGEFEGKKS---ATVYLGIKDRFVDIADTSLEGNDKKLATEAI	401
Ag234-5	QVLTDIWLKKEDSKFLGSRFSFKLTNPANATVYKGISDDFVGSNSTVADADKVKAEFL	397
	. * * : * : * : * : * : * : * * * * * * * * : : : * * * * * :	
Mhp3	SEAKKEFEETKTIPAEVVRKTLTLEIPMPDKQPDQKQESLDKLTIDINKN-----	451
Ag234-5	NEATADFKKQIQANPTN-YKSVLGIPITMLINDNDADKNEKASLFHFDNWQTYWAFHSRFI	456
	. * * . : * : : : * : : : * * * * : : * : : : * : : : * : :	
Mhp3	-	
Ag234-5	N 457	

FIG. 2



ES 2 267 466 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Pfizer Products Inc.

5 <120> ÁCIDOS NUCLEICOS Y PROTEÍNAS DEL GEN *mhp3* DE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* Y USOS DE LOS MISMOS

10 <130> PC105555

<140> PC10555

15 <141> 29-09-1999

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1

<211> 1692

25 <212> ADN

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

30 <400> 1

```

gtttttgaat ataatagaaa atgtaaaata aaaattaatt tattaaaaaa taattgaaag 60
tcacgcgaat taaaacaatt aattaggaga acaactatga aaaaaaagat aaaatgaaat 120
aaatttcctg gcttaggctt agtttttccg ctttcagcaa tcgcgacaat ctctgccgga 180
tggtgggata aagaacaac taaagaagaa aaatcagccg ataatcaaaa taagcaaatc 240
actgatgtct caaaaatttc aggactagtt aatgaacgaa aatccgaaat tatggccgca 300
aaagctgatg caaacaacaa ttttgggcta aatatggcaa ttgtaaccgc tggtggaacg 360
gtaaatgata attcatTTaa ccaatcaagt tgagaggcaa ttcaacaact tggcgctctt 420
actggagggt agattacttc agtagatagt tcaactgctg aacttgaagg aaaatatagc 480
tcacttgcta ataccaacaa aaatgtttga gtactttctg gttttcaaca cggatgatgcg 540
ttcacaagat gattaaaaat ccctgaaaat aagcaattat ttactgaaaa aaatattatc 600
atactcggaa ttgactgaac tgatactgaa aatgtaattc caacaggtcg atatattaat 660
ttaacctata aaactgaaga agccggatga cttgcaggat atgcgaatgc ttcccttttg 720
gcaaaaaaat tcccgaagtga tccaactaaa agatcagcaa ttgttatcgg tggtgggatt 780
tcgccagctg taactgattt tatcgctggt tatctagccg gaattaaagc ttgaaatcta 840
aaaaattctg ataaaaaac aaagataaca actgataaaa tcgagataaa tcttggtttt 900
gatgttcaag atacttcaac aaaagaaaga cttgaacaaa ttgcttcaaa agataaacct 960
tcaacactat tagctgtcgc tggaccactt actgaaattt tctcgatat aatcgcaaac 1020
caaatgatac gttatctcat tgggtgtgac accgaccaat cacttgttta taaaaaac 1080
aaaaataaat ttttcacctc aattttgaaa aatttaggtt actccgtttt cagcgttctt 1140
agtgatTTat ataccaaaaa atcaaatTca agaaatttag ccggctttga atttggtaaa 1200
aaaagtgcaa ccgtttatct tggaaTtaaa gacaggtttg tcgatattgc tgatacttct 1260
ttagaaggca atgataaaaa actcgcaact gaagccattt ctgaagctaa aaaagaattt 1320
gaagaaaaaa ctaagacaat tcctgccgaa gaagtTcgta aaactttaga aattccggaa 1380
atgcctgata aacaacctga taagcaacag gaaagcttag acaaaactaa taccgatatt 1440
aataaaaatt aagtaagaaa aaataacaat tttttaacat tatacttttt tttagagatt 1500
aattttcttc taatttagtt taatttaata taaaattata ttaaattaaa aaaataaaaa 1560

atccggacta tttttgttcc ggatttttta tttttgtgtt actatttaat ataatgataa 1620
atcaggatta tgcaattgaa ttatttcaag tctcgaaaaa atttggcagt ttttatgcca 1680
attacaaaat ag
1692

```

ES 2 267 466 T3

<210> 2

<211> 451

5 <212> PRT

<213> *Micoplasma hyopneumoniae*

<400> 2

```

10      Met Lys Lys Lys Ile Lys Trp Asn Lys Phe Leu Gly Leu Gly Leu Val
        1             5             10             15

15      Phe Pro Leu Ser Ala Ile Ala Thr Ile Ser Ala Gly Cys Trp Asp Lys
        20             25             30

20      Glu Thr Thr Lys Glu Glu Lys Ser Ala Asp Asn Gln Asn Lys Gln Ile
        35             40             45

25      Thr Asp Val Ser Lys Ile Ser Gly Leu Val Asn Glu Arg Lys Ser Glu
        50             55             60

30      Ile Met Ala Ala Lys Ala Asp Ala Asn Lys His Phe Gly Leu Asn Met
        65             70             75             80

35      Ala Ile Val Thr Ala Gly Gly Thr Val Asn Asp Asn Ser Phe Asn Gln
        85             90             95

40      Ser Ser Trp Glu Ala Ile Gln Gln Leu Gly Ala Leu Thr Gly Gly Glu
        100            105            110

45      Ile Thr Ser Val Asp Ser Ser Thr Ala Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Ser
        115            120            125

50      Ser Leu Ala Asn Thr Asn Lys Asn Val Trp Val Leu Ser Gly Phe Gln
        130            135            140

55      His Gly Asp Ala Phe Thr Arg Trp Leu Lys Ile Pro Glu Asn Lys Gln
        145            150            155            160

60      Leu Phe Thr Glu Lys Asn Ile Ile Ile Leu Gly Ile Asp Trp Thr Asp
        165            170            175

65      Thr Glu Asn Val Ile Pro Thr Gly Arg Tyr Ile Asn Leu Thr Tyr Lys
        180            185            190

70      Thr Glu Glu Ala Gly Trp Leu Ala Gly Tyr Ala Asn Ala Ser Phe Leu

```

ES 2 267 466 T3

	195	200	205
5	Ala Lys Lys Phe Pro Ser Asp Pro Thr Lys Arg Ser Ala Ile Val Ile 210	215	220
10	Gly Gly Gly Ile Ser Pro Ala Val Thr Asp Phe Ile Ala Gly Tyr Leu 225	230	235 240
15	Ala Gly Ile Lys Ala Trp Asn Leu Lys Asn Ser Asp Lys Lys Thr Lys 245	250	255
20	Ile Thr Thr Asp Lys Ile Glu Ile Asn Leu Gly Phe Asp Val Gln Asp 260	265	270
25	Thr Ser Thr Lys Glu Arg Leu Glu Gln Ile Ala Ser Lys Asp Lys Pro 275	280	285
30	Ser Thr Leu Leu Ala Val Ala Gly Pro Leu Thr Glu Ile Phe Ser Asp 290	295	300
35	Ile Ile Ala Asn Gln Asn Asp Arg Tyr Leu Ile Gly Val Asp Thr Asp 305	310	315 320
40	Gln Ser Leu Val Tyr Thr Lys Thr Lys Asn Lys Phe Phe Thr Ser Ile 325	330	335
45	Leu Lys Asn Leu Gly Tyr Ser Val Phe Ser Val Leu Ser Asp Leu Tyr 340	345	350
50	Thr Lys Lys Ser Asn Ser Arg Asn Leu Ala Gly Phe Glu Phe Gly Lys 355	360	365
55	Lys Ser Ala Thr Val Tyr Leu Gly Ile Lys Asp Arg Phe Val Asp Ile 370	375	380
60	Ala Asp Thr Ser Leu Glu Gly Asn Asp Lys Lys Leu Ala Thr Glu Ala 385	390	395 400
	Ile Ser Glu Ala Lys Lys Glu Phe Glu Glu Lys Thr Lys Thr Ile Pro 405	410	415
	Ala Glu Glu Val Arg Lys Thr Leu Glu Ile Pro Glu Met Pro Asp Lys 420	425	430
	Gln Pro Asp Lys Gln Gln Glu Ser Leu Asp Lys Leu Ile Thr Asp Ile 435	440	445

<210> 3

<211> 1263

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 267 466 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: mhp3 manipulada para expresión *in vitro*.

5 <400> 3

```

    atgtgggata aagaaacaac taaagaagaa aaatcagccg ataatcaaaa taagcaaadc 60
    actgatgtct caaaaatttc aggactagtt aatgaacgaa aatccgaaat tatggccgca 120
    aaagctgatg caaacaaca ttttgggcta aatatggcaa ttgtaaccgc tggggaacg 180
10  gtaaatgata attcatttaa ccaatcargt tgggaggcaa ttcaacaact tggcgctctt 240
    actggaggtg agattacttc agtagatagt tcaactgctg aacttgaagg aaaatatagc 300
    tcacttgcta ataccaacaa aaatgttttg gtactttctg gttttcaaca cggtgatgcg 360
    ttcacaagat gggttaaaaat ccctgaaaat aagcaattat ttactgaaaa aaatattatc 420
15  atactcggaa ttgactggac tgatactgaa aatgtaattc caacaggtcg atatattaat 480
    ttaacctata aaactgaaga agccggatgg cttgcaggat atgcgaatgc ttcctttttg 540
    gcaaaaaaat tccaagtga tccaactaaa agatcagcaa ttgttatcgg tggtgaggatt 600
20  tcgccagctg taactgattt tatcgtcgtt tatctagccg gaattaaagc ttggaatcta 660
    aaaaattctg ataaaaaac aaagataaca actgataaaa tcgagataaa tcttggggtt 720
    gatgttcaag atacttcaac aaaagaaaga cttgaacaaa ttgcttcaaa agataaacct 780
    tcaacactat tagctgtcgc tggaccactt actgaaattt tctcggatat aatcgcaaac 840
25  caaaatgatc gttatctcat tgggtgttgac accgaccaat cacttgttta tacaaaaact 900
    aaaaataaat ttttcacctc aattttgaaa aatttaggtt actccgtttt cagcggttctt 960
    agtgatttat ataccacaaa atcaaattca agaaatttag ccggctttga atttggtaaa 1020
    aaaagtgcga ccgttttatc ttggaattaaa gacaggtttg tcgatattgc tgatacttct 1080
30  ttagaaggca atgataaaaa actcgcaact gaagccattt ctgaagctaa aaaagaattt 1140
    gaagaaaaaa ctaagacaat tcctgccgaa gaagttcgta aaactttaga aattccggaa 1200
    atgcctgata aacaacctga taagcaacag gaaagcttag acaaacttaa ttaccgatat 1260
35  taa
                                     1263

```

<210> 4

<211> 423

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de secuencia artificial: mhp3 manipulada para expresión *in vitro*.

50

55

60

65

ES 2 267 466 T3

<400> 4

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

ES 2 267 466 T3

	260	265	270
5	Ile Phe Ser Asp Ile Ile Ala Asn Gln Asn Asp Arg Tyr Leu Ile Gly 275 280 285		
10	Val Asp Thr Asp Gln Ser Leu Val Tyr Thr Lys Thr Lys Asn Lys Phe 290 295 300		
15	Phe Thr Ser Ile Leu Lys Asn Leu Gly Tyr Ser Val Phe Ser Val Leu 305 310 315 320		
20	Ser Asp Leu Tyr Thr Lys Lys Ser Asn Ser Arg Asn Leu Ala Gly Phe 325 330 335		
25	Glu Phe Gly Lys Lys Ser Ala Thr Val Tyr Leu Gly Ile Lys Asp Arg 340 345 350		
30	Phe Val Asp Ile Ala Asp Thr Ser Leu Glu Gly Asn Asp Lys Lys Leu 355 360 365		
35	Ala Thr Glu Ala Ile Ser Glu Ala Lys Lys Glu Phe Glu Glu Lys Thr 370 375 380		
40	Lys Thr Ile Pro Ala Glu Glu Val Arg Lys Thr Leu Glu Ile Pro Glu 385 390 395 400		
45	Met Pro Asp Lys Gln Pro Asp Lys Gln Gln Glu Ser Leu Asp Lys Leu 405 410 415		
50	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa 420		

45 <210> 5
 <211> 602
 <212> ADN
 50 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

55

60

65

ES 2 267 466 T3

<400>5

```

5      atgataatat ttttttcagt aaataattgc ttattttcag ggatttttaa tcatcttgtg 60
      aacgcatacac cgtggtgaaa accagaaagt actcaaaca ttttggttgt attagcaagt 120
      gagctatatt ttcttcaag ttcagcagtt gaactatcta ctgaagtaat ctcacctcca 180
      gtaagagcgc caagttgttg aattgcctct caacttgatt ggttaaatga attatcattt 240
10     accgttccac cagcggttac aattgccata tttagcccaa aatgtttgtt tgcatacagct 300
      tttgoggcca taatttcgga ttttcgttca ttaactagtc ctgaaatttt tgagacatca 360
      gtgatttgct tattttgatt atcggctgat tttcttctt tagttgtttc tttatcccaa 420
      catcgggcag agattgtcgc gattgctgaa agcggaaaaa ctaagcctaa gccaagaaat 480
15     ttatttcatt ttatcttttt tttcatagtt gttctcctaa ttaattgttt taattacgat 540

      gactttcaat tattttttaa taaattaatt tttattttac attttctatt atattcaaaa 600
20     ac
                                           602

```

<210> 6

<211> 200

<212> PRT

<213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 267 466 T3

<400> 6

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

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

60 <213> *Mycoplasma hyopneumoniae*

<400> 7

65	Ala	Gly	Xaa	Trp	Ala	Lys	Glu	Thr	Thr	Lys	Glu	Glu	Lys	Ser	1	5	10
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----

ES 2 267 466 T3

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.
 10
 <400> 8

 Ala Trp Val Thr Ala Asp Gly Thr Val Asn
 1 5 10
 15

 <210> 9
 <211> 21
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.

 <400> 9

 Ala Ile Val Thr Ala Asp Gly Thr Val Asn Asp Asn Lys Pro Asn
 1 5 10 15
 30
 Gln Trp Val Arg Lys Tyr
 20
 35
 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.

 <400> 10

 tgytgrgcna argaracnac naargargar
 50
 <210> 11
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.

 <400> 11

 tggtgagcwa aagaaacwac waaagaagaa
 65
 <210> 12

30

30

ES 2 267 466 T3

	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
10	<400>12	
	tgrgtnacng cngayggnac ngtnaay	27
15	<210> 13	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
25	<400> 13	
	tgagtwacwg cwgatggwac wgtwaat	27
30	<210> 14	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
40	<400>14	
	rttnacngtn ccrtcngcng tnacyc	26
45	<210> 15	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
55	<400> 15	
	attsacs gts ccatesgcsg tsactc	26
60	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

ES 2 267 466 T3

	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
	<400> 16	
5	tttgagacat cagtgatttg c	21
	<210> 17	
10	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
	<400> 17	
20	gaacgaaaat ccgaaattat gg	22
	<210> 18	
25	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
	<400> 18	
35	ctatctactg aagaatctca cc	22
	<210> 19	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
	<400> 19	
50	gtgatgccgt tcacaagatg	20
	<210> 20	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
	<400> 20	
65	cactaagaac gctgaaaacg g	21

ES 2 267 466 T3

	<210> 21	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
10	<400> 21	
	gattacaact gtaaaatcga g	21
15	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
25	<400> 22	
	ggcttcttca gttttatagg	20
30	<210> 23	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
40	<400> 23	
	aaactcgcaa ctgaagcc	18
45	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
55	<400> 24	
	gaaatgcctg ataaacaacc	20
60	<210> 25	
	<211> 22	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 267 466 T3

	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.		
5	<400> 25		
	cttcagaaat ggcttcagtt gc		22
10	<210> 26		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.		
20	<400>26		
	gctagataac cagcgataaa atcag		25
25	<210> 27		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.		
35	<400> 27		
	tgcataatcc tgatttatc		19
40	<210> 28		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.		
50	<400> 28		
	tgaaagtcac cgtaattaaa ac		22
55	<210> 29		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.		
65	<400> 29		
	aatcggcata tgtgggataa agaaacaact aaag		34

ES 2 267 466 T3

	<210> 30	
	<211> 34	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
10	<400> 30	
	ggagtaatct agattattaa tatcggtaat taag	34
15	<210> 31	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
25	<400> 31	
	gtttttgaat ataatagaaa atg	23
30	<210> 32	
	<211> 28	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
40	<400> 32	
	tttattaaaa aataattgaa agtcacg	28
45	<210> 33	
	<211> 28	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
55	<400> 33	
	ctattttgta attggcataa aaactgcc	28
60	<210> 34	
	<211> 24	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 267 466 T3

	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.		
5	<400> 34		
	gataaaatgg aataaatttc ttgg		24
10	<210> 35		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.		
20	<400> 35		
	caggttggga ggcaattcaa c		21
25	<210> 36		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.		
35	<400> 36		
	caaaaatggtt tgggtacttt ctgg		24
40	<210> 37		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.		
50	<400> 37		
	cacaagatgg ttaaaaatcc c		21
55	<210> 38		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.		
65	<400> 38		
	ggaattgact ggactgatac tg		22

ES 2 267 466 T3

	<210> 39	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
10	<400> 39	
	gccggatggc ttgcaggata tg	22
15	<210> 40	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido.	
25	<400> 40	
	taaagcttgg aatctaaaaa attc	24
30	<210> 41	
	<211> 457	
	<212> PRT	
35	<213> <i>Mycoplasma Hyorhinis</i>	
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 267 466 T3

<400> 41

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

ES 2 267 466 T3

	145		150		155		160									
5	Val	Ala	Val	Asp	Trp	Asp	Leu	Ser	Lys	Glu	Asp	Lys	Asp	Leu	Ile	Lys
				165					170					175		
10	Ala	Gly	His	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Tyr	Lys	Thr	Glu	Glu	Ala	Gly	Phe
			180						185					190		
15	Ile	Ala	Gly	Tyr	Ala	Ser	Ser	Lys	Phe	Leu	Ala	Tyr	Lys	Phe	Pro	Asn
			195					200					205			
20	Asp	Glu	Ala	Lys	Arg	Thr	Ile	Ala	Pro	Phe	Gly	Gly	Gly	His	Gly	Ala
		210					215					220				
25	Gly	Val	Thr	Asp	Phe	Ile	Ala	Gly	Phe	Leu	Ala	Gly	Ile	Ala	Lys	Tyr
	225					230				235					240	
30	Asn	Asn	Asp	Asn	Pro	Thr	Ala	Lys	Val	Thr	Ile	Ser	Asp	Asn	Asn	Ile
				245					250						255	
35	Asn	Ile	Asp	Thr	Gly	Phe	Ile	Ser	Asn	Asp	Lys	Thr	Ala	Thr	Phe	Ile
			260					265					270			
40	Asn	Gly	Ile	Val	Asn	Lys	Ser	Ser	Leu	Val	Leu	Pro	Val	Ala	Gly	Ser
		275				280					285					
45	Leu	Thr	Ser	Ser	Val	Val	Asp	Ala	Ile	Lys	Lys	Ser	Asn	Lys	Asp	Thr
	290					295					300					
50	Lys	Tyr	Leu	Ile	Gly	Val	Asp	Thr	Asp	Gln	Ser	Lys	Ile	Phe	Ser	Pro
	305				310					315				320		
55	Ala	Thr	Val	Phe	Phe	Thr	Ser	Ile	Glu	Lys	His	Leu	Gly	Arg	Thr	Ile
				325					330				335			
60	Tyr	Gln	Val	Leu	Thr	Asp	Ile	Trp	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Ser	Lys	Phe
		340					345						350			
65	Leu	Gly	Ser	Phe	Arg	Ser	Phe	Lys	Leu	Thr	Asn	Pro	Ala	Asn	Ala	Thr
		355					360					365				
70	Val	Tyr	Lys	Gly	Ile	Ser	Asp	Asp	Phe	Val	Gly	Val	Ser	Asn	Ser	Thr
	370					375					380					
75	Val	Ala	Asp	Ala	Asp	Lys	Val	Lys	Ala	Gln	Glu	Phe	Leu	Asn	Glu	Ala
	385					390				395			400			
80	Thr	Ala	Asp	Phe	Lys	Lys	Gln	Ile	Gln	Ala	Asn	Pro	Thr	Asn	Tyr	Lys

ES 2 267 466 T3

405

410

415

5 Ser Val Leu Gly Ile Pro Thr Met Leu Ile Asn Asp Asn Asp Ala Lys
420 425 430

10 Asp Asn Glu Lys Ala Ser Leu Phe His Phe Asp Asn Trp Gln Thr Tyr
435 440 445

15 Trp Ala Phe His Ser Arg Phe Ile Asn
450 455

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65