

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 552**

51 Int. Cl.:

C07K 14/30 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2013 PCT/CN2013/071379**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14121433**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2013 E 13874332 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 2955192**

54 Título: **Vacuna subunitaria contra *Mycoplasma* spp.**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 812 552 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna subunitaria contra *Mycoplasma* spp.

5 Antecedentes

Campo técnico

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

Descripción de la técnica relacionada

15 *Mycoplasma* spp. se conoce actualmente como la bacteria más pequeña capaz de autorreplicarse fuera de las células hospedadoras. Aunque la neumonía enzoótica porcina podría no producir la muerte del porcino, reducirá la eficacia de la alimentación y producirá un retraso del crecimiento, inflamación e inmunosupresión, así como convertirá al porcino en más vulnerable a la infección por otros patógenos, lo que por tanto resultará en un daño económico para la industria.

20 Hasta la fecha, la neumonía enzoótica porcina se evitaba mediante tres estrategias principales, incluyendo: la administración de medicamentos, la gestión del entorno y la vacunación. Al ver la mala eficacia preventiva de los antibióticos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, la administración de medicamentos se puede usar solo con fines de tratamiento y es difícil cumplir las necesidades de prevención. Asimismo, considerando que la drogodependencia puede conducir a infecciones más importantes producidas por bacterias resistentes a fármacos, la administración de
25 medicamentos necesita planes cautelosos y existen muchas limitaciones.

La gestión del entorno es la base de la prevención de la infección por *Mycoplasma* spp. Una buena desinfección y gestión de las pocilgas serían útiles para reducir la incidencia de la infección. Por otro lado, la prevención podría ser
30 más comprehensiva a través de la vacunación.

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

Hasta ahora, existen algunas proteínas candidatas potenciales que podrían utilizarse para las vacunas de *M. hyopneumoniae*; sin embargo, no existen además informes adicionales que verifiquen las proteínas adecuadas para
40 las vacunas de *M. hyopneumoniae*.

Minion F.C. *et al.*, Database Gene 21 de diciembre de 2012 (2012-12-21) se refiere a la subunidad alfa de la piruvato deshidrogenasa E1 [*mycoplasma hyopneumoniae* 232].

45 El documento WO2007/006712 A2 divulga una vacuna de subunidades de micoplasma que comprende L-alfa-glicerofosfato oxidasa.

El documento 15 EP 0 571 648 A1 se refiere a una vacuna que protege contra la neumonía por micoplasmas siendo una cepa de hiopneumonía plasmática designada PRIT-5.

50 Sumario

A la vista de lo anterior, uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar antígenos adecuados para utilizarse en vacunas contra *M. hyopneumoniae* y producir por tanto novedosas vacunas de *M. hyopneumoniae* para
55 que se pueda reducir el coste de la prevención.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una combinación de antígenos que sea adecuada para utilizarse en vacunas contra *M. hyopneumoniae* y proporcionar por tanto vacunas de subunidades con mejor comportamiento; por tanto, habría más opciones para las tareas de prevención.

60 Para conseguir los objetivos anteriormente mencionados, la presente invención proporciona una composición de acuerdo con la reivindicación 1.

Preferentemente, dicho principio activo tiene una concentración de 50 a 3500 µg/ml basada en el volumen total de
65 dicha composición.

Preferentemente, dicho principio activo comprende PdhA y P78 de acuerdo con la reivindicación 3.

Preferentemente, dicho adyuvante farmacéuticamente aceptable es un adyuvante completo de Freund, un adyuvante incompleto de Freund, un gel de alúmina, un tensioactivo, un adyuvante de polianiones, un péptido, una emulsión de aceite, o una combinación de los mismos.

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

La presente invención proporciona además un vector de expresión para prevenir la invención por *Mycoplasma* spp., de acuerdo con la reivindicación 7.

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

Preferentemente, dicho plásmido es pET-MSY, pET-YjgD, pET-D, o pET-SUMO.

Preferentemente, dicho plásmido comprende además un gen que codifica una pareja de fusión. Preferentemente, dicha pareja de fusión es MsyB de *E. coli*, YjgD de *E. coli*, la proteína D del bacteriófago Lambda, o SUMO de *S. cerevisiae*.

Preferentemente, dicho vector de expresión se usa para un sistema de expresión génico de *E. coli*.

Para resumir, la presente invención se refiere a antígenos que son adecuados para utilizarse como el principio activo de una vacuna de subunidades de *M. hyopneumoniae* y una vacuna de subunidades/composición de *M. hyopneumoniae* preparada usando el mismo. La presente vacuna de subunidades no solo puede usarse eficazmente en las tareas de prevención para disminuir el coste de la misma, la divulgación de la presente invención muestra también una vacuna de subunidades de tipo "cóctel" (es decir, que tiene al menos dos antígenos como principios activos) que utiliza al menos dos antígenos de la presente invención y que tiene una inducción mejorada de la respuesta inmunitaria.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el resultado de la electroforesis de proteínas en gel bidimensional llevada a cabo en el 1^{er} ejemplo de la presente invención.

La Figura 2 muestra el resultado de la reacción colorimétrica de la transferencia Western llevada a cabo en el 1^{er} ejemplo de la presente invención.

La Figura 3 muestra el resultado de la electroforesis de los productos de la PCR obtenidos en el 2^o ejemplo de la presente invención.

La Figura 4 muestra los registros de los experimentos de estímulo llevados a cabo en el 3^{er} ejemplo de la presente invención.

Descripción detallada

Uno de los conceptos fundamentales de la presente invención es analizar antígenos candidatos potenciales adecuados para las vacunas de subunidades usando la electroforesis de proteínas en gel bidimensional junto con la tecnología de cribado inmunitario y para identificar los antígenos mediante espectrometría de masas. A continuación, se verificaron los comportamientos de las presentes vacunas de subunidades mediante experimentos de modelización animal.

En resumen, el progreso del desarrollo de la presente invención es:

(1) Inducir respuestas inmunitarias en cerdos experimentales inyectando una vacuna de *M. hyopneumoniae* convencional y obtener suero que contenga anticuerpos dirigidos contra *M. hyopneumoniae*. (2) Obtener proteínas totales de *M. hyopneumoniae* para electroforesis de proteínas en gel bidimensional. (3) Llevar a cabo la hibridación del resultado de la electroforesis de proteínas en gel bidimensional de la etapa (2) usando el suero de la etapa (1) como 1^{er} anticuerpo, y a continuación recoger las proteínas con resultado positivo (es decir, antígenos candidatos) a partir del gel tras la amplificación con un 2^o anticuerpo y el siguiente procedimiento de desarrollo. (4) Identificar los antígenos candidatos obtenidos en la etapa (3). (5) Expresar dichos antígenos candidatos en grandes cantidades usando un sistema de expresión génica de *E. coli*. (6) Examinar la eficacia de las presentes vacunas de subunidades en la reducción de los rasgos patológicos en el pulmón mediante experimentos de estímulo de los cerdos y verificar así el valor de dichos antígenos candidatos para su uso como principios activos de una vacuna de subunidades.

La presente composición para prevenir la infección por *Mycoplasma* spp., comprende un principio activo y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. En una realización de la presente invención, dicho principio activo puede ser PdhA, y P78. En una realización alternativa, siempre que el determinante antigénico de la proteína anteriormente mencionada no esté interferido, dicho principio activo puede ser una proteína de fusión ef de las proteínas anteriormente mencionadas. En otra realización alternativa, dicho principio activo comprende las proteínas anteriormente mencionadas; esto es, la así denominada vacuna "cóctel" de la presente invención.

En otra realización de la presente invención, dicho principio activo puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08, o SEQ ID NO: 12.

En una realización alternativa, siempre que el determinante antigénico formado mediante plegado de un péptido de dicha secuencia de aminoácidos no esté interferido, dicho principio activo puede ser una proteína de fusión con las mencionadas secuencias. En otra realización alternativa, dicho principio activo comprende dos proteínas que comprenden respectivamente una de las secuencias de aminoácidos anteriormente mencionadas; esto es, la así denominada vacuna "cóctel" de la presente invención.

Dicho adyuvante farmacéuticamente aceptable se usa para mejorar el efecto inmunitario de dicho principio activo, estabilizar dicho principio activo, y/o aumentar la seguridad de las vacunas. Dicho adyuvante farmacéuticamente aceptable de la presente invención incluye, aunque no de forma limitativa: un adyuvante completo de Freund, un adyuvante incompleto de Freund, un gel de alúmina, un tensioactivo, un adyuvante de polianiones, un péptido, una emulsión de aceite, o una combinación de los mismos.

La composición de la presente invención puede tener uno o al menos dos de dichos principios activos (es decir, una vacuna de tipo cóctel). En un ejemplo de la presente composición, dicho principio activo tiene una concentración de 50 a 3500 µg/ml basada en el volumen total de dicha composición. En una realización preferida de la presente invención, cuando dicha composición comprende solo uno de dichos principios activos, dicho principio activo tiene una concentración de 50 a 500 µg/ml basada en el volumen total de dicha composición. En una realización alternativa de la presente invención, la presente composición comprende al menos uno de dichos principios activos; en donde la concentración total de dicho(s) principio(s) activo(s) contenidos en dicha composición es de 50 a 1000 µg/ml, 50 a 1500 µg/ml, 50 a 2000 µg/ml, 50 a 2500 µg/ml, 50 a 3000 µg/ml, o 50 a 3500 µg/ml basado en el volumen total de dicha composición.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un vector de expresión para prevenir la infección por *Mycoplasma* spp. Específicamente, dicho vector de expresión se puede usar para un sistema de expresión génica de *E. coli*.

Dicho vector de expresión comprende un plásmido. Dicho plásmido comprende: una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 01; y un elemento regulador.

Dicho vector se usa en un sistema de expresión génica de *E. coli* y para producir los antígenos de la presente invención mediante *E. coli*. En otras palabras, dicha secuencia de nucleótidos se puede traducir en la secuencia de aminoácidos del presente antígeno mediante un sistema de expresión génica de *E. coli* y a continuación, la secuencia de aminoácidos puede plegarse al presente antígeno.

En una realización alternativa, siempre que el funcionamiento del sistema de expresión génica de *E. coli* no esté impedido y la producción de dicha secuencia de nucleótidos y el plegado de la secuencia de aminoácidos consiguiente del mismo no esté interferido, dicho plásmido puede comprender dos o más de dichas secuencias de nucleótidos.

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

En una realización preferida de la presente invención, dicho plásmido comprende además un gen que codifica una pareja de fusión. Dicha pareja de fusión incluye, aunque no de forma limitativa, MsyB de *E. coli*, YjgD de *E. coli*, la proteína D del bacteriófago Lambda, o SUMO de *S. cerevisiae*. Dicho MsyB es rico en aminoácidos ácidos y podría ser favorable para mejorar la solubilidad de las proteínas que se van a producir.

Los siguientes ejemplos enumeran los ensayos y experimentos de la presente invención a fin de explicar adicionalmente las características y ventajas de la presente invención. Debe señalarse que los siguientes ejemplos son ilustrativos y no deben utilizarse para limitar el alcance de las reivindicaciones de la presente invención.

Ejemplo 1: Cribado de antígenos candidatos adecuados para utilizarse como principios activos de una vacuna de subunidades.

Preparación de suero que contiene anticuerpo dirigido contra *Mycoplasma* spp. de porcino.

De acuerdo con las investigaciones, existen siete *Mycoplasma* spp. que se pueden aislar de porcinos: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyopharyngis*, *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma bovis* (Gourlay *et al.*, 1978; Blank *et al.*, 1996; Assuncao *et al.*, 2005). Entre ellos, *M. hyopneumoniae* es el patógeno principal de la neumonía enzoótica de porcino con una tasa de infección del 25 al 93 %. Por tanto, la presente invención utilizó *M. hyopneumoniae* (cepa PRIT-5) para los estudios inmunoproteómicos y como fuentes de genes que codifican antígenos. Se utilizó medio de Friis (Friis *et al.*, 1975) para cultivar *M. hyopneumoniae*. De acuerdo con el diseño del experimento, se añadió una cantidad adecuada de antibiótico o agar del 1,5 % para formular un medio sólido.

Se trajeron tres cerdos SPF de 4 semanas de edad del Agricultural Technology Research Institute y se alimentaron con el mismo pienso y se mantuvieron en el mismo entorno y condición de crecimiento en la pocilga antes de los experimentos. Después, los cerdos se alimentaron hasta el día 32, el día 46, y el día 60 de edad, se administraron a los cerdos 2 ml de vacuna Bayovac® MH-PRIT-5 (*M. hyopneumoniae* PRIT-5) mediante inyección intramuscular. A continuación, los cerdos se alimentaron de forma continua hasta el día 74 de edad y se extrajo sangre de la vena yugular de los mismos. La sangre recogida se puso a temperatura ambiente durante 1 hora y se almacenó a 4 °C. Al día siguiente, la sangre recogida se centrifugó a 1.107×g durante 30 minutos y se retiró el sobrenadante a un tubo limpio y se almacenó a -20 °C.

Electroforesis de proteínas en gel bidimensional de la proteína total de *Mycoplasma* spp.

Se usó el kit de extracción de proteínas ReadyPrep™ (proteínas totales) (Bio-Rad, CA, EE.UU.) para extraer la proteína total de *Mycoplasma* spp. Después, se determinó la concentración de la proteína recogida usando un kit de ensayo de proteínas RC DC de Bio-Rad (CA, EE.UU.). Se puede inferir el protocolo detallado a partir de la descripción del producto o se puede modificar a partir de protocolos bien conocidos en el campo.

La electroforesis de proteínas en gel bidimensional se llevó a cabo en dos etapas: isoelectroenfoque (IEF) y electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). La IEF estaba destinada a separar proteínas en la muestra según el punto isoelectrónico de las mismas; la SDS-PAGE estaba destinada a separar proteínas de acuerdo con el peso molecular de las mismas. Véase la figura 1, que muestra el resultado de la electroforesis de proteínas en gel bidimensional.

Hibridación.

El suero obtenido en la etapa (1) se usó como 1^{er} anticuerpo para hibridarse con el resultado de la electroforesis de proteínas en gel bidimensional en la etapa (2). Tras amplificarse por el 2^o anticuerpo y revelarse mediante el siguiente procedimiento de revelado, se recogieron las proteínas que mostraban un resultado positivo. Aquellas proteínas fueron reconocidas por el anticuerpo dirigido contra *Mycoplasma* spp., y serían por tanto adecuadas como antígenos candidatos para el principio activo de las vacunas de subunidades.

La hibridación se llevó a cabo mediante transferencia Western. En resumen, el gel 2D tras la electroforesis se transfirió a una membrana de PVDF. A continuación, la membrana se incubó y se hibridó secuencialmente con el 1^{er} anticuerpo (el suero que contenía el anticuerpo dirigido contra *Mycoplasma* spp) y el 2^o anticuerpo (anticuerpo dirigido contra IgG de cerdo conjugado con AP). Después, se llevó a cabo una reacción colorimétrica utilizando la solución NBT/BCIP.

En la figura 2 se muestra el resultado de la reacción colorimétrica de la transferencia Western; en donde 10 proteínas positivas para la inmunohibridación con anticuerpo dirigido contra *Mycoplasma* spp. se marcaron como antígenos candidatos para utilizarse como principios activos de las vacunas de subunidades.

Identificación de los antígenos candidatos obtenidos.

De acuerdo con la reacción colorimétrica de la transferencia Western, el gel correspondiente a la localización positiva en la membrana se cortó en micropéptidos y se analizó mediante espectrometría de masas. Los datos obtenidos de la espectrometría de masas se hicieron corresponder a continuación con la secuencia de aminoácidos y la base de datos para identificar aquellas proteínas.

Véase la tabla 1 siguiente, se relacionaron dichas 10 proteínas positivas para la inmunohibridación con anticuerpo dirigido contra *Mycoplasma* spp.

Tabla 1: las 10 proteínas positivas para la inmunohibridación con anticuerpo dirigido contra *Mycoplasma* spp y la secuencia de aminoácidos de las mismas.

Candidatos	Nombre	SEQ ID NO
1	XylF (lipoproteína de unión a xilosa)	SEQ ID NO: 09

(continuación)

Candidatos	Nombre	SEQ ID NO
2	XylF (lipoproteína de unión a xilosa)	SEQ ID NO: 09
3	XylF (lipoproteína de unión a xilosa)	SEQ ID NO: 09
4	PdhA (subunidad E1-alfa de la piruvato deshidrogenasa)	SEQ ID NO: 08
5	Mhp145 (proteína de unión a azúcar periplásmico)	SEQ ID NO: 11
6	EutD (fosfotransacetilasa)	SEQ ID NO: 10
7	EutD (fosfotransacetilasa)	SEQ ID NO: 10
8	Mhp389	SEQ ID NO: 14
9	P78 (lipoproteína)	SEQ ID NO: 12
10	P132	SEQ ID NO: 13
*XylF y EutD tienen diferentes estados de carga en las células y por tanto, se convierten en 3 y 2 localizaciones positivas sobre la membrana.		

En la siguiente divulgación, las realizaciones con respecto a los candidatos 1 a 3, 5 a 8 y 10 son únicamente para referencia.

5

Ejemplo 2: Expresión de dichos antígenos candidatos en gran cantidad por el sistema de expresión génica de E. coli.

10

Se usó *Escherichia coli* JM109 como células hospedadoras para la clonación y se usó *Escherichia coli* BL21 (DE3) como células hospedadoras para la expresión de la proteína. Las células de *Escherichia coli* se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani; Difco, Michigan, EE.UU.). De acuerdo con el diseño del experimento, se añadió una cantidad adecuada de antibiótico o agar del 1,5 % para formular un medio sólido.

15

Amplificación de los genes que codifican los antígenos candidatos.

20

Después de identificar los antígenos candidatos, los genes que codificaban aquellos antígenos se buscaron en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los cebadores específicos que se dirigían a los genes antigénicos se diseñaron en consecuencia. A continuación, los genes antigénicos se amplificaron usando los cebadores específicos y el cromosoma de *M. hyopneumoniae* PRIT-5 como molde. En la siguiente tabla 2 se relacionaron los cebadores específicos utilizados.

Tabla 2: Conjunto de cebadores.

Candidatos	Secuencias del conjunto de cebadores
PdhA	PdhAF (SEQ ID NO:15) 5'-GATATAGGATCCATGGACAAATTTTCGCTATGTAAAGCCTG-3' PdhAR (SEQ ID NO:16) 5'-CAATATGTCGACTTATTTTACTCCTTTAAAAAATTCAAGCGCTTC-3'
XylF	XylFF (SEQ ID NO:17) 5'-GATATAGGATCCATGAATGGAATAAATTTCTTGGCTTAGGCTTAGTTTTTC-3' XylFR (SEQ ID NO:18) 5'-CAATATGTCGACTTAATTTTTATTAATATCGGTAATTAGTTTGTCTAAGC-3'
EutD	EUTDF (SEQ ID NO:19) 5'-GATATAGGATCCATGACATACCAAGAATATCTTCAAGCAAG-3') EUTDR (SEQ ID NO:20) 5'-CAATATGTCGACCTATTTACCTTCTTCAACTTGTAGAGCGCT-3')
Mhp145	Mhp145F (SEQ ID NO:21) 5'-GATATAGGATCCATAGCTTCAAGGTCGAATACAACCTGC-3' Mhp145R (SEQ ID NO:22) 5'-CAATATGTCGACTTAATTTACCTTTTGGAGTATCCCATTTTC-3'
P78	P78F (SEQ ID NO:23) 5'-GATATAGGATCCTTATCCTATAAATTTAGGCGTTTTTCC-3' P78R (SEQ ID NO:24) 5'-CAATATGTCGACTTATTTTGATTTAAAGCAGGACCTAAAT-3'
P132	P132F (SEQ ID NO:25) 5'-GATATAGGATCCATTGGACTAACAATTTTTGAGAAATCATTTAG-3' P132R (SEQ ID NO:26) 5'-CAATATGTCGACTTATTATTCTAAATAGCCCCATAAAGTG-3'
Mhp389	Mhp389F (SEQ ID NO:21) 5'-GATATAGGATCCATGGACAAATTTTCACGAACGTGTTCT-3' Mhp389R (SEQ ID NO:28) 5'-CAATATGTCGACCTAGATTTTAAAGGATTTTTTAATTCAATAATATAATC-3'

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los conjuntos de cebadores relacionados en la tabla 2 anterior para amplificar los genes de los antígenos candidatos. Los genes amplificados se usaron a continuación en el sistema de expresión génica de *E. coli*. La condición de la PCR era: 5 minutos a 98 °C (un ciclo); 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, X segundos a 68 °C (35 ciclos); 5 minutos a 68 °C (un ciclo). Dicha X era el tiempo de alargamiento para la ADN polimerasa y se ajustó dependiendo del tamaño del fragmento que se iba a amplificar. Tras la reacción de la PCR, se llevó a cabo una electroforesis para verificar si los productos de la PCR contenían los fragmentos de ADN de tamaño esperado. Véase la figura 3, que muestra el resultado de la electroforesis de los productos de la PCR; en donde la banda 1 era el gen *eutD*; la banda 2 era *pdhA*; la banda 3 era *xyf*; la banda 4 era el gen P78; la banda 5 era el gen P132; la banda 6 era *mhp145*; la banda 7 era *mhp389*.

Clonación de los productos de la PCR.

La clonación se llevó a cabo usando un Kit de clonación CloneJET PCR, y la mezcla de ligadura se transformó en *E. coli* ECOS™ 9-5 (Yeastern, Taipei, Taiwan). Se puede inferir el protocolo detallado a partir de la descripción del producto o modificarse a partir del protocolo bien conocido en el campo.

Tras la transformación, se cultivaron las bacterias en un medio LB sólido que contenía ampicilina (100 µg/ml) hasta que se formó una colonia de las mismas. A continuación, se llevó a cabo la PCR de la colonia para cribar con éxito cepas en transformación. La condición de la PCR era: 5 minutos a 95 °C (un ciclo); 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, X segundos a 72 °C (25 ciclos); 7 minutos a 72 °C (un ciclo). Dicha X era el tiempo de alargamiento para la ADN polimerasa y se ajustó dependiendo del tamaño del fragmento que se iba a amplificar. La velocidad de alargamiento de la ADN polimerasa Taq (Genomics, Taipei, Taiwan) es 1 kb/min; por tanto, si se usa la ADN polimerasa Taq para amplificar un fragmento de ADN de 1 kb, dicha X debe ajustarse a 1 minuto.

Los plásmidos de las cepas, para cuyos plásmidos recombinantes se verificó que contenían el ADN de inserción, se procesaron a continuación para secuenciar el ADN (Total Solution Provider of Systems Biology and Chemoinformatics Ltd.). Los plásmidos que contenían *eutD*, *pdhA*, *xyf*, el gen P78, el gen P132, *mhp145*, y *mhp389* se nombraron como pJET-eutD, pJET-pdhA, pJET-xyf, pJET-P78, pJET-P132, pJET-mhp145, pJET-mhp389, respectivamente.

Mutación puntual y clonación de los genes antigénicos de *M. hyopneumoniae*.

Antes de amplificar los antígenos candidatos en un sistema de expresión génica de *E. coli*, debe considerarse la utilización del codón en diferentes organismos. Dicho esto, si el gen contiene un codón que esté codificado de forma ambigua entre el organismo original del mismo y *E. coli*, el gen debe modificarse mediante mutación puntual.

Los genes antigénicos de *M. hyopneumoniae*, *pdhA*, *xyf*, el gen P78, el gen P132, *mhp145*, y *mhp389*, contienen el codón TGA (*eutD* no tiene riesgo en la utilización del codón como otros). El codón TGA se tradujo a triptófano en *Mycoplasma* spp., pero se tradujo como un codón de detención en *E. coli*. Para evitar no poder producir la proteína completa en un sistema de expresión génica de *E. coli*, se diseñaron cebadores que se dirigían al sitio TGA y se llevó a cabo la mutación puntual que sustituía TGA por TGG usando la reacción en cadena de la polimerasa con extensión por solapamiento. Como resultado, los genes que se van a expresar en el sistema de expresión génica de *E. coli* pueden traducirse completamente al antígeno candidato de la presente invención. Además, los sitios de corte de *Bam*HI del gen P78, el gen P132, y *mhp389* experimentaron una mutación silenciosa por comodidad de la clonación.

Los cebadores usados para la mutación puntual se diseñaron para localizar el sitio de la mutación puntual en la parte central del cebador y para tener un valor Tm mayor de 78 °C. El valor Tm de los cebadores para la mutación puntual se calculó utilizando la fórmula proporcionada por Invitrogen Co.: $T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N$ - % de emparejamiento incorrecto; en donde %GC se refiere al porcentaje de GC en vista de los nucleótidos totales contenidos en el cebador correspondiente; N se refiere a la longitud del cebador correspondiente; el % de emparejamiento incorrecto se refiere al porcentaje de la base que va a mutar en vista de los nucleótidos totales contenidos en el cebador correspondiente. Los conjuntos de cebadores usados para los genes anteriormente mencionados se relacionaron en la Tabla 3 a Tabla 8 siguientes.

Tabla 3: Los conjuntos de cebadores para la mutación puntual de *pdhA*.

Cebador	Secuencia de ADN (5' a 3')
PdhAF SEQ ID NO: 29	GATATAGGATCCATGGACAAATTTGCTATGTAAAGCCTG
PdhAM1 SEQ ID NO: 30	GCTAACAAAAGATGACTGGTTTGTCCCAGCTTTTCG
PdhAM2 SEQ ID NO: 31	CGAAAAGCTGGGACAAACCAGTCATCTTTTGTAGC
PdhAM3 SEQ ID NO: 32	CTTGCAAATGCAATATTGGAATGGTAGCGAAAAAGG
PdhAM4 SEQ ID NO: 33	CCTTTTTCGCTACCATTCCAATATTGCATTTGCAAG
PdhAM5 SEQ ID NO: 34	CGAGGCGCTAAATATTGCAAGTATTGGAAATGGCCAGTTGTTTTTTCGTAAATAAC

(continuación)

Cebador	Secuencia de ADN (5' a 3')
PdhAM6 SEQ ID NO: 35	GTTATTTACGCAAAAAACAACCTGGCCATTTCCAAATACTTGCAATATTTAGCGCCTCG
PdhAM7 SEQ ID NO: 36	GTTTTTTGCGTAAATAACAATCAATGGGCAATTTCAACCCCAAATAAATATG
PdhAM8 SEQ ID NO: 37	CATATTTATTTGGGGTTGAAATTGCCATTGATTGTTATTTACGCAAAAAAC
PdhAM9 SEQ ID NO: 38	GTTGAGTTTGTAACCTGGCGTCAAGGTGTTTCATACC
PdhAM10 SEQ ID NO: 39	GGTATGAACACCTTGACGCCAAGTTACAACTCAAC
PdhAM11 SEQ ID NO: 40	GAGAACACGAAAAATGGGAACCAATGCACCGG
PdhAM12 SEQ ID NO: 41	CCGGTGCATTGGTTCCCATTTTTCTGTTCTC
PdhAM13 SEQ ID NO: 42	CCGAAAAACAAAAATTTGGGATGAAGCGCTTGCGATTG
PdhAM14 SEQ ID NO: 43	CAATCGCAAGCGCTTCATCCCAATTTTTGTTTTTCGG
PdhAR SEQ ID NO: 44	CAATATGTCGACTTATTTACTCCTTTAAAAAATCAAGCGCTTC

Tabla 4: Los conjuntos de cebadores para la mutación puntual de *xyIF*.

Cebador	Secuencia de ADN (5' a 3')
XyIFF SEQ ID NO: 45	GATATAGGATCCATGAAATGGAATAAATTTCTTGGCTTAGGCTTAGTTTTTC
XyIFM1 SEQ ID NO: 46	CATTTAACCAATCAAGTTGGGAGGCAATTCAACAACCTTGG
XyIFM2 SEQ ID NO: 47	CCAAGTTGTTGAATTGCCTCCCAACTTGATTGGTTAAATG
XyIFM3 SEQ ID NO: 48	CTAATACCAACAAAAATGTTTGGGTACTTTCTGGTTTTCAACACG
XyIFM4 SEQ ID NO: 49	CGTGTGTAAGAACAGAAAGTACCCAAACATTTTTGTTGGTATTAG
XyIFM5 SEQ ID NO: 50	CGGTGATGCGATCACAAAATGGTTAAAAATCCCTGAAAAATAAGC
XyIFM6 SEQ ID NO: 51	GCTTATTTTCAGGGATTTTTAACCATTTTGTGATCGCATCACCG
XyIFM7 SEQ ID NO: 52	TTATCATACTCGGAATTGACTGGACTGATACTGAAAATGTAATTC
XyIFM8 SEQ ID NO: 53	GAATTACATTTTCAGTATCAGTCCAGTCAATTCCGAGTATGATAA
XyIFM9 SEQ ID NO: 54	GAAGAAGCCGGATGGCTTGCAGGATATGC
XyIFM10 SEQ ID NO: 55	GCATATCCTGCAAGCCATCCGGCTTCTTC
XyIFM11 SEQ ID NO: 56	GGTTATCTAGCCGGAATTAAGCTTGAATCTAAAAAATTCTGATAAAAAAAC
XyIFM12 SEQ ID NO: 57	GTTTTTTTATCAGAATTTTTTAGATTCCAAGCTTTAATTCCGGCTAGATAACC
XyIFR SEQ ID NO: 58	CAATATGTCGACTTAATTTTTATTAATATCGGTAATTAGTTTGTCTAAGC

Tabla 5: Los conjuntos de cebadores para la mutación puntual del gen P78.

Cebador	Secuencia de ADN (5' a 3')
P78F SEQ ID NO: 59	GATATAGGATCCTTATCCTATAAATTTAGGCGTTTTTTCC
P78M1 SEQ ID NO: 60	CAATTAATAAAGTTTTGTTTGGTTGGATGATTAATAAAGCACTTGCTGATCC
P78M2 SEQ ID NO: 61	GGATCAGCAAGTGCTTTATTAATCATCCAACCAACAAAACCTTTATTAATTG
P78M3 SEQ ID NO: 62	GATATTAAAGAAATTGAAAGAATCTGGAAAAAATATGTCTCCGATGATCAAGG
P78M4 SEQ ID NO: 63	CCTTGATCATCGGAGACATATTTTTCCAGATTCTTTCAATTTCTTAATATC
P78M5 SEQ ID NO: 64	GCCCTTTCAGGAGGCTCCACTGATTCGGCA
P78M6 SEQ ID NO: 65	TGCCGAATCAGTGGAGCCTCCTGAAAGGGC
P78M7 SEQ ID NO: 66	GCCGCAAAAGCTTTTGTAAATGGCTTTTGACAGAAAAAATAGTCT
P78M8 SEQ ID NO: 67	AGACTATTTTTCTGTCAAAAGCCATTTAACAAAAGCTTTTGCAGGC
P78R SEQ ID NO: 68	CAATATGTCGACTTATTTTGATTTAAAGCAGGACCTAAAT

Tabla 6: Los conjuntos de cebadores para la mutación puntual de gen P132

Cebador	Secuencia de ADN (5' a 3')
P132F SEQ ID NO: 69	GATATAGGATCCATTGGACTAACAATTTTTGAGAAATCATTTAG
P132M1 SEQ ID NO: 70	CTAACTTCTCTAAAGGTTGGAAAGAAGAAGATGATTTTG

(continuación)

Cebador	Secuencia de ADN (5' a 3')
P132M2 SEQ ID NO: 71	CAAAATCATCTTCTTCTTTCCAACCTTTTAGAGAAGTTAG
P132M3 SEQ ID NO: 72	CTTCTATTACTTTTGAACCTCTGGGACCCAAATGGTAAATTAGTATC
P132M4 SEQ ID NO: 73	GATACTAATTTACCATTTGGGTCCCAGAGTTCAAAAGTAATAGAAA
P132M5 SEQ ID NO: 74	CCCTGAAGGAGATTGGATAACTTTAGGGAG
P132M6 SEQ ID NO: 75	CTCCCTAAAGTTATCCAATCTCCTTCAGGG
P132M7 SEQ ID NO: 76	CTACCAGGAACTACCTGGGATTTCATGTTGAAC
P132M8 SEQ ID NO: 77	GTTCAACATGGAAATCCCAGGTAGTTCCTGGTAG
P132M9 SEQ ID NO: 78	GGACAACATAATTTGGAGCCAGTTAGCTTCC
P132M10 SEQ ID NO: 79	GGAAGCTAACTGGCTCCAAATTAGTTGTCC
P132M11 SEQ ID NO: 80	GGAACAAAAAAGGAATGGATTCTTGATGATCTGG
P132M12 SEQ ID NO: 81	CCAGATCCTACAAGAATCCATTCTTTTTTTGTTCC
P132M13 SEQ ID NO: 82	CCAATACGCAATATGGATAACCCGCTAGGAAC
P132M14 SEQ ID NO: 83	GTTCTAGACGGTTATCCATATTTGCGTATTGG
P132M15 SEQ ID NO: 84	CCAAGGGGAAGTTCTCTGGACTACTATTAATCCAAAC
P132M16 SEQ ID NO: 85	GTTTGGATTTAATAGTAGTCCAGAGAACTTCCCTTGG
P132M17 SEQ ID NO: 86	CAAAAACTTCACCTTTGGTGGATTGCTAATGATAGC
P132M18 SEQ ID NO: 87	GCTATCATTAGCAATCCACCAAAGGTGAAGTTTTTG
P132R SEQ ID NO: 88	CAATATGTCGACTTATTCCTAAATAGCCCCATAAAGTG

Tabla 7: Los conjuntos de cebadores para la mutación puntual de *mhp145*.

Cebador	Secuencia de ADN (5' a 3')
Mhp145F SEQ ID NO: 89	GATATAGGATCCATAGCTTCAAGGTCGAATACAACCTGC
Mhp145M1 SEQ ID NO: 90	AATAATTGCAGAAAAAATTCTTAAAGATCAATGGAAAACAAGTAAATATTCTGATT TTTATTACAAAT
Mhp145M2 SEQ ID NO: 91	ATTGTGAATAAAAAATCAGAATATTTACTTGTTCCTTCCATTGATCTTTAAGAATTTTTT CTGCAATTATT
Mhp145R SEQ ID NO: 92	CAATATGTCGACTTAATTTACCTTTTGGAGTATCCCATTTTC

5

Tabla 8: Los conjuntos de cebadores para la mutación puntual de *mhp389*.

Cebador	Secuencia de ADN (5' a 3')
Mhp389F SEQ ID NO: 93	GATATAGGATCCATGGACAAATTTTCACGAACCTGTTCT
Mhp389M1 SEQ ID NO: 94	CAATAGTGACAATGGACCCCCCAAATGTTGGTTCG
Mhp389M2 SEQ ID NO: 95	CGACCAACATTTGGGGGGTCCATTGTCACTATTG
Mhp389M3 SEQ ID NO: 96	GATAAAGGCGCATCATGGCTTGCCTTGCACCAAC
Mhp389M4 SEQ ID NO: 97	GTTGGTGCAAGCGCAAGCCATGATGCGCCTTTATC
Mhp389M5 SEQ ID NO: 98	GGAAAACTTAAAGGTAAATGGACTTTTGGACTAACCTATTT
Mhp389M6 SEQ ID NO: 99	AAATAGGTTAGTCCAAAAGTCCATTACCTTTAAGTTTTCC
Mhp389R SEQ ID NO: 100	CAATATGTCGACCTAGATTTTAAAGGATTTTTTAATTCAATAATATAATC

El método para la mutación puntual se explicó brevemente del siguiente modo. El cromosoma de *M. hyopneumoniae* PRIT-5 se usó como molde y los fragmentos de ADN se amplificaron usando los conjuntos de cebadores que se muestran en la tabla 3 a la tabla 8 anteriormente.

10

Los 50 µl de la mezcla de reacción de la PCR comprendían el tampón de la PCR 1x GDP-HiFi, 200 µM de la mezcla de dATP, dTTP, dGTP, y dCTP, 1 µM de cebadores, 100 ng del cromosoma de *M. hyopneumoniae* PRIT-5, y 1 U de ADN polimerasa GDP-HiFi. La condición de la PCR era: 5 minutos a 98 °C (un ciclo); 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, X segundos a 68 °C (35 ciclos); 5 minutos a 68 °C (un ciclo). Dicha X era el tiempo de alargamiento para la ADN polimerasa y se ajustó dependiendo del tamaño del fragmento que se iba a amplificar. La velocidad de alargamiento de la ADN polimerasa GDP-HIFI (GeneDirex, Las Vegas, EE.UU.) es 1 kb/15 segundos; por tanto, si la ADN polimerasa GDP-HIFI se usa para amplificar un fragmento de 1 kb de ADN, dicho X debe ajustarse a 15 segundos. Tras la reacción de la PCR, se llevó a cabo una electroforesis para verificar si los productos de la PCR contenían los fragmentos de ADN de tamaño esperado. A continuación, el producto de la PCR se recirculó usando un kit del sistema de extracción en gel Gel-M™.

15

20

Después, el producto de la PCR se usó como un molde y se amplificó usando los conjuntos de cebadores que se muestran en la tabla 2 anterior. La condición de la PCR era: 2 minutos a 98 °C (un ciclo); 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, X segundos a 68 °C (35 ciclos); 5 minutos a 68 °C (un ciclo). Dicha X era el tiempo de alargamiento para la ADN polimerasa y se ajustó dependiendo del tamaño del fragmento que se iba a amplificar. La velocidad de alargamiento de la ADN polimerasa GDP-HIFI (GeneDirex, Las Vegas, EE.UU.) es 1 kb/15 segundos; por tanto, si la ADN polimerasa GDP-HIFI se usa para amplificar un fragmento de 1 kb de ADN, dicho X debe ajustarse a 15 segundos. Tras la etapa de amplificación anteriormente mencionada, se puede obtener una secuencia de longitud completa de los genes antigénicos candidatos con mutaciones puntuales.

A continuación, el producto de la PCR se recirculó usando un kit del sistema PCR-M™ Clean Up (GeneMark, Taichung, Taiwan) y se llevó a cabo la clonación del mismo usando un Kit de Clonación de la PCR CloneJET. Se llevó a cabo la PCR de la colonia para confirmar que las cepas tras la transformación contenían el plásmido con el ADN de inserción y a continuación se aislaron los plásmidos del anterior para la secuenciación del ADN (Total Solution Provider of Systems Biology and Chemoinformatics Ltd.). Los plásmidos que contenían genes antigénicos candidatos mutados se nombraron pJET-pdhA, pJET-xylF, pJET-P78M, pJET-P132M, pJET-mhp145M, pJET-mhp389M, respectivamente.

De acuerdo con los resultados de la secuenciación, las secuencias de ADN de los genes antigénicos candidatos tras la mutación puntual eran como se muestra en la SEQ ID NO:01 (*pdhA*), SEQ ID NO:02 (*xylF*), SEQ ID NO:03 (*eutD*, no estaba mutada puntualmente), SEQ ID NO:04 (*mhp145*), SEQ ID NO:05 (gen P78), SEQ ID NO:06 (gen P132), SEQ ID NO:07 (*mhp389*).

Construcción de los vectores de expresión para expresar antígenos de *M. hyopneumoniae*

En esta parte de los experimentos, el plásmido pET-MSY se usó como estructura principal para construir un vector de expresión para expresar el antígeno de *M. hyopneumoniae*. pET-MSY es un derivado de pET29a y tiene un *msyB* de *E. coli*. Por tanto, el antígeno recombinante expresado podría tener por tanto una pareja de fusión de *MsyB*. *MsyB* es rico en aminoácidos ácidos y puede aumentar la solubilidad de la proteína expresada.

Tras digerirse pJET-eutD, pJET-pdhA, pJET-xylF, pJET-P78, pJET-P132, pJET-mhp145 y pJET-mhp389 con BamHI y *Sall*, El fragmento de ADN obtenido se insertó en pET-Msy digerido previamente con las mismas enzimas de restricción por la ligasa. A continuación, el pET-Msy con el fragmento de ADN se transformó en *E. coli* ECOS 9-5. Se llevó a cabo la PCR de la colonia para confirmar que las cepas tras la transformación contenían el plásmido con el ADN de inserción y a continuación se aislaron los plásmidos del anterior para la secuenciación del ADN (Total Solution Provider of Systems Biology and Chemoinformatics Ltd.). Los plásmidos verificados con la secuencia de ADN correcta se nombraron pET-MSYEutD, pET-MSYPdhA, pET-MSYXylF, pET-MSYP78, pET-MSYP132, pET-MSYMhp145, y pET-MSYMhp389, respectivamente. Aquellos plásmidos obtenidos fueron ejemplos de los vectores de expresión para prevenir la infección por *Mycoplasma* spp. de la presente invención.

Expresión y aislamiento de los antígenos de *M. hyopneumoniae*

Los vectores para la expresión antigénica se transformaron en *E. coli* BL21(DE3). Una única colonia de cepas correspondientes tras la transformación se inoculó en medio líquido LB que contenía kanamicina (concentración de trabajo: 30 µg/ml). tras el cultivo durante la noche a 37 °C, 180 rpm, la suspensión de bacterias se diluyó a una relación de 1:100 y se inoculó de nuevo en otro medio líquido LB que contenía kanamicina (concentración de trabajo: 30 µg/ml). las bacterias se cultivaron a 37 °C, 180 rpm hasta la DO₆₀₀ alcanzando por tanto aproximadamente de 0,6 a 0,8. A continuación, se añadió IPTG 0,1 mM para inducir la expresión. Tras la inducción durante 4 horas, se recogió el aglomerado mediante centrifugación (10000×g, 10 minutos, 4 °C) y se examinó la expresión mediante electroforesis de proteínas.

Después, se usó la cromatografía por afinidad de metales inmovilizados (IMAC) para el aislamiento de proteínas mediante el enlace covalente entre la etiqueta His del extremo N de la proteína recombinante e iones de níquel o iones de cobalto. El protocolo de aislamiento de proteínas concordaba con la descripción de producto del QIAexpressionist™ (cuarta edición, Qiagen). El aglomerado se suspendió en un tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) y se alteró mediante un procesador ultrasónico. Tras la centrifugación (8.000×g, 15 minutos), se recogió el sobrenadante para introducir en una columna de 1 ml de resina Ni-NTA. Los antígenos recombinantes se adherirían sobre dicha resina. A continuación, 15 ml de tampón de lavado (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8,0) se introdujeron en la columna para lavar la resina para que las proteínas no específicas adheridas a la misma se pudieran eliminar. Por último, se añadieron 20 ml de tampón de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0) para eliminar mediante lavado los antígenos recombinantes de la resina; en donde el imidazol de alta concentración puede competir por el sitio de unión en la resina con las proteínas recombinantes y por tanto conseguir que las proteínas recombinantes se eliminen mediante lavado. A continuación se examinó el resultado del aislamiento mediante electroforesis de proteínas.

Los antígenos candidatos de la presente invención recogidos mediante aislamiento se pueden usar a continuación en

los siguientes ensayos inmunitarios para confirmar su capacidad de utilizarse como principio activo de las vacunas de subunidades dirigidas contra *Mycoplasma* spp.

Ejemplo 3: Experimentos de estímulo inmunitario en cerdos de los antígenos candidatos de la presente invención.

En este ejemplo, los antígenos candidatos de la presente invención se utilizaron como principio activo para preparar vacunas de subunidades y se probaron para determinar los efectos inmunitarios de los mismos en cerdos vivos.

Preparación de la vacuna

Un antígeno recombinante aislado o varios antígenos recombinantes aislados se mezclaron con gel de alúmina como un adyuvante para preparar una vacuna de subunidades o una vacuna de subunidades de tipo cóctel. Cada dosis de la vacuna preparada era de 2 ml de volumen y cada tipo de antígeno contenido en la misma era de 100 µg.

La siguiente tabla 9 relaciona las muestras preparadas en este ejemplo para los experimentos de estímulos inmunitarios.

Tabla 9: Muestras de vacuna preparadas en el Ejemplo 3

Muestra	Principio activo (Antígeno)
1	PdhA
2	XylF
3	EutD
4	Mhp145
5	P78
6	P132
7	Mhp389
8	PdhA + P78
9	XylF + Mhp145

Los experimentos de estímulo inmunitario en cerdos se realizarían usando Bayovac® MH-PRIT-5 (preparado usando PRIT-5 de *M. hyopneumoniae*, como grupo control positivo), vacunas de subunidades (muestra 1 de la presente invención), y vacuna de tipo cóctel (muestra 8 de la presente invención).

33 cerdos SPF de 4 semanas de edad se trajeron del Agricultural Technology Research Institute y se alimentaron con el mismo pienso, entorno, y condiciones de crecimiento en la pocilga antes de los experimentos.

Después, los cerdos se alimentaron hasta el día 35 y el día 49 de edad, se administraron a los cerdos 2 ml de la vacuna anterior mediante inyección intramuscular.

Experimentos de estímulo

Los cerdos anteriormente mencionados que indujeron respuestas inmunitarias se estimularon con *Mycoplasma* spp. en el día 109 de edad para confirmar el efecto inmunitario de las vacunas anteriormente mencionadas.

En primer lugar, un pulmón recogido de los cerdos infectados por *Mycoplasma* spp. se molturó en 20 ml de medio de Friis y se centrifugó a 148,8×g durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante a un tubo limpio y se centrifugó de nuevo a 7.870×g durante 40 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se suspendió la precipitación en 6 ml de medio de Friis para obtener una suspensión. Después, se filtró la suspensión mediante una membrana de 5 µm y 0,45 µm secuencialmente para obtener las soluciones de bacterias requeridas para los experimentos de estímulo.

La solución de bacterias (5 ml) se administró a cerdos anestesiados a través de la tráquea de los mismos. Después de 28 días de la administración, se sacrificaron los cerdos y se diseccionaron para recoger el pulmón de los mismos. Se examinó el efecto inmunitario observando el pulmón y se registró de acuerdo con los siguientes criterios: cualquiera de los lóbulos superiores medios y los lóbulos superiores de cualquier lado del pulmón observado con rasgos patológicos se puntuó como 10 puntos; cualquiera de los lóbulos superiores medios y los lóbulos diafragmáticos de cualquier lado del pulmón observado con rasgos patológicos se puntuó como 5 puntos. La puntuación completa fue de 55 puntos. En la figura 4 se mostraron los registros de la observación.

En comparación con los resultados de los cerdos no inyectados, los siete antígenos candidatos de la presente invención pudieron proporcionar efectos inmunitarios equivalentes a los de una vacuna convencional (Bayovac® MH-PRIT-5). Si se toma en consideración la mayor seguridad de las vacunas de subunidades, las vacunas que contienen los antígenos candidatos de la presente invención deben ser más valiosas.

Por otro lado, no era común utilizar dos o más antígenos que inducirían efectos inmunitarios en una vacuna ya que los dos o más antígenos pueden no proporcionar efecto inmunitario duplicado. De hecho, hay más posibilidad de que dos o más antígenos puedan interferir entre sí y por consiguiente, reducir el efecto inmunitario de la vacuna. De acuerdo con el resultado de este ejemplo, la muestra 8 y la muestra 9 de la presente invención (es decir, la vacuna de tipo cóctel) proporcionan de forma inesperada un aumento significativo en el efecto inmunitario. Dicho esto, las vacunas de subunidades de la presente invención no solo tienen una alta seguridad, sino que también proporcionan un mejor efecto inmunitario cuando los antígenos candidatos de la presente invención se usan en combinación.

10 Listado de secuencias

<110> AGRICULTURAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE

<120> Vacuna subunitaria contra *Mycoplasma Spp.*

<130> GPI13TW0261

<160> 100

<170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

<211> 1125

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gen pdhA mutado

<400> 1

ES 2 812 552 T3

atggacaaat ttogctatgt aaagcctggt caaattatgg caaaagatga agaaatgatt	60
cgctttcttg atattgatgg taatctttta ttttcaactg tttttggacc aatcgacgaa	120
acaaatgata ttogcttatac aaaacaggaa atcaaaaaag cttatgaatt tatggtttta	180
tctogccaac aagatacgta tatgacacaa ctacagcgac aaggtagaat gttgactttt	240
gcccctaact ttggtgaaga agctcttcaa gtagcctcag ggatggcgct aacaaaagat	300
gactggtttg tcccagcttt tcgttcaaat gcaacaatgt tatactttgg cgtgccaatg	360
atcttgcaaa tgcaatattg gaatggtagc gaaaaaggta atgtaattcc cgaaaatgtt	420
aatgtttttac ctattaacat tcccatcgga acgcagtttt cccatgctgc cggaattgct	480
tatgcagcaa aactaacagg taaaaaaata gtttcaatga gttttattgg aaacggggga	540
actgcogaag gcgagtttta cgaggcgcta aatattgcaa gtatttgga atgaccagtt	600
gttttttgcg taaataacaa tcaatgggca atttcaacc caaataaata tgaaaacggt	660
gcctcaacaa ttgctgcaaa agcaatggca gccggaattc ctggaattcg tgtagacgga	720
aatgaccttt tagcttotta tgaagtaatc aaggaagctg ttgattatgc tcgttctgga	780
aacggctctg ttcttggtga gtttgtaact tggcgtaag gtgttcatac ctcttctgat	840
aatccacgaa tttatcgtac tgttgaagag gaaagagaac acgaaaaatg ggaaccaatg	900
caccggattg aaaaatatat gtttgaccgc ggaattcttg attctgccga aaaacaaaaa	960
atttgggatg aagcgcttgc gattgtcaaa gaaacttatg aaaaatctct tgttgggctt	1020
gagtcaacaa ttgatgaaat tttogatcat acctacaagg ttttaccacc agaacttgaa	1080
gaacaaaaac aagaagcgct tgaatttttt aaaggagtaa aataa	1125

<210> 2
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> gen xylF mutado

<400> 2

ES 2 812 552 T3

atgaaatgga ataaatttct tggcttaggc ttagtttttc cgctttcagc aatcgcgaca	60
atctctgccg gatgttggga taaagaaaca actaaagaag aaaaatcagc cgataatcaa	120
aataaacaaa tcaactgatgt ctcaaaaatt tcaggactag ttaatgagcg aaaatccgaa	180
attatggccg caaaagctga tgcaaacaaa cattttgggc taaatatggc aattgtaacc	240
gctgatggaa cggtaaatga taattcattt aaccaatcaa gttgggaggc aattcaacaa	300
cttggcgctc ttactggagg tgagattact tcagtagata gttcaactgc tgaacttgaa	360
ggaaaatata gctcacttgc taataccaac aaaaatgttt gggtactttc tggttttcaa	420
cacggtgatg cgatcacaaa atggttaaaa atccctgaaa ataagcaatt atttactgaa	480
aaaaatatta tcatactcgg aattgactgg actgatactg aaaatgtaat tccaacaggt	540
cgatatatta atttaaccta taaaactgaa gaagccggat ggcttgcagg atatgcgaat	600
gcttcctttt tggcaaaaaa attcccaagt gatccaacta aaagatcagc aattgttatt	660
ggtggtggga ttttcccagc tgtaactgat tttatcgctg gttatctagc cggaattaaa	720
gcttggaaac taaaaaatc tgataaaaaa acaaagataa caactgataa aatcgaaata	780
aatcttgggt ttgattttca aaataacttca acaaaagaaa gacttgaaca aattgcttca	840
aaagataaac cttcaacact attagcagtc gctggaccac ttactgaaat tttctcgat	900
ataatcgcaa accaaaatga tcgttatctc attggtgttg acaccgacca atcacttggt	960
tatacaaaaa ctaaaaataa atttttcacc tcaattttga aaaatttagg ttactccggt	1020
ttcagtgttc ttagtgattt atataccaaa aaatcaaatt caagaaattt agccgggctt	1080
gaatttggtg aaaaaagtgc aaccgtttat cttggaatta aagacaagtt tgtcgatatt	1140
gctgatactt ctttagaagg aaatgataaa aaactcgcaa ctgaagccat ttctgaagct	1200
aaaaaagaat ttgaagaaaa aactaagaca actcctgccg aagaagtctg taaaacttta	1260
gaaattccgg aaatgactga taaacaacct gataaacaac aggaaagctt agacaaacta	1320
attaccgata ttaataaaaa ttaa	1344

<210> 3
 <211> 1122
 <212> ADN
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

 <400> 3

ES 2 812 552 T3

atagcttcaa ggtogaatac aactgccaaa gttgccccag ttgctgttgt tttctcaaca	60
agaaataatc cttttttcca aaatgttgaa aaagggattg aaacagcggc aaaagaatta	120
ggagttgact atgaagtcta tgactctgaa aatgactcgg ataaagaagc aagaaatatt	180
tcaaataatta ttgcaaaaca acaaaaagtt gtaattttta acgatgttaa tgaagattca	240
ggaatctcag ctgttaaaaa attaaatcaa gctggaattc cggtaattgc cactgatcat	300
ttactaaatt cgccaaaagc cttagaagca aaaattaaag ttgaagccaa tattgcttct	360
gataataaac aagcaggagt aattcttgcc cagtttatgg cccaaaaaat cggacttcct	420
caagattcac ttacttattc agtctatgga attcccgga ctgaatcagg ggaatcccga	480
gctcaagggt ttattgaaac agttaaaaat ctaaataatc aagcaataaa atacaacctt	540
ttttcttatg gaaaatacgg aaaagaaaaat gcaaatggaa aaacttacat cggaagacaa	600
gctgatgata atcgcgatct agcaaatcaa agagttgcaa atgatgcaac gcaagtattc	660
caagatgctc aaaaaaggcc acttttggtt tttgggacta atgatgaagc tgccttaggt	720
tcaatttctg cccttgaaag tgcccagatt ccattaggag gtggagataa attccttcca	780
ggttcaggaa aagtttatat tacoggagt gattatacaa atgatgctca aaaagcggta	840
ttaaataata aattatcagc aactgttgaa caagatactg atcttttagg aagactttct	900
ttaataattg cagaaaaaat tcttaaagat caatggaaaa caagtaaata ttctgatttt	960
tattcacaat ttctcagct tgataaagac aaaaatcctg atgatcaagt tgagcaagga	1020
tattatttta aagtaggaac aaaacttttc tggaaaggac cagatggaaa aggtgaaaaa	1080
cttcaagcgg atgaaaatgg gatactccaa aaggtaaatt aa	1122

<210> 4
 <211> 1122
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> gen mhp145 mutado

<400> 4

atagcttcaa ggtogaatac aactgccaaa gttgccccag ttgctgttgt tttctcaaca	60
agaaataatc cttttttcca aaatgttgaa aaagggattg aaacagcggc aaaagaatta	120
ggagttgact atgaagtcta tgactctgaa aatgactcgg ataaagaagc aagaaatatt	180
tcaaataatta ttgcaaaaca acaaaaagtt gtaattttta acgatgttaa tgaagattca	240
ggaatctcag ctgttaaaaa attaaatcaa gctggaattc cggtaattgc cactgatcat	300
ttactaaatt cgccaaaagc cttagaagca aaaattaaag ttgaagccaa tattgcttct	360
gataataaac aagcaggagt aattcttgcc cagtttatgg cccaaaaaat cggacttcct	420

ES 2 812 552 T3

caagattcac	ttacttattc	agtctatgga	attccccgaa	ctgaatcagg	ggaatccccga	480
gctcaagggt	ttattgaaac	agttaaaaat	ctaaataatc	aagcaataaa	atacaacctt	540
ttttcttatg	gaaaatacgg	aaaagaaaat	gcaaatggaa	aaacttacat	cggagagacaa	600
gctgatgata	atcgcgatct	agcaaatcaa	agagttgcaa	atgatgcaac	gcaagtattc	660
caagatgctc	aaaaaaggcc	acttttggtt	tttgggacta	atgatgaagc	tgcccttaggt	720
tcaattttctg	cccttgaaag	tgcccagatt	ccattaggag	gtggagataa	attccttcca	780
ggttcaggaa	aagtttatat	taccggagtt	gattatacaa	atgatgctca	aaaagcggta	840
ttaaataata	aattatcagc	aactggtgaa	caagatactg	atcttttagg	aagactttct	900
ttaataattg	cagaaaaaat	tcttaaagat	caatggaaaa	caagtaaata	ttctgatttt	960
tattcacaat	ttcctcagct	tgataaagac	aaaaatcctg	atgatcaagt	tgagcaagga	1020
tattatttta	aagtaggaac	aaaacttttc	tggaaaggac	cagatggaaa	aggtgaaaaa	1080
cttcaagccg	atgaaaatgg	gatactccaa	aaggtaaatt	aa		1122

5
 <210> 5
 <211> 2076
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> gen P78 mutado

<400> 5						
ttatcctata	aatttaggcg	ttttttccta	accagcgcac	ttagttttgc	tccttggct	60
ttagttgcaa	gttgtgttaa	taattccoga	tttgattcaa	atgaggataa	taaattagtt	120
tttggtcata	ctttttcatc	ttcaggaaaa	gaggcaaaaag	cacttgagaa	aattattgaa	180
gtctggaata	aaactgcaac	taatcaaaaa	gattttatca	aaatggaagc	acaatatctt	240
cagaatggct	ataatggatc	agcggcttca	attacaaact	ttttacagac	aaaagatcgg	300
ataaaactgc	caaatattgt	cacaaattat	ccttcacttc	tggcaatagt	taataaatat	360
tcaatgactt	ttccgcttgt	taaagatttt	agttctaata	aagaaccaca	agatgaaaaa	420
gaaaaagcaa	taaaaaagtt	cctaaaagag	caaggaattt	ctgatttcct	tgagattaat	480
aaagaagttc	ctttccttga	tacaaaggga	gtttataccc	ttccatttgg	aaaatcaact	540
gaagtcttta	caattaataa	agttttgttt	ggttggatga	ttaataaagc	acttgctgat	600
ccaaaaaagc	cagcaaaaat	taaagaagaa	gataaacctt	attttgccga	atttcaaaaa	660
ttaggcaagg	aaaaaactgg	tgatatataa	gaaattgaaa	gaatctggaa	aaaatatgtc	720
tcgatgatc	aaggacttgc	aggctatgaa	tttcgccgat	cgatcttga	aaattttact	780

15

ES 2 812 552 T3

gacctacaga aattatcatc acgaattott ogttotttttc cagaggccct ttcaggaggc 840
 tccactgatt cggcaaaatc agtttttagga attgataatc aagcaacgct agttttttgct 900
 cttgccagat cagtttcaga aggtaatoga tcccaggaag ttactgttct tgataggcaa 960
 aagaatttaa ttgattatat atctttttata gataaacctg attcaattag atataaaaat 1020
 ttagaaaaaa tttttaattt attaagccaa gggataaaaag atcgctcaat ttattataca 1080
 tctgcagggg agtataatc aacttttttc cggaatcatc agcaggtttt ctcaattggt 1140
 tcaacttcag gctattttcca taattttgtc aaaccaacag cgacaaatta tcaaatcgga 1200
 ttttaagaaa atgatggtct taagtcagtt tatagcgta gctatcccaa atttagcgca 1260
 attgtatcac ttgaagatct caaggatata accaaagatc tagaaataac agcaaccgat 1320
 ggtagctcta aattaaaaat tgatgctaaa tttttaggaa aactcaaaga atatgcacag 1380
 caaatccag ttaaaaaagt gttttatttt actgatogat cagaaaaacc ttcagggtatc 1440
 ttcgaaaaag atttatattgt tttaggcaaa tacaaaaatg ataaaaatga agaatttaat 1500
 ggccttgtaa ttccaactta tacagaactc tataaaaatt ctggatcaaa tgcccttaat 1560
 gatgatgaac ttgcacttga agccccaccg cataaattcg atgcaaatag taaaatcacc 1620
 cccattgtcg cccaaggctc tgatctaatt tttattcatt caactgaaaa agaagataaa 1680
 gccgcaaaag cttttgttaa atggcttttg acagaaaaaa tagtctttga ggaaaatagt 1740
 caggaaaaaa tgactccgct tgagtatttt gccagagcaa cctcatattt attgccaata 1800
 aatcaacgc ttgataaaac ccatttttagt ccaaaaaata gatctcagaa attcatactt 1860
 gaccaattta gtaaatctct taatgctgat tcaaaaggaa aatattcgct tgtctatgat 1920
 aatgccgatg caaatgcttc atccttcogt gaatcactag attcttcagt tgcccagatg 1980
 caatcattaa aagccagcga tggaaaacta cgtagtttta aagagttttt agaaaaacta 2040
 gagggaaatt taggtcctgc ttttaaatca aaataa 2076

<210> 6
 <211> 3549
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> gen P132 mutado

<400> 6

attggactaa caatttttga gaaatcattt agttcccaag tttcaggagg ggtcgataag 60
 aacaaagttg tggattttaa atcagattca gatcaaatct totcagaaga agatttttata 120
 agagcagttg agaattotaa actttttgat aaatataaac atctaacagc aagaatggca 180
 ttaggacttg ctagggaagc agctaatagc ttttaacttt tagatactta tgactacacc 240

ES 2 812 552 T3

ccaattacaa aacattcatt taagatttct ttggatatatt ccgatgcctt tgcggctaatt 300

aaagaagtaa aagcggtagt ggtagtgca tattcccaaa aatatcaagt tacctattca 360

agactaactt ctctaaaagg ttggaaagaa gaagatgatt ttggcgatga tattatagat 420

tatcaaatta atcaagagct ttcaggtcta tcactttctt ccttagcccc tgaaagcgcg 480

catcttttag cctcagaaat ggcttttcgg cttgataatg actttcaagt tgcataataa 540

aaaacaggat caagagccga ggcttttcgt caggccttga taaagaatta tcttggttat 600

aacttagtta accgccaaagg tttgccact atgtccaaa agggttatgt gctagcccc 660

aaaacaattg aaaataaaaa tgcaagcgaa gaaaaattag taaatataaa tgaaaatgac 720

cgtgcaaggg ttaataaact acaaaaagta gaaatctag cctttaaaaa cttaagtgat 780

ccaaatggaa cgctttctat tacttttgaa ctctgggacc caaatggtaa attagtatcc 840

gaatacgatt ttaaaattaa gggaatcaaa aaacttgatt ttgatcttaa aaaacaagag 900

gaaaaagtac ttcaaaaagt aactgaattt gttgagatta aaccttatgt tcaattaggt 960

ttaatccgtg ataatttatac attgtctgaa attatctata aaaatgataa taatccggag 1020

tatcttagga aaatattagc taaactaaaa gaacacaata acaacaaaag ggtggataat 1080

aatacatcca ctactaaatt tcaagaagag gatcttaaaa acgaaccaa ttctaattgga 1140

tcagaacaag attctttcga gaaagcaaag gaaaatttcc ttagtttttt tgatctaagg 1200

tcgagactaa ttctatttc cgatcttctt ttatattatc ttaaagttaa ttcaattaat 1260

tttgatagaa atattgaaga aaatgaaaa gaaaaattat taaaaaatga acaagtagta 1320

ctcaaagtag attttagtct taaaaaagtt gttagcgata ttagagctcc ttacctagtt 1380

tctagtcagg ttagatcaaa ttatccccg gttttaaaag cttcgctagc aaaaaataggt 1440

aaggggtcaa attcaaaagt tgtcctttta gatcttgga atttatcttc aagattttaa 1500

gttcaacttg attatagtgc aaaacaaaga gaaataatta atactttatt aaaggaaaat 1560

ccagaaagag aaaaagaatt acaagctaaa attgaaagta agacgttttag tccaatagat 1620

cttaacaatg atgatctatt agcaatcgaa tttcaatatg aggataaccc tgaaggagat 1680

tggataactt tagggagaat ggaaaagtta gtcaaagagg ttatccaata taaaaagaa 1740

ggtaaaacct tcttagatga tgaagtcgcg aaaacacttt attatttaga tttccatcat 1800

ctacctcaa gtaaaaaaga cctogaagaa tataaagaaa aacacaaaaa caagtttatc 1860

agcgaaataa aacctgtac accagcaagt caagcaaaaa caagtcaagc aaaaaatgaa 1920

aaagaagtaa aacctgaatc agcccaagca gaagcttcat cttcaaattc taatgattct 1980

agtagtaaaa ccacttcttc ttcaagtatg gcgggtacaa cccaaaataa atctacagaa 2040

ES 2 812 552 T3

actccaaatt caagttcaaa ttcaacacca acaagttcag caacaacttc agcaacaact 2100
tcaacaacaa gttcaaattc aagttcaaca acaagttcaa caacaacaac aacttcaaca 2160
caagcagcaa caacttcagc ctcttoggct aaagtaaaaa caactaaatt ccaagaacaa 2220
gtaaaagaac aagaacaaaa acaagaaaaa gcaaaagaaa ctaaccaatt attagatact 2280
aaaagaaata aagaagactc agggcttgga ttaattcttt gggatttcct agtaaattca 2340
aatataaaaa ctctaccagg aactacctgg gatttccatg ttgaaccaga taatttcaat 2400
gatcgtctaa aaataacagc gattctaaaa gaaaatacat cccaggcaaa gtcaaacca 2460
gatagtaaaa acctaacttc cctatcacga aaccttataa taaaaggggt tatggctaatt 2520
aaatacattg actacttagt ccaagaagat ccagtacttc ttgtagatta tacaagaaga 2580
aaccagatta aaacogaaag agaaggacaa ctaatttgga gccagttagc ttcccctcaa 2640
atggcatctc ctgaatctag tcccgaaaag gctaagctcg agatcaccga ggaaggactc 2700
cgtgttaaaa aaggtggcac taagataaaa gagacaagaa aaagcacaac cagcaatgct 2760
aaaagcaata ctaactccaa accaaataaa aagttagtcc tactaaaagg gtctataaaa 2820
aaccgggaa caaaaaagga atggattctt gtaggatctg ggaataaggc caccaaaaac 2880
ggaagctcca gcaacaactc caatacgcaa atatggataa cccgtctagg aacatctgtt 2940
ggttcattaa aaacogaagg tgagacagtc cttggaattt cgaataataa ttccaagggt 3000
gaagttctct ggactactat taaatccaaa ctcgaaaacg aaaataactc agataacaat 3060
caaatccaat actccccaag tacgcatagt ttaacaacca attctcgatc aaatacccaa 3120
caatcagggc gaaatcaaat taaaattaca aacacgcaaa ggaaaacaac aacttcgcca 3180
agccaaaatc taagtcaaaa tcctgatctc aaccaaattg atgtaagact tggcttacta 3240
gtacaagaca aaaaacttca cctttggtgg attgctaattg atagctctga tgagcctgag 3300
catataacaa ttgatttgcg tgaagggaca aaatttaatt atgatgattt aaattatgtc 3360
ggaggggcttt taaaaaatac tacaaataat aacaatatgc aaaccaaga cgatgaagggt 3420
gatggatatc ttgccctaaa aggattaggt atctatgaat ttcttgatga tgaaagtatt 3480
gatcaaccog ctactgttga aaaggcagag agattatata aacactttat ggggctattt 3540
aggaataa 3549

5 <210> 7
<211> 1053
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> gen mhp389 mutado

ES 2 812 552 T3

<400> 7

```

atggacaaat tttcacgaac tgttctcggg gatattcacc catcggaatt aggtgttggt      60
gactgtcatg atcatttaat taaaaattat ggaccaaaag ctcacgaaca tccggatttt      120
gtaatgttat caaatgaggc tgcaattgct gaatcacttg aatatgcttc ccgggggtgga      180
aaaacaatag tgacaatgga ccccccaaat gttggtcggg atgtctatcg aatgttaaag      240
attgccaaag ctcttgaagg aaaagtgcac attattatgg caactggatt tcataaagcg      300
gctttctatg ataaaggcgc atcatggctt gcgcttgcac caacagatga aattgtaaaa      360
atggttgttg ctgaaattac acagggaaatg gatgaatata attattcagg tcctgtgggt      420
agacgttcaa aagccaaagc aggaattatc aaagccggaa ctggatatgg agcaattgat      480
cgacttgaat taaaatcact tgaggttgca gcaagagcct caattgaaac cggggcaccg      540
attttggttc ataccaatt aggaacaatg gcctatgaag cggcaaaata tttaattgat      600
tttggtgcaa atccacggaa aattcagatc tcacatotta ataaaaacc tgataaatat      660
tattatgcaa aaataattaa agaacttggg gtatctttat gttttgatgg tcctgatcgg      720
gttaagtatt ttctgatac aactcttgcg gaaaatatta aatatcttgc cgatttagga      780
ctagaaaaac atattacctt atcacttgat gccggtcgtg ttttatatca gcgaaattat      840
ggaaaactta aaggtaaattg gacttttgga ctaacctatt tattcgatcg gtttattccg      900
cttttagaac aagttggaat tagcaaggaa acaattaata atattcttgc taataatcca      960
gctgaaattc ttgcctttga tcagccaaga aaatttgatc catcaattct tccagattat     1020
attattgaat taaaaaaatc ctttaaaatc tag                                     1053

```

5 <210> 8
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

10 <400> 8

```

Met Asp Lys Phe Arg Tyr Val Lys Pro Gly Gln Ile Met Ala Lys Asp
1           5           10           15

Glu Glu Met Ile Arg Phe Leu Asp Ile Asp Gly Asn Leu Leu Ser Ser
          20           25           30

Thr Val Phe Gly Pro Ile Asp Glu Thr Asn Asp Ile Arg Leu Ser Lys
          35           40           45

Gln Glu Ile Lys Lys Ala Tyr Glu Phe Met Val Leu Ser Arg Gln Gln
          50           55           60

```

ES 2 812 552 T3

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

ES 2 812 552 T3

305						310						315						320
Ile	Trp	Asp	Glu	Ala	Leu	Ala	Ile	Val	Lys	Glu	Thr	Tyr	Glu	Lys	Ser			
			325						330						335			
Leu	Val	Gly	Leu	Glu	Ser	Thr	Ile	Asp	Glu	Ile	Phe	Asp	His	Thr	Tyr			
			340						345						350			
Lys	Val	Leu	Pro	Pro	Glu	Leu	Glu	Glu	Gln	Lys	Gln	Glu	Ala	Leu	Glu			
			355						360						365			
Phe	Phe	Lys	Gly	Val	Lys													
370																		

<210> 9
<211> 447
<212> PRT
<213> Mycoplasma hyopneumoniae
<400> 9

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

ES 2 812 552 T3

Ile	Thr	Lys	Trp	Leu	Lys	Ile	Pro	Glu	Asn	Lys	Gln	Leu	Phe	Thr	Glu	145	150	155	160
Lys	Asn	Ile	Ile	Ile	Leu	Gly	Ile	Asp	Trp	Thr	Asp	Thr	Glu	Asn	Val	165	170	175	
Ile	Pro	Thr	Gly	Arg	Tyr	Ile	Asn	Leu	Thr	Tyr	Lys	Thr	Glu	Glu	Ala	180	185	190	
Gly	Trp	Leu	Ala	Gly	Tyr	Ala	Asn	Ala	Ser	Phe	Leu	Ala	Lys	Lys	Phe	195	200	205	
Pro	Ser	Asp	Pro	Thr	Lys	Arg	Ser	Ala	Ile	Val	Ile	Gly	Gly	Gly	Ile	210	215	220	
Phe	Pro	Ala	Val	Thr	Asp	Phe	Ile	Ala	Gly	Tyr	Leu	Ala	Gly	Ile	Lys	225	230	235	240
Ala	Trp	Asn	Leu	Lys	Asn	Ser	Asp	Lys	Lys	Thr	Lys	Ile	Thr	Thr	Asp	245	250	255	
Lys	Ile	Glu	Ile	Asn	Leu	Gly	Phe	Asp	Phe	Gln	Asn	Thr	Ser	Thr	Lys	260	265	270	
Glu	Arg	Leu	Glu	Gln	Ile	Ala	Ser	Lys	Asp	Lys	Pro	Ser	Thr	Leu	Leu	275	280	285	
Ala	Val	Ala	Gly	Pro	Leu	Thr	Glu	Ile	Phe	Ser	Asp	Ile	Ile	Ala	Asn	290	295	300	
Gln	Asn	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ile	Gly	Val	Asp	Thr	Asp	Gln	Ser	Leu	Val	305	310	315	320
Tyr	Thr	Lys	Thr	Lys	Asn	Lys	Phe	Phe	Thr	Ser	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	325	330	335	
Gly	Tyr	Ser	Val	Phe	Ser	Val	Leu	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Lys	Lys	Ser	340	345	350	
Asn	Ser	Arg	Asn	Leu	Ala	Gly	Phe	Glu	Phe	Gly	Lys	Lys	Ser	Ala	Thr	355	360	365	
Val	Tyr	Leu	Gly	Ile	Lys	Asp	Lys	Phe	Val	Asp	Ile	Ala	Asp	Thr	Ser	370	375	380	

ES 2 812 552 T3

Leu Glu Gly Asn Asp Lys Lys Leu Ala Thr Glu Ala Ile Ser Glu Ala
385 390 395 400

Lys Lys Glu Phe Glu Glu Lys Thr Lys Thr Thr Pro Ala Glu Glu Val
405 410 415

Arg Lys Thr Leu Glu Ile Pro Glu Met Thr Asp Lys Gln Pro Asp Lys
420 425 430

Gln Gln Glu Ser Leu Asp Lys Leu Ile Thr Asp Ile Asn Lys Asn
435 440 445

<210> 10

<211> 373

<212> PRT

<213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 10

Ile Ala Ser Arg Ser Asn Thr Thr Ala Lys Val Ala Pro Val Ala Val
1 5 10 15

Val Phe Ser Thr Arg Asn Asn Pro Phe Phe Gln Asn Val Glu Lys Gly
20 25 30

Ile Glu Thr Ala Ala Lys Glu Leu Gly Val Asp Tyr Glu Val Tyr Asp
35 40 45

Ser Glu Asn Asp Ser Asp Lys Glu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ile Ile
50 55 60

Ala Lys Gln Gln Lys Val Val Ile Phe Asn Asp Val Asn Glu Asp Ser
65 70 75 80

Gly Ile Ser Ala Val Lys Lys Leu Asn Gln Ala Gly Ile Pro Val Ile
85 90 95

Ala Thr Asp His Leu Leu Asn Ser Pro Lys Ala Leu Glu Ala Lys Ile
100 105 110

Lys Val Glu Ala Asn Ile Ala Ser Asp Asn Lys Gln Ala Gly Val Ile
115 120 125

Leu Ala Gln Phe Met Ala Gln Lys Ile Gly Leu Pro Gln Asp Ser Leu
130 135 140

Thr Tyr Ser Val Tyr Gly Ile Pro Gly Thr Glu Ser Gly Glu Ser Arg
145 150 155 160

5

10

ES 2 812 552 T3

Ala Gln Gly Phe Ile Glu Thr Val Lys Asn Leu Asn Asn Gln Ala Ile
165 170 175

Lys Tyr Asn Leu Phe Ser Tyr Gly Lys Tyr Gly Lys Glu Asn Ala Asn
180 185 190

Gly Lys Thr Tyr Ile Gly Arg Gln Ala Asp Asp Asn Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asn Gln Arg Val Ala Asn Asp Ala Thr Gln Val Phe Gln Asp Ala Gln
210 215 220

Lys Arg Pro Leu Leu Val Phe Gly Thr Asn Asp Glu Ala Ala Leu Gly
225 230 235 240

Ser Ile Ser Ala Leu Glu Ser Ala Gln Ile Pro Leu Gly Gly Gly Asp
245 250 255

Lys Phe Leu Pro Gly Ser Gly Lys Val Tyr Ile Thr Gly Val Asp Tyr
260 265 270

Thr Asn Asp Ala Gln Lys Ala Val Leu Asn Asn Lys Leu Ser Ala Thr
275 280 285

Val Glu Gln Asp Thr Asp Leu Leu Gly Arg Leu Ser Leu Ile Ile Ala
290 295 300

Glu Lys Ile Leu Lys Asp Gln Trp Lys Thr Ser Lys Tyr Ser Asp Phe
305 310 315 320

Tyr Ser Gln Phe Pro Gln Leu Asp Lys Asp Lys Asn Pro Asp Asp Gln
325 330 335

Val Glu Gln Gly Tyr Tyr Phe Lys Val Gly Thr Lys Leu Phe Trp Lys
340 345 350

Gly Pro Asp Gly Lys Gly Glu Lys Leu Gln Ala Asp Glu Asn Gly Ile
355 360 365

Leu Gln Lys Val Asn
370

<210> 11
<211> 373
<212> PRT
<213> Mycoplasma hyopneumoniae

ES 2 812 552 T3

<400> 11

```

Ile Ala Ser Arg Ser Asn Thr Thr Ala Lys Val Ala Pro Val Ala Val
1          5          10          15

Val Phe Ser Thr Arg Asn Asn Pro Phe Phe Gln Asn Val Glu Lys Gly
20          25          30

Ile Glu Thr Ala Ala Lys Glu Leu Gly Val Asp Tyr Glu Val Tyr Asp
35          40          45

Ser Glu Asn Asp Ser Asp Lys Glu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ile Ile
50          55          60

Ala Lys Gln Gln Lys Val Val Ile Phe Asn Asp Val Asn Glu Asp Ser
65          70          75          80

Gly Ile Ser Ala Val Lys Lys Leu Asn Gln Ala Gly Ile Pro Val Ile
85          90          95

Ala Thr Asp His Leu Leu Asn Ser Pro Lys Ala Leu Glu Ala Lys Ile
100         105         110

Lys Val Glu Ala Asn Ile Ala Ser Asp Asn Lys Gln Ala Gly Val Ile
115         120         125

Leu Ala Gln Phe Met Ala Gln Lys Ile Gly Leu Pro Gln Asp Ser Leu
130         135         140

Thr Tyr Ser Val Tyr Gly Ile Pro Gly Thr Glu Ser Gly Glu Ser Arg
145         150         155         160

Ala Gln Gly Phe Ile Glu Thr Val Lys Asn Leu Asn Asn Gln Ala Ile
165         170         175

Lys Tyr Asn Leu Phe Ser Tyr Gly Lys Tyr Gly Lys Glu Asn Ala Asn
180         185         190

Gly Lys Thr Tyr Ile Gly Arg Gln Ala Asp Asp Asn Arg Asp Leu Ala
195         200         205

Asn Gln Arg Val Ala Asn Asp Ala Thr Gln Val Phe Gln Asp Ala Gln
210         215         220

Lys Arg Pro Leu Leu Val Phe Gly Thr Asn Asp Glu Ala Ala Leu Gly

```

ES 2 812 552 T3

225		230		235		240
Ser Ile Ser Ala Leu Glu Ser Ala Gln Ile Pro Leu Gly Gly Gly Asp						
		245		250		255
Lys Phe Leu Pro Gly Ser Gly Lys Val Tyr Ile Thr Gly Val Asp Tyr						
		260		265		270
Thr Asn Asp Ala Gln Lys Ala Val Leu Asn Asn Lys Leu Ser Ala Thr						
		275		280		285
Val Glu Gln Asp Thr Asp Leu Leu Gly Arg Leu Ser Leu Ile Ile Ala						
		290		295		300
Glu Lys Ile Leu Lys Asp Gln Trp Lys Thr Ser Lys Tyr Ser Asp Phe						
305		310		315		320
Tyr Ser Gln Phe Pro Gln Leu Asp Lys Asp Lys Asn Pro Asp Asp Gln						
		325		330		335
Val Glu Gln Gly Tyr Tyr Phe Lys Val Gly Thr Lys Leu Phe Trp Lys						
		340		345		350
Gly Pro Asp Gly Lys Gly Glu Lys Leu Gln Ala Asp Glu Asn Gly Ile						
		355		360		365
Leu Gln Lys Val Asn						
		370				

<210> 12
 <211> 691
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae
 <400> 12

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

ES 2 812 552 T3

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

ES 2 812 552 T3

Val	Ser	Glu	Gly	Asn	Arg	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	Val	Leu	Asp	Arg	Gln	305	310	315	320
Lys	Asn	Leu	Ile	Asp	Tyr	Ile	Ser	Phe	Ile	Asp	Lys	Pro	Asp	Ser	Ile	325	330	335	
Arg	Tyr	Lys	Asn	Leu	Glu	Lys	Ile	Phe	Asn	Leu	Leu	Ser	Gln	Gly	Ile	340	345	350	
Lys	Asp	Arg	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Glu	Tyr	Asn	Ser	Thr	355	360	365	
Phe	Phe	Arg	Asn	His	Gln	Gln	Val	Phe	Ser	Ile	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	370	375	380	
Tyr	Phe	His	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Thr	Ala	Thr	Asn	Tyr	Gln	Ile	Gly	385	390	395	400
Phe	Lys	Lys	Asn	Asp	Gly	Leu	Lys	Ser	Val	Tyr	Ser	Val	Ser	Tyr	Pro	405	410	415	
Lys	Phe	Ser	Ala	Ile	Val	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asp	Ile	Thr	Lys	420	425	430	
Asp	Leu	Glu	Ile	Thr	Ala	Thr	Asp	Gly	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Ile	Asp	435	440	445	
Ala	Lys	Phe	Leu	Gly	Lys	Leu	Lys	Glu	Tyr	Ala	Gln	Gln	Asn	Pro	Val	450	455	460	
Lys	Lys	Val	Phe	Tyr	Phe	Thr	Asp	Arg	Ser	Glu	Lys	Pro	Ser	Gly	Ile	465	470	475	480
Phe	Glu	Lys	Asp	Tyr	Ile	Val	Leu	Gly	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asp	Lys	Asn	485	490	495	
Glu	Glu	Phe	Asn	Gly	Leu	Val	Ile	Pro	Thr	Tyr	Thr	Glu	Leu	Tyr	Lys	500	505	510	
Asn	Ser	Gly	Ser	Asn	Ala	Leu	Asn	Asp	Asp	Glu	Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	515	520	525	
Pro	Pro	His	Lys	Phe	Asp	Ala	Asn	Ser	Lys	Ile	Thr	Pro	Ile	Val	Ala	530	535	540	
Gln	Gly	Pro	Asp	Leu	Ile	Phe	Ile	His	Ser	Thr	Glu	Lys	Glu	Asp	Lys				

ES 2 812 552 T3

545		550		555		560									
Ala	Ala	Lys	Ala	Phe	Val	Lys	Trp	Leu	Leu	Thr	Glu	Lys	Ile	Val	Phe
			565					570						575	
Glu	Glu	Asn	Ser	Gln	Glu	Lys	Met	Thr	Pro	Leu	Glu	Tyr	Phe	Ala	Arg
		580					585						590		
Ala	Thr	Ser	Tyr	Leu	Leu	Pro	Ile	Lys	Ser	Thr	Leu	Asp	Lys	Thr	His
		595					600					605			
Phe	Ser	Pro	Lys	Asn	Arg	Ser	Gln	Lys	Phe	Ile	Leu	Asp	Gln	Phe	Ser
	610					615					620				
Lys	Phe	Leu	Asn	Ala	Asp	Ser	Lys	Gly	Lys	Tyr	Ser	Leu	Val	Tyr	Asp
625					630					635					640
Asn	Ala	Asp	Ala	Asn	Ala	Ser	Ser	Phe	Arg	Glu	Ser	Leu	Asp	Ser	Ser
			645						650					655	
Val	Ala	Gln	Met	Gln	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Gly	Lys	Leu	Arg	Ser
			660					665					670		
Phe	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Lys	Leu	Glu	Gly	Asn	Leu	Gly	Pro	Ala	Phe
		675					680					685			
Lys	Ser	Lys													
		690													

<210> 13
 <211> 1182
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae
 <400> 13

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

ES 2 812 552 T3

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

ES 2 812 552 T3

Gln Lys Val Thr Glu Phe Val Glu Ile Lys Pro Tyr Val Gln Leu Gly
 305 310 315 320
 Leu Ile Arg Asp Asn Leu Ser Leu Ser Glu Ile Ile Tyr Lys Asn Asp
 325 330 335
 Asn Asn Pro Glu Tyr Leu Arg Lys Ile Leu Ala Lys Leu Lys Glu His
 340 345 350
 Asn Asn Asn Lys Arg Val Asp Asn Asn Thr Ser Thr Thr Lys Phe Gln
 355 360 365
 Glu Glu Asp Leu Lys Asn Glu Pro Asn Ser Asn Gly Ser Glu Gln Asp
 370 375 380
 Ser Phe Glu Lys Ala Lys Glu Asn Phe Leu Ser Phe Phe Asp Leu Arg
 385 390 395 400
 Ser Arg Leu Ile Pro Ile Pro Asp Leu Pro Leu Tyr Tyr Leu Lys Val
 405 410 415
 Asn Ser Ile Asn Phe Asp Arg Asn Ile Glu Glu Asn Glu Lys Glu Lys
 420 425 430
 Leu Leu Lys Asn Glu Gln Val Val Leu Lys Val Asp Phe Ser Leu Lys
 435 440 445
 Lys Val Val Ser Asp Ile Arg Ala Pro Tyr Leu Val Ser Ser Gln Val
 450 455 460
 Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Val Leu Lys Ala Ser Leu Ala Lys Ile Gly
 465 470 475 480
 Lys Gly Ser Asn Ser Lys Val Val Leu Leu Asp Leu Gly Asn Leu Ser
 485 490 495
 Ser Arg Phe Lys Val Gln Leu Asp Tyr Ser Ala Lys Gln Arg Glu Ile
 500 505 510
 Ile Asn Thr Leu Leu Lys Glu Asn Pro Glu Arg Glu Lys Glu Leu Gln
 515 520 525
 Ala Lys Ile Glu Ser Lys Thr Phe Ser Pro Ile Asp Leu Asn Asn Asp
 530 535 540
 Asp Leu Leu Ala Ile Glu Phe Gln Tyr Glu Asp Asn Pro Glu Gly Asp

ES 2 812 552 T3

545				550				555				560			
Trp	Ile	Thr	Leu	Gly 565	Arg	Met	Glu	Lys	Leu	Val	Lys	Glu	Val	Ile	Gln
Tyr	Lys	Lys	Glu	Gly 580	Lys	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Glu	Val	Ala	Lys	Thr
Leu	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Phe	His	His	Leu	Pro	Gln	Ser	Lys	Lys	Asp	Leu
Glu	Glu	Tyr	Lys	Glu	Lys	His	Lys	Asn	Lys	Phe	Ile	Ser	Glu	Ile	Lys
Pro	Ala	Thr	Pro	Ala	Ser	Gln	Ala	Lys	Thr	Ser	Gln	Ala	Lys	Asn	Glu
Lys	Glu	Val	Lys	Pro	Glu	Ser	Ala	Gln	Ala	Glu	Ala	Ser	Ser	Ser	Asn
Ser	Asn	Asp	Ser	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Met	Ala	Gly
Thr	Thr	Gln	Asn	Lys	Ser	Thr	Glu	Thr	Pro	Asn	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser
Thr	Pro	Thr	Ser	Ser	Ala	Thr	Thr	Ser	Ala	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser
Ser	Asn	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr
Gln	Ala	Ala	Thr	Thr	Ser	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Val	Lys	Thr	Thr	Lys
Phe	Gln	Glu	Gln	Val	Lys	Glu	Gln	Glu	Gln	Lys	Gln	Glu	Lys	Ala	Lys
Glu	Thr	Asn	Gln	Leu	Leu	Asp	Thr	Lys	Arg	Asn	Lys	Glu	Asp	Ser	Gly
Leu	Gly	Leu	Ile	Leu	Trp	Asp	Phe	Leu	Val	Asn	Ser	Lys	Tyr	Lys	Thr
Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Trp	Asp	Phe	His	Val	Glu	Pro	Asp	Asn	Phe	Asn

ES 2 812 552 T3

Asp Arg Leu Lys Ile Thr Ala Ile Leu Lys Glu Asn Thr Ser Gln Ala
 805 810 815
 Lys Ser Asn Pro Asp Ser Lys Asn Leu Thr Ser Leu Ser Arg Asn Leu
 820 825 830
 Ile Ile Lys Gly Val Met Ala Asn Lys Tyr Ile Asp Tyr Leu Val Gln
 835 840 845
 Glu Asp Pro Val Leu Leu Val Asp Tyr Thr Arg Arg Asn Gln Ile Lys
 850 855 860
 Thr Glu Arg Glu Gly Gln Leu Ile Trp Ser Gln Leu Ala Ser Pro Gln
 865 870 875 880
 Met Ala Ser Pro Glu Ser Ser Pro Glu Lys Ala Lys Leu Glu Ile Thr
 885 890 895
 Glu Glu Gly Leu Arg Val Lys Lys Gly Gly Thr Lys Ile Lys Glu Thr
 900 905 910
 Arg Lys Ser Thr Thr Ser Asn Ala Lys Ser Asn Thr Asn Ser Lys Pro
 915 920 925
 Asn Lys Lys Leu Val Leu Leu Lys Gly Ser Ile Lys Asn Pro Gly Thr
 930 935 940
 Lys Lys Glu Trp Ile Leu Val Gly Ser Gly Asn Lys Ala Thr Lys Asn
 945 950 955 960
 Gly Ser Ser Ser Asn Asn Ser Asn Thr Gln Ile Trp Ile Thr Arg Leu
 965 970 975
 Gly Thr Ser Val Gly Ser Leu Lys Thr Glu Gly Glu Thr Val Leu Gly
 980 985 990
 Ile Ser Asn Asn Asn Ser Gln Gly Glu Val Leu Trp Thr Thr Ile Lys
 995 1000 1005
 Ser Lys Leu Glu Asn Glu Asn Asn Ser Asp Asn Asn Gln Ile Gln
 1010 1015 1020
 Tyr Ser Pro Ser Thr His Ser Leu Thr Thr Asn Ser Arg Ser Asn
 1025 1030 1035

ES 2 812 552 T3

Thr Gln Gln Ser Gly Arg Asn Gln Ile Lys Ile Thr Asn Thr Gln
1040 1045 1050

Arg Lys Thr Thr Thr Ser Pro Ser Gln Asn Leu Ser Gln Asn Pro
1055 1060 1065

Asp Leu Asn Gln Ile Asp Val Arg Leu Gly Leu Leu Val Gln Asp
1070 1075 1080

Lys Lys Leu His Leu Trp Trp Ile Ala Asn Asp Ser Ser Asp Glu
1085 1090 1095

Pro Glu His Ile Thr Ile Asp Phe Ala Glu Gly Thr Lys Phe Asn
1100 1105 1110

Tyr Asp Asp Leu Asn Tyr Val Gly Gly Leu Leu Lys Asn Thr Thr
1115 1120 1125

Asn Asn Asn Asn Met Gln Thr Gln Asp Asp Glu Gly Asp Gly Tyr
1130 1135 1140

Leu Ala Leu Lys Gly Leu Gly Ile Tyr Glu Phe Pro Asp Asp Glu
1145 1150 1155

Ser Ile Asp Gln Pro Ala Thr Val Glu Lys Ala Glu Arg Leu Tyr
1160 1165 1170

Lys His Phe Met Gly Leu Phe Arg Glu
1175 1180

<210> 14

<211> 350

<212> PRT

<213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 14

Met Asp Lys Phe Ser Arg Thr Val Leu Gly Asp Ile His Pro Ser Glu
1 5 10 15

Leu Gly Val Val Asp Cys His Asp His Leu Ile Lys Asn Tyr Gly Pro
20 25 30

Lys Ala His Glu His Pro Asp Phe Val Met Leu Ser Asn Glu Ala Ala
35 40 45

Ile Ala Glu Ser Leu Glu Tyr Ala Ser Arg Gly Gly Lys Thr Ile Val

5

10

ES 2 812 552 T3

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

ES 2 812 552 T3

Val Gly Ile Ser Lys Glu Thr Ile Asn Asn Ile Leu Val Asn Asn Pro
305 310 315 320

Ala Glu Ile Leu Ala Phe Asp Gln Pro Arg Lys Phe Asp Pro Ser Ile
325 330 335

Leu Pro Asp Tyr Ile Ile Glu Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ile
340 345 350

5 <210> 15
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 15
gatataggat ccatggacaa attcgctat gtaaagcctg 40

15 <210> 16
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 16
caatatgtcg acttatttta ctccttaaa aaattcaagc gcttc 45

25 <210> 17
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 17
gatataggat ccatgaatgg aataaatttc ttggcttagg ctagtttt c 51

35 <210> 18
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

<400> 18
caatatgtcg acttaatttt tattaatatc ggtaattagt ttgtctaagc 50

45 <210> 19
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> cebador

55 <400> 19

	gatataggat ccatgacata ccaagaatat ctcaagcaa g	41
5	<210> 20 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 20 caatatgtcg acctatttac ctcttcaac ttgtagagcg ct	42
15	<210> 21 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 21 gatataggat ccatagcttc aaggtcgaat acaactgc	38
30	<210> 22 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 22 caatatgtcg acttaattta cctttggag tatccattt tc	42
45	<210> 23 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
55	<400> 23 gatataggat cctatccta taaatttagg cgtttttcc	40
60	<210> 24 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	
	<400> 24 caatatgtcg acttatttg atttaaaagc aggacctaaa t	41
	<210> 25 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 25	

	gatataggat ccattggact aacaatttt gagaaatcat ttag	44
5	<210> 26 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 26 caatatgtcg acttattcct aaatagcccc ataaagtg	38
15	<210> 27 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 27 gatataggat ccatggacaa atttcacga actgttct	38
25	<210> 28 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 28 caatatgtcg acctagattt taaaggattt tttaattca ataataat c	51
40	<210> 29 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 29 gatataggat ccatggacaa atttcgctat gtaaagcctg	40
50	<210> 30 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
55	<400> 30 gctaacaaaa gatgactggt ttgtcccagc ttttcg	36
60	<210> 31 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	
	<400> 31	

ES 2 812 552 T3

	cgaaaagctg ggacaaacca gtcactttt gtttagc	36
5	<210> 32 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 32 cttgcaaatg caatattgga atggtagcga aaaagg	36
15	<210> 33 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 33 cctttttcgc taccattcca atattgcatt tgcaag	36
25	<210> 34 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 34 cgaggcgccta aatattgcaa gtatttgga atggccagtt gtttttcgc taaataac	58
40	<210> 35 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 35 gttatttacg caaaaaacaa ctggccattt ccaaatactt gcaatattta gcgcctcg	58
50	<210> 36 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
55	<400> 36 gttttttcgc taaataacaa tcaatgggca atttcaaccc caaataaata tg	52
60	<210> 37 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	
	<400> 37	

ES 2 812 552 T3

	catatttatt tggggttgaa attgccatt gattgttatt tacgcaaaaa ac	52
5	<210> 38 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 38 gttgagtttg taacttgcg tcaaggtgtt catacc	36
15	<210> 39 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 39 ggtatgaaca ccttgacgcc aagttacaaa ctcaac	36
30	<210> 40 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 40 gagaacacga aaaatgggaa ccaatgcacc gg	32
45	<210> 41 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
55	<400> 41 ccggtgcatt ggttccatt ttcgtgttc tc	32
60	<210> 42 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	
	<400> 42 ccgaaaaaca aaaaatttgg gatgaagcgc ttgcgattg	39
	<210> 43 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 43	

	caatcgcaag cgcttcatcc caaattttt gttttcgg	39
5	<210> 44 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 44 caatatgtcg acttatttta ctctttaa aaattcaagc gcttc	45
15	<210> 45 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 45 gatataggat ccatgaaatg gaataaattt ctggccttag gcttagttt tc	52
30	<210> 46 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 46 catttaacca atcaagttgg gaggcaattc aacaactgg	40
45	<210> 47 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
55	<400> 47 ccaagttgtt gaattgcctc ccaactgat tggtaaagt	40
60	<210> 48 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	
	<400> 48 ctaataccaa caaaaatgtt tgggtacttt ctggtttca acacg	45
	<210> 49 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 49	

	cggtgtgaaa accagaaagt acccaaacat tttgttggt attag	45
5	<210> 50 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 50 cgggtgatgcg atcacaaaat ggtaaaaat ccctgaaaat aagc	44
15	<210> 51 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 51 gcttattttc agggattttt aaccatttg tgatcgcatc accg	44
30	<210> 52 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 52 ttatcatact cggaattgac tggactgata ctgaaaatgt aattc	45
45	<210> 53 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
55	<400> 53 gaattacatt ttcagtatca gtccagtcaa ttccgagtat gataa	45
60	<210> 54 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	
	<400> 54 gaagaagccg gatggcttgc aggatatgc	29
	<210> 55 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 55	

	gcatactctg caagccatcc ggcttcttc	29
5	<210> 56 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 56 gggtatctag ccggaattaa agcttggaat ctaaaaaatt ctgataaaaa aac	53
15	<210> 57 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 57 gttttttat cagaatttt tagattcaa gctttaattc cggctagata acc	53
30	<210> 58 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 58 caatatgtcg acttaatttt tattaatatc ggtaattagt ttgtctaagc	50
45	<210> 59 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
55	<400> 59 gatataggat ccttatccta taaatttagg cgtttttcc	40
60	<210> 60 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	
	<400> 60 caattaataa agttttgttt ggttgatga ttaataaagc acttgctgat cc	52
	<210> 61 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 61	

	ggatcagcaa gtgctttatt aatcatccaa ccaaacaaaa ctttattaat tg	52
5	<210> 62 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 62 gatattaaag aaattgaaag aatctggaaa aaatatgtct ccgatgatca agg	53
15	<210> 63 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 63 ccttgatcat cggagacata tttttccag attctttcaa tttcttaat ate	53
30	<210> 64 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 64 gccctttcag gaggctccac tgattcggca	30
45	<210> 65 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
55	<400> 65 tgccgaatca gtggagcctc ctgaaagggc	30
60	<210> 66 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	
	<400> 66 gccgcaaaag cttttgttaa atggcttttg acagaaaaaa tagtct	46
	<210> 67 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 67	

	agactatttt ttctgtcaaa agccatttaa caaaagcttt tgcggc	46
5	<210> 68 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 68 caatatgtcg acttatttg atttaaaagc aggacctaaa t	41
15	<210> 69 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 69 gatataggat ccattggact aacaatttt gagaaatcat ttag	44
30	<210> 70 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 70 ctaactctc taaaagggtg gaaagaagaa gatgatttg	40
45	<210> 71 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
55	<400> 71 caaatcatc ttctcttc caaccttta gagaagtag	40
60	<210> 72 <211> 47 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	
	<400> 72 ctttctatta ctttgaact ctgggacca aatggtaa tagtatc	47
	<210> 73 <211> 47 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 73	

	gatactaatt taccatttgg gtcccagagt tcaaaagtaa tagaaag	47
5	<210> 74 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 74 ccctgaagga gattggataa ctttagggag	30
15	<210> 75 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 75 ctccctaaag ttatccaatc tccttcaggg	30
25	<210> 76 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 76 ctaccaggaa ctacctggga ttccatgtt gaac	34
40	<210> 77 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 77 gttcaacatg gaaatcccag gtagttcctg gtag	34
50	<210> 78 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
55	<400> 78 ggacaactaa ttggagcca gtagcttcc	30
60	<210> 79 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
65	<400> 79	

ES 2 812 552 T3

	ggaagctaac tggctccaaa ttagtgtcc	30
5	<210> 80 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 80 ggaacaaaaa aggaatggat tctgttagga tctgg	35
15	<210> 81 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 81 ccagatccta caagaatcca ttccttttt gtcc	35
25	<210> 82 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 82 ccaatacgca aatatggata acccgtctag gaac	34
40	<210> 83 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 83 gttcctagac gggttatcca tatttgcgta ttgg	34
50	<210> 84 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
55	<400> 84 ccaaggggaa gttctctgga ctactattaa atccaaac	38
60	<210> 85 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	
	<400> 85	

	gtttgattt aatagtagtc cagagaactt ccccttgg	38
5	<210> 86 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 86 caaaaaactt caccttggg ggattgctaa tgatagc	37
15	<210> 87 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 87 gctatcatta gcaatccacc aaaggtgaag tttttg	37
30	<210> 88 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 88 caatatgtcg acttattcct aaatagcccc ataaagtg	38
45	<210> 89 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador	
55	<400> 89 gatataggat ccatagcttc aaggtcgaat acaactgc	38
60	<210> 90 <211> 68 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 90 aataattgca gaaaaaatcc ttaaagatca atggaaaaca agtaaattatt ctgattttta	60
	ttcacaaat	68
	<210> 91 <211> 68 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> cebador		
	<400> 91		
	attgtgaata aaaatcagaa tatttacttg ttttccattg atctttaaga attttttctg		60
	caattatt		68
5	<210> 92		
	<211> 42		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 92		
15	caatatgtcg acttaattta cctttggag tatccattt tc	42	
	<210> 93		
	<211> 38		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 93		
25	gatataggat ccatggacaa atttcacga actgttct	38	
	<210> 94		
	<211> 34		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
35	<400> 94		
	caatagtgac aatggacccc ccaaatgttg gtcg	34	
	<210> 95		
40	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> cebador		
	<400> 95		
	cgaccaacat ttggggggtc cattgtcact attg	34	
	<210> 96		
50	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
55	<223> cebador		
	<400> 96		
	gataaaggcg catcatggct tgcgcttgca ccaac	35	
60	<210> 97		
	<211> 35		
	<212> ADN		

ES 2 812 552 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 97	
	gttggtgcaa gcgcaagcca tgatg'gcct ttatc	35
10	<210> 98	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 98	
	ggaaaactta aaggtaaag gacttttga ctaacctatt t	41
20	<210> 99	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 99	
	aaataggta gtccaaaagt ccatttacct ttaagtttc c	41
30	<210> 100	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 100	
40	caatatgtcg acctagattt taaaggattt tttaattca ataataat c	51

REIVINDICACIONES

1. Una composición para prevenir una infección por *Mycoplasma* spp., que comprende:
 - 5 un principio activo, que comprende una proteína de PdhA; y
un adyuvante farmacéuticamente aceptable;
en donde dicho PdhA comprende la secuencia de SEQ ID NO: 08.
 2. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho principio activo tiene una concentración de 50 a 3500 µg/ml
10 basado en el volumen total de dicha composición.
 3. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho principio activo comprende PdhA y P78; en donde dicho P78
comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12.
 - 15 4. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho adyuvante farmacéuticamente aceptable es un adyuvante
completo de Freund, un adyuvante incompleto de Freund, un gel de alúmina, un tensioactivo, un adyuvante de
polianiones, un péptido, una emulsión de aceite o una combinación de los mismos.
 - 20 5. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un aditivo farmacéuticamente aceptable.
 6. La composición de la reivindicación 5, en donde dicho aditivo farmacéuticamente aceptable es un disolvente, un
estabilizante, un diluyente, un conservante, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente isotónico, un
agente de retraso de la absorción o una combinación de los mismos.
 - 25 7. Un vector de expresión para prevenir una infección por *Mycoplasma* spp., que comprende: un plásmido; en donde
dicho plásmido comprende:
una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 01; y
un elemento regulador;
30 en donde dicho plásmido comprende además un gen que codifica una pareja de fusión, y dicha pareja de fusión
es MsyB de *E. coli*, YjgD de *E. coli*, la proteína D del bacteriófago Lambda o SUMO de *S. cerevisiae*.
 8. El vector de expresión de la reivindicación 7, en donde dicho elemento regulador comprende un promotor y un sitio
de unión a ribosoma.
35 9. El vector de expresión de la reivindicación 7, en donde dicho plásmido es pET-MSY, pET-YjgD, pET-D o pET-
SUMO.
 - 40 10. El vector de expresión de la reivindicación 7, para su uso en un sistema de expresión génica de *E. coli*.

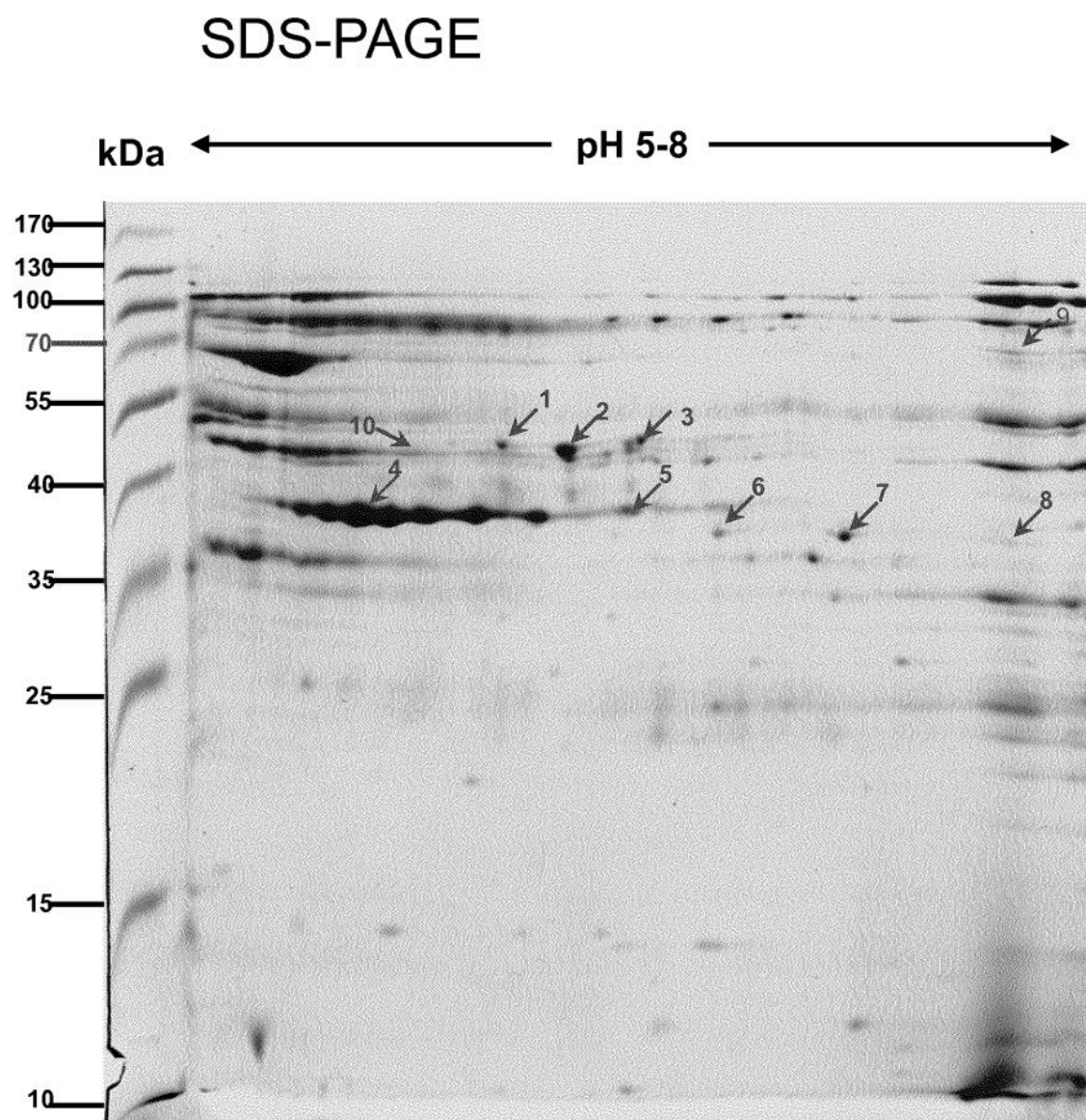


Figura 1

Transferencia Western

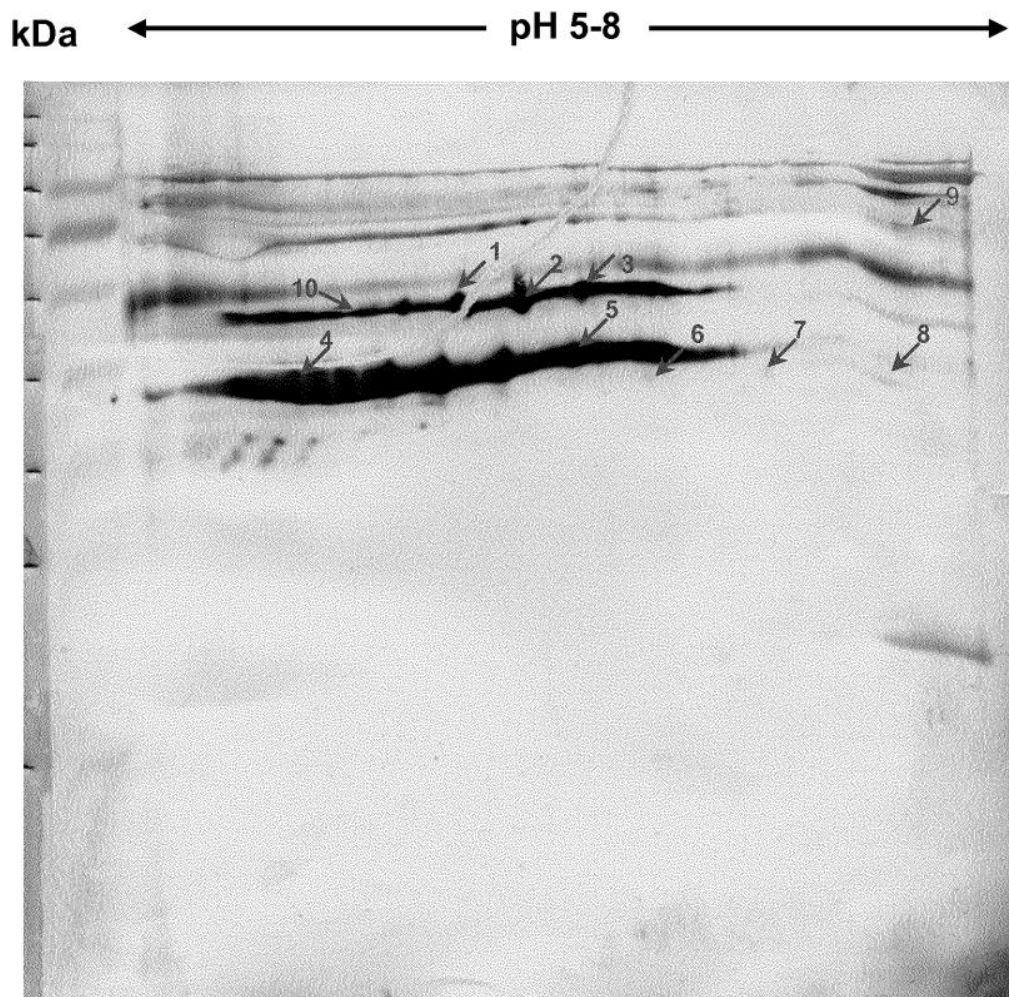


Figura 2

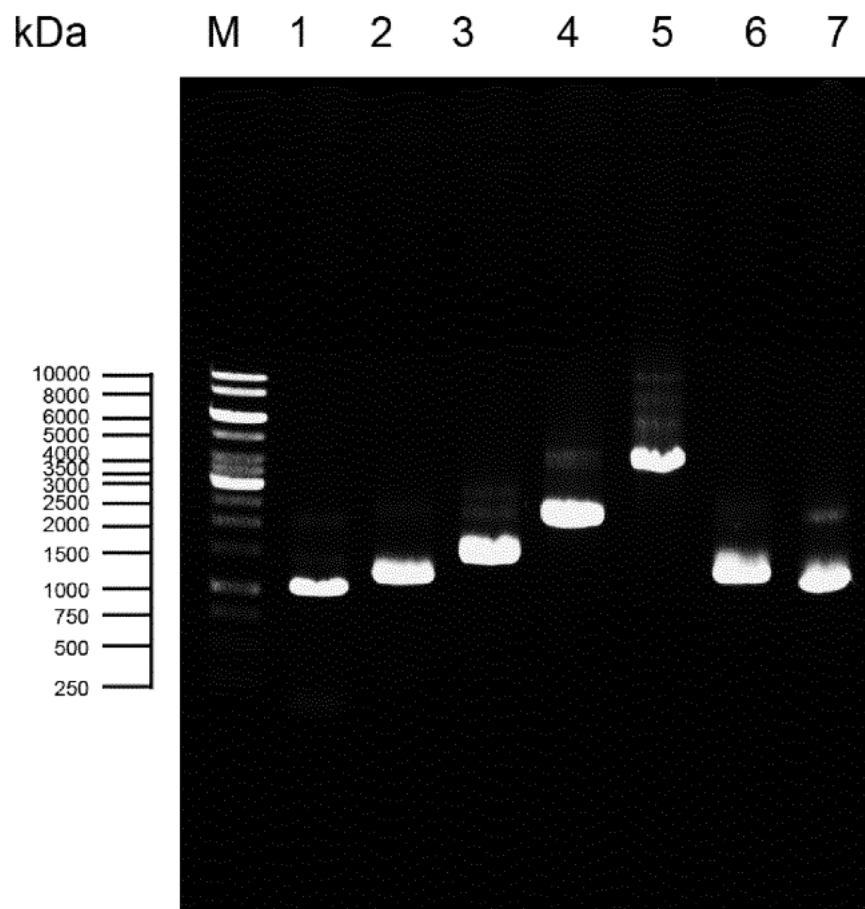


Figura 3

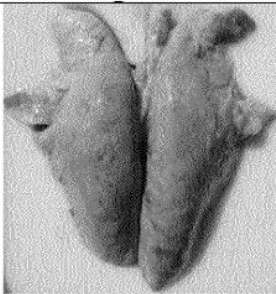
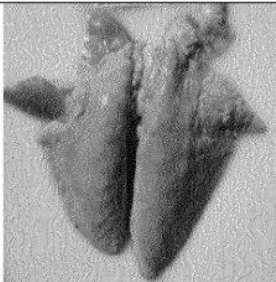
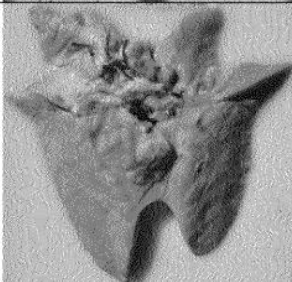
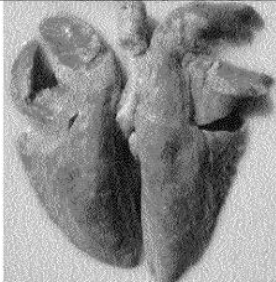
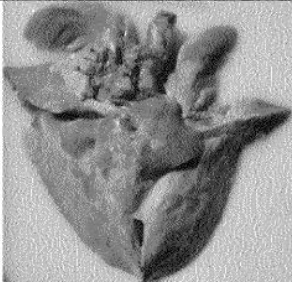
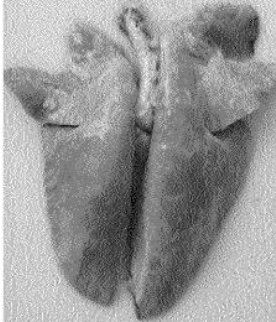
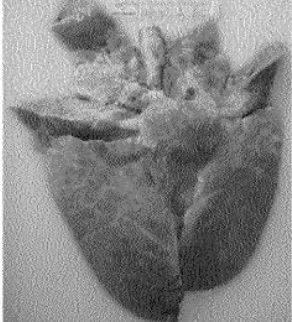
Antígeno(s)	Puntuación	Pulmón, dorsal	Pulmón, ventral
XylF+Mhp145	13		
PdhA+P78	15		
P132	26		
XylF	27		

Figura 4

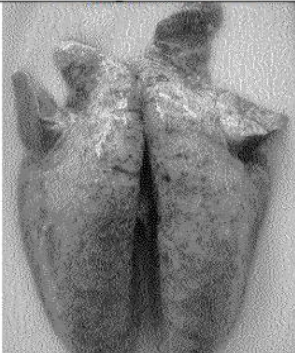
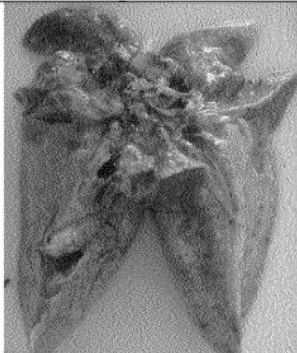
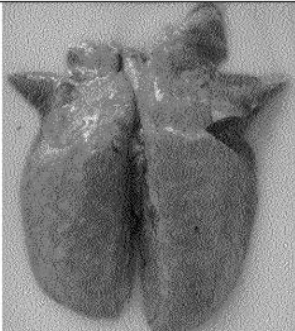
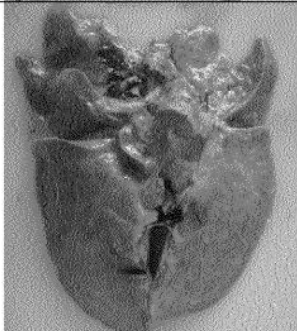
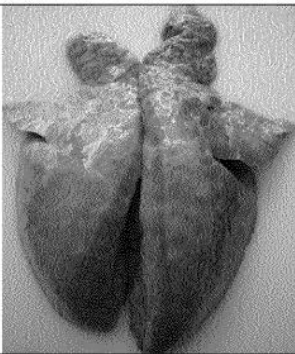
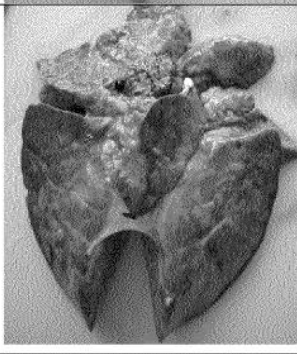
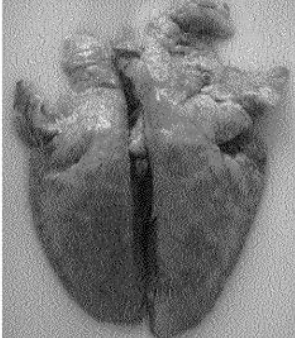
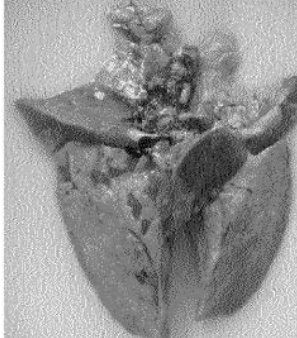
Antígeno(s)	Puntuación	Pulmón, dorsal	Pulmón, ventral
Mhp145	28		
P78	25		
PdhA	28		
EutD	24		

Figura 4 (cont.)

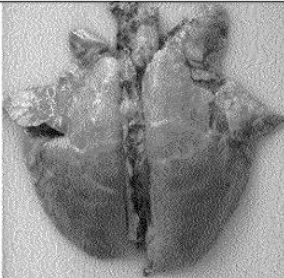
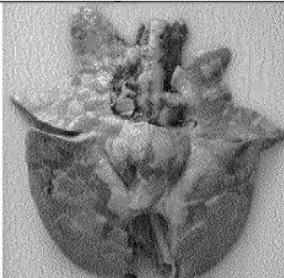
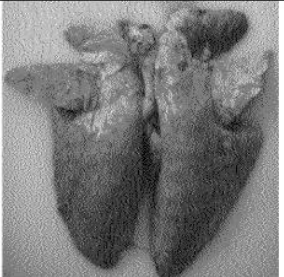
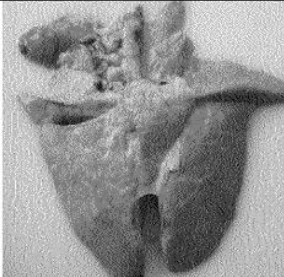
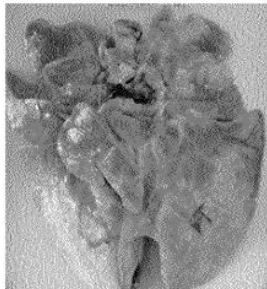
Antígeno(s)	Puntuación	Pulmón, dorsal	Pulmón, ventral
Mhp389	27		
<i>Vacuna PRIT-5</i> (control positivo)	20		
<i>Control no tratado</i>	43		

Figura 4 (cont.)