



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

04-111105

21 EXPEDIENTE No

54 TITULO BACTERIA GRAM NEGATIVA ATENUADA

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71 SOLICITANTE MERIAL LLC,

DOMICILIO Duluth, Georgia, Estados Unidos de América,

74 APODERADO EMILIO FERRERO

C C. 438.019 de Usaquén,

22 BOGOTA, D C , _____



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 04111105 00000000

Fecha (AMD): 2004-11-04 17:18:49

Folios: 225 sión

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2008 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: Merial LLC sociedad constituida y existente bajo las leyes de los Estados Unidos de América Dirección: Satellite Blv., Duluth, Georgia 30096-4640, Estados Unidos de América Domicilio: Duluth, Georgia, Estados Unidos de América		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE APODERADO	Nombre: EMILIO FERRERO Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@camyp.com Domicilio: Bogotá, Colombia.		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 438.019 T.P 31.929
4 INVENTOR (ES) (72)	1. Helen Rachel CROOKE 545 Eskdale Road Winersh Triangle, Wokingham Berkshire RG41 5TU, Reino Unido 3. Robert Graham FELDMAN 545Eskdale Road Winnersh Triangle, Wokingham Berkshire RG41 5TU, Reino Unido 5. François-Xavier LEGROS 85 Avenue de Gadagne, F-69230 Saint Genis Laval, Francia 2. Jacqueline Elizabeth SHEA 545Eskdale Road Winnersh Triangle, Wokingham Berkshire RG41 5TU, Reino Unido 4. Sylvain Gabriel COUTEBROZE 12 rue Dansard, F-69007 Lyon, Francia		
5 PCT (86)	Solicitud Internacional No. <u>PCT/US03/10308</u> Fecha: <u>4 de Abril de 2003</u> Publicación Internacional No. <u>WO 03/086277 A2</u> Fecha: <u>23 de Octubre de 2003</u>		
6 Título (54)	<u>BACTERIA GRAM NEGATIVA ATENUADA</u>		
7 Clasificación Internacional (51)	<u>A61K 1/00</u>		
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	<u>US</u> <u>US</u>	<u>5 de Abril de 2002</u> <u>3 de Abril de 2003</u>	<u>60/370.282</u> <u>10/406.686</u>
9	Comprobante de pago No.: _____		Fecha: _____

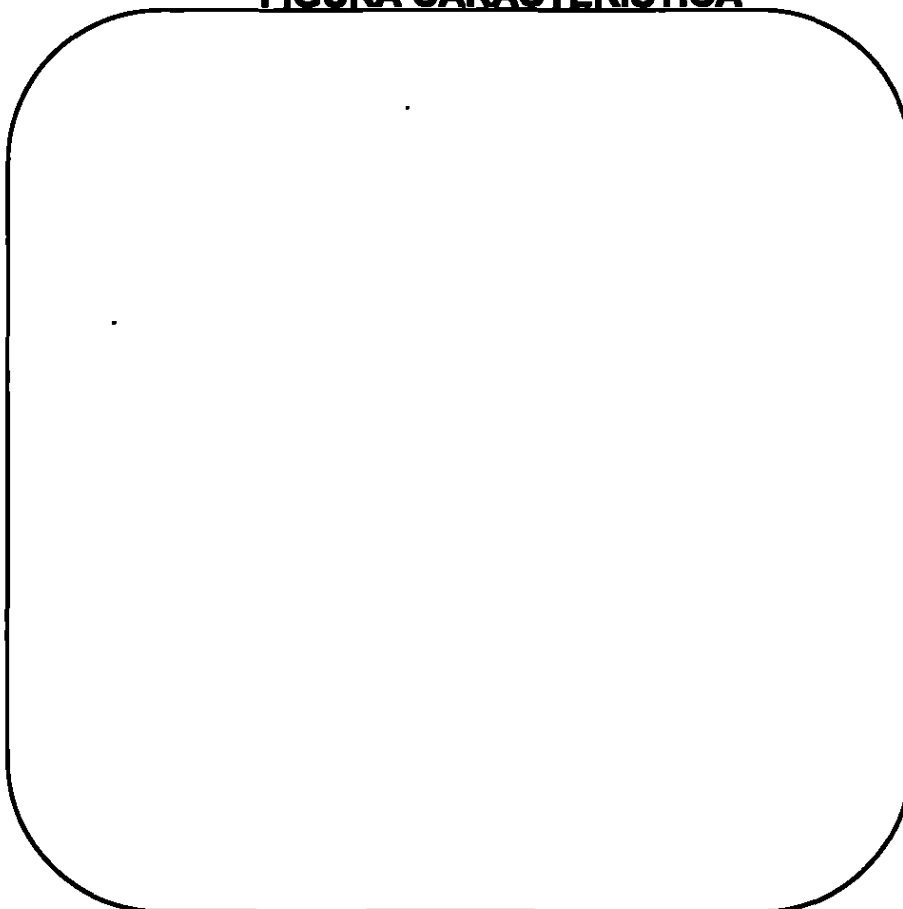
10

An xos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 422.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

PRP

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 October 2003 (23.10.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/086277 A2

- (51) International Patent Classification⁷: A61K (74) Agents: FROMMER, William, S. et al.; Frommer Lawrence & Haug LLP, 745 Fifth Avenue, New York, NY 10151 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US03/10308
- (22) International Filing Date: 4 April 2003 (04.04.2003) (81) Designated States (*national*): AR, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GR, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/370,282 5 April 2002 (05.04.2002) US
10/406,686 3 April 2003 (03.04.2003) US
- (71) Applicant: Merial LLC [US/US]; 3239 Satellite Blvd., Duluth, GA 30096-4640 (US).
- (72) Inventors: CROOKE, Helen, Rachel; 545 Eskdale Road Winnersh Triangle, Wokingham Berkshire RG41 5TU (GB). SHEA, Jacqueline, Elizabeth; 545 Eskdale Road Winnersh Triangle, Wokingham Berkshire RG41 5TU (GB). FELDMAN, Robert, Graham; 545 Eskdale Road Winnersh Triangle, Wokingham Berkshire RG41 5TU (GB). COUTERROZE, Sylvain, Gabriel; 12 rue Danzard, F-69007 Lyon (FR). LEGROS, François-Xavier; 85 Avenue de Gagny, F-69230 Saint Genis Laval (FR).
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/086277 A2

- (54) Title: ATTENUATED GRAM NEGATIVE BACTERIA
- (57) Abstract: Disclosed and claimed are a mutant of a gram negative bacterium, wherein said bacterium has at least one mutation in a nucleotide sequence which codes for a polypeptide having an identity which is equal or more than 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, or 99 % with an amino acid sequence coded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of nucleotide sequences identifies SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93; said mutation resulting in attenuated virulence of the bacterium. Immunogenic compositions and vaccines containing such as a mutant are also disclosed and claimed.

TITLE OF THE INVENTION***ATTENUATED GRAM NEGATIVE BACTERIA*****RELATED APPLICATIONS/INCORPORATION BY REFERENCE**

This application claims priority from U.S. provisional application Serial No. 60/370,282, filed on April 5, 2002, incorporated herein by reference. The foregoing application, and all documents cited therein or during its prosecution ("appln cited documents") and all documents cited or referenced in the appln cited documents, and all documents cited or referenced herein ("herein cited documents"), and all documents cited or referenced in herein cited documents, together with any manufacturer's instructions, descriptions, product specifications, and product sheets for any products mentioned herein or in any document incorporated by reference herein, are hereby incorporated herein by reference, and may be employed in the practice of the invention.

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to live attenuated gram negative bacteria. Attenuated gram negative bacteria can be used in immunogenic compositions or in vaccine compositions, e.g., for the prevention of bacterial infections, as well as in research, as attenuated strains present a greater degree of safety to researchers and those (e.g., animals, humans) with whom they may come in contact.

The invention accordingly relates to immunogenic or vaccine compositions comprising gram negative bacteria of the invention; e.g., live attenuated gram negative bacteria. The bacteria also could be inactivated in the compositions; but it may be advantageous that the bacteria are live attenuated gram negative bacteria. The invention therefore further relates to methods for preparing and/or formulating such compositions; e.g., culturing or growing or propagating the bacteria on or in suitable medium, harvesting the bacteria, optionally inactivating the bacteria, and admixing with a suitable veterinarily or pharmaceutically acceptable carrier, excipient, diluent or vehicle and/or an adjuvant and/or stabilizer; or, admixing the bacteria with a suitable veterinarily or pharmaceutically acceptable carrier, excipient, diluent or vehicle and/or an adjuvant and/or stabilizer. Thus, the invention also relates to the use of the bacteria in formulating such compositions.

The attenuated bacteria also can act as an expression or replication vector, e.g., for replicating and/or expressing a nucleic acid molecule heterologous to the attenuated bacteria, e.g., a nucleic acid molecule encoding an immunogen, antigen

5

or epitope from a pathogenic agent, such as a pathogenic agent that is other than the attenuated bacteria. The use of attenuated bacteria as a vector also provides a greater degree of safety to researchers or technicians working with the attenuated vectors and those (e.g., animals, humans) with whom they may come in contact.

5 The invention therefore further relates to methods for preparing such vectors, e.g., transforming the bacteria so that the bacteria contains and optionally expresses a heterologous nucleic acid molecule.

10 The invention also relates to uses of such vectors; e.g., a method for producing a gene product, e.g., polypeptide such as an immunogen, epitope or antigen, heterologous to the bacteria comprising culturing, growing or propagating bacteria transformed to contain and express a heterologous nucleic acid molecule encoding the gene product under conditions suitable for expression, and optionally harvesting or isolating or separating the gene product; or, harvesting or isolating or separating the gene product from bacteria transformed to express it; or, a method for
15 eliciting an immunological response or immunogenic response against a gene product and/or the bacteria or a protective immune response as to a pathogen from which the gene product is derived or obtained and/or the bacteria comprising administering to a subject, e.g., animal, such as an animal susceptible to infection by the pathogen and/or the bacteria, for instance, a bovine or turkey, bacteria
20 transformed to express the gene product; or a method for preparing an immunogenic, immunological or vaccine composition comprising admixing the vector or transformed bacteria with a pharmaceutically or veterinarily acceptable carrier, diluent, vehicle or excipient and/or adjuvant and/or stabilizer.

25 The invention also relates to targets for attenuation of bacteria, e.g., mutated nucleotide sequences or genes encoding the targets for attenuation of bacteria, and methods for targeting polypeptides for attenuation of bacteria and methods for generating attenuated bacteria. The targets for attenuation can be used as immunogenic compounds, e.g., in immunogenic compositions or in vaccine compositions, or for generating epitopes for use in immunogenic or vaccine
30 compositions. Thus, the invention relates to the use of targets for attenuation in preparing in compositions, e.g., admixing with a pharmaceutically or veterinarily acceptable carrier, diluent, excipient or vehicle and/or an adjuvant and/or a stabilizer.

The invention further relates to methods for inducing an immunological or immunogenic or protective immune response in a subject, e.g., an animal, such as an animal susceptible to infection by a gram negative bacteria, such as a *Pasteurella*, e.g., a turkey or bovine, comprising administering to the animal a vaccine or immunogenic composition of the invention.

Even further still the invention relates to preparing such attenuated bacteria, e.g., gram negative bacteria, such as *Pasteurella*, for instance, comprising introducing one or more transposable elements into the bacteria and isolating bacteria containing the transposable element that do not cause mortality in a target species (and are hence attenuated). One can further optionally identify the mutations in the bacteria, to thereby allow for alternative means for producing the attenuated bacteria.

The invention even further relates to such alternative means for producing attenuated bacteria. Since the mutations are identified or characterized, the mutations can be introduced into bacteria through techniques other than introducing one or more transposable elements into the bacteria, such as by homologous recombination, e.g., homologous recombination whereby a portion of the bacterial genome results in at least an addition thereto (insertion) or a deletion therefrom (two or more additions and/or deletions are also envisioned) or a substitution (such as a replacement of at least one nucleotide by another one). Accordingly, the invention relates to a method for producing an attenuated bacteria containing a known or previously identified modification or mutation, e.g., a modification or mutation herein identified, comprising introducing a deletion or insertion or replacement into the bacterial genome, advantageously through recombination, and optionally identifying and/or isolating the bacteria containing the modification or mutation.

Thus, the invention further relates to a mutant of a gram negative bacterium, wherein said bacterium has at least one mutation in a nucleotide sequence which codes for a polypeptide having an identity which is equal or more than 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% with an amino acid sequence coded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of nucleotide sequences identified SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93; said mutation resulting in

attenuated virulence of the bacterium. And, the invention relates to uses, compositions and methods involving such bacterium as herein described.

BACKGROUND

It is well established that live attenuated micro-organisms can be highly effective vaccines; immune responses elicited by such vaccines are often of greater magnitude and of longer duration than those produced by non-replicating immunogens. One explanation for this may be that live attenuated strains establish limited infections in the host and mimic the early stages of natural infection. In addition, unlike killed or inactivated preparations, live vaccines are able to induce potent cell-mediated responses which may be connected with their ability to replicate in antigen-presenting cells, such as macrophages.

There has been a long history of the use of live attenuated vaccines in animals and humans, notably using chemical mutagenesis techniques. However, empirically attenuated vaccines can revert to virulence.

Modern molecular biology techniques, coupled with the increasing knowledge of bacterial pathogenesis, has led to the identification of several genes that are involved in the growth and survival of the micro-organisms *in vivo*. This has provided new gene targets for attenuation, and to the concept that future vaccine strains could be 'rationally' attenuated by introducing defined non-reverting mutations into selected genes known to be involved in virulence, see for example WO-A-00/61724, WO-A-00/68261 and EP-A-0889120.

Although many attenuated strains have been produced in laboratories, only a few have qualified as potential vaccine candidates for use in animals. This may be due in part to the need to balance the immunogenicity of the vaccine with the possibility of the micro-organism to revert, becoming reactive and pathogenic.

It is clear that the selection of appropriate genes for attenuation, which will result in a suitable vaccine candidate, is not straightforward and cannot easily be predicted. Many factors may influence the acceptability of an attenuated mutant as a vaccine, and consequently research effort is required to identify and select suitable attenuating genes. Many attenuation experiments were conducted only *in vitro* and their results cannot be extrapolated *in vivo*, notably in relation to residual pathogenicity of the resulting mutants for the vaccinated animals.

Mention is made of:

Kachlany SC, Planet PJ, Bhattacharjee MK, Kollia E, DeSalle R, Fine DH, Figurski DH., Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in bacteria and archaea. J Bacteriol. 2000 Nov;182(21):6169-76.

5 Fuller TE, Martin S, Teel JF, Alaniz GR, Kennedy MJ, Lowery DE., Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. Microb Pathog. 2000 Jul;29(1):39-51.

10 Fuller TE, Kennedy MJ, Lowery DE., Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. Microb Pathog. 2000 Jul;29(1):25-38.

Kehrenberg C, Werckenthin C, Schwarz S., Tn5706, a transposon-like element from *Pasteurella multocida* mediating tetracycline resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Aug;42(8):2116-8.

15 DeAngelis PL., Transposon Tn916 insertional mutagenesis of *Pasteurella multocida* and direct sequencing of disruption site. Microb Pathog. 1998a Apr;24(4):203-9.

20 DeAngelis PL, Jing W, Drake RR, Achyuthan AM., Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. J Biol Chem. 1998b Apr 3;273(14):8454-8.

Lee MD, Henk AD., Tn10 insertional mutagenesis in *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol. 1996 May;50(1-2):143-8.

25 Choi KH, Maheswaran SK, Choi CS., Colorimetric assay using XTT for assessing virulence of avian *Pasteurella multocida* strains. Vet Microbiol. 1995 Jul;45(2-3):191-200.

Nnalue NA. Tn7 inserts in both orientations at a single chromosomal location and apparently forms cointegrates in *Pasteurella multocida*. Mol Microbiol. 1990 Jan;4(1):107-17.

30 Stocker US Patents Nos. 4,550,081, 4,837,151, 5,210,035 and 5,643,771.

Highlander US Patent No. 6,180,112.

Kachlany involved Tad genes. There is no relation between the Tad genes mutated in Kachlany and attenuation. There is no testing on animals in Kachlany

and the Tad genes are not selected in the present invention. The Fuller papers involve sequences that are not selected in the present invention. Kehrenberg did not involve an attenuated mutant, or a Signature Tagged Mutagenesis or STM technique; but rather, Kehrenberg involved a directed insertion of a transposon (use of identical insertion element). DeAngelis 1998a provides only a general description of a STM technique, and nothing about mutants, *per se*. DeAngelis 1998b involved the use of a STM technique to insert a transposon in the HA biosynthesis locus (Genbank AF036004). This sequence is a homologue to the sequence Pm0775 of PM70. The sequence encoding Pm0775 is not selected in the present invention. Lee concerns the use of a STM technique with a Tn10 transposon; Lee fails to disclose or suggest any tests on animals or any searches for attenuated mutants; but rather, Lee involved only auxotrophic mutants. While Choi cites a *Pasteurella multocida* transposon insertion mutant, and there may have been no mortality induced by this mutant, Choi contains no details about the location of the transposon insertion and therefore cannot be said to be reproducible. Nnalue similarly fails to teach or suggest the instant invention. The Stocker patents involved the insertion of a Tn10 transposon in the *aroA* gene. *AroA* gene is not selected in the present invention. Highlander concerns the insertion of a Tn1545 transposon in the *lktC* gene to inactive leukotoxin. *LktC* gene is not selected in the instant invention. Accordingly, it is verily believed that the instant invention is not taught or suggested in the art.

Moreover, it is desirable to characterize genes or nucleic acid sequences involved in attenuation and on this basis develop attenuated bacteria, as well as attenuated vaccines or immunogenic compositions, such as those having a high degree of immunogenicity and which exhibit a good safety profile with limited or no side effects.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides a mutant of a gram negative bacterium having a mutation in a first nucleotide sequence that codes for a first polypeptide and results in the bacterium having attenuated virulence, wherein:

the first polypeptide has an amino acid sequence;

10

a second polypeptide has an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence identified as SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, or 93; and

the amino acid sequence of the first polypeptide is the same as that of the
 5 second polypeptide, or the amino acid sequence of the first polypeptide has an identity which is equal to or more than 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% with the amino acid sequence of the second polypeptide.

The mutant bacterium can be a *Pasteurellaceae*, e.g. the bacterium can be: *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* or
 10 *Actinobacillus pleuropneumoniae*; advantageously *Pasteurella multocida*.

The mutation can be a deletion in the first nucleotide sequence, or an insertion into it or replacement of nucleic acids, such as a deletion of the whole first nucleotide sequence; or an insertion between: nucleotides 180-181 or nucleotides 182-183 or nucleotides 190-191 in SEQ ID NO: 2, nucleotides 77-78 or nucleotides
 15 1026-1027 or nucleotides 1027-1028 in SEQ ID NO: 6, nucleotides 416-417 in SEQ ID NO: 9, nucleotides 389-390 in SEQ ID NO: 12, nucleotides 381-382 in SEQ ID NO: 16, nucleotides 219-220 in SEQ ID NO: 19, nucleotides 1353-1354 in SEQ ID NO: 22, nucleotides 136-137 in SEQ ID NO: 25, nucleotides 384-385 in SEQ ID NO: 28, nucleotides 222-223 or nucleotides 225-226 in SEQ ID NO: 31, nucleotides
 20 217-218 in SEQ ID NO: 34, nucleotides 1411-1412 in SEQ ID NO: 37, nucleotides 943-944 in SEQ ID NO: 40, nucleotides 855-856 in SEQ ID NO: 43, nucleotides 369-370 in SEQ ID NO: 46, nucleotides 111-112 in SEQ ID NO: 49, nucleotides 443-444 in SEQ ID NO: 52, nucleotides 4-5 in SEQ ID NO: 55, nucleotides 573-574 in SEQ ID NO: 61, nucleotides 875-876 in SEQ ID NO: 64, nucleotides 218-219 in
 25 SEQ ID NO: 70, nucleotides 1072-1087 in SEQ ID NO: 75, nucleotides 64-65 in SEQ ID NO: 78, nucleotides 282-283 in SEQ ID NO: 81, nucleotides 1431-1432 in SEQ ID NO: 84, nucleotides 974-975 in SEQ ID NO: 87, nucleotides 802-803 in SEQ ID NO: 90, nucleotides 850-851 in SEQ ID NO: 92; or immediately upstream nucleotide 1 in SEQ ID NO: 58; or immediately upstream nucleotide 1 in SEQ ID
 30 NO: 67.

The mutant can comprise a heterologous nucleic acid sequence, such as a heterologous nucleic acid sequence that codes for an immunogen from a pathogenic

viral, parasitic or bacterial agent, a therapeutic protein, an allergen, a growth factor or a cytokine.

The invention also provides an immunogenic composition or vaccine comprising a mutant according to the invention, and a pharmaceutically or
5 veterinarily acceptable diluent, carrier, vehicle or excipient, and optionally further comprising an adjuvant.

The invention further provides an isolated first polypeptide having an amino acid sequence, wherein there is:

a second polypeptide having an amino acid sequence encoded by a
10 nucleotide sequence identified as SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, or 93; and

the amino acid sequence of the first polypeptide is the same as that of the second polypeptide, or the amino acid sequence of the first polypeptide has an identity which is equal to or more than 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,
15 97%, 98%, or 99% with the amino acid sequence of the second polypeptide.

The invention envisions an immunogenic or vaccine composition containing the isolated first polypeptide, and a pharmaceutically or veterinarily acceptable diluent, carrier, vehicle or excipient, and optionally an adjuvant.

Further still, the invention envisions an antibody preparation comprising an
20 antibody specific to the first isolated polypeptide.

The invention also involves a diagnostic method for detecting infection by a gram negative bacterium, comprising detecting in a sample the first isolated polypeptide or an antibody specific to that first isolated polypeptide.

The invention further concerns a passive immunization method comprising
25 administering the antibody preparation.

The invention also provides an isolated nucleic acid molecule having a sequence identified as SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, or 93, or identified as SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57,
30 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, or 97, as well as a PCR primer for detecting gram negative bacteria comprising an isolated nucleic acid molecule having a sequence that is at least 10 contiguous nucleic acids of a nucleotide sequence identified as SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43,

46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, or 93, or identified as SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, or 97. A probe or primer can be any stretch of at least 8, preferably at least 10, more preferably at least 12, 13, 14, or 15, such as at least 20, e.g., at least 23 or 25, for instance at least 27 or 30 nucleotides which are unique to the sequence desired to be amplified or which are in the sequence desired to be amplified and are least conserved, e.g., conserved among the gram negative bacteria or among a particular family or species of gram negative bacteria, such as among *Pasteurella*, or among any one of *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* or *Actinobacillus pleuropneumoniae*; advantageously *Pasteurella multocida*. As to PCR or hybridization primers or probes and optimal lengths therefor, reference is also made to Kajimura et al., GATA 7(4):71-79 (1990).

The terms "immunogenic composition" and "immunological composition" and "immunogenic or immunological composition" cover any composition that elicits an immune response against the targeted pathogen; for instance, after administration or injection into the animal (such as an avian, e.g., turkey or bovine, e.g. cow), elicits an immune response against the targeted pathogen (e.g., *Pasteurella multocida*). The terms "vaccinal composition" and "vaccine" and "vaccine composition" covers any composition that induces a protective immune response against the targeted pathogen or which efficaciously protects against the pathogen; for instance, after administration or injection into the animal (e.g., avian such as turkey or bovine such as cow), elicits a protective immune response against the targeted pathogen or provides efficacious protection against the pathogen (e.g., *P. multocida*). A subunit of a pathogen, e.g. an antigen or immunogen or epitope isolated from the pathogen, e.g., bacteria such as a gram negative bacteria, for instance, *P. multocida*; and, a subunit composition comprises or consists essentially of one or more antigens, immunogens or epitopes isolated from the pathogen, e.g., bacteria, such as a gram negative bacteria, for instance *P. multocida*.

It is noted that in this disclosure and particularly in the claims, terms such as "comprises", "comprised", "comprising" and the like can have the meaning attributed to it in U.S. Patent law; e.g., they can mean "includes", "included", "including", and the like; and that terms such as "consisting essentially of" and

"consists essentially of" have the meaning ascribed to them in U.S. Patent law, e.g., they allow for elements not explicitly recited, but exclude elements that are found in the prior art or that affect a basic or novel characteristic of the invention.

These and other embodiments are disclosed or are obvious from and
5 encompassed by, the following Detailed Description.

DETAILED DESCRIPTION

The present invention provides nucleotide sequences and genes involved in the attenuation of a micro-organism, such as bacteria, for instance, gram negative
10 bacteria, e.g., *Pastuerella multocida*, products (e.g., proteins, antigens, immunogens, epitopes) encoded by the nucleotide sequences, methods for producing such nucleotide sequences, products, micro-organisms, and uses therefor, such as for preparing vaccine or immunogenic compositions or for eliciting an immunological or immune response or as a vector, e.g., as an expression vector (for instance, an *in*
15 *vitro* or *in vivo* expression vector).

Mutations introduced into nucleotide sequences and genes of micro-organisms produce novel and nonobvious attenuated mutants. These mutants are useful for the production of live attenuated immunogenic compositions or live attenuated vaccines having a high degree of immunogenicity.

20 These mutants are also useful as vectors which can be useful for expression *in vitro* of expression products, as well as for reproduction or replication of nucleotide sequences (e.g., replication of DNA), and for *in vivo* expression products.

Identification of the mutations provides novel and nonobvious nucleotide
25 sequences and genes, as well as novel and nonobvious gene products encoded by the nucleotide sequences and genes.

Such gene products provide antigens, immunogens and epitopes, and are useful as isolated gene products.

Such isolated gene products, as well as epitopes thereof, are also useful for
30 generating antibodies, which are useful in diagnostic applications.

Such gene products, which can provide or generate epitopes, antigens or immunogens, are also useful for immunogenic or immunological compositions, as well as vaccines.

In an aspect, the invention provides bacteria containing an attenuating mutation in a nucleotide sequence or a gene wherein the mutation modifies, reduces or abolishes the expression and/or the biological activity of a polypeptide or protein encoded by a gene, resulting in attenuated virulence of the bacterium.

5 The mutation is not necessarily located within a coding sequence or gene to disrupt its function, leading to attenuation. The mutation can also be made in nucleotide sequences involved in the regulation of the expression of the gene, for instance, in regions that regulate transcription initiation, translation and transcription termination. Thus also included are promoters and ribosome binding regions (in
10 general these regulatory elements lie approximately between 60 and 250 nucleotides upstream of the start codon of the coding sequence or gene; Doree S M *et al.*, J. Bacteriol. 2001, 183(6): 1983-9 ; Pandher K *et al.*, Infect. Imm. 1998, 66(12): 5613-9 ; Chung J Y *et al.*, FEMS Microbiol letters 1998, 166: 289-296), transcription
15 terminators (in general the terminator is located within approximately 50 nucleotides downstream of the stop codon of the coding sequence or gene ; Ward C K *et al.*, Infect. Imm. 1998, 66(7): 3326-36). In the case of an operon, such regulatory regions may be located in a greater distance upstream of the gene or coding sequence. A mutation in an intergenic region can also lead to attenuation.

20 A mutation within such regulatory sequences associated with the coding sequence or gene so that the mutation of this nucleotide sequence modifies, inhibits or abolishes the expression and/or the biological activity of the polypeptide or the protein encoded by the gene, resulting in attenuated virulence of the bacterium would be an equivalent to a mutation within a gene or coding sequence identified in the present invention

25 Attenuation reduces or abolishes the pathogenicity of the bacteria and the gravity of the clinical signs or lesions, decreases the growth rate of the bacteria, and prevents the death from the bacteria.

30 The invention concerns micro-organisms, such as bacteria, e.g., gram negative bacteria, such as bacteria of the *Pasteurellaceae* family, for instance, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Advantageously the bacteria are *Pasteurella multocida*.

Pasteurella multocida is a gram negative bacterium, which is the causative agent of various diseases of production animals and an opportunistic human pathogen. It is the aetiologic agent of severe pasteurellosis, such as fowl cholera in domestic and wild birds, bovine haemorrhagic septicaemia and porcine atrophic rhinitis (Hunt ML *et al.*, Vet Microbiol 2000, 72(1-2): 3-25). Isolates may be
5 grouped serologically based on the capsular antigens into serogroups (A, B, D, E and F) or into 16 serotypes based on somatic LPS antigens.

Potential nucleotide sequences involved in attenuation of bacteria have been identified using Signature Tagged Mutagenesis (STM). This method is discussed in
10 documents cited herein and mention is also made of WO-A-96/17951.

STM involves the insertion of a unique, signature-tagged, transposon into the genome of a micro-organism.

At the locus of insertion, the genome nucleotide sequence is disrupted. In the instant invention, the resulting mutation (and hence mutant carrying the
15 mutation) is analyzed for attenuation.

The sequence of the disrupted region (e.g. gene or coding sequence or open reading frame (ORF)) for each attenuated mutant is determined by PCR-amplification (polymerase chain reaction), cloning and sequencing of the DNA regions flanking the transposon.

In an embodiment of the instant invention, the STM method described in
20 WO-A-96/17951 was adapted to be functional in *Pasteurella multocida*. These adaptations notably include the use of the Tn10 transposon rather than Tn5, and the use for selection of a CDM medium without leucine rather than a streptomycin resistance selection. More details are given in the examples.

A further selection of genes or nucleotide sequences involved in attenuation
25 from the potential genes identified by the STM method is based on absence of mortality after inoculation of the mutant bacteria to animals.

For veterinary applications, one advantageous aspect of the invention comprises the implementation of an experimental selection directly in the target
30 animal, rather than in an animal model. This method allows a more accurate selection for appropriate mutations of the mutant bacteria. For *Pasteurella multocida*, experiments are done directly in turkeys, one of the natural target hosts of *Pasteurella multocida*.

Turkeys are inoculated intramuscularly with a sufficient amount of pools of signature-tagged *P. multocida* mutants (e.g. 0.5 ml, 10^7 CFU per animal). The mutants that are not re-isolated at a certain time after inoculation are considered as potentially attenuated. The mutants which are not re-isolated are distinguished from those in the pool that are re-isolated by PCR amplification and analysis of the signature tags.

Each potentially attenuated mutant is then injected by the intramuscular route into turkeys (e.g. 0.5 ml, 10^4 CFU per animal). The mortality of the turkeys is recorded daily for 7 days after the inoculation. The mutants not leading to death are considered as attenuated.

The specific method has been carried out on *Pasteurella multocida* strain P-1059 and a number of attenuated mutants have been obtained. Five of them have been deposited on the 1st April 2003 in the CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) of the Pasteur Institute, Paris, France. The 4G11 mutant is available under the accession number CNCM I-2999. The 5D5 mutant is available under the accession number CNCM I-3000. The 9C8 mutant is available under the accession number CNCM I-3001. The 9H4 mutant is available under the accession number CNCM I-3002. The 13E1 mutant is available under the accession number CNCM I-3003.

The nucleotide sequences flanking the locus of the transposon insertion are designated SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96; 97.

The transposons were inserted in *Pasteurella multocida* strain P-1059 immediately at the 5' end of the sequences 1, 8, 11, 14, 15, 27, 33, 42, 54, 57, 66, 72, 73, 77, 80, 95 and 97, and immediately at the 3' end of the sequences 4, 5, 18, 21, 24, 30, 36, 39, 45, 48, 51, 60, 63, 69, 83, 86, 89 and 96. For the mutant 9H4, the transposon was inserted between the nucleotides at positions 850-851 of the sequence SEQ ID NO: 92.

A particular aspect of the invention is attenuated mutants of *Pasteurella multocida* strain P-1059 having an attenuating mutation in the gene or ORF and/or their regulatory regions comprising a sequence selected from the sequences SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, and 97.

Further particular embodiments of the invention include attenuated mutants according to the invention such as the attenuated mutants herein-mentioned as deposited in the CNCM under the terms of the Budapest Treaty.

Attenuated P-1059 mutants may be obtained, for example, by transposon
5 insertion or by directed mutagenesis (deletion, insertion, replacement). The attenuating mutation can be made within these nucleotide sequences or genes as well as in the complementary sequences thereof. The attenuating mutation can also be made in nucleotide sequences involved in the regulatory region of the said genes or nucleotide sequences.

10 The above sequences or parts thereof (such as at least 10, 15 or 20 nucleotides thereof, for instance, at least 10 contiguous nucleotides thereof, or at least 15 contiguous nucleotides thereof and more advantageously at least 20 contiguous nucleotides thereof, up to the full length of the sequences) may be used as PCR primers to detect and select the transposon insertion mutants. PCR can
15 involve a pair of primers, for instance, one specific to the transposon, and the other specific to the gene or nucleotide sequence to be mutated. Based on the expected size of PCR amplified products, the method allows for amplification and/or detection of the PCR fragments. The knowledge of the corresponding gene or ORF and/or their regulatory regions in the organism, e.g., gram negative bacteria, such as
20 *Pasteurella*, e.g., *Pasteurella multocida*, for instance *Pasteurella multocida* strain PM70 or P-1059 (see, e.g., *infra*); for example the size of the corresponding gene or ORF and/or their regulatory regions may be used to design PCR primers, to screen the amplified PCR fragments and to detect those having a right size allowing the selection of the mutants.

25 The whole genome of *Pasteurella multocida* strain PM70 is available in the EMBL database and in May BJ *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98(6): 3460-5. Blasts done with the sequences SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, 97 allowed to localise the homologous sequences on PM70 genome
30 and then to determine the corresponding genes or ORFs in PM70.

These nucleotide sequence in *Pasteurella multocida* strain PM70 are designated SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90.

For the mutant 9H4 of the P-1059 strain, no homologous sequence was found in PM70. The P-1059 ORF has been sequenced and designated SEQ ID NO: 93.

Another aspect of the invention is attenuated mutants of strain PM70 having at least one attenuating mutation in a gene or ORF comprising a nucleotide sequence selected from SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87 and 90 and/or their regulatory regions.

The attenuating mutation can be made within these nucleotide sequences or genes as well as in the complementary sequences thereof. The attenuating mutation can also be made in nucleotide sequences involved in the regulatory region of the said genes. Attenuated mutants may be obtained, for example, by transposon insertion or by directed mutagenesis (deletion, insertion, replacement).

The term of "complementary" means herein the nucleotide sequence of the other strand in the double-stranded genome, so covers the anti-sense strand as complement of the sense strand, and conversely. The term "nucleotide" also encompasses deoxyribonucleotide (so constituted with deoxyribonucleic acids or DNA), ribonucleotide (so constituted with ribonucleic acids or RNA) and messenger ribonucleotide (mRNA).

More generally attenuating mutations can be introduced into the genome of a bacterium such as a gram negative bacterium, for instance a bacteria of the *Pasteurellaceae* family, e.g. *P. multocida*, *P. haemolytica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumoniae*, advantageously a bacteria in the genome of any one of the various strains of *P. multocida* (e.g. P-1059 strain, PM70 strain), mutations in at least one nucleotide sequence which codes for an amino acid sequence that has at least about 70% identity, at least about 75% identity, at least about 80% identity, at least about 85%, at least about 90% identity, and advantageously at least about 95, 96, 97, 98, or 99% or more identity to one of the amino acid sequences coded by a nucleotide sequence identified as SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93. The attenuating mutation can be made within these nucleotide sequences or genes as well as in the complementary sequences thereof. The attenuating mutation can also be made in nucleotide sequences involved in the regulatory region of the said genes. Attenuated mutants may be obtained for example by transposon insertion or by directed mutagenesis (deletion, insertion, replacement). The attenuated mutants

obtained are embodiments of the invention. Particular embodiments are the P-1059 attenuated mutants.

The percentage of identity between two amino acid sequences can be established by the NCBI (National Center for Biotechnology Information) pairwise blast and the blosum62 matrix, using the standard parameters (That is, note the BLAST or BLASTX algorithm available on the "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, Md., USA) server, as well as in Altschul et al. J. Mol. Biol. 1990. 215. 403-410; and thus, this document speaks of using the algorithm or the BLAST or BLASTX and BLOSUM62 matrix by the term "blasts").

The verb "code" used herein does not mean that the nucleotide sequence is limited to an actual coding sequence but also encompasses the whole gene including its regulatory sequences which are non-coding sequences.

Sequence homology or identity such as nucleotide sequence homology also can be determined using the "Align" program of Myers and Miller, ("Optimal Alignments in Linear Space", CABIOS 4, 11-17, 1988, incorporated herein by reference) and available at NCBI, as well as the same or other programs available via the Internet at sites thereon such as the NCBI site.

Alternatively or additionally, the term "homology" or "identity", for instance, with respect to a nucleotide or amino acid sequence, can indicate a quantitative measure of homology between two sequences. The percent sequence homology can be calculated as

$(N_{ref} - N_{diff}) * 100 / N_{ref}$, wherein N_{diff} is the total number of non-identical residues in the two sequences when aligned and wherein N_{ref} is the number of residues in one of the sequences. Hence, the DNA sequence AGTCA'GTC will have a sequence identity of 75% with the sequence AATCAATC ($N_{ref} = 8$; $N_{diff} = 2$).

Alternatively or additionally, "homology" or "identity" with respect to sequences can refer to the number of positions with identical nucleotides or amino acids divided by the number of nucleotides or amino acids in the shorter of the two sequences wherein alignment of the two sequences can be determined in accordance with the Wilbur and Lipman algorithm (Wilbur and Lipman, 1983 PNAS USA 80:726, incorporated herein by reference), for instance, using a window size of 20 nucleotides, a word length of 4 nucleotides, and a gap penalty of 4, and computer-assisted analysis and interpretation of the sequence data including alignment can be

conveniently performed using commercially available programs (e.g., Intelligenetics[™] Suite, Intelligenetics Inc. CA).. When RNA sequences are said to be similar, or have a degree of sequence identity or homology with DNA sequences, thymidine (T) in the DNA sequence is considered equal to uracil (U) in the RNA sequence. Thus,
5 RNA sequences are within the scope of the invention and can be derived from DNA sequences, by thymidine (T) in the DNA sequence being considered equal to uracil (U) in RNA sequences.

Advantageously, sequence identity or homology such as amino acid sequence identity or homology can be determined using the BlastP program
10 (Altschul *et al.*, Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402, incorporated herein by reference) and available at NCBI, as well as the same or other programs available via the Internet at sites thereon such as the NCBI site.

The following documents (each incorporated herein by reference) provide algorithms for comparing the relative identity or homology of sequences such as
15 amino acid residues of two proteins, and additionally or alternatively with respect to the foregoing, the teachings in these references can be used for determining percent homology or identity: Needleman SB and Wunsch CD, "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins," J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970); Smith TF and Waterman MS, "Comparison of Bio-sequences," Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981); Smith TF,
20 Waterman MS and Sadler JR, "Statistical characterization of nucleic acid sequence functional domains," Nucleic Acids Res., 11:2205-2220 (1983); Feng DF and Dolittle RF, "Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees," J. of Molec. Evol., 25:351-360 (1987); Higgins DG and Sharp
25 PM, "Fast and sensitive multiple sequence alignment on a microcomputer," CABIOS, 5: 151-153 (1989); Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ, "ClusterW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions-specific gap penalties and weight matrix choice," Nucleic Acid Res., 22:4673-480 (1994); and, Devereux J, Haeberlie P and
30 Smithies O, "A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX," Nucl. Acids Res., 12: 387-395 (1984). And, without undue experimentation, the skilled artisan can consult with many other programs or references for determining percent homology.

The invention concerns the mutation of the nucleotide sequences or genes encoding polypeptides or proteins having the same biological function. The similarity of function may be analyzed or identified or determined or reviewed by the conservation of active sites. This can be done by a NCBI DART research
5 (Domain Architecture Retrieval Tool).

The present invention thus provides attenuated mutants of a bacterium as described herein, comprising an attenuating mutation as defined herein.

The attenuated gram negative bacteria mutants include one mutation, wherein all or part of at least one specific gene or nucleic acid sequence is mutated
10 as discussed herein. The specific gene or nucleic acid sequence includes those comprising, or homologous to (e.g., 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% homologous to), sequence SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 or 93, or their regulatory regions. Advantageously, the specific gene or nucleic acid sequence
15 includes those comprising, or homologous to, the sequence SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 25, 31, 37, 40, 43, 46, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 or 93, or their regulatory regions. More advantageously, the specific gene or nucleic acid sequence includes those comprising, or homologous to, the sequence SEQ ID NO: 6, 12, 25, 31, 37, 40, 46, 70, 75, 84, 87, 90 or 93, or their regulatory regions. And even more advantageously,
20 the specific gene or nucleic acid sequence includes those comprising, or homologous to, sequence SEQ ID NO: 37, 40, 75, 90 or 93, or their homologous nucleotide sequences. Preferably the mutant is a *Pasteurella*, such as a *P. multocida*, for example P-1059 or PM70.

The mutations may be introduced into the micro-organism using any known
25 technique, such as, for example, recombinant DNA-technology, in order to introduce a well-defined mutation in the selected gene or nucleic acid sequence (directed mutagenesis). Such a mutation may be an insertion of homologous or heterologous nucleic acid sequence, a deletion, a replacement, e.g., a replacement of at least one nucleotide by another or a combination thereof. In an embodiment, the mutation is a
30 deletion mutation, where disruption of the gene or nucleic acid sequence is caused by the deletion of part, and advantageously by the deletion of the entire nucleic acid sequence or gene. Deletion of nucleic acids avoids reversion to pathogenicity. In another embodiment the mutation is an insertion into a locus that corresponds to the

transposon insertion loci described herein, e.g., in the examples. These loci, with reference to the P-1059 strain, are advantageously located immediately at the 5' end of the sequences 1, 8, 11, 14, 15, 27, 33, 42, 54, 57, 66, 72, 73, 77, 80, 95 and 97, and immediately at the 3' end of the sequences 4, 5, 18, 21, 24, 30, 36, 39, 45, 48, 51, 60, 63, 69, 83, 86, 89 and 96. These loci are also those located in the PM70 strain between: nucleotides 180-181 or 182-183 or 190-191 in SEQ ID NO: 2, 77-78 or 1026-1027 or 1027-1028 in SEQ ID NO: 6, 416-417 in SEQ ID NO: 9, 389-390 in SEQ ID NO: 12, 381-382 in SEQ ID NO: 16, 219-220 in SEQ ID NO: 19, 1353-1354 in SEQ ID NO: 22, 136-137 in SEQ ID NO: 25, 384-385 in SEQ ID NO: 28, 222-223 or 225-226 in SEQ ID NO: 31, 217-218 in SEQ ID NO: 34, 1411-1412 in SEQ ID NO: 37, 943-944 in SEQ ID NO: 40, 855-856 in SEQ ID NO: 43, 369-370 in SEQ ID NO: 46, 111-112 in SEQ ID NO: 49, 443-444 in SEQ ID NO: 52, 4-5 in SEQ ID NO: 55, 573-574 in SEQ ID NO: 61, 875-876 in SEQ ID NO: 64, 218-219 in SEQ ID NO: 70, 1072-1087 in SEQ ID NO: 75, 64-65 in SEQ ID NO: 78, 282-283 in SEQ ID NO: 81, 1431-1432 in SEQ ID NO: 84, 974-975 in SEQ ID NO: 87, 802-803 in SEQ ID NO: 90, 850-851 in SEQ ID NO: 92; or, immediately upstream nucleotide 1 in SEQ ID NO: 58; or immediately upstream nucleotide 1 in SEQ ID NO: 67. These loci are also those located between similar pairs of nucleotides (than recited for PM70) in nucleotide sequences of another gram negative bacterium, such as a *Pasteurellaceae* family member, e.g. *P. multocida*, *P. haemolytica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumoniae*, encoding an homologous amino acid sequence as defined herein with its percentage of identity. Thus, mutants can be gram negative bacteria and are advantageously a *Pasteurella*, such as a *P. multocida*, *P. haemolytica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumoniae*, for example a *P. multocida*, such as P-1059 or PM70.

By definition, deletion mutants comprise at least one deletion of or in a nucleotide sequence according to the invention. These deletion mutants include those wherein all or part of a specific gene sequence or specific nucleotide sequence is deleted. In one aspect, the mutation results in deletion of at least one nucleic acid, of at least about 10%, at least about 20%, at least about 30%, at least about 40%, at least about 50%, at least about 60%, at least about 70%, at least about 80%, at least about 90%, at least about 95%, at least about 98%, or at least about 99% of the gene

73

or specific nucleotide sequence. Preferably the entire gene or specific nucleotide sequence is deleted.

The mutants can comprise more than one mutation, which may result in additive or synergistic degrees of attenuation, and may result in a better prevention of the reversion of attenuation.

These multiple mutations may associate mutation(s) into nucleotide sequences or genes known for their attenuating properties such as *aro* genes, for example *aroA* (Homchampa P. *et al.*, Veterinary Microbiology, 1994, 42: 35-44), and mutations into nucleotide sequences or genes according to the invention.

In one embodiment the mutants include at least two mutations, wherein for each mutation all or part of a specific gene or nucleic acid sequence is mutated as discussed herein. These specific genes or nucleic acid sequences include those comprising, or homologous to, sequences SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 or 93, or their regulatory regions. Thus, mutants having two or more of the foregoing sequences mutated, e.g., deleted as discussed herein, are envisioned by the invention. Advantageously, mutants have two or more of the following sequences or sequences comprising, or homologous to, the following sequences mutated, e.g., deleted, as discussed herein: SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 25, 31, 37, 40, 43, 46, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 or 93, or their regulatory regions. More advantageously the specific genes or nucleic acid sequences that are mutated (e.g., the two or more that are mutated) include those comprising, or homologous to, the sequences SEQ ID NO: 6, 12, 25, 31, 37, 40, 46, 70, 75, 84, 87, 90 or 93, or their regulatory regions. The mutant can be a gram negative bacteria, and advantageously the mutant is a *Pasteurella*, such as a *P. multocida*, for example P-1059 or PM70.

Advantageously mutants having two or more of the following sequences, or their regulatory regions, mutated, e.g., deleted as discussed herein, are envisioned by the invention: SEQ ID NO: 37, 40, 75, 90 and 93, or their homologous nucleotide sequences.

Various embodiments include mutants having deletions of or in the genes or nucleic acid sequences comprising, or homologous to, sequences SEQ ID NO: 37 and 40; SEQ ID NO: 37 and 75; SEQ ID NO: 37 and 90; SEQ ID NO: 37 and 93; SEQ ID NO: 40 and 75; SEQ ID NO: 40 and 90; SEQ ID NO: 40 and 93; SEQ ID

NO: 75 and 90; SEQ ID NO: 75 and 93; SEQ ID NO: 90 and 93, or their regulatory regions. The mutant can be a gram negative bacteria and advantageously the mutant is a *Pasteurella*, such as a *P. multocida*, for example P-1059 or PM70.

Methods to introduce the mutations into the specific genomic regions are
5 known and will be apparent to the skilled person from this disclosure and the knowledge in the art. For instance, the whole gene or sequence to be mutated or a fragment is cloned into a vector and modified in order to abolish its expression and/or its biological activity. The vector is introduced into the bacteria, for example, by electroporation (e.g. Jablonski L. et al., Microbial Pathogenesis, 1992, 12, 63-68),
10 or by conjugation (Lee M. D. et al., Vet. Microbiol., 1996, 50, 143-148). The modified DNA fragment is reintroduced into the bacterial genome by genetic recombination, advantageously by homologous recombination between the bacterial chromosome and the vector. As an example the vector can be a suicide plasmid as described in Cardenas (Cardenas M *et al.*, Vet Microbiol 2001 May 3; 80(1): 53-61).
15 Advantageously this vector additionally comprises, between the two flanking arms or regions (employed in homologous recombination) a polystop sequence (e.g., 6 stop codons, one in each reading frame) to block any possible translation.

The attenuated micro-organism of the invention, e.g. gram negative bacteria such as *P. multocida*, may further comprise at least one homologous or heterologous
20 nucleic acid sequence inserted into its genome. This is useful for reproducing or replicating heterologous nucleic acid molecules and/or for expression of heterologous nucleic acid molecules, either *in vivo* or *in vitro*. The heterologous nucleic acid sequence advantageously codes for an immunogen, antigen or epitope from a pathogenic viral, parasitic or bacterial agent which is different from those
25 naturally expressed by the attenuated micro-organism. This heterologous sequence may encode an immunogen, antigen or epitope from another strain of the micro-organism or bacteria, e.g., another *P. multocida* strain. An immunogen or antigen is a protein or polypeptide able to induce an immune response against the pathogenic agent or a secreted antigen of the pathogenic agent, and contains one or more
30 epitopes; and epitope is a peptide or polypeptide which is able to induce an immune response against the pathogenic agent or a secreted antigen of the pathogenic agent.

Heterologous nucleic acid sequences which are suitable for this use in such a vector will be apparent to the skilled person (Fedorova ND and Highlander SK,

15

Infect Immun 1997, 65(7): 2593-8) and include for example those coming from *Pasteurellaceae* family members (notably *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*), or from bacteria like *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*.

5 The heterologous sequence is advantageously inserted so as to be expressed by the micro-organism in the host when administered in order to develop an immune response against both the attenuated micro-organism and said expressed immunogen. The heterologous sequence is advantageously inserted with or operably linked to or downstream from the regulatory elements allowing its
10 expression, such as a promoter. Nucleotide sequences useful for the addressing and the secretion of the protein may also be added. Accordingly, leader or signal sequences may be included in expressed products to facilitate transport through the cell wall and/or secretion.

 In one embodiment the homologous or heterologous sequence is inserted
15 within the selected nucleotide sequence or the selected gene used for the attenuation; advantageously the homologous or heterologous sequence is inserted in one of the loci corresponding to the transposon insertion loci identified herein.

 To improve the expression, the codon usage can be adapted to the bacterial vector used.

20 The attenuated mutants of the invention may also comprise a nucleic acid sequence encoding a therapeutic protein, an allergen, a growth factor or a cytokine or an immunomodulator or immunostimulator such as a GM-CSF, for instance a GM-CSF matched to the target species (e.g., if the attenuated vector is *P. multocida*, for administration to bovines, bovine GM-CSF could be expressed by the vector, for
25 example with the expression by the vector of another heterologous protein, peptide, polypeptide, antigen, immunogen or epitope).

 According to a further aspect of the invention attenuated micro-organisms are used to produce live attenuated immunogenic compositions or live attenuated vaccine compositions.

30 According to an advantageous aspect of the invention, the attenuated micro-organism is a gram negative bacteria, such as a *Pasteurella*, for instance, a *P. multocida*, for example P-1059 or PM70, mutated according to the invention.

Advantageously as described herein, the micro-organism may act as a recombinant vector to immunise and/or vaccinate animals or humans against infections caused by other agents than *Pasteurella*.

5 The immunogenic compositions or the vaccine compositions comprise the attenuated mutant and a pharmaceutically or veterinarily acceptable carrier, excipient, diluent or vehicle, and optionally a stabiliser and/or an adjuvant. The attenuated mutant can be a vector that additionally expresses nucleic acid molecules heterologous to the vector, such as a heterologous epitope, antigen, immunogen, and/or growth factor, cytokine, immunoregulator or immunostimulator.

10 The term of "immunogenic composition" covers herein any composition able, once it has been injected to animals or to a human to elicit an immune response against the targeted pathogen. The term of "vaccine composition" or "vaccine" covers herein any composition able, once it has been injected to animals or to a human to induce a protective immune response against the targeted pathogen.

15 The pharmaceutically or veterinarily acceptable vehicle may be water or saline, but it may, for example, also comprise bacteria culture medium.

The live attenuated bacteria according to the invention may be freeze-dried advantageously with a stabiliser. Freeze-drying can be done according to well-known standard freeze-drying procedures. The pharmaceutically or veterinarily
20 acceptable stabilisers may be carbohydrates (e.g. sorbitol, mannitol, lactose, sucrose, glucose, dextran, trehalose), sodium glutamate (Tsvetkov T et al., Cryobiology 1983, 20(3): 318-23 ; Israeli E et al., Cryobiology 1993, 30(5): 519-23), proteins such as peptone, albumin, lactalbumin or casein, protein containing agents such as skimmed milk (Mills CK et al., Cryobiology 1988, 25(2): 148-52 ; Wolff E et al.,
25 Cryobiology 1990, 27(5): 569-75), and buffers (e.g. phosphate buffer, alkaline metal phosphate buffer).

An adjuvant may be used to make soluble the freeze-dried preparations.

Examples of adjuvants are oil-in-water, water-in-oil-in-water emulsions based on mineral oil and/or vegetable oil and non ionic surfactants such as block
30 copolymers, Tween®, Span®. Other suitable adjuvants are for example vitamin E, saponins, and Carbopol®, aluminium hydroxide or aluminium phosphate ("Vaccine Design, The subunit and adjuvant approach", Pharmaceutical Biotechnology, vol. 6, Edited by Michael F. Powell and Mark J. Newman, 1995, Plenum Press New York).

27

The live attenuated bacteria may be stored at -70°C in a medium containing glycerol.

Optionally, the immunogenic composition or vaccine can be combined with one or more immunogens, antigens or epitopes selected from other pathogenic
5 micro-organisms or viruses in an inactivated or live form.

Another aspect of the invention is the nucleotide sequences or genes according to the invention, such as the nucleotide sequences or genes according to the invention designated SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 and 93, and
10 advantageously those designated SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, 97.

Another aspect of the invention is the use of the nucleotide sequences or genes according to the invention, for the expression and the production of peptides,
15 polypeptides or proteins, or more generally, expression products, e.g., immunogens, antigens or epitopes. In an embodiment, the polypeptides or peptides or proteins encoded by these nucleotide sequences or genes may be used as subunit immunogens or antigens or epitopes in immunogenic compositions or vaccines. Epitope determination procedures, such as, generating overlapping peptide libraries
20 (Hemmer B. et al., Immunology Today, 1998, 19 (4), 163-168), Pepscan (Geysen H. M. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, 81 (13), 3998-4002; Geysen H. M. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1985, 82 (1), 178-182; Van der Zee R. et al., Eur. J. Immunol., 1989, 19 (1), 43-47; Geysen H. M., Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 1990, 21 (4), 523-533; Multipin® Peptide Synthesis Kits de Chiron) and
25 algorithms (De Groot A. et al., Nature Biotechnology, 1999, 17, 533-561), can be used in the practice of the invention, without undue experimentation.

Advantageous polypeptides are those having the amino acid sequences identified as SEQ ID NO: 3, 7, 10, 13, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 76, 79, 82, 85, 88, 91, 94, or those encoded by the
30 nucleotide sequences SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93. Epitopes from these polypeptides can also be used advantageously.

The invention encompasses the equivalent polypeptides from another bacterium, such as a gram negative bacterium, advantageously a *Pasteurellaceae* family member, e.g. *P. multocida*, *P. haemolytica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumoniae*, and more advantageously in the genome of any one of the various strains of *P. multocida* are thus included by equivalence polypeptides whose amino acid sequences have at least about 70%, at least about 75%, at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, at least about 95%, and at least about 96, 97, 98 or 99% identity to one of the amino acid sequences identified as SEQ ID NO: 3, 7, 10, 13, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 76, 79, 82, 85, 88, 91, 94 and/or polypeptides that have the same biological function(s) than the polypeptides identified above with SEQ. The criteria for establishing the identity or the same biological function have been described above.

The invention also embraces the immunogenic fragments of these polypeptides, having at least a chain of 10 amino acids of the polypeptide, at least 20, such as at least 30, advantageously at least 50 and more advantageously at least 70, e.g., fragments of the polypeptides containing at least 10 contiguous amino acids of the polypeptide, advantageously at least 20 contiguous amino acids of the polypeptide, such as at least 30 and more advantageously at least 50 contiguous amino acids of the polypeptide, and even more advantageously at least 70 contiguous amino acids of the polypeptide. Of course, a fragment is less than the entire polypeptide. A fragment can be combined with other polypeptides, e.g., in fusion polypeptides; for instance, a polypeptide of the invention or fragment thereof can be a portion of a fusion polypeptide which includes another portion (another polypeptide), e.g., an immunogenicity-enhancing portion and/or a secretion-enhancing portion such as a lipoprotein portion that enhances immunogenicity or a signal or leader sequence portion. Accordingly, the invention envisions the expression of polypeptides, proteins, antigens, immunogens or epitopes – whether herein identified sequences or fragments thereof or those that are heterologous to the vectors of the invention – as fusions, e.g., as a portion of a fusion polypeptide, e.g., a fusion polypeptide that advantageously includes an immunogenicity enhancing portion such as a lipoprotein portion and/or a secretion-enhancing portion such as a signal or leader sequence portion.

The polypeptides or fragments are produced advantageously by *in vitro* expression. The nucleotide sequences according to the invention (e.g. SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93) or fragments thereof are inserted into a vector, operably
5 linked to regulatory elements such as promoter, ribosome binding region and terminator, and start codon and stop codon. Advantageous vectors are plasmids useful for *in vitro* expression in bacteria i.e. *Escherichia coli* (Mahona F *et al.*, Biochimie 1994, 46(1): 9-14 ; Watt M A *et al.*, Cell Stress Chaperones 1997, 2(3): 180-90 ; Frey J Res. Microbiol. 1992, 143(3): 263-9).

10 These polypeptides can also be synthesised chemically (Luo Y *et al.*, Vaccine 1999, 17(7-8): 821-31).

An aspect of the invention is thus an immunogenic composition or vaccine comprising at least one polypeptide or fragment according to the invention (sub-unit immunogenic composition or vaccine) or at least one *in vivo* expression vector as
15 described herein (live recombinant immunogenic composition or vaccine), and a pharmaceutically or veterinarily acceptable carrier, excipient, diluent or vehicle, and optionally an adjuvant. Examples of such ingredients have been described herein in relation to the live vaccine.

In another embodiment, these nucleotide sequences or their fragments may
20 be inserted into recombinant vectors to produce live recombinant immunogenic compositions or vaccines able to express *in vivo* in the host the polypeptide encoded by this nucleotide sequence or fragment.

The *in vivo* expression vector can be a polynucleotide vector or plasmid (EP-A2-1001025; Chaudhuri P Res. Vet. Sci. 2001, 70(3), 255-6), viruses (e.g.
25 adenovirus, poxvirus such as fowlpox (US-A-5,174,993 US-A-5,505,941 and US-A-5,766,599) or canarypox (US-A-5,756,103)) or bacteria i.e. *Escherichia coli* or *Salmonella sp.*

Polypeptides and fragments of the invention may also be used in therapy.

The polypeptides and fragments may also be used as reagents in antibody-
30 antigen reactions. Accordingly, another aspect of the invention is thus a diagnostic method and/or kit for detecting infection by the gram negative bacterium. Kits, e.g. ELISA, can include at least one polypeptide or fragment according to the invention

(e.g., at least one polypeptide identified by sequence herein or a fragment thereof as herein discussed).

Antibodies against the herein polypeptides or fragments (e.g., polypeptides identified by sequence herein or fragments thereof as herein discussed) can be used
5 as a diagnostic reagent or in passive immunization or vaccination or in therapy. The amounts of antibody administered in passive immunization can be the same as or analogous to amounts used in the art, such that from the knowledge in the art, the skilled artisan can practice passive immunization without undue experimentation.

Another aspect of the invention is an antibody preparation comprising an
10 antibody specific to a polypeptide or a fragment according to the invention and methods of diagnosis using the same. With respect to an antibody specific to a polypeptide, it is meant that the antibody binds preferentially to the polypeptide, e.g., the antibody binds to the polypeptide and not to other polypeptides or has a specificity to the polypeptide that is acceptably particular to the polypeptide such
15 that the antibody can be used to isolate the polypeptide from a sample or detect its presence in a sample with no more than 5% false positives, using techniques known in the art or discussed in documents cited herein, including Sambrook, *infra*.

Antibodies can be polyclonal or monoclonal.

Methods for producing antibodies are well-known to the skilled artisan.

20 If polyclonal antibodies are desired, a selected animal (e.g. mouse, rabbit, goat, horse, etc.) is immunized with a polypeptide or a fragment. Serum from the immunized animal is collected and treated according to known procedures and possibly purified. See, e.g. Jurgens et al. J. Chrom., 1985, 348: 363-370.

The general methodology for making monoclonal antibodies by using
25 hybridoma technology is well known. Immortal antibody-producing cell lines can be created by cell fusion, and also by other techniques such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. See, e.g. J. E. Liddell "A practical guide to monoclonal antibodies" ed. John Wiley and sons, 1991, p.188; S. J. de StGroth et al. J. Immunol. Methods, 1980, 35(1-2), 1-21.

30 The nucleotide sequences according to the invention and their fragments may be used as a probe for hybridisation, e.g. in a diagnostic method.

Stringent hybridisation conditions are advantageously used. One can refer to those described by Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold

Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104. Hybridisation under stringent conditions means that a positive hybridisation signal is still observed after washing for 1 hour with 1 x SSC buffer and 0.1 % SDS at 55°C, advantageously at 62°C and more advantageously at 68°C, e.g., for 1 hour in 0.2 x SSC buffer and 0.1 % SDS at 55°C, such as at 62°C and advantageously at 68°C.

One can also characterize nucleotide sequences by their ability to bind under stringent hybridization conditions. Thus, the invention can envision herein identified nucleic acid sequences and nucleic acid molecules that bind thereto under stringent hybridization conditions.

The nucleotide sequences according to the invention and their fragments may be used as primers for PCR or in a similar method involving amplification and/or hybridization, e.g., for detection of gram negative bacteria in any media, for example tissue samples, biological fluids, water, food.

Advantageously use is made of nucleotide sequence fragments which have at least 20 contiguous, such as at least 30 contiguous, e.g., at least 50 contiguous, for instance at least 70 contiguous or more advantageously at least 100 contiguous nucleic acids of nucleotide sequences or genes according to the invention, e.g., of SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93.

Further, the present invention relates to methods to immunise against or to prevent bacterial infection or protect against bacterial infection in animals, advantageously animals susceptible thereto, such as avian, rabbit, bovine and porcine species, and more advantageously in avian species such as chicken, turkey and duck (including breeders, broilers and layers) or in a human.

According to these methods, (1) a live attenuated immunogenic composition or vaccine of the invention, or (2) a sub-unit immunogenic composition or vaccine of the invention, or (3) a live recombinant immunogenic composition or vaccine of the invention, or combinations thereof, are administered. Of course, embodiments of the invention may be employed with other vaccines or immunogenic compositions that are not of the invention, e.g., in prime-boost processes, such as where a vaccine or immunogenic composition of the invention is administered first and a different vaccine or immunogenic composition is administered thereafter, or *vice versa*.

32

The administration may be notably made by intramuscular (IM), intradermal (ID) or subcutaneous (SC) injection or via intranasal, intratracheal or oral administration. The immunogenic composition or the vaccine according to the invention is advantageously administered by syringe, needleless apparatus (like for example Pigjet, Avijet, Dermojet or Biojector (Bioject, Oregon, USA)), spray, drinking water, eye-drop.

Advantageous administrations for the live attenuated immunogenic composition or vaccine are *in ovo*, via the oral (e.g. drinking water, whole body spray), ocular (e.g. eye-drop, whole body spray), tracheal (e.g. spray), intradermal, subcutaneous (SC) or intramuscular (IM) routes.

The quantity of live attenuated micro-organisms can be determined and optimised by the skilled person, without undue experimentation from this disclosure and the knowledge in the art. Generally an animal (including a human) may be administered approximately 10^4 - 10^9 CFUs, advantageously approximately 10^5 - 10^8 CFUs and more advantageously approximately 10^6 - 10^7 CFUs in a single dosage unit.

By intramuscular route an avian animal may be administered approximately 10^4 - 10^7 CFUs, advantageously approximately 10^5 - 10^6 CFUs in a single dosage unit. The volume of one single dosage unit can be between about 0.2 ml and about 0.5 ml and advantageously about 0.3 ml. By oral, tracheal or ocular route an avian animal may be administered approximately 10^3 - 10^8 CFUs, advantageously approximately 10^6 - 10^7 CFUs in a single dosage unit. For spray administration the volume is adjusted to the apparatus and the size of droplets, from about 30 to about 600 ml for about 1000 animals and advantageously about 0.2 ml per animal.

For bovine and porcine animals, the advantageous routes are IM and SC. The animal may be administered approximately 10^4 - 10^9 CFUs, advantageously approximately 10^5 - 10^8 CFUs in a single dosage unit. The volume of one single dosage unit can be between about 0.2 ml and about 5.0 ml and advantageously between about 0.5 ml and about 2.0 ml and more advantageously about 1.0 ml.

Rabbits may be administered via IM or SC route approximately 10^4 - 10^8 CFUs, advantageously approximately 10^5 - 10^7 CFUs in a single dosage unit. The volume of one single dosage unit can be between about 0.2 ml and about 0.5 ml and advantageously about 0.5 ml. They may also be administered via ID route

approximately 10^4 - 10^8 CFUs, advantageously approximately 10^5 - 10^7 CFUs in a single dosage unit. The volume of one single dosage unit can be between about 0.1 ml and about 0.2 ml.

5 The invention will now be further described by way of the following non-limiting examples.

EXAMPLES

Example 1: Construction of a library of signature tagged *P. multocida* transposon mutants (STM screening)

Construction of the tagged SM10 λ pir pLOF/km transformants

10 Tags were produced as described in Hensel *et al.*, (Science, 1995, 269:400-403). Initially tagged-pUTminiTn5Km2 plasmids were selected that contain tags that hybridise well but do not cross hybridise with each other. The mini-Tn5 transposon in the tagged pUTminiTn5Km2 vector was found not to transpose in several strains of *Pasteurella multocida*. In contrast the transposon mini-Tn10 has
15 been shown to function in *P. multocida* (Lee *et al.*, Vet Microbiol, 1996, 50:143-8). The pre-selected tags were therefore transferred from the pUTminiTn5 vectors into the mini-Tn10 containing plasmid pLOF/Km (Herrero *et al.*, J. Bacteriology, 1990, 172: 6557-6567). The tags were amplified by PCR using primers that bind to the pUTminiTn5Km2 vector, either side of the *KpnI* site into which the tags were
20 cloned. These primers included sequences for the restriction enzyme *SalI*. The PCR products were then digested with *SalI* and cloned into the *SalI* site of a modified version of the pLOF/Km vector, in which a *SalI* site has replaced the unique *SfiI* cloning site. The tagged pLOF/Km plasmids were then transformed into the *E. coli* strain SM10 λ pir (*Km^r*, *thi*, *thr*, *leu*, *tonA*, *lacY*, *supE*, *recA::RP4-2-Tc::Mu λ pir*)
25 (Miller V.L. *et al.*, J. Bacteriol., 1988, 170: 2575-83). This strain can mobilise plasmids such as pLOF/Km into recipient bacteria by conjugation.

Methods of selecting and counter-selecting

The conjugation process requires a method of selecting for the recipient *P. multocida*, which have acquired the plasmid pLOF/KM and a method of counter-
30 selection against the *E. coli* SM10 λ pir donor.

In the method of selecting the recipient *P. multocida* are selected for using kanamycin, which is encoded by the mini-Tn10 transposon.

Initially for counter-selection against the *E. coli* donor in conjugations, a spontaneously streptomycin resistant mutant of *Pasteurella* strain P-1059 was used. However it appeared that this strain was attenuated in virulence for turkeys and thus was not usable here. *Pasteurella multocida* strains can grow on a chemically defined media (CDM) (Hu *et. al.*, Infection and Immunity 1986, 804-810). A modified version of this chemically defined medium containing agar but not containing leucine was utilised to allow counter-selection against the *E. coli* donor. The *Pasteurella* strain was able to grow on this medium, the composition of which is given in table 1, whereas the *E. coli* SM10 λ pir strain, which is a leucine auxotrophe did not.

Table 1:

Component	Concentration g/litre
Noble Agar	20
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	32.31
KH ₂ PO ₄	1.368
NaCl	1.196
Glucose	6.0
L-Arginine hydrochloride	0.24
L- cysteine Hydrochloride	0.12
L-Serine	0.2
L-glutamic acid	0.15
L-isoleucine	0.064
L-phenylalanine	0.095
L-Aspartic acid	1.6
L-tyrosine	0.08
Thiamine hydrochloride	0.0002
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.246
Calcium pantothenate	0.004
Nicotinamide	0.01
Orotic acid	0.003

Passaging of *P. multocida* strain on CDM media

A lyophilised ampoule of *P. multocida* strain (USDA P-1059, available from the American Type Culture Collection, accession number ATCC 15742) was revived by the addition of 200µl of BHI (brain-heart infusion) and an aliquot of the suspension streaked onto a BHI agar plate and the plate incubated at 37°C overnight. Colony material from this plate was used to inoculate a BHI broth culture, which was incubated with shaking at 37°C overnight. Glycerol was added to a final concentration of 15% v/v and aliquots were stored frozen at -80°C. A sample from one of these frozen aliquots was streaked onto a BHI agar plate and incubated overnight. Colony material from this BHI plate was then streaked onto CDM agar plates with the composition given in table 1 and incubated at 37°C for 3 days. Colony material from this CDM plate was inoculated into a BHI broth culture and incubated with shaking at 37°C overnight. Glycerol was added to this culture to a

final concentration of 15% v/v and aliquots frozen at -80°C. This strain was termed 16084 (CDM).

Construction of the mutant bank

The tagged SM10λpir pLOF/km transformants were conjugated with the 16084 (CDM) *P. multocida* strain. To minimise the isolation of sibling mutants (mutants with the transposon located in the same position that arise due to replication of the mutant during the conjugation procedure) each tagged SM10λpir transformant was conjugated with the *P. multocida* strain in at least three separate conjugations. *Pasteurella* transposon mutants were selected on CDM agar plates supplemented with 50µg/ml kanamycin.

The kanamycin resistant mutants for each of the tagged transposons were then streaked to form single colonies twice on BHI kanamycin 50µg/ml agar plates. Single colonies were then inoculated into BHI broth cultures, grown overnight at 37°C with shaking. Glycerol was then added to a final concentration of 15% v/v and the mutants stored at -80°C in individual vials.

Example 2: Screening of the signature-tagged *Pasteurella* mutant bank for mutants attenuated in virulence for turkeys.

Cultures of the *P. multocida* mutants were grown for inoculation of turkeys by mixing 20µl of each of the glycerol stocks of the mutants obtained in example 1 with 200µl of BHI culture medium, supplemented with 50µg/ml of kanamycin, and placing in 96 well microtitre dishes. These microtitre dishes were incubated in static conditions for about 18 hours at 37°C. Then 10µl aliquots of the 18 hour cultures of each mutant were mixed with 200µl of BHI culture medium supplemented with 50µg/ml of kanamycin in a fresh microtitre plate and the plate incubated at 37°C for approximately 4 hours. The cultures were stopped in the exponential phase of growth and 100µl of the cultures of each mutant were transferred to a fresh microtitre plate and used for determination of the optical density (OD) at 650 nm.

The inocula or input pools were formed by mixing the remaining 100µl of the 4 hour cultures. Each input pool consisted of 48 different mutants. The titre of these pooled suspensions were determined by FACS (fluorescence activated cell sorter) analysis of 100µl aliquots. Aliquots (1ml) of the pooled suspension were then diluted in physiologically buffered water to obtain a suspension with a titre of

2.10⁷ cfu/ml. Groups of 5 three-week-old turkeys were then inoculated intramuscularly with 0.5ml aliquots of this suspension (10⁷ cfu per animal). The serological status of the turkeys prior to inoculation was determined by screening for the presence of antibodies to *Pasteurella* in blood samples taken one day before inoculation. The cells from the remainder of the input pools were harvested by centrifugation and chromosomal DNA extracted from the cell pellets.

Approximately 14 hours after inoculation 1 ml blood samples were taken from 3 of the 5 turkeys. Dilution series (10⁻¹ to 10⁻⁷) of the blood samples were plated onto Columbia agar plates supplemented with 5% sheeps blood. The plates were incubated at 37°C for 24 hours after which time approximately 10000 *Pasteurella* colonies were resuspended in BHI medium. These suspensions, which are termed the output pool, were then centrifuged and chromosomal DNA extracted from the cell pellet.

Pasteurella mutants that were present in the input pool but were not re-isolated from the turkeys were identified by PCR amplification of the signature tags present in DNA samples from the input and output pools, and hybridisation of the amplified PCR products against dot blots loaded with DNA encoding the signature tags, as described in Hensel et al. (Science 1995, 269:400-403). These mutants were considered as potentially attenuated in virulence. This attenuation was confirmed by screening for a lack of mortality after single infections of the potentially mutants in turkeys.

Example 3: Confirmation of the attenuation in virulence for turkeys of the *P. multocida* mutants.

The transposon mutants identified as potentially attenuated in Example 2 or the mutants which have limited ability to grow in culture, were revived by mixing 20µl of the glycerol stocks with 200µl of BHI culture medium supplemented with 50µg/ml of kanamycin in microtitre dishes. These microtitre dishes were incubated in static conditions for 18 hours at 37°C. Then 10µl aliquots of each mutant of these cultures were taken and mixed with 200µl of BHI medium, supplemented with 50µg/ml of kanamycin in a fresh microtitre plate and this plate incubated in static conditions for about 4 hours. The cultures were stopped in the exponential phase of growth and 100µl of the cultures of each mutant were transferred to a fresh microtitre plate and used for determination of the optical density (OD) at 650nm.

38

The cultures of each of the mutants were then diluted 1 in 10000 in physiologically buffered water to obtain a concentration of approximately $2 \cdot 10^4$ cfu/ml. Aliquots (0.5ml) of these dilutions were then inoculated intramuscularly into 2 five-week-old turkeys (10^4 cfu per animal). The serological status of a few animals from each group of turkeys was determined from blood samples taken the day before inoculation. The turkeys were monitored for the following 7 days for mortality. Of the mutants tested 72 did not result in mortality in either of the two birds inoculated. These 72 mutants were considered attenuated in virulence.

Example 4: Characterisation of transposon insertion mutants identified after screening in Turkeys

The transposon insertion sites in the genome of attenuated *P. multocida* mutants were identified by cloning the DNA flanking one side of the transposon insertion, either by Inverse PCR or by arbitrarily primed PCR.

These mutants were revived from the -80°C glycerol stocks by streaking an aliquot onto BHI kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$ agar plates. Single colonies were then used to inoculate BHI broth cultures from which chromosomal DNA was prepared.

For Inverse PCR the chromosomal DNA was digested with a restriction enzyme that has a 4 base pairs recognition site, such as Tsp509I, αTaqI or RsaI. The DNA is then ligated in a large volume to encourage intra-molecular ligation. The DNA flanking the transposon is then amplified from this ligated DNA template using outwardly facing primers that anneal to known sequence of the transposon, such as StipJ (SEQ ID NO: 98, 20 mer) (5' ATC TGA TCC TTC AAC TCA GC 3'), StipA (SEQ ID NO: 99, 19 mer) (5' CGC AGG GCT TTA TTG ATT C 3'), KTGR1 (SEQ ID NO: 100, 27 mer) (5' GCG GAA TTC GAT GAA TGT TCC GTT GCG 3'), Tn10IR1 (SEQ ID NO: 101, 20 mer) (5' TTT ACC AAA ATC ATT AGG GG 3') and Tn10IR4 (SEQ ID NO: 102, 19 mer) (5' GAT CAT ATG ACA AGA TGT G 3'). These Inverse PCR products are then cloned and sequenced.

For arbitrarily primed PCR the chromosomal DNA was used as a template in a first round PCR reaction with one outwardly facing primer that anneals to the transposon, such as StipA, and an arbitrary primer, such as arb1 (SEQ ID NO: 103, 35 mer) (5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN GAT AT 3') or arb6 (SEQ ID NO: 104, 35 mer) (5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN CAG CC 3'). The annealing temperature of this first round PCR reaction

is initially set very low, with the annealing temperature being raised in subsequent cycles. A portion of the products of this first round PCR is then used as a template in a second round PCR. This second round PCR utilises another outwardly facing primer, such as KTGR1, which anneals to the transposon at a position that is closer to the end of the transposon than the primer used in the first round PCR. The other primer used in this second round PCR has the same sequence as the 20 bases of known sequence at the 5' end of the arbitrary primer used in the first round PCR, such as arb2 (SEQ ID NO: 105, 20 mer) (5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC 3'). The PCR products of this second PCR are then cloned and sequenced.

10 The sequences obtained were then analysed to identify open reading frames (ORF), which may be disrupted by the transposon and were also used to search for similar sequences currently available in the EMBL database and in the genome sequence of the *Pasteurella multocida* strain PM70, determined by the University of Minnesota (May BJ *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98(6): 3460-5).

15 For information, in the following nucleotide sequences, N is corresponding to any nucleic acid (A or C or G or T).

Mutants 1G4, 3F4, 3G12, 12D6 and 14C10

The mutants 1G4, 3F4 and 12D6 have exactly the same transposon insertion site. The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 1 (775 mer). The transposon is inserted immediately at the 5' end of this sequence.

A start codon is located at positions 179-181 of the sequence SEQ ID NO: 1.

For the mutant 3G12, the DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 95 (101 mer). The transposon is inserted immediately at the 5' end of this sequence.

For the mutant 14C10, the DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 96 (220 mer). The transposon is inserted immediately at the 3' end of this sequence.

Four other *Pasteurellaceae* proteins and genes were identified by blasts done with a 60 amino acid sequence encoded by SEQ ID NO: 1.

Strain	Gene (Genbank ref.)	Protein (Genbank ref.)	% of identity
<i>P. multocida</i> taxon 747	PhyA (AF067175)	PhyA (AAC67248)	100% over 60 amino acids
<i>P. multocida</i> PM70	PM0773 (AE006115)	PhyA (AAK02857)	98% over 60 amino acids
<i>P. multocida</i> P4218	PhyA (AF302467)	PhyA (AAK17919)	98% over 60 amino acids
<i>P. multocida</i> P934	PhyA (AF302465)	PhyA (AAK17907)	95% over 60 amino acids

The location of the transposon in mutants 1G4, 3F4 and 12D6 corresponds to position 8507-8508 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank Accession number AE006115. The location of the transposon in the mutant 3G12 corresponds to position 8609-8610 of the AE006115 sequence. The location of the transposon in the mutant 14C10 corresponds to position 8517-8518 of the AE006115 sequence. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM0773, PhyA. The PhyA gene is predicted to be involved in capsule synthesis.

The nucleotide sequence of PM0773 is herein identified as SEQ ID NO: 2 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 3.

Mutants 1G8, 9D1 and 9D8

In mutant 1G8, the transposon is inserted immediately at the 3' end of the sequence SEQ ID NO: 4 (226 mer). This sequence has two open reading frames (+2 and -2) encoding potential longer proteins. The ORF according to the invention is in frame -2.

The transposon inserted in mutant 9D1 is immediately at the 3' end of the sequence SEQ ID NO: 5 (87 mer).

The transposon inserted in mutant 9D8 is after position 225 of the sequence SEQ ID NO:4.

The transposons in mutants 1G8, 9D1 and 9D8 disrupt a homologue of the PM70 gene, PM0871. The locations of the transposons in these mutants correspond to positions 9849-9850 (mutant 1G8), 8899-8900 (mutant 9D1) or 9848-9849 (mutant 9D8) of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence Genbank accession number AE006125. The nucleotide sequence of PM0871 is herein identified as SEQ ID NO: 6 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 7.

One other Pasteurellaceae gene/protein was identified by blasts done with SEQ ID NO: 7. This is *Haemophilus influenzae* HI1586 (Genbank accession numbers U32832 and AAC23234). We find an identity of 72% over 507 amino acids between PM0871 and HI1586.

5 Mutant 2F2

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 8 (78 mer). The transposon is immediately at the 5' end of this sequence. This sequence has three open reading frames (+1, +2 and -1) encoding potential longer proteins. The ORF according to the invention is in frame +2.

10 The transposon in mutant 2F2 disrupts a homologue gene of PM70 gene PM1727. This transposon is located at a position which corresponds to 644-645 of the *Pasteurella multocida* PM70 sequence, Genbank accession number AE006210 (PM1727). The nucleotide sequence of PM1727 is herein identified as SEQ ID NO: 9 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 10.

15 One other Pasteurellaceae gene/protein was identified by blasts done with SEQ ID NO: 10. This is *Haemophilus influenzae* HI0621 (Genbank accession numbers U32744 and AAC22281). We find an identity of 77% over 183 amino acids between PM1727 and HI0621.

PM1727 is a member of a superfamily of hydrolases, in particular it is related to histidinol phosphate phosphatases.

Mutant 3A2

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 11 (467 mer). The transposon is immediately at the 5' end of this sequence.

A stop codon is located at positions 428-430.

25 The transposon in mutant 3A2 is located at a position which correspond to 5103-5104 of the *Pasteurella multocida* PM70 sequence, Genbank accession number AE006094 (PM0586). The nucleotide sequence of PM0586 is herein identified as SEQ ID NO: 12 and its amino sequence as SEQ ID NO: 13.

Two other Pasteurellaceae genes and proteins were identified by blasts done with SEQ ID NO: 13. These genes and proteins are *Pasteurella haemolytica* A1 PlpD (Genbank accession numbers AF058703 and AAC32565) and *Haemophilus somnus* 31 kDa (Genbank accession numbers L07795 and AAA24941). We find an

identity of 73% over 276 amino acids between PM0586 and *P. haemolytica* PlpD and of 71% over 273 amino acids between PM0586 and *H. somnus* 31 kDa.

PlpD and PM0586 are members of the ompA protein family.

Mutant 3D3

- 5 The DNA sequences flanking the both sides of the transposon insertion site are given in SEQ ID NO: 14 (204 mer, transposon at the 5' end) and SEQ ID NO: 15 (35 mer, transposon at the 5' end).

A stop codon is located at positions 7-9 of SEQ ID NO: 14 and at positions 33-35 of SEQ ID NO: 15.

- 10 One other *Pasteurellaceae* gene/protein was identified by blasts done with SEQ ID NO: 14 and its encoded amino acid sequence (65 amino acids). We find an identity of 100% over 65 amino acids with PM0064 protein. The location of the transposon in mutant 3D3 corresponds to positions 4778-4779 or 4787-4788 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number
- 15 AE006042, positions deduced from SEQ ID NO: 14 and 15 respectively. This difference is likely to be due to insertion of the transposon resulting in the duplication of a few nucleotides at the transposon insertion site. Position 4788 is located in the PM0064 gene. Position 4778 is 6 bp downstream of the stop codon of PM0064. The nucleotide sequence of PM0064 is herein identified as SEQ ID NO:
- 20 16 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 17.

Other gram negative bacteria genes and proteins were identified by blasts done with SEQ ID NO: 17.

Strain	Gene (Genbank ref.)	Protein (Genbank ref.)	% of identity
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI0017 (U32687)	HI0017 (AAC21695)	81% over 127 amino acids
<i>Escherichia coli</i> K12	YfID (AE000344)	yfID (AAC75632)	81% over 127 amino acids
<i>Salmonella typhi</i>	STY2839 (AL627275)	yfID (CAD02795)	81% over 127 amino acids
<i>Salmonella typhimurium</i>	STM2646 (AB008820)	yfID (AAL21540)	81% over 127 amino acids
<i>Serratia liquefaciens</i>	OrFX (X66505)	OrFX (CAA47136)	79% over 127 amino acids
<i>Yersinia pestis</i>	YPO2705 (AJ414153)	YPO2705 (CAC92944)	79% over 127 amino acids
<i>Vibrio cholerae</i>	VC2361 (AB004306)	VC2361 (AAF95504)	73% over 127 amino acids

Mutant 3D8

5 The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 18 (75 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence.

 The location of the transposon in mutant 3D8 corresponds to between positions 7769-7770 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006080. The transposon disrupts a homologue of the PM70
10 gene PM0445. The nucleotide sequence of PM0445 is herein identified as SEQ ID NO: 19 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 20.

Mutant 3E1

 The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 21 (229 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence.

15 The location of the transposon in mutant 3E1 corresponds to between positions 9195-9196 of *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006133. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM0940. The nucleotide sequence of PM0940 is herein identified as SEQ ID NO: 22 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 23.

Other gram negative bacteria genes and proteins were identified by blasts done with SEQ ID NO: 17.

Strain	Gene (Genbank ref.)	Protein (Genbank ref.)	% of identity
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI0075 (U32693)	nrdD (AAC21751)	87% over 713 amino acids
<i>Escherichia coli</i> K12	nrdD (AB000495)	nrdD (AAC77195)	76% over 709 amino acids
<i>Salmonella typhi</i>	STY4791 (AL627283)	nrdD (CAD06912)	76% over 709 amino acids
<i>Salmonella typhimurium</i>	STM4452 (AB008908)	nrdD (AAL23272)	76% over 709 amino acids
<i>Yersinia pestis</i>	YPO3464 (AJ414157)	nrdD (CAC92683)	75% over 709 amino acids
<i>Vibrio cholerae</i>	VCA0511 (AB004381)	VCA0511 (AAF96414)	74% over 709 amino acids

Mutant 3H2

- 5 The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 24 (58 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence. This sequence has two open reading frames (+1 and -3) encoding potential longer proteins. The ORF according to the invention is in frame +1.

- One other *Pasteurellaceae* gene was identified by blasts done with SEQ ID
10 NO: 24 and with its encoded amino acid sequence (19 amino acids). We find an identity of 100% over 19 amino acids with PM1951 protein. The location of the transposon in mutant 3H2 corresponds to between positions 9418-9419 of the *Pasteurella multocida* PM70 sequence, Genbank accession number AE006231 (PM1951, *uvrA*). The nucleotide sequence of PM1951 is herein identified as SEQ
15 ID NO: 25 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 26.

Other gram negative bacteria genes and proteins were identified by blasts done with SEQ ID NO: 26.

Strain	Gene (Genbank ref.)	Protein (Genbank ref.)	% of identity
<i>Haemophilus influenzae</i>	UvrA (U32711)	UvrA (AAC21915)	89% over 943 amino acids
<i>Escherichia coli</i> K12	UvrA (AE000479)	UvrA (AAC77028)	80% over 940 amino acids
<i>Yersinia pestis</i>	UvrA (AJ414142)	UvrA (CAC89185)	80% over 943 amino acids
<i>Vibrio cholerae</i>	UvrA (AE004127)	UvrA (AAF93567)	80% over 940 amino acids
<i>Salmonella typhi</i>	UvrA (AL627282)	UvrA (CAD09238)	80% over 941 amino acids
<i>Salmonella typhimurium</i>	UvrA (AE008898)	UvrA (AAA27250)	80% over 941 amino acids
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UvrA (AE004840)	UvrA (AAG07622)	75% over 943 amino acids

UvrA is a DNA repair ABC excision nuclease.

Mutant 4D6

5 The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 27 (54 mer). The transposon is immediately at the 5' end of this sequence. This sequence has two open reading frames (+1 and -2) encoding potential longer proteins. The ORF according to the invention is in frame +1.

10 The location of the transposon in mutant 4D6 corresponds to between positions 6492-6493 of the *Pasteurella multocida* PM70 sequence, Genbank accession number AE006036. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM0032 or hktE. The nucleotide sequence of PM0032 is herein identified as SEQ ID NO: 28 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 29.

15 One other Pasteurellaceae gene/protein was identified by blasts done with SEQ ID NO: 29. This is *Actinobacillus actinomycetemcomitans* catalase (Genbank accession numbers AF162654 and AAF17882). We find an identity of 85% over 482 amino acids between PM0032 and *A. actinomycetemcomitans* catalase.

HktE is a catalase.

Mutant 4F4 and 12A5

20 For the mutant 4F4, the DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 30 (172 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence.

46

For the mutant 12A5, the DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 97 (546 mer). The transposon is inserted immediately at the 5' end of this sequence.

Four other *Pasteurellaceae* genes and proteins were identified by blasts done with the 57 amino acid sequence encoded by SEQ ID NO: 30.

Strain	Gene (Genbank ref.)	Protein (Genbank ref.)	% of identity
<i>P. multocida</i> taxon 747	HyaC (AF067175)	HyaC (AAC67251)	96% over 57 amino acids
<i>P. multocida</i> PM70	PM0776 (AE006116)	AAK02860	96% over 57 amino acids
<i>P. multocida</i> P4218	FcbC (AF302467)	FcbC (AAK17922)	91% over 57 amino acids
<i>P. multocida</i> P934	DcbC (AF302465)	DcbC (AAK17904)	88% over 57 amino acids

The location of the transposon in mutant 4F4 corresponds to between positions 5272-5273 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006116. The location of the transposon in mutant 12A5 corresponds to between positions 5275-5276 of the AE006116 sequence. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM0776. The nucleotide sequence of PM0776 is herein identified as SEQ ID NO: 31 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 32. These proteins are UDP glucose dehydrogenases.

Mutant 4F12

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 33 (226 mer). The transposon is immediately at the 5' end of this sequence.

The location of the transposon in mutant 4F12 corresponds to between positions 9263-9264 of the *Pasteurella multocida* PM70 sequence, Genbank accession number AE006038. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM0048 or fadR. The nucleotide sequence of PM0048 is herein identified as SEQ ID NO: 34 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 35. FadR is a homologue of an *E. coli* protein which is a transcription regulator of fatty acid metabolism, affecting several fatty acid biosynthesis (fab) and fatty acid degradation (fad) genes.

Mutant 4G11

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 36 (214 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence.

One other *Pasteurellaceae* gene was identified by blasts done with SEQ ID NO: 36 and its encoded amino acid sequence (70 amino acids). We find an identity of 100% over 70 amino acids with PM1024 protein. The location of the transposon in mutant 4G11 corresponds to between positions 3532-3533 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006143. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM1024 or HtpG. The nucleotide sequence of PM1024 is herein identified as SEQ ID NO: 37 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 38.

Other gram negative bacteria genes and proteins were identified by blasts done with SEQ ID NO: 38.

Strain	Gene (Genbank ref.)	Protein (Genbank ref.)	% of identity
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	HtpG (U26968)	HtpG (AAC44732)	88% over 625 amino acids
<i>Haemophilus influenzae</i>	HtpG (U32695)	HtpG (AAC21778)	86% over 625 amino acids
<i>Escherichia coli</i> K12	HtpG (AE000153)	HtpG (AAC73575)	76% over 621 amino acids
<i>Yersinia pestis</i>	HtpG (AJ414155)	HtpG (CAC92355)	76% over 622 amino acids
<i>Salmonella typhi</i>	STY0531 (AL627267)	HtpG (CAD04972)	76% over 621 amino acids
<i>Salmonella typhimurium</i>	HtpG (AE008718)	HtpG (AAL19441)	75% over 621 amino acids

HtpG is a heat shock protein.

The 4G11 mutant was deposited under Budapest Treaty in the Pasteur Institute Collection and is available under the accession number CNCM I-2999.

15 Mutant 5D5

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 39 (252 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence.

The location of the transposon in mutant 5D5 corresponds to between positions 5695-5696 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006188. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM1517 or PlpE). The nucleotide sequence of PM1517 is herein identified as SEQ ID NO: 40 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 41.

PlpE is predicted to be a membrane lipoprotein.

The 5D5 mutant was deposited under Budapest Treaty in the Pasteur Institute Collection and is available under the accession number CNCM I-3000.

Mutant 5F11

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 42 (546 mer). The transposon is immediately at the 5' end of this sequence.

A stop codon is located at positions 148-150.

- 5 The location of the transposon in mutant 5F11 corresponds to between positions 572-573 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome, Genbank accession number AE006150. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM1087 or NifR3. The nucleotide sequence of PM1087 is herein identified as SEQ ID NO: 43 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 44.

- 10 One other Pasteurellaceae gene/protein was identified by blasts done with SEQ ID NO: 44. This is *Haemophilus influenzae* HI0979 (Genbank accession numbers U32778 and AAC22639). We find an identity of 78% over 332 amino acids between PM1087 and HI0979.

NifR3 is a nitrogenase regulatory gene.

15 **Mutant 5G9**

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 45 (43 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence. This sequence has three open reading frames (+2, +3 and -1) encoding potential longer proteins. The ORF according to the invention is in frame +2.

- 20 Four other *Pasteurellaceae* genes and proteins were identified by blasts done with 14 amino acid sequence encoded by SEQ ID NO: 45.

Strain	Gene (Genbank ref.)	Protein (Genbank ref.)	% of identity
<i>P. multocida</i> P4218	FcbE (AF302467)	FcbE (AAK17920)	100% over 14 amino acids
<i>P. multocida</i> PM70	PM0774 (AE006116)	HyaE (AAK02858)	100% over 14 amino acids
<i>P. multocida</i> taxon 747	HyaE (AF067175)	HyaE (AAC67249)	100% over 14 amino acids
<i>P. multocida</i> P934	DcbE (AF302465)	DcbE (AAK17906)	71% over 14 amino acids

- 25 The location of the transposon in mutant 5G9 corresponds to between positions 573-574 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006116. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM0774 or HyaE. The nucleotide sequence of PM0774 is herein identified as

SEQ ID NO: 46 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 47. These genes are involved in the capsule synthesis.

Mutant 6E5

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 48 (279 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence.

A start codon is located at positions 169-171.

The location of the transposon in mutant 6E5 corresponds to between positions 6673-6674 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome, Genbank accession number AE006182. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM1459 or pgtB. The nucleotide sequence of PM1459 is herein identified as SEQ ID NO: 49 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 50.

PgtB is a phosphoglycerate transport regulatory protein.

Mutant 6E6

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 51 (93 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence.

A stop codon is located at positions 12-14.

The location of the transposon in mutant 6E6 corresponds to between positions 9051-9052 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006096. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM0605. The nucleotide sequence of PM0605 is herein identified as SEQ ID NO: 52 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 53.

Mutant 6F12

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 54 (772 mer). The transposon is immediately at the 5' end of this sequence.

A start codon is located at positions 2-4.

The location of the transposon in mutant 6F12 corresponds to between positions 5362-5363 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006192. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM1556 or comF gene. The nucleotide sequence of PM1556 is herein identified as SEQ ID NO: 55 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 56.

ComF is the competence protein F.

Mutant 6G4

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 57 (700 mer). The transposon is immediately at the 5' end of this sequence.

5 The location of the transposon in mutant 6G4 corresponds to between positions 3758-3759 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006206. The insertion is between the PM1696 and PM1697 genes. The transposon is inserted between the promoter region and the start codon of PM1696.

10 The start codon of PM1696 is located at positions 26-28 in the SEQ ID NO: 57 sequence.

The nucleotide sequence of PM1696 is herein identified as SEQ ID NO: 58 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 59.

Other gram negative bacteria genes and proteins were identified by blasts done with SEQ ID NO: 59.

Strain	Gene (Genbank ref.)	Protein (Genbank ref.)	% of identity
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI0266 (U32713)	HI0266 (AAC21932)	87% over 184 amino acids
<i>Salmonella typhi</i>	STY3386 (AL627278)	STY3386 (CAD07732)	71% over 185 amino acids
<i>Salmonella typhimurium</i>	STM3207 (AE008847)	ygjH (AAL22081)	71% over 185 amino acids

15

Mutant 6H1

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 60 (188 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence.

20 The location of the transposon in mutant 6H1 corresponds to between positions 4139-4140 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006119. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM0806 or speF gene. The nucleotide sequence of PM0806 is herein identified as SEQ ID NO: 61 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 62.

25 Two other Pasteurellaceae and Vibrionaceae genes were identified by blasts done with SEQ ID NO: 62. These genes are *Haemophilus influenzae* speF (Genbank accession numbers U32740 and AAC22248) and *Vibrio cholerae* ornithine decarboxylase (AE004431 and AAF96957). We find an identity of 83% over 719 amino acids between PM0806 and *H. influenzae* speF.

SpeF is an ornithine decarboxylase.

Mutant 6H6

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 63 (101 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence. This sequence has two open reading frames (+1 and -1) encoding potential longer proteins. The ORF according to the invention is in frame +1.

The location of the transposon in mutant 6H6 corresponds to between positions 983-984 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006155. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM1138. The nucleotide sequence of PM1138 is herein identified as SEQ ID NO: 64 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 65.

Mutant 7A7

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 66 (222 mer). The transposon is immediately at the 5' end of this sequence. The location of the transposon in mutant 7A7 corresponds to between positions 7853-7854 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006170 (in the intergenic region between PM1321 and PM1322). The transposon is inserted between the terminator region and the stop codon of PM1322.

The stop codon is located at positions 25-27 in the SEQ ID NO: 66 sequence. The nucleotide sequence of PM1322 is herein identified as SEQ ID NO: 67 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 68.

Mutant 7F8

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 69 (55 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence. This sequence has three open reading frames (+1, +3 and -3) encoding potential longer proteins. The ORF according to the invention is in frame +3.

The location of the transposon in mutant 7F8 corresponds to between positions 8292-8293 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006224. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM1866. The nucleotide sequence of PM1866 is herein identified as SEQ ID NO: 70 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 71.

Mutant 9C8

The DNA sequences flanking the both sides of the transposon insertion site are given in SEQ ID NO: 72 (598 mer, transposon at the 5' end) and SEQ ID NO: 73 (561 mer, transposon at the 5' end).

- 5 A stop codon is located at positions 26-28 of SEQ ID NO: 72. Sequences SEQ ID NO: 72 and 73 are combined together and limited to the ORF. The resulting sequence is designated SEQ ID NO: 74 (575 mer).

- 10 The location of the transposon in mutant 9C8 corresponds to between positions 2224-2225 or 2210-2211 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006132, positions deduced from SEQ ID NO: 72 and 73 respectively. Both positions are inside the PM0926 (fimA) gene. The nucleotide sequence of PM0926 is herein identified as SEQ ID NO: 75 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 76.

- 15 One other Pasteurellaceae gene/protein was identified by blasts done with SEQ ID NO: 76. This is *Haemophilus influenzae* FimA (Genbank accession numbers AF053125 and AAC08991). We find an identity of 77% over 171 amino acids between PM0926 and *H. influenzae* FimA.

FimA is an adhesin, a fimbrial protein.

- 20 The 9C8 mutant was deposited under Budapest Treaty in the Pasteur Institute Collection and is available under the accession number CNCM I-3001.

Mutant 9H4

- 25 The DNA sequences flanking the both sides of the transposon insertion site are given in SEQ ID NO: 92 (1391 mer). The transposon was inserted at the position 850-851 of this sequence. This sequence has only one reading frame. The ORF according to the invention is in frame -2.

A start codon is located at positions 1318-1316 and a stop codon is located at positions 29-31 of SEQ ID NO: 92. The ORF resulting sequence is designated SEQ ID NO: 93 (1290 mer) and its amino acid sequence is designated SEQ ID NO: 94.

- 30 The blasts done with the sequences SEQ ID NO: 92 and SEQ ID NO: 94 did not identify any homologous genes or proteins.

The 9H4 mutant was deposited under Budapest Treaty in the Pasteur Institute Collection and is available under the accession number CNCM I-3002.

Mutant 10G11

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 77 (70 mer). The transposon is immediately at the 5' end of this sequence. A start codon is located at positions 62-64.

- 5 The location of the transposon in mutant 10G11 corresponds to between positions 2938-2939 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006056. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM0220 (rpL31_1). The nucleotide sequence of PM0220 is herein identified as SEQ ID NO: 78 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 79.

- 10 RpL31_1 is a 50S ribosomal protein.

Mutant 11E8

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 80 (506 mer). The transposon is immediately at the 5' end of this sequence.

A start codon is located at positions 195-197 of SEQ ID NO: 80.

- 15 The location of the transposon in mutant 11E8 corresponds to between positions 282-283 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006085. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM0488. The nucleotide sequence of PM0488 is herein identified as SEQ ID NO: 81 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 82.

20 **Mutant 12A1**

The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 83 (243 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence.

- 25 One other *Pasteurellaceae* gene was identified by blasts done with SEQ ID NO: 83 and its encoded amino acid sequence (81 amino acids). We find an identity of 100% over 81 amino acids with PM0063 protein. The location of the transposon in mutant 12A1 corresponds to between positions 2880-2881 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006042. The transposon disrupts a homologue of the PM70 gene PM0063 or lepA gene. The nucleotide sequence of PM0063 is herein identified as SEQ ID NO: 84 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 85.
- 30

Other gram negative bacteria genes and proteins were identified by blasts done with SEQ ID NO: 85.

ea

Strain	Gene (Genbank ref.)	Protein (Genbank ref.)	% of identity
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI0016 (U32687)	LepA (AAC21694)	95% over 598 amino acids
<i>Yersinia pestis</i>	YPO2716 (AJ414153)	LepA (CAC92955)	88% over 597 amino acids
<i>Escherichia coli</i> K12	LepA (AE000343)	LepA (AAC75622)	89% over 597 amino acids
<i>Salmonella typhi</i>	STY2829 (AL627275)	LepA (CAD02785)	89% over 597 amino acids
<i>Salmonella typhimurium</i>	LepA (AE008817)	LepA (AAL21477)	89% over 597 amino acids
<i>Vibrio cholerae</i>	VC2463 (AE004316)	LepA (AAF95605)	84% over 597 amino acids
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA0767 (AE004511)	LepA (AAG04156)	75% over 594 amino acids

LepA is a GTP-binding membrane protein.

Mutant 12B3

5 The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 86 (147 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence.

 The location of the transposon in mutant 12B3 corresponds to between positions 4028-4029 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank accession number AE006152. The transposon disrupts a homologue of the PM70
10 gene PM1112 or *deaD* gene. The nucleotide sequence of PM1112 is herein identified as SEQ ID NO: 87 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 88.

 One other Pasteurellaceae gene/protein was identified by blasts done with SEQ ID NO: 88. This is *Haemophilus influenzae* HI0231 (Genbank accession numbers U32709 and AAC21900). We find an identity of 80% over 605 amino
15 acids between PM1112 and HI0231.

$DeaD$ is an RNA helicase.

Mutant 13E1

 The DNA sequence flanking the transposon insertion site is given in SEQ ID NO: 89 (187 mer). The transposon is immediately at the 3' end of this sequence.
20 This sequence has two open reading frames (+1 and -3) encoding potential longer proteins. The ORF according to the invention is in frame -3.

 The location of the transposon in mutant 13E1 corresponds to between positions 2173-2174 of the *Pasteurella multocida* PM70 genome sequence, Genbank

accession number AE006138 (PM0989). The nucleotide sequence of PM0989 is herein identified as SEQ ID NO: 90 and its amino acid sequence as SEQ ID NO: 91.

One other Pasteurellaceae gene/protein was identified by blasts done with SEQ ID NO: 91. This is *Haemophilus influenzae* HI0325 (Genbank accession numbers U32717 and AAC21988). We find an identity of 79% over 414 amino acids between PM0989 and HI0325.

The 13E1 mutant was deposited under Budapest Treaty in the Pasteur Institute Collection and is available under the accession number CNCM I-3003.

Example 5: PCR selection of transposon insertion mutants

10 The transposon may insert everywhere in the genome of the bacteria. But a selection of the right mutants can be done using PCR.

A pair of primers are used, one specific for the transposon, such as Tn10IR1 (SEQ ID NO: 101), Tn10IR4 (SEQ ID NO: 102), KTGR1 (SEQ ID NO: 100), StipA (SEQ ID NO: 99) and StipJ (SEQ ID NO: 98), and one specific for the gene or
15 sequence to be mutated. The nucleotide sequence of this gene or a part thereof (e.g. sequences of the region near the locus of insertion of the transposon as sequenced above) is helpful to the design of such primers. This can be adapted to genes or nucleotide sequences of other strains of *Pasteurella multocida*, or other gram negative bacteria, such as bacteria of the *Pasteurellaceae* family, notably
20 *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

The knowledge of the corresponding gene or ORF and/or their regulatory regions in the *Pasteurella multocida* strain PM70 or P-1059 (Example 4) such as its size is used to screen the amplified PCR fragments and to detect those having a size
25 corresponding to a transposon inserted in the gene or sequence to be mutated. If the transposon was inserted outside the gene, it may have no amplified PCR fragment or it may amplify fragments with a size too long. Thus PCR allows for the selection of the mutants.

For *Pasteurella multocida* P-1059 strain, such gene-specific primers may be:

Mutant	Primer name	Primer sequence	SED ID NO:
13E1	13E1C	5' TACGTTAACGCCACCCGTTG	106 (20 mer)
3A2	3 ^o 2C	5' GCTTCCATACCTTGTGAACC	107 (20 mer)
2F2	2F2C	5' GGGTGTACGCCTTCTGCTG	108 (19 mer)
9C8	9C8C	5' ATTGCAGTCATTGCGGATGC	109 (20 mer)
12A1	12A1C	5' CGATATGGTACGTGTCGAC	110 (19 mer)
5F11	5F11C	5' AAAAGGCGGACCTAAGTCCG	111 (20 mer)
5D5	5D5C	5' CCGACAACATGACAATGGAG	112 (20 mer)
4G11	4G11C	5' TTTGCAGTGGCTTACCGTC	113 (19 mer)
12B3	12B3C	5' CCTGACGACCAATACGGTG	114 (19 mer)
5G9	5G9C	5' GGATGGTCTGATCCTAATGC	115 (20 mer)
9H4	9H4C	5' CGTTCATCAGATGACACTGC	116 (20 mer)
3H2	3H2C	5' GTGATTACGGGATTATCGGG	117 (20 mer)
10G11	10G11C	5' TGAAGTGGTAACGAGGCTTG	118 (20 mer)

In the case of the mutants obtained previously, the PCR was be carried out with the following pairs of primers and the amplified PCR fragments had a size of:

5

Gene-specific Primer	Transposon-specific Primer	PCR size (bp)
13E1C	Tn10IR4	250
13E1C	StipA	320
13E1C	StipJ	1720
3A2C	KTGRI	510
2F2C	Tn10IR1	105
2F2C	StipJ	1710
9C8C	Tn10IR4	500
12A1C	Tn10IR4	310
5F11C	Tn10IR4	560
5D5C	StipJ	1705
4G11C	StipJ	1680
12B3C	StipJ	1720
5G9C	StipJ	1660
9H4C	Tn10IR4	585
3H2C	StipJ	1690
10G11C	Tn10IR4	395

Example 6: Efficacy and protection of transposon insertion mutants against homologous challenge

10 The transposon insertion mutants derived from *Pasteurella multocida* 16084 strain (Example 1) were administered by eye-drop to three week-old conventional turkeys. Efficacy was studied against an ocular homologous challenge with *Pasteurella multocida* 16084 strain.

24 groups of conventional turkeys aged 3 weeks were set up. On D0, the groups were inoculated by eye drop with about 10^8 CFU of the mutants as indicated in the following table.

5 A group of conventional turkeys aged 3 weeks remained unvaccinated and served as controls (Group25).

All the turkeys were challenged on D23 using *Pasteurella multocida* 16084 strain administered by eye drop at 10^8 CFU per bird.

10 Mortality was daily recorded for 2 weeks after challenge. At the end of the study (D37), a clinical examination was carried out to determine the health status of the surviving birds.

The protection rate was calculated considering the number of challenged birds and the number of healthy birds on D37.

Group	Mutant	Number of birds	Protection rate
Group1	1G4	8	25%
Group2	4F4	10	40%
Group3	3A2	6	67%
Group4	1G8	10	50%
Group5	13E1	22	82%
Group6	5D5	22	68%
Group7	7F8	10	40%
Group8	11E8	10	20%
Group9	9C8	22	82%
Group10	4G11	20	100%
Group11	12B3	6	100%
Group12	10G11	10	20%
Group13	5G9	8	63%
Group14	12A1	10	50%
Group15	2F2	10	20%
Group16	5F11	10	30%
Group17	9H4	7	100%
Group18	3H2	10	40%
Group19	Control	41	7%

For some groups, these experiments have been reproduced and the protection rate is cumulative result. Some mutants of the invention were not tested in these experiments.

Example 7: Efficacy and protection of transposon insertion mutants against
5 heterologous challenge

The transposon insertion mutants derived from *Pasteurella multocida* 16084 strain (Example 1) were administered by eye-drop to three week-old conventional turkeys. Efficacy was studied against an ocular heterologous challenge with *Pasteurella multocida* X73 strain (USDA).

10 Five groups of 10 conventional turkeys aged 3 weeks were set up. On D0, the groups were inoculated by eye drop with about 10^8 CFU of the mutants as indicated in the following table.

A group of 10 conventional turkeys aged 3 weeks remained unvaccinated and served as controls (Group6).

15 All the turkeys were challenged on D21 using *Pasteurella multocida* X73 strain administered by eye drop at 10^6 CFU per bird.

Mortality was daily recorded for 2 weeks after challenge. At the end of the study (D36), a clinical examination was carried out to determine the health status of the surviving birds.

20 The protection rate was calculated considering the number of challenged birds and the number of healthy birds on D36.

Group	Mutant	Number of birds	Protection rate
Group1	13E1	10	70%
Group2	5D5	10	80%
Group3	9C8	10	100%
Group4	4G11	10	100%
Group5	9H4	10	50%
Group6	Control	10	20%

Example 8: Construction of defined deletion mutants by conjugation

Initially, the targeted gene plus flanking DNA sequences are amplified by
 25 PCR using high fidelity polymerase and cloned into a suitable cloning vector. PCR primers are designed which delete the gene when used in inverse PCR to generate an

initial construct. The PCR primers contain an *Xba*I site to introduce a new restriction site and thus provide a marker for the gene deletion. The deletion constructs are then transferred into a suicide vector pCVD442 (Donnenberg *et. al.*, Infection and Immunity, 1991, 59: 4310-4317) for transfer to the *Pasteurella* chromosome. The pCVD442 plasmids are then transformed into the *E. coli* strain SM10 λ pir. This construct is introduced into the 16084 (CDM) *P. multocida* strain by conjugation with *E. coli* SM10 λ pir/pCVD442. Transformants and recombinants containing the plasmid integrated into the chromosome at the homologous site (merodiploids) are selected using the antibiotic resistance marker present on the pCVD442 plasmid (ampicillin resistance gene). *Pasteurella* mutants are selected on BHI agar plates supplemented with 1 μ g/ml ampicillin.

The pCVD442 plasmid requires the Pir protein for replication. This protein is encoded by the *pir* gene, which is present as a lambda phage lysogen in the donor strain SM10 λ pir, but not in the recipient *P. multocida*. So the pCVD442 plasmid does not replicate in the recipient *P. multocida* strain: antibiotic resistant colonies are therefore only obtained if the plasmid integrates into the chromosome. This suicide vector also contains the *sacB* gene that encodes the enzyme levan sucrase, which is toxic to most Gram negative bacteria in the presence of sucrose. Sucrose selection can therefore be employed as a counter selection to isolate colonies in which a second recombination event has occurred, resulting in loss of the plasmid from the chromosome. This second recombination event can result in two outcomes, re-generation of the wild type allele or generation of a deletion mutant. Colonies containing the deletion mutation are identified by colony PCR.

Example 9: Construction of defined deletion mutants by electroporation

Initially, the targeted gene plus flanking DNA sequences are amplified by PCR using high fidelity polymerase and cloned into a suitable cloning vector. PCR primers are designed which delete the gene when used in inverse PCR to generate an initial construct. The PCR primers contain an *Xba*I site to introduce a new restriction site and thus provide a marker for the gene deletion. The deletion constructs are then transferred to a suicide vector pCVD442 for transfer to the *Pasteurella* chromosome. This construct is introduced into the 16084 (CDM) *P. multocida* strain by electroporation. To remove the substantial extracellular capsule of 16084, the stationary phase cells are treated with ovine testicular hyaluronidase (type V, filter

sterilized before use, final concentration 25 µg/ml) for 1 hour before harvesting and washing the cells. The pCVD442 (1.5 µg) is mixed with cell suspension in 10% glycerol (0.05 ml, 10^{10} cell/ml) just prior to pipetting the mixture into the ice-cold 1-mm electroporation cuvettes (Biorad, Hercules, CA, USA). The GenePulser (Biorad) is used to pulse the cells (12.5 kV/cm, 250 ohms, 40 µF). Immediately after the pulse, the cells are diluted with 1 ml BHI and portions of culture (5-50 µl) are quickly (within 1-5 min) spread onto BHI agar plates containing 1 µg/ml ampicillin. Recombinants containing the plasmid integrated into the chromosome at the homologous site (merodiploids) are selected using the antibiotic resistance marker present on the plasmid (ampicillin resistance gene).

The pCVD442 plasmid does not replicate in the recipient *P. multocida* strain: antibiotic resistant colonies are therefore only obtained if the plasmid integrates into the chromosome. This suicide vector also contains the *sacB* gene that encodes the enzyme levan sucrase, which is toxic to most gram negative bacteria in the presence of sucrose. Sucrose selection can therefore be employed as a counter selection to isolate colonies where a second recombination event has occurred, resulting in loss of the plasmid from the chromosome. This second recombination event can result in two outcomes, re-generation of the wild type allele or generation of a deletion mutant.

Colonies appear after incubation at 37°C for 2-4 days. Streaking out colonies onto similar plates isolates individual transformants. Colonies containing the deletion mutation are identified by colony PCR.

Example 10: Vaccine and test of efficacy

The attenuated deletion mutants obtained in Example 8 or 9 are cultured in CDM culture medium (Hu *et. al.*, Infection and Immunity 1986, 804-810) under shaking condition for 24 to 48 hours.

The culture is harvested when the growth stops, which is followed by optical density (OD) or pH measurement.

The bacterial concentration is determined by optical density and when needed the concentration is adjusted to a final concentration of 10^9 CFU per ml with fresh culture medium.

The efficacy of the vaccine is tested in 3 week-old turkeys by vaccination and challenge.

The turkeys are checked prior to vaccination for the absence of *Pasteurella* antibodies by ELISA of blood samples.

A first group of turkeys is vaccinated by injection of 10^8 CFU in 0.1 ml via ocular route.

5 A second group remained unvaccinated (control group).

All animals are challenged on D21 or D23 with *P. multocida* P-1059 strain by ocular route (10^8 CFU in 0.1 ml per animal).

The mortality is observed every day until D35.

10 A lower mortality is observed in the vaccinated animals compared to the controls.

The invention is further described by the following paragraphs:

1- A mutant of a gram negative bacterium, wherein said bacterium has a mutation in a nucleotide sequence which codes for a polypeptide having an identity which is equal or more than 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or
15 99% with an amino acid sequence coded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of nucleotide sequences identified SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93 said mutation resulting in attenuated virulence of the bacterium.

2- The mutant of paragraph 1, wherein the bacterium is a
20 *Pasteurellaceae*.

3- The mutant of paragraph 2, wherein the bacterium is chosen among the group of: *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

4- The mutant of paragraph 3, wherein the bacterium is *Pasteurella*
25 *multocida*.

5- The mutant of any one of paragraphs 1 to 4, wherein the mutation is a deletion in the nucleotide sequence, or an insertion into it or replacement of nucleic acids.

6- The mutant of paragraph 5, wherein the mutation is the deletion of the
30 whole nucleotide sequence.

7- The mutant of paragraph 5, wherein the insertion is done between: nucleotides 180-181 or 182-183 or 190-191 in SEQ ID NO: 2, 77-78 or 1026-1027 or 1027-1028 in SEQ ID NO: 6, 416-417 in SEQ ID NO: 9, 389-390 in SEQ ID NO:

12, 381-382 in SEQ ID NO: 16, 219-220 in SEQ ID NO: 19, 1353-1354 in SEQ ID NO: 22, 136-137 in SEQ ID NO: 25, 384-385 in SEQ ID NO: 28, 222-223 or 225-226 in SEQ ID NO: 31, 217-218 in SEQ ID NO: 34, 1411-1412 in SEQ ID NO: 37, 943-944 in SEQ ID NO: 40, 855-856 in SEQ ID NO: 43, 369-370 in SEQ ID NO: 46, 111-112 in SEQ ID NO: 49, 443-444 in SEQ ID NO: 52, 4-5 in SEQ ID NO: 55, immediately upstream nucleotide 1 in SEQ ID NO: 58, 573-574 in SEQ ID NO: 61, 875-876 in SEQ ID NO: 64, immediately upstream nucleotide 1 in SEQ ID NO: 67, 218-219 in SEQ ID NO: 70, 1072-1087 in SEQ ID NO: 75, 64-65 in SEQ ID NO: 78, 282-283 in SEQ ID NO: 81, 1431-1432 in SEQ ID NO: 84, 974-975 in SEQ ID NO: 87, 802-803 in SEQ ID NO: 90, 850-851 in SEQ ID NO: 92.

8- The mutant of any one of paragraphs 1 to 7, which comprises an heterologous nucleic acid sequence coding for an immunogen from a pathogenic viral, parasitic or bacterial agent, for a therapeutic protein, for an allergen, for a growth factor or for a cytokine.

9- An immunogenic composition comprising an attenuated mutant according to any one of paragraphs 1 to 8, and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, vehicle or excipient.

10- The immunogenic composition of paragraph 9 comprising further an adjuvant.

11- A vaccine comprising an attenuated mutant according to any one of paragraphs 1 to 8, and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, vehicle or excipient.

12- The vaccine of paragraph 11 comprising further an adjuvant.

13- An immunogenic composition comprising a polypeptide having an identity which is equal or more than 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% with an amino acid sequence coded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of nucleotide sequences identified SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93 and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, vehicle or excipient, and optionally an adjuvant.

14- An antibody preparation comprising an antibody specific to a polypeptide having an identity which is equal or more than 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% with an amino acid sequence coded by a

nucleotide sequence selected from the group consisting of nucleotide sequences identified SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93.

- 15- Diagnostic method for detecting infection by a gram negative
5 bacterium, using a polypeptide having an identity which is equal or more than 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% with an amino acid sequence coded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of nucleotide sequences identified SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, or an antibody specific
10 to said polypeptide.

16- Use of an antibody preparation according to paragraph 14 for the production of a passive immunization composition or a therapeutic composition against gram negative bacteria.

- 17- Use of a nucleotide sequence selected from the group consisting of
15 nucleotide sequences identified SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, or a fragment of at least 20 nucleotides, as primers for PCR for detection of gram negative bacteria in a media.

* * *

- 20 Having thus described in detail preferred embodiments of the present invention, it is to be understood that the invention defined by the above paragraphs is not to be limited to particular details set forth in the above description as many apparent variations thereof are possible without departing from the spirit or scope of the present invention.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A mutant of a gram negative bacterium having a mutation in a first nucleotide sequence that codes for a first polypeptide and results in the bacterium having attenuated virulence, wherein:
 - 5 the first polypeptide has an amino acid sequence;
 - a second polypeptide has an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence identified as SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, or 93; and
 - the amino acid sequence of the first polypeptide is the same as that of the
 10 second polypeptide, or the amino acid sequence of the first polypeptide has an identity which is equal to or more than 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% with the amino acid sequence of the second polypeptide.
 2. The mutant of claim 1, wherein the bacterium is a *Pasteurellaceae*.
 3. The mutant of claim 2, wherein the bacterium is: *Pasteurella*
15 *multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* or *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
 4. The mutant of claim 3, wherein the bacterium is *Pasteurella multocida*.
 5. The mutant of claim 1, wherein the mutation is a deletion in the first
 20 nucleotide sequence, or an insertion into it or replacement of nucleic acids.
 6. The mutant of claim 5, wherein the mutation is the deletion of the whole first nucleotide sequence.
 7. The mutant of claim 5, wherein the mutation is an insertion between:
 nucleotides 180-181 or nucleotides 182-183 or nucleotides 190-191 in SEQ ID NO:
 25 2, nucleotides 77-78 or nucleotides 1026-1027 or nucleotides 1027-1028 in SEQ ID NO: 6, nucleotides 416-417 in SEQ ID NO: 9, nucleotides 389-390 in SEQ ID NO: 12, nucleotides 381-382 in SEQ ID NO: 16, nucleotides 219-220 in SEQ ID NO: 19, nucleotides 1353-1354 in SEQ ID NO: 22, nucleotides 136-137 in SEQ ID NO: 25, nucleotides 384-385 in SEQ ID NO: 28, nucleotides 222-223 or nucleotides 225-226
 30 in SEQ ID NO: 31, nucleotides 217-218 in SEQ ID NO: 34, nucleotides 1411-1412 in SEQ ID NO: 37, nucleotides 943-944 in SEQ ID NO: 40, nucleotides 855-856 in SEQ ID NO: 43, nucleotides 369-370 in SEQ ID NO: 46, nucleotides 111-112 in SEQ ID NO: 49, nucleotides 443-444 in SEQ ID NO: 52, nucleotides 4-5 in SEQ ID

NO: 55, nucleotides 573-574 in SEQ ID NO: 61, nucleotides 875-876 in SEQ ID NO: 64, nucleotides 218-219 in SEQ ID NO: 70, nucleotides 1072-1087 in SEQ ID NO: 75, nucleotides 64-65 in SEQ ID NO: 78, nucleotides 282-283 in SEQ ID NO: 81, nucleotides 1431-1432 in SEQ ID NO: 84, nucleotides 974-975 in SEQ ID NO: 87, nucleotides 802-803 in SEQ ID NO: 90, nucleotides 850-851 in SEQ ID NO: 92; or immediately upstream nucleotide 1 in SEQ ID NO: 58; or immediately upstream nucleotide 1 in SEQ ID NO: 67.

8. The mutant of claim 1, which comprises an heterologous nucleic acid sequence.
- 10 9. The mutant of claim 9 wherein the heterologous nucleic acid sequence codes for an immunogen from a pathogenic viral, parasitic or bacterial agent, a therapeutic protein, an allergen, a growth factor or a cytokine.
- 15 10. An immunogenic composition or vaccine comprising a mutant according to claim 1, and a pharmaceutically or veterinarily acceptable diluent, carrier, vehicle or excipient.
11. The immunogenic composition or vaccine of claim 10 further comprising an adjuvant.
12. An immunogenic composition or vaccine comprising a mutant according to claim 9, and a pharmaceutically or veterinarily acceptable diluent, carrier, vehicle or excipient.
- 20 13. The immunogenic composition or vaccine of claim 12 further comprising an adjuvant.
14. An isolated first polypeptide having an amino acid sequence, wherein there is:
25 a second polypeptide having an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence identified as SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, or 93; and
the amino acid sequence of the first polypeptide is the same as that of the second polypeptide, or the amino acid sequence of the first polypeptide has an
30 identity which is equal to or more than 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% with the amino acid sequence of the second polypeptide.

15. An immunogenic or vaccine composition containing the isolated first polypeptide of claim 14, and a pharmaceutically or veterinarily acceptable diluent, carrier, vehicle or excipient, and optionally an adjuvant.

5 16. An antibody preparation comprising an antibody specific to the first isolated polypeptide of claim 14.

17. A diagnostic method for detecting infection by a gram negative bacterium, comprising detecting in a sample the first isolated polypeptide of claim 14 or an antibody specific to that first isolated polypeptide.

10 18. A passive immunization method comprising administering the antibody preparation according to claim 16.

19. An isolated nucleic acid molecule having a sequence identified as SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, or 93.

15 20. A PCR primer for detecting gram negative bacteria comprising an isolated nucleic acid molecule having a sequence that is at least 10 contiguous nucleic acids of a nucleotide sequence identified as SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, or 93.

20 21. The mutant of claim 1 wherein the mutant is a mutant gram negative bacterium having a mutation in a nucleotide sequence that codes for a polypeptide and results in the bacterium having attenuated virulence, wherein: the polypeptide has an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence identified as SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, or 93.

25 22. The isolated polypeptide of claim 14 having an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence identified as SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, or 93.

30 23. The mutant of claim 1 which is mutant 4G11 available under the accession number CNCM I-2999, or a bacterium having all the identifying characteristics thereof; mutant 5D5 mutant available under the accession number CNCM I-3000, or a bacterium having all the identifying characteristics thereof; mutant 9C8 available under the accession number CNCM I-3001, or a bacterium

having all the identifying characteristics thereof; mutant 9H4 available under the accession number CNCM I-3002, or a bacterium having all the identifying characteristics thereof; or mutant 13E1 available under the accession number CNCM I-3003, or a bacterium having all the identifying characteristics thereof.

5 24. An isolated nucleic acid molecule having a sequence identified as SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96 or 97.

 25. A PCR primer for detecting gram negative bacteria comprising an isolated nucleic acid molecule having a sequence that is at least 10 contiguous
10 nucleic acids of a nucleotide sequence identified as SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, or 97.

 26. A mutant gram negative bacteria having a mutation in a nucleotide sequence identified as SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36,
15 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, or 97.

 27. The mutant of claim 26 which is a *Pasteurellaceae*.

 28. The mutant of claim 26, wherein the bacterium is: *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* or *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

20 29. The mutant of claim 26, wherein the bacterium is *Pasteurella multocida*.

 30. The mutant of claim 26, which comprises an heterologous nucleic acid sequence.

 31. The mutant of claim 30 wherein the heterologous nucleic acid
25 sequence codes for an immunogen from a pathogenic viral, parasitic or bacterial agent, a therapeutic protein, an allergen, a growth factor or a cytokine.

 32. An immunogenic composition or vaccine comprising a mutant according to claim 26, and a pharmaceutically or veterinarily acceptable diluent, carrier, vehicle or excipient.

30 33. The immunogenic composition or vaccine of claim 32 further comprising an adjuvant.

68

34. An immunogenic composition or vaccine comprising a mutant according to claim 30, and a pharmaceutically or veterinarily acceptable diluent, carrier, vehicle or excipient.

35. The immunogenic composition or vaccine of claim 34 further
5 comprising an adjuvant.

36. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of claim 24.

PCT
REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty

International Application No.
International Filing Date
Name of receiving Office and "PCT International Application"
Applicant's or agent's file reference (if desired)(12 characters maximum) 454313-3171.1WO

Box No. I	TITLE OF INVENTION ATTENUATEDGRAM NEGATIVE BACTERIA	
Box No. II	APPLICANT ☐ This person is also inventor.	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)		Telephone No.
MERIAL LIMITED, Registered in England and Wales No. 3332751 With Registered Office at P.O. Box 327 Sandringham House, Sandringham Avenue Harlow Business Park, Harlow Essex CM19 5TG, England And domesticated in Delaware, USA as Merial LLC, with a place of business at 3239 Satellite Blvd., Duluth, GA 30096-4640		Facsimile No.
		Teleprinter No.
		Applicant's Registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US		State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☒ all designated states ☐ all designated states except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the states indicated in the Supplemental Box		
Box No. III	FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)		This person is:
CROOKE, Helen Rachel 545 Eekdale Road, Winnersh Triangle Wokingham Berkshire RG41 5TU United Kingdom		☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☒ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)
		Applicant's registration No. with the Office:
State (that is, country) of nationality:		State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated states ☐ all designated states except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the states indicated in the Supplemental Box		
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.		
Box No. IV	AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:		☒ agent ☐ common representative
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)		Telephone No. (212) 588-0800
FROMMER, William S. KOWALSKI, Thomas J. Frommer Lawrence & Haug LLP 745 Fifth Avenue New York, New York 10151 United States of America		Facsimile No. (212) 588-0500
		Teleprinter No.
		Agent's registration No. with the Office 25,506 and 32,147
☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.		

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) SHEA, Jacqueline Elizabeth 545 Eakdale Road, Winnersh Triangle Wokingham Berkshire RG41 5TU United Kingdom	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☒ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below) Agent's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated states ☐ all designated states except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the states indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) FELDMAN, Robert Graham 545 Eakdale Road, Winnerah Triangle Wokingham Berkshire RG41 5TU United Kingdom	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☒ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below) Agent's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated states ☐ all designated states except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the states indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) COUTEBROZE, Sylvain Gabriel 12 Rue Dansard 69007 Lyon, France	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☒ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below) Agent's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated states ☐ all designated states except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the states indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) LEGROS, Francois-Xavier 85 Avenue de Gadagne 69230, Saint Genis Laval, France	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☒ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below) Agent's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated states ☐ all designated states except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the states indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	

71

Box No. V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ **AP** ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)
- ☒ **EA** Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** European Patent: AT Austria, BE Belgium, BG Bulgaria, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, CZ Czech Republic, DE Germany, DK Denmark, EE Estonia, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, HU Hungary, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, SK Slovakia, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA** OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line).

- | | | |
|---|--|---|
| ☒ AE United Arab Emirates | ☒ GR Greece | ☒ MX Mexico |
| ☒ AG Antigua and Barbuda | ☒ GM Gambia | ☒ MZ Mozambique |
| ☒ AL Albania | ☒ HR Croatia | ☒ NO Norway |
| ☒ AM Armenia | ☒ HU Hungary | ☒ NZ New Zealand |
| ☒ AT Austria | ☒ ID Indonesia | ☒ OM Oman |
| ☒ AU Australia | ☒ IL Israel | ☒ PH Philippines |
| ☒ AZ Azerbaijan | ☒ IN India | ☒ PL Poland |
| ☒ BA Bosnia and Herzegovina | ☒ IS Iceland | ☒ PT Portugal |
| ☒ BB Barbados | ☒ JP Japan | ☒ RO Romania |
| ☒ BG Bulgaria | ☒ KE Kenya | ☒ RU Russian Federation |
| ☒ BR Brazil | ☒ KG Kyrgyzstan | |
| ☒ BY Belarus | ☒ KP Democratic People's Republic of Korea | ☒ SC Seychelles |
| ☒ BE Belgium | ☒ KR Republic of Korea | ☒ SD Sudan |
| ☒ CA Canada | ☒ KZ Kazakhstan | ☒ SE Sweden |
| ☒ CH & LI Switzerland and Liechtenstein | ☒ LC Saint Lucia | ☒ SG Singapore |
| ☒ CN China | ☒ LK Sri Lanka | ☒ SK Slovakia |
| ☒ CO Colombia | ☒ LR Liberia | ☒ SL Sierra Leone |
| ☒ CR Costa Rica | ☒ LS Lesotho | ☒ TJ Tajikistan |
| ☒ CU Cuba | ☒ LT Lithuania | ☒ TM Turkmenistan |
| ☒ CZ Czech Republic | ☒ LU Luxembourg | ☒ TN Tunisia |
| ☒ DE Germany | ☒ LV Latvia | ☒ TR Turkey |
| ☒ DK Denmark | ☒ MA Morocco | ☒ TT Trinidad and Tobago |
| ☒ DM Dominica | ☒ MD Republic of Moldova | |
| ☒ DZ Algeria | ☒ MG Madagascar | ☒ TZ United Republic of Tanzania |
| ☒ EC Ecuador | ☒ MK The Former Yugoslav Republic of Macedonia | ☒ UA Ukraine |
| ☒ EE Estonia | ☒ MN Mongolia | ☒ UG Uganda |
| ☒ ES Spain | ☒ MW Malawi | ☐ US United States of America |
| ☒ FI Finland | | ☒ UZ Uzbekistan |
| ☒ GB United Kingdom | | ☒ VC Saint Vincent and the Grenadines |
| ☒ GD Grenada | | ☒ VN Viet Nam |
| ☒ GE Georgia | | ☒ YU Yugoslavia |
| | | ☒ ZA South Africa |
| | | ☒ ZM Zambia |
| | | ☒ ZW Zimbabwe |

Check-box reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- ☐ ☐ ☐
- ☐ ☐ ☐

Provisional Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT, except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that these additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

72

Box No. VI PRIORITY CLAIM				
The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:				
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier applications	Where earlier application is:		
		national application: country or member of WTO	Regional application: * Regional Office	international application: receiving Office
Item (1) 05/04/02	60/370,282	US		
Item (2) 03/04/03	NOT YET ASSIGNED	US		
Item (3)				
Item (4)				
Item (5)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

☐ all items ☒ item (1) ☒ item (2) ☐ item (3) ☐ item (4) ☐ item (5) ☐ other, see Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)): _____

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY	
Choice of International Searching Authority (ISA) (If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):	
ISA/ <u>US</u>	
Request to use results of earlier search; reference to that search (If an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):	
Date (day/month/year)	Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS	
The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable)	
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor :
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent :
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application :
☐ Box No. VIII (vi)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) :
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty :

73

Box No. IX CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING																																																																						
This international application contains: (a) the following number of sheets in paper form: request (including declaration sheets) : 5 description (excluding sequence listing and/or tables related thereto) : 60 claims : 5 abstract : 1 drawings : 2 Sub-Total number of sheets: 38 Sequence Listing: (for book, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below) : 104 Total number of sheets : 213 (b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listings (ii) ☐ tables related thereto (c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii)) (i) ☐ sequence listings (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the ☐ sequence listings ☐ tables related thereto (additional copies to be indicated under items 9(i) and/or 10(ii), in right column)	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item): <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30px;">1.</td> <td style="width: 70%;">☒ the calculation sheet</td> <td style="width: 10%; text-align: right;">:</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">1</td> </tr> <tr> <td>2.</td> <td>☐ original separate power of attorney</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>3.</td> <td>☐ original general power of attorney</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>4.</td> <td>☐ copy of general power of attorney, reference number, if any:</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>5.</td> <td>☐ statement of explaining lack of signature</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>6.</td> <td>☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>7.</td> <td>☐ translation of international application into (language):</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>8.</td> <td>☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>9.</td> <td>☒ sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other))</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>(i) ☒ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part contained in left column</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>10.</td> <td>☐ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers)</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quarter) only (and not as part of the international application)</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quarter)</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column</td> <td>:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>11.</td> <td>☐ other (specify):</td> <td>:</td> <td></td> </tr> </table>	1.	☒ the calculation sheet	:	1	2.	☐ original separate power of attorney	:		3.	☐ original general power of attorney	:		4.	☐ copy of general power of attorney, reference number, if any:	:		5.	☐ statement of explaining lack of signature	:		6.	☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:		7.	☐ translation of international application into (language):	:		8.	☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:		9.	☒ sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other))	:			(i) ☒ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)	:			(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	:			(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part contained in left column	:		10.	☐ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers)	:			(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quarter) only (and not as part of the international application)	:			(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quarter)	:			(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column	:		11.	☐ other (specify):	:		Number of items
1.	☒ the calculation sheet	:	1																																																																			
2.	☐ original separate power of attorney	:																																																																				
3.	☐ original general power of attorney	:																																																																				
4.	☐ copy of general power of attorney, reference number, if any:	:																																																																				
5.	☐ statement of explaining lack of signature	:																																																																				
6.	☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:																																																																				
7.	☐ translation of international application into (language):	:																																																																				
8.	☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:																																																																				
9.	☒ sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other))	:																																																																				
	(i) ☒ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)	:																																																																				
	(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	:																																																																				
	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part contained in left column	:																																																																				
10.	☐ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers)	:																																																																				
	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quarter) only (and not as part of the international application)	:																																																																				
	(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quarter)	:																																																																				
	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column	:																																																																				
11.	☐ other (specify):	:																																																																				
Figure of the drawings which should accompany the abstract:		Language of filing of the international application: English																																																																				
Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE <i>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signed (if such capacity is not obvious from reading the request).</i>  William S. Frouinier																																																																						
For receiving Office use only																																																																						
1. Date of actual receipt of the purported international application: 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11 (2): 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:																																																																					
6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.																																																																						
For International Bureau use only																																																																						
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:																																																																						

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

FROMMER, William, S.
Frommer Lawrence & Haug LLP
745 Fifth Avenue
New York, NY 10151
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

DOCKETED

Date of mailing (day/month/year) 23 October 2003 (23.10.03)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 454313-3171.1WO			
International application No. PCT/US03/10308	International filing date (day/month/year) 04 April 2003 (04.04.03)	Priority date (day/month/year) 05 April 2002 (05.04.02)	
Applicant MERIAL LLC			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

AU, AZ, BY, CH, CN, CO, DE, DZ, HU, JP, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, RU, TM

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CR, CU, CZ, DK, DM, EA, EC, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 23 October 2003 (23.10.03) under No. 03/088277

4. **TIME LIMITS** for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Judith Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.91.11

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

FROMMER, William, S.
Frommer Lawrence & Haug LLP
745 Fifth Avenue
New York, NY 10151
United States of America

DOCKETED

Date of mailing (day/month/year) 26 November 2003 (26.11.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 454313-3171.1WO	
International application No. PCT/US03/10308	International filing date (day/month/year) 04 April 2003 (04.04.03)
International publication date (day/month/year) 23 October 2003 (23.10.03)	Priority date (day/month/year) 05 April 2002 (05.04.02)
Applicant MERIAL LLC	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
05 April 2002 (05.04.02)	60/370,282	US	07 May 2003 (07.05.03)
03 April 2003 (03.04.03)	10/406,686	US	24 Nov 2003 (24.11.03)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.87.20	Authorized officer José BAZAN HERNANDEZ Telephone No. (41-22) 338 8772
--	--

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To: WILLIAM S. FROMMER FROMMER LAWRENCE & HAUG LLP 745 FIFTH AVENUE NEW YORK, NEW YORK 10151	PCT DOCKETED NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM (PCT Rules 26bis.1 and 26bis.2 and Administrative Instructions, Sections 302 and 314)
Date of mailing (day/month/year) 21 NOV 2003	Applicant's or agent's file reference 454313-3171.
International application No. PCT/US03/10308	International filing date (day/month/year) 04 Apr 2003
Applicant MERIAL LIMITED REGISTRATERED IN ENGLAND & WALES NO.3332751 WITH REGISTERED OFFICE	

The applicant is hereby notified of the following in respect of the priority claim(s) made in the international application.

1. ☒ **Correction of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on : 02 JUNE 2003
 the following priority claim has been corrected to read as follows:
 US 03 APRIL 2003 10/408,888
☒ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
2. ☐ **Addition of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on :
 the following priority claim has been added:
☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
3. ☐ **As a result of the correction and/or addition of (a) priority claim(s) under items 1 and/or 2, the (earliest) priority date is:**
4. ☐ **The priority claim (see also item 5, below, if applicable) is considered not to have been made because:**
☐ the applicant failed to respond to the invitation under Rule 26bis.2(a) (Form PCT/RO/110) within the prescribed time limit.
☐ the applicant's notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(a).
☐ the applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10.
 The applicant may, before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee, request the International Bureau to publish, together with the international application, information concerning the priority claim. See Rule 26bis.2(c) and the *PCT Applicant's Guide*, Volume I, Annex B3(1B).
5. ☒ **In case where multiple priorities have been claimed, the above item(s) relate to the following priority claim(s):**
 ITEM 2
6. **A copy of this notification has been sent to the International Bureau and**
☒ **to the International Searching Authority**

Name and mailing address of the receiving Office Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 703-305-3230	Authorized officer Virginia Irby VI Telephone No. 703-305-3748
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:
WILLIAM S. FROMMER
FROMMER LAWRENCE & HAUG LLP
745 FIFTH AVENUE
NEW YORK, NEW YORK 10151

PCT

NOTIFICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION NUMBER AND OF THE
INTERNATIONAL FILING DATE

(PCT Rule 20.5(c))

Date of mailing (day/month/year) 01 May 2003

Applicant's or agent's file reference
454313-3171.1WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US03/10308

International filing date (day/month/year)
04 Apr 2003

Priority date (day/month/year)
05 Apr 2002

Applicant
MERIAL LIMITED REGISTRATERED IN ENGLAND & WALES NO.3332751 WITH REGISTERED OFFICE

Title of the invention
ATENUATEDGRAM NEGATIVE BACTERIA

1. The applicant is hereby notified that the international application has been accorded the international application number and the international filing date indicated above.

2. The applicant is further notified that the record copy of the international application:

- ☒ was transmitted to the International Bureau on 01 May 2003
- ☐ has not yet been transmitted to the International Bureau for the reason indicated below and a copy of this notification has been sent to the International Bureau*:
- ☐ because the necessary national security clearance has not yet been obtained.
- ☐ because (reason to be specified):

* The International Bureau monitors the transmittal of the record copy by the receiving Office and will notify the applicant (with Form PCT/IB/301) of its receipt. Should the record copy not have been received by the expiration of 14 months from the priority date, the International Bureau will notify the applicant (Rule 22.1(c)).

3. FOREIGN TRANSMITTAL LICENSE INFORMATION

Completed by: JW

- ☐ Additional license for foreign transmittal not required. This subject matter is covered by a license already granted or the equivalent U.S. national application. Refer to that license for information concerning its scope.
- ☐ License for foreign transmittal not required. 37 CFR 5.11(e)(1) or 37 CFR 5.11(e)(2). However, a license may be required for additional subject matter. See 37 CFR 5.15(b).
- ☒ Foreign transmittal license granted. 35 U.S.C. 184; 37 CFR 5.11 on 28 Apr 2003 :
- ☐ 37 CFR 5.15(a) ☒ 37 CFR 5.15(b) (date)

Name and mailing address of the receiving Office
Assistant Commissioner for Patent, Box PCT
Washington, D.C. 20231 Attn:RO/US
Facsimile No. 703-305-3230

Authorized officer
Jeanette Washington
Telephone No. 703-305-3887

TRANSMITTAL LETTER TO THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

Date	04 April 2003
International Application No	
Attorney Docket No.	454313-3171.1WO

78

I. Certification under 37 CFR 1.10 (if applicable)

EV 196783171US	04 April 2003
Express Mail mailing number	Date of Deposit

I hereby certify that the application/correspondence attached hereto is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Box PCT, Washington, D.C. 20231.

	Edward Nay
Signature of person mailing correspondence	Typed or printed name of person mailing correspondence

II. ☒ New International Application

TITLE	ATTENUATED GRAM NEGATIVE BACTERIA	Earliest priority Date (Day/Month/Year)
		05/04/02

SCREENING DISCLOSURE INFORMATION: In order to assist in screening the accompanying international application for purposes of determining whether a license for foreign transmittal should and could be granted and for other purposes, the following information is supplied. (Note: check as many boxes as apply):

A. ☐ The invention disclosed was not made in the United States.

B. ☐ There is no prior U.S. application relating to this invention.

C. ☒ The following prior U.S. application(s) contain subject matter which is related to the invention disclosed in the attached international application. (Note: priority to these applications may or may not be claimed on form PCT/RO/101 (Request) and this listing does not constitute a claim for priority.)

application no.	60/370,282	Filed on	05 April 2002
application no.	TO BE ASSIGNED	Filed on	03 April 2003

D. ☐ The present international application ☐ contains additional subject matter not found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C above. The additional subject matter on pages _____ and ☐ DOES NOT ALTER ☐ MIGHT BE CONSIDERED TO ALTER the general nature of the invention in a manner which would require the U.S. application to have been made available for inspection by the appropriate defense agencies under 35 U.S.C. 181 and 37 CFR 5.1. See 37 CFR 5.15.

III. ☐ A Response to an Invitation from the RO/US. The following document(s) is(are) enclosed:

A. ☐ A Request for An Extension of Time to File a Response.

B. ☐ A Power of Attorney (General or Regular)

C. ☐ Replacement Pages:

Pages		Of the request (PCT/RO/101)	pages		of the figures
Pages		Of the description	pages		of the abstract
Pages		Of the claims			

D. ☐ Submission of Priority Documents

Priority document		Priority document	
-------------------	--	-------------------	--

E. ☒ Fees as specified on attached Fee Calculation sheet form PCT/RO/101 annex

IV. ☐ A Request for Rectification under PCT 91 ☐ A Petition ☐ A Sequence Listing Diskette

V. ☒ Other (please specify): Check in the amount of \$3,224.00

☐ Applicant	William S. Frommer
☒ Attorney/Agent (Reg. No. 25,506)	Typed name of signer
☐ Common Representative	
	Signature

79

For receiving office use only

PCT
FEE CALCULATION
Annex to the Request

Applicant's or agent's
file reference **454313-3171.1WO**

International application no.

Date stamp of the receiving Office

Applicant **MERIAL LIMITED**

CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE..... **\$240.00** **T**

2. SEARCH FEE..... **\$450.00** **S**

International search to be carried out by **ISA**
(If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.)

3. INTERNATIONAL FEE

Basic Fee

Where item (b) of Box No. IX applies, enter Sub-Total number of sheets } **213**
Where item (b) of Box No. IX does not apply, enter Total number of sheets

b1 first 30 sheets **\$ 407.00** **b1**

b2 **183** x **\$9.00** = **\$1,647.00** **b2**

number of sheets in excess of 30 fee per sheet

b3 additional component (only if sequence listings and/or tables related thereto are filed in computer readable form under Section 801(a)(i), or both in that form and on paper, under Section 801(a)(ii):

400 x **b3**

fee per sheet

Add amounts entered at b1, b2 and b3 enter total at B **\$2,054.00** **B**

Designation Fees

The international application contains **ALL** designations except the U.S.

5 x **\$88.00** = **\$ 440.00** **D**

Number of designation fees payable (maximum 9) amount of designation fee

Add amounts entered at B and D and enter total at I

\$2,494.00 **I**

(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 25% of the sum of the amounts entered at B and D.)

4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT (if applicable)..... **\$40.00** **P**

5. TOTAL FEES PAYABLE..... **\$3,224.00**

Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box **TOTAL**

☐ The designation fees are not paid at this time

MODE OF PAYMENT

☐ Authorization to charge deposit account (see below) ☐ postal money order ☐ cash ☐ coupons

☒ cheque ☐ bank draft ☐ revenue stamps ☐ other (specify):

AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT
(This mode of payment may not be available at all receiving Offices)

The Commissioner is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayments to **Fremmer Lawrence & Haug LLP Account No. 90-0320**

☐ Authorization to charge the total fees indicated above.

☒ (This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the receiving Office so permit) Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.

☐ Authorization to charge the fee for priority document.

Receiving Office: **BOVUS**

Deposit Account No.: **50-0320**

Date: **April 4, 2003**

Name: **William S. Fremmer**

Signature: 

BACTERIA ATENUADA GRAM NEGATIVA**SOLICITUD/INCORPORACIÓN RELACIONADA POR REFERENCIA**

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional U.S. Serie No. 60/370,282, presentada en Abril 5, 2002, incorporada aquí como referencia. La anterior solicitud, y todos los documentos citados aquí o durante su trámite ("documentos citados de la solicitud") y todos los documentos citados o referenciados en los documentos citados en la solicitud, y todos los documentos citados o referenciados aquí ("documentos citados aquí"), y todos los documentos citados o referenciados en los documentos citados aquí, junto con cualquiera de las instrucciones, descripciones, especificaciones del producto, y hojas del producto del fabricante para cualquiera de los productos mencionados aquí o en cualquier documento incorporado como referencia aquí, son incorporados aquí como referencia, y se pueden emplear en la práctica de la invención.

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona con bacterias gram negativas atenuadas. Las bacterias gram negativas atenuadas se pueden utilizar en composiciones inmunogénicas o en composiciones de vacuna, por ejemplo, para la prevención de infecciones bacteriales, así como también en investigación, como cepas atenuadas que presentan un mayor grado de seguridad a los investigadores y aquellos (por ejemplo, animales, humanos) con quienes ellos entran en contacto.

La invención de acuerdo con esto se relaciona con composiciones inmunogénicas o de vacuna que comprenden bacterias gram negativas de la invención; por ejemplo bacteria gram negativa atenuada viva. La bacteria también se podría inactivar en las composiciones; pero puede ser ventajoso que las bacterias sean bacterias vivas atenuadas gram negativas. La invención por lo tanto se relaciona además con métodos para preparar y/o formular tales composiciones; por ejemplo cultivar o hacer crecer o hacer propagar las bacterias en un medio adecuado, cosechar las bacterias, opcionalmente inactivar las bacterias, y mezclarlas con un portador veterinaria o

farmacéuticamente aceptable adecuado, excipiente, diluyente o vehículo y/o adyuvante y/o estabilizador; o, mezclando las bacterias con un portador veterinaria o farmacéuticamente aceptable adecuado, excipiente, diluyente o vehículo y/o adyuvante y/o estabilizador. Así, la invención también se relaciona con el uso de bacterias para formular tales composiciones.

Las bacterias atenuadas también pueden actuar como un vector de expresión o replicación, por ejemplo, para replicar y/o expresar una molécula de ácido nucleico heteróloga a la bacteria atenuada, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un inmunógeno, antígeno o epítipo de un agente patogénico, tal como un agente patogénico que es diferente de la bacteria atenuada. El uso de bacteria atenuada como un vector también suministra un mayor grado de seguridad a los investigadores o técnicos que trabajan con los vectores atenuados y aquellos (por ejemplo, animales, humanos) con quienes ellos pueden entrar en contacto.

La invención por lo tanto además se relaciona con métodos para preparar tales vectores, por ejemplo, transformar la bacteria de tal forma que la bacteria contenga y

opcionalmente exprese una molécula de ácido nucleico heteróloga.

La invención también se relaciona con el uso de tales vectores, por ejemplo, un método para producir un producto de gen, por ejemplo, polipéptido tal como un inmunógeno, epítipo o antígeno, heterólogo a la bacteria que comprende cultivar, hacer crecer, o hacer propagar bacterias transformadas para contener y expresar una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica el producto de gen bajo condiciones adecuadas para la expresión, y opcionalmente cosechar o aislar o separar el producto de gen; o, cosechar o aislar o separar el producto de gen de la bacteria transformada para expresarla; o, un método para elicitar una respuesta inmunogénica o una respuesta inmunogénica contra un producto de gen y/o la bacteria o una respuesta inmune protectora como para un patógeno del cual se deriva el producto de gen o se obtiene y/o la bacteria comprende administrar a un sujeto, por ejemplo, animal, tal como un animal susceptible de infección por el patógeno y/o la bacteria, por ejemplo, un bovino o un pavo, bacterias transformadas para expresar el producto de gen, o un método para preparar una composición inmunogénica,

inmunológica o vacuna que comprende mezclar el vector o la bacteria transformada con un portador farmacéutica o veterinariamente adecuado, diluyente, vehículo o excipiente y/o adyuvante y/o estabilizador.

La invención también se relaciona con objetivos para la atenuación de bacterias, por ejemplo, secuencias de nucleótido mutadas o genes que codifican los objetivos para atenuación de bacterias, y métodos para polipéptidos objetivo para atenuación de bacterias y métodos para generar bacterias atenuadas. Los objetivos para atenuación se pueden utilizar como compuestos inmunogénicos, por ejemplo, en composiciones inmunogénicas o en composiciones de vacuna o para generar epítomos para uso en composiciones inmunogénicas o de vacuna. Así, la invención se relaciona con el uso de objetivos para la atenuación en la preparación de composiciones, por ejemplo, mezclar con un portador, diluyente, excipiente o vehículo y/o adyuvante y/o un estabilizador farmacéutica o veterinariamente aceptable.

La invención se relaciona además con métodos para inducir una respuesta inmunológica o inmunogénica o inmune protectora en un sujeto, por ejemplo, un animal, tal como

un animal susceptible de infección por medio de una bacteria gram negativa, tal como *Pasteurela*, por ejemplo, un pavo o bovino, que comprende administrar al animal una vacuna o composición inmunogénica de la invención.

De manera adicional la invención se relaciona con preparar tal bacteria atenuada, por ejemplo, bacteria gram negativa, tal como *Pasteurela*; por ejemplo, que comprende introducir uno o más elementos responsables en la bacteria y aislar la bacteria que contiene el elemento transponible que no origina mortalidad en una especie objetivo (y son de esta manera atenuadas). Uno puede adicionalmente de manera opcional identificar las mutaciones en la bacteria, para permitir de esta manera medios alternativos para producir la bacteria atenuada.

La invención se relaciona aún adicionalmente con tales medios alternativos para producir la bacteria atenuada. En razón a que las mutaciones son identificadas o caracterizadas, las mutaciones se pueden introducir en la bacteria a través de técnicas diferentes a introducir uno o más elementos responsables en la bacteria, tal como por recombinaciones homólogas, por ejemplo, recombinación homóloga por medio de la cual una porción del genoma

bacterial resulta en al menos una adición a éste (inserción) o una supresión de éste (dos o más adiciones y/o supresiones también se prevén) o una sustitución (tal como el reemplazo de al menos un nucleótido por otro). De acuerdo con esto, la invención se relaciona con un método para producir una bacteria atenuada que contiene una modificación o mutación conocida o previamente identificada, por ejemplo, la modificación o mutación aquí identificada que comprende introducir una supresión o inserción o reemplazo en el genoma bacterial, ventajosamente a través de la combinación y opcionalmente identificar y/o aislar la bacteria que contiene la modificación o mutación.

De esta manera, la invención se relaciona además con un mutante de una bacteria gram negativa, en donde dicha bacteria tiene al menos una mutación en una secuencia de nucleótido que codifica para un polipéptido que tiene una identidad que es igual o mayor del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de las secuencias de nucleótido identificadas ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58,

61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93; dicha mutación resulta en virulencia atenuada de la bacteria. Y, la invención se relaciona con los usos, composiciones y métodos involucrados con tal bacteria como se describe aquí.

ANTECEDENTES

Está bien establecido que los microorganismos vivos atenuados pueden ser vacunas altamente efectivas, respuestas inmunes elicitadas por tales vacunas son a menudo de mayor magnitud y de mayor duración que aquellas producidas por inmunógenos no replicantes. Una explicación para esto puede ser que las cepas vivas atenuadas establezcan infecciones limitadas en huéspedes y semejen las etapas tempranas de la infección natural. Además, a diferencia de las preparaciones muertas o inactivadas, las vacunas vivas son capaces de inducir potentes respuestas mediadas por célula que pueden estar conectadas con su capacidad para replicar en células que presentan antígeno, tales como macrófagos.

Ha habido una larga historia de uso de vacunas vivas atenuadas en animales y humanos, que utilizan



notablemente técnicas de mutagénesis química. Sin embargo, las vacunas empíricamente atenuadas pueden revertir a virulencia.

Las técnicas de biología molecular moderna, acopladas con incrementar el conocimiento de patogénesis bacterial, ha conducido a la identificación de varios genes que están involucrados en el crecimiento y supervivencia del microorganismo *in vivo*. Esto ha suministrado nuevos objetivos de gen para la atenuación, y al concepto de que las cepas de vacunas futuras podrían ser "relacionalmente" atenuadas al introducir mutaciones definidas sin reversión en genes seleccionados conocidos por estar involucrados en virulencia, ver por ejemplo WO-A-00/61724, WO-A-00/68261 y EP-A-0889120.

Aunque muchas cepas atenuadas se han producido en laboratorios, solamente unas pocas se han calificado como candidatos potenciales a vacuna para uso en animales. Esto puede ser debido en parte a la necesidad de balancear la inmunogenicidad de la vacuna con la posibilidad del microorganismo de revertir, volverse reactivo y patogénico.

Es claro que la selección de los genes apropiados para atenuación, quien dará como resultado un candidato a vacuna adecuado, no es directo y no puede ser fácilmente predicho. Muchos factores pueden influenciar la aceptabilidad de un mutante atenuado, una vacuna, y consecuentemente se requieren esfuerzos de investigación para identificar y seleccionar los genes atenuantes adecuados. Muchos experimentos de atenuación fueron conducidos solamente *in vitro* y los resultados no se pueden extrapolar *in vivo*, notablemente en relación con la patogenicidad residual de los mutantes resultantes para los animales vacunados.

Se hace mención de:

Kachlany SC, Planet PJ, Bhattacharjee MK, Kollia E, DeSalle R, Fine DH, Figurski DH., Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in bacteria and archaea. J Bacteriol. 2000 Nov; 182(21): 6169-76.

Fuller TE, Martin S, Teel JF, Alaniz GR, Kennedy MJ, Lowery DE., Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged

mutagenesis in a swine infection model. Microb Pathog. 2000 Jul; 29(1): 39-51.

Fuller TE, Kennedy MJ, Lowery DE., Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. Microb Pathog. 2000 Jul; 29(1): 25-38.

Kehrenberg C, Werckenthin C, Schwarz S., Tn5706, a transposon- like element from *Pasteurella multocida* mediating tetracycline resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Aug; 42(8): 2116-8.

DeAngelis PL., Transposón Tn916 insertional mutagenesis of *Pasteurella multocida* and direct sequencing of disruption site. Microb Pathog. 1998a Apr; 24(4): 203-9.

DeAngelis PL, Jing W, Drake RR, Achyuthan AM., Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. J Biol Chem. 1998b Apr 3; 273(14): 8454-8.

Lee MD, Henk AD., Tn10 insertional mutagenesis in *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol. 1996 May; 50(1-2): 143-8.

Choi KH, Maheswaran SK, Choi CS., Colorimetric assay using XTT for assessing virulence of avian *Pasteurella multocida* strains. Vet Microbiol. 1995 Jul; 45(2-3): 191-200.

Nnalue NA. Tn7 inserts in both orientations at a single chromosomal location and apparently forms cointegrates in *Pasteurella multocida*. Mol Microbiol. 1990 Jan; 4(1): 107-17.

Stocker US Patents Nos. 4,550,081, 4,837,151, 5,210,035 y 5,643,771.

Highlander US Patent No. 6,180,112.

Genes Tad involucrados con Kachlany. No existe relación entre los genes Tad mutados en Kachlany y la atenuación. No existen pruebas en animales en Kachlany y los genes Tad no se seleccionan en la presente invención. Los papeles de Fuller involucran secuencias que no son

seleccionadas en la presente invención. Kehrenberg no involucra un mutante atenuado, o una Signature Tagged Mutagénesis o técnica STM; sino en su lugar, Kehrenberg involucró una inserción dirigida de un transposón (uso del elemento de inserción idéntico). DeAngelis 1998a suministra solamente una descripción general de una técnica STM, y nada alrededor de los mutantes, *per se*. DeAngelis 1998b involucró el uso de una técnica STM para insertar un transposón en el locus de biosíntesis HA (Genbank AF036004). Esta secuencia es homóloga a la secuencia Pm0775 de PM70. La secuencia que codifica el Pm0775 no se selecciona en la presente invención. Lee se relaciona con el uso de una técnica STM con un transposón Tn10; Lee no describe ni sugiere ningún ensayo o animal o ninguna investigación para mutantes atenuados; sino en su lugar, Lee involucró solo mutantes autotróficos. Aunque Choi cita un mutante con inserción transposón de *Pasteurela multocida*, y podría no haber mortalidad inducida por este mutante, Choi no contiene detalles alrededor de la localización de la inserción del transposón y por lo tanto no se puede decir que sea reproducible. Nnalue de manera similar no enseña ni sugiere la presente invención. Las patentes de Stocker involucraron la inserción de un transposón Tn10 en el gen

aroA. El gen aroA no se selecciona en la presente invención. Highlander se preocupa de la inserción de un transposón Tn1545 en el gen lktC para inactivar leucotoxina. El gen lktC no se selecciona en la presente invención. De acuerdo con esto, es sumamente creíble que la presente invención no se enseña ni se sugiere en la técnica.

Más aún, es deseable caracterizar genes o secuencias de ácido nucleico involucradas en la atenuación y sobre esta base desarrollar bacterias atenuadas, así como también vacunas o composiciones inmunogénicas atenuadas, tales como aquellas que tienen un alto grado de inmunogenicidad y que exhiben un buen perfil de seguridad con efectos colaterales limitados o sin ellos.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención suministra un mutante de una bacteria gram negativa que tiene una mutación en una primera secuencia de nucleótido que codifica para un primer polipéptido y da como resultado la bacteria que tiene virulencia atenuada, en donde:

El primer polipéptido tiene una secuencia de aminoácido;

Un segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido identificada como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, o 93; y

La secuencia aminoácido del primer polipéptido es igual que aquella del segundo polipéptido, o la secuencia aminoácido del primer polipéptido tiene una identidad que es igual o más del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la secuencia aminoácido del segundo polipéptido.

La bacteria mutante puede ser una *Pasteurelacea*, por ejemplo, la bacteria puede ser: *Pasteurela multocida*, *Pasteurela hemolítica*, *Pasteurela anatipestifer* o *Actinobacillus pleuropneumonie*; ventajosamente *Pasteurela multocida*.

La mutación puede ser una supresión en la primera secuencia de nucleótido, o una inserción en esta o reemplazo de los ácidos nucleicos, tal como una supresión

de la primera secuencia de nucleótido completa; o una inserción entre: los nucleótidos 180-181 o los nucleótidos 182-183 o los nucleótidos 190-191 en ID de Sec. No.: 2, los nucleótidos 77-78 o 1026-1027 o 1027-1028 en ID de Sec. No.: 6, nucleótidos 416-417 en ID de Sec. No.: 9, nucleótidos 389-390 en ID de Sec. No.: 12, nucleótidos 381-382 en ID de Sec. No.: 16, nucleótidos 219-220 en ID de Sec. No.: 19, nucleótidos 1353-1354 en ID de Sec. No.: 22, nucleótidos 136-137 en ID de Sec. No.: 25, nucleótidos 384-385 en ID de Sec. No.: 28, nucleótidos 222-223 o nucleótidos 225-226 en ID de Sec. No.: 31, nucleótidos 217-218 en ID de Sec. No.: 34, nucleótidos 1411-1412 en ID de Sec. No.: 37, nucleótidos 943-944 en ID de Sec. No.: 40, nucleótidos 855-856 en ID de Sec. No.: 43, nucleótidos 369-370 en ID de Sec. No.: 46, nucleótidos 111-112 en ID de Sec. No.: 49, nucleótidos 443-444 en ID de Sec. No.: 52, nucleótidos 4-5 en ID de Sec. No.: 55, nucleótidos 573-574 en ID de Sec. No.: 61, nucleótidos 875-876 en ID de Sec. No.: 64, nucleótidos 218-219 en ID de Sec. No.: 70, nucleótidos 1072-1087 en ID de Sec. No.: 75, nucleótidos 64-65 en ID de Sec. No.: 78, nucleótidos 282-283 en ID de Sec. No.: 81, nucleótidos 1431-1432 en ID de Sec. No.: 84, nucleótidos 974-975 en ID de Sec. No.: 87, nucleótidos

802-803 en ID de Sec. No.: 90, nucleótidos 850-851 en ID de Sec. No.: 92; o, inmediatamente corriente arriba del nucleótido 1 en ID de Sec. No.: 58; o inmediatamente corriente arriba del nucleótido 1 en la ID de Sec. No.: 67.

El mutante puede comprender una secuencia de ácido nucleico heteróloga, tal como una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica para un inmunógeno de un agente viral, parasítico o bacterial patogénico, una proteína terapéutica, un alérgeno, un factor de crecimiento o una citoquina.

La invención también proporciona una composición o vacuna inmunogénica que comprende un mutante de acuerdo con la invención, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable y opcionalmente además que comprende un adyuvante.

La invención suministra además un primer polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácido, en donde existe:

Un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido identificada como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, o 93; y

La secuencia aminoácido del primer polipéptido es la misma que aquella del segundo polipéptido, o la secuencia aminoácido del primer polipéptido tiene una identidad que es igual o mayor del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la secuencia aminoácido del segundo polipéptido.

La invención visualiza una composición inmunogénica o de vacuna que contiene el primer polipéptido aislado, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante.

Aún adicionalmente, la invención prevé una preparación de anticuerpo que comprende un anticuerpo específico al primer polipéptido aislado.

La invención también involucra un método de diagnóstico para detectar la infección por medio de una bacteria gram

negativa, que comprende detectar en una muestra el primer polipéptido aislado en el anticuerpo específico a aquel primer polipéptido aislado.

La invención además se relaciona con un método de inmunización pasivo que comprende administrar la preparación de anticuerpo.

La invención también suministra una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia identificada como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, o 93, o identificada como ID de Sec. No.: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, o 97, así como también un iniciador PCR para detectar bacterias gram negativas que comprenden una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia que es al menos 10 ácidos nucleicos contigua de la secuencia de nucleótido identificada como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, o 93, o identificada como ID de Sec. No.: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39,

42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, o 97. Una sonda o iniciador puede ser cualquier tramo de al menos 8, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 12, 13, 14, o 15, tal como al menos 20, por ejemplo, al menos 23 o 25, por ejemplo al menos 27 o 30 nucleótidos que son únicos a la secuencia deseada a ser amplificada o que están en la secuencia deseada a ser amplificada o al menos conservada, por ejemplo, conservada entre las bacterias gram negativas o entre una familia particular o especies de bacterias gram negativas, tales como entre *Pasteurela*, o entre cualquiera de *Pasteurela multocida*, *Pasteurela hemolítica*, *Pasteurela anatipestifer* o *Actinobacillus pleuropneumonie*; ventajosamente *Pasteurela multocida*. Para los PCR o iniciadores o sondas de hibridización y las longitudes óptimas para estos, se hace también referencia a Kajimura et al., GATA 7(4): 71-79 (1990).

Los términos "composición inmunogénica" y "composición inmunológica" y "composición inmunogénica o inmunológica" cubre cualquier composición que elicitaba una respuesta inmune contra el patógeno objetivo; por ejemplo, después de administración o inyección en el animal (tal como un ave, por ejemplo, pavo o bovino, por ejemplo vaca),

elicitaba una respuesta inmune contra el patógeno objetivo (por ejemplo, *Pasteurella multocida*). Los términos "composición de vacuna" y "vacuna" y "composición de vacuna" cubre cualquier composición que induce una respuesta inmune protectora contra el patógeno objetivo o que protege eficazmente contra el patógeno; por ejemplo, después de la administración o inyección en el animal (por ejemplo, ave tal como pavo o bovino tal como una vaca), elicitaba una respuesta inmune protectora contra el patógeno objetivo o suministra la protección eficaz contra el patógeno (por ejemplo, *P. multocida*). Una sub-unidad de un patógeno, por ejemplo un antígeno o inmunógeno o epítipo aislado del patógeno, por ejemplo, bacteria tal como bacteria gram negativa, por ejemplo, *P. multocida*; y, una composición sub-unitaria comprende o consiste esencialmente de uno o más antígenos, inmunógenos o epítipos aislados del patógeno, por ejemplo, bacterias, tal como bacteria gram negativa, por ejemplo *P. multocida*.

Se nota que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones, los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado atribuido a este en la ley de Patentes de

los Estados Unidos; por ejemplo, ellos pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que los términos tales como "que consiste esencialmente de" y "consiste esencialmente de" tienen el significado imputado a ellos en la ley de Patentes U.S., por ejemplo, ellos permiten elementos no explícitamente citados, pero excluyen elementos que son encontrados en la técnica anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

Estas y otras modalidades son descritas o son obvias y comprendidas por, la siguiente Descripción Detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención suministra secuencias de nucleótidos y genes involucrados en la atenuación de un microorganismo, tal como una bacteria, por ejemplo, una bacteria gram negativa, por ejemplo, *Pastuerella multocida*, productos (por ejemplo, proteínas, antígenos, inmunógenos, epítomos) codificados por las secuencias de nucleótido, los métodos para producir tales secuencias de nucleótido, los productos, microorganismos, y usos para estos, tales como preparar composiciones de vacuna o

inmunogénicas o para elicitir una respuesta inmunológica o inmune o como un vector, por ejemplo, como un vector de expresión (por ejemplo, un vector de expresión *in vitro* o *in vivo*).

Las mutaciones introducidas en las secuencias de nucleótido y los genes de microorganismos producen mutantes atenuados novedosos y no obvios. Estos mutantes son útiles para la producción de composiciones inmunogénicas atenuadas vivas o vacunas atenuadas vivas que tienen un alto grado de inmunogenicidad.

Estos mutantes son también útiles como vectores que pueden ser útiles para la expresión *in vitro* de productos de expresión, así como también para la producción o replicación de secuencias de nucleótido (por ejemplo, replicación de ADN), y para productos de expresión *in vivo*.

La identificación de mutaciones suministra secuencias de nucleótidos y genes novedosos y no obvios, así como también productos de genes novedosos y no obvios codificados por las secuencias y genes de nucleótidos.

Tales productos de gen suministran antígenos, inmunógenos y epítomos, y son útiles como productos de gen aislado.

Tales productos de gen aislado, así como también epítomos de estos, son también útiles para generar anticuerpos, que son útiles en las aplicaciones de diagnóstico.

Tales productos de gen, que pueden suministrar o generar epítomos, antígenos o inmunógenos, son también útiles para composiciones inmunogénicas o inmunológicas, así como también vacunas.

En un aspecto, la invención suministra bacterias que contienen una mutación atenuante en una secuencia de nucleótido o un gen en donde la mutación modifica, reduce o elimina la expresión y/o la actividad biológica de un polipéptido o proteína codificada por un gen, que resulta en virulencia atenuada de la bacteria.

La mutación no está necesariamente localizada dentro de la secuencia o gen codificante para alterar su función, conduciendo a la atenuación. La mutación también puede ser hecha en secuencias de nucleótido involucradas en la regulación de la expresión del gen, por ejemplo, en

104

regiones que regulan la iniciación de la transcripción, traducción y terminación de la transcripción. Así también están incluidos los promotores y las regiones que se unen al ribosoma (en general a estos elementos regulatorios les corresponde aproximadamente entre 60 y 250 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio de la secuencia o gen codificante; Doree S M et al., J. Bacteriol. 2001, 183(6): 1983-9; Pandher K et al., Infect. Imm. 1998, 66(12): 5613-9; Cheng J Y et al., FEMS Microbiol letters 1998, 166: 289-296), los terminadores de transcripción (en general el terminador está localizado dentro de aproximadamente 50 nucleótidos corriente abajo del codón de parada de la secuencia o gen codificante; Ward C K et al., Infect. Imm. 1998, 66(7): 3326-36). En el caso de un operon, talesw regiones regulatorias pueden ser localizadas en una mayor distancia corriente arriba del gen o secuencia codificante. Una mutación en la región intergénica también puede conducir a atenuación.

Una mutación dentro de tales secuencias regulatorias asociadas con la secuencia o gen codificante de tal forma que la mutación de esta secuencia de nucleótido modifica, inhibe o abole la expresión y/o la actividad biológica del polipéptido o la proteína codificada por el gen, que

resulta en virulencia atenuada de la bacteria sería un equivalente a una mutación dentro del gen o la secuencia codificante identificada en la presente invención.

La atenuación reduce o abole la patogenicidad de la bacteria y la gravedad de los signos o lesiones clínicas, disminuye el índice de crecimiento de la bacteria, y evita la muerte por la bacteria.

La invención se relaciona con microorganismos, tales como bacterias, por ejemplo, bacterias gram negativas, tal como bacteria de la familia *Pasteurelacea*, por ejemplo, *Pasteurela multocida*, *Pasteurela hemolítica*, *Pasteurela anatipestifer* y *actinobacillus pleuropneumonie*. Ventajosamente las bacterias son *Pasteurela multocida*.

La *Pasteurela multocida* es una bacteria gram negativa, que es el agente causante de varias enfermedades de animales de producción y un patógeno oportunístico en humanos. Este es el agente etiológico de varias pasteurolosis, tales como cólera aviaria en pájaros domésticos y silvestres, septicemia hemorrágica bovina y rinitis atrófica porcina (Hunt ML et al., Vet Microbiol 2000, 72(1-2): 3-25). Los aislados pueden ser agrupados

serológicamente con base en los antígenos capsulares en serogrupos (A, B, D, E y F) o en 16 serotipos basados en antígenos LPS somáticos.

Las secuencias de nucleótido potenciales involucradas en la atenuación de bacterias se han identificado utilizando Signatura Tagged Mutagenesis (STM). Este método se discute en los documentos citados aquí y también se menciona la WO-A-96/17951.

El STM involucra la inserción de un transposón único con firma etiquetada en el genoma de un microorganismo.

En el locus de inserción, la secuencia de nucleótido del genoma es alterada. En la presente invención, la mutación resultante (y por lo tanto el mutante que lleva la mutación) es analizada para atenuación.

La secuencia de la región alterada (por ejemplo la secuencia o gen codificante o la estructura de lectura abierta (ORF)) para cada mutante atenuado se determina mediante amplificación PCR (reacción en cadena de polimerasa), clonación y secuenciación de regiones de ADN que flanquean el transposón.

En una modalidad de la presente invención, el método STM descrito en la WO-A-96/17951 se adaptó para ser funcional en *Pasteurela multocida*. Estas adaptaciones notablemente incluyen el uso del transposón Tn10 en lugar del Tn5, y el uso para la selección de un medio CDM sin leucina en lugar de una selección de resistencia de estreptomicina. Más detalles son dados en los ejemplos.

Una selección adicional de los genes o las secuencias de nucleótidos involucradas en la atenuación de los genes potenciales identificados por el método STM están basados o ausentes de mortalidad después de la inoculación de la bacteria mutante a los animales.

Para aplicaciones veterinarias, un aspecto ventajoso de la invención compromete la implementación de una selección experimental directamente en el animal objetivo, en lugar de un modelo de animal. Este método permite una selección más precisa de mutaciones apropiadas de bacterias mutantes. Para *Pasteurela multocida*, son hechos experimentos directamente en pavos, uno de los huéspedes objetivo naturales de *Pasteurela multocida*.

Los pavos son inoculados intramuscularmente con una cantidad suficiente de grupos de mutantes *P. multocida* de firma etiquetada (por ejemplo 0,5 ml, 10^7 CFU por animal). Los mutantes que no son re-aislados en un cierto tiempo después de la inoculación son considerados como potencialmente atenuados. Los mutantes que no son re-aislados son distinguidos de aquellos en el grupo que son re-aislados mediante amplificación PCR y análisis de las etiquetas de firma.

Cada mutante potencialmente atenuado es luego inyectado por la ruta intramuscular en pavos (por ejemplo 0,5 ml, 10^4 CFU por animal). La mortalidad de los pavos es registrada diariamente durante 7 días después de la inoculación. Los mutantes que no conducen a la muerte son considerados como atenuados.

El método específico ha sido llevado a cabo en la cepa de *Pasteurella multocida* P-1059 y se ha obtenido un número de mutantes atenuados. Cinco de ellos han sido depositados el 1^{ro} de Abril de 2003 en CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismos) del Instituto Pasteur, París, Francia. El mutante 4G11 está disponible bajo el

número de acceso CNCM I-2999. El mutante 5D5 está disponible bajo el número de acceso CNCM I-3000. El mutante 9C8 está disponible bajo el número de acceso CNCM I-3001. El mutante 9H4 está disponible bajo el número de acceso CNCM I-3002. El mutante 13E1 está disponible bajo el número de acceso CNCM I-3003.

Las secuencias de nucleótido que flanquean el locus de la inserción del transposón son designadas ID de Sec. No.: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, 97.

Los transposones fueron insertados en la cepa de *Pasteurela multocida* P-1059 inmediatamente en el extremo 5' de las secuencias 1, 8, 11, 14, 15, 27, 33, 42, 54, 57, 66, 72, 73, 77, 80, 95 y 97, e inmediatamente en el extremo 3' de las secuencias 4, 5, 18, 21, 24, 30, 36, 39, 45, 48, 51, 60, 63, 69, 83, 86, 89 y 96. Para el mutante 9H4, el transposón fue insertado entre los nucleótidos en las posiciones 850-851 de la secuencia ID de Sec. No.: 92.

170

Un aspecto particular de la invención son los mutantes atenuados de la cepa de *Pasteurella multocida* P-1059 que tiene una mutación atenuante en el gen ORF y/o sus regiones regulatorias que comprenden una secuencia seleccionada de las secuencias ID de Sec. No.: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, 97.

Las modalidades particulares adicionales de la invención incluyen mutantes atenuados de acuerdo con la invención tales como los mutantes atenuados aquí mencionados como depositados en el CNCM bajo nuevos términos del Tratado de Budapest.

Los mutantes atenuados P-1059 pueden ser obtenidos, por ejemplo, mediante inserción de transposón o mediante mutagénesis dirigida (supresión, inserción, reemplazo). La mutación atenuante puede ser hecha dentro de estas secuencias de nucleótidos o genes así como también en las secuencias complementarias de estos. La mutación atenuante puede ser hecha en secuencias de nucleótidos involucradas en la región regulatoria de dichos genes o secuencias de nucleótido.

///

Las secuencias anteriores o partes de estas (tales como al menos 10, 15 o 20 nucleótidos de estos, por ejemplo, al menos 10 nucleótidos contiguos de estos, o al menos 15 nucleótidos contiguos de estos o más ventajosamente al menos 20 nucleótidos contiguos de estos, hasta la longitud completa de las secuencias) se pueden utilizar como iniciadores PCR para detectar y seleccionar los mutantes de inserción del transposon. El PCR puede involucrar un par de iniciadores, por ejemplo, uno específico al transposon, y el otro específico al gen o la secuencia de nucleótido a ser mutada. Con base en el tamaño esperado de los productos amplificados PCR, el método permite la amplificación y/o la detección de los fragmentos PCR. El conocimiento del gen correspondiente o el ORF y/o sus regiones regulatorias en el organismo, por ejemplo, las bacterias gram negativas, tales como la *Pasteurela*, por ejemplo, *Pasteurela multocida*, por ejemplo *Pasteurela multocida* cepa PM70 o P-1059 (ver, por ejemplo, *infra*); por ejemplo el tamaño del gen correspondiente o el ORF y/o sus regiones regulatorias se pueden utilizar para diseñar iniciadores PCR, para seleccionar los fragmentos PCR amplificados y para

detectar aquellos que tienen el tamaño correcto que permita la selección de los mutantes.

El genoma completo de la cepa de *Pasteurela multocida* PM70 está disponible en la base de datos EMBL y en May BJ et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98(6): 3460-5. Los reticulocitos hechos con las secuencias ID de Sec. No.: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, 97 permiten localizar las secuencias homogéneas en el genoma PM70 y luego determinar los genes correspondientes o los ORF en el PM70.

Estas secuencias de nucleótido en la cepa de *Pasteurela multocida* PM70 son designados ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90.

Para la 9H4 mutante de la cepa P-1059, no se encontró secuencia homóloga en la PM70. La ORF P-1059 se ha secuenciado y designado como ID de Sec. No.: 93.

Otro aspecto de la invención son los mutantes atenuados de la cepa PM70 que tienen al menos una mutación atenuante en el gen o el ORF que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada de ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87 y 90 y/o sus regiones regulatorias.

La mutación atenuante se puede hacer dentro de estas secuencias de nucleótido o los genes así como también en secuencias complementarias de estas. La mutación atenuante también se puede hacer en secuencias de nucleótidos involucradas en la región regulatoria de dichos genes. Los mutantes atenuados se pueden obtener, por ejemplo, mediante la inserción de transposón o mediante la mutagénesis dirigida (supresión, inserción, reemplazo).

El término de "complementariedad" significa aquí las secuencias de nucleótidos o de otras hebras en el genoma de doble hebra, para cubrir así la hebra contra-sentido como complemento de la hebra con sentido, y al contrario. El término "nucleótido" también comprende desoxiribonucleótido (constituido así con ácidos

desoxiribonucleicos o ADN), ribonucleótido (así constituido con ácidos ribonucleicos o ARN) y ribonucleótido mensajero (mARN).

Las mutaciones más generalmente atenuantes se pueden introducir en el genoma de una bacteria tal como una bacteria gram negativa, por ejemplo una bacteria de la familia *Pasteurelanceae*, por ejemplo *P. multocida*, *P. hemolítica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumoniae*, ventajosamente una bacteria en el genoma de cualquiera de las varias cepas de *P. multocida* (por ejemplo la cepa P-1059, la cepa PM70), las mutaciones en al menos una secuencia de nucleótido que codifica para una secuencia de aminoácido que tiene al menos aproximadamente 70% de identidad, al menos 75% de identidad, al menos aproximadamente 80% de identidad, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90% de identidad, y ventajosamente al menos aproximadamente 95, 96, 97, 98, o 99% o más de identidad con una de las secuencias de aminoácido codificadas por una secuencia de nucleótido identificada como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93. La mutación atenuante se puede hacer dentro de estas

secuencias de nucleótido o genes así como también en las secuencias complementarias de estas. La mutación atenuante también se puede hacer en las secuencias de nucleótido involucradas en la región regulatoria de dichos genes. Los mutantes atenuados se pueden obtener por ejemplo mediante la inserción del transposón o mediante la mutagénesis dirigida (supresión, inserción, reemplazo). Los mutantes atenuados obtenidos son modalidades de la invención. Las modalidades particulares son los mutantes atenuados P-1059.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido se puede establecer mediante el reticulocito en pares del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y la matriz blosum62, utilizando los parámetros estándar (Esto es, note el algoritmo BLAST o BLASTX disponible en el servidor del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, Md., USA), así como también en Altschul et al. J. Mol. Biol. 1990. 215. 403-410; y así, este documento habla del uso del algoritmo o de la matriz BLAST o BLASTX y BLOSUM62 mediante el término "reticulocito".

El verbo "codificar" utilizado aquí no significa que la secuencia de nucleótido es limitada a una secuencia de codificación actual sino también comprende el gen completo que incluye sus secuencias regulatorias que no son secuencias codificantes.

La homología o identidad de la secuencia tal como la homología de la secuencia de nucleótido también se puede determinar utilizando el programa "Align" de Myers y Miller, ("Optimal Alignments in Linear Space", CABIOS 4, 11-17, 1988, incorporado aquí como referencia) y disponible en el NCBI, así como también el mismo u otros programas disponibles vía Internet en sitios de este tales como el sitio NCBI.

Alternativa o adicionalmente, el término "homología" o "identidad", por ejemplo, con respecto a una secuencia de nucleótido o aminoácido, puede indicar una medición cuantitativa de la homología entre dos secuencias. La homología de secuencia porcentual se puede calcular como

$(N_{ref} - N_{dif}) * 100 / N_{ref}$, en donde N_{dif} es el número total de residuos no idénticos en dos secuencias cuando se alinean y en donde N_{ref} es el número de residuos en una de las

secuencias. De esta manera, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencia de 75% con la secuencia AATCAATC ($N_{ref} = 8$; $N_{dif} = 2$).

Alternativa o adicionalmente, "homología" o "identidad" con respecto a las secuencias se puede referir al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias más cortas en donde el alineamiento de las dos secuencias se puede determinar de acuerdo con el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman, 1983 PNAS USA 80: 726, incorporado aquí como referencia), por ejemplo, utilizando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una pena de espacio de 4, y un análisis asistido por computador y la interpretación de los datos de la secuencia que incluyen alineamiento pueden ser convenientemente desarrollados utilizando programas comercialmente disponibles (por ejemplo, Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc. CA). Cuando las secuencias de ARN se dice que son similares, o tienen un grado de secuencia de identidad u homología con las secuencias de ADN, la timidita (T) en la secuencia ADN es considerada igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN. Así, las

secuencias de ARN están dentro del alcance de la invención y se pueden derivar de las secuencias de ADN, mediante timidita (T) en la secuencia de ADN siendo considerado igual al uracilo (U) en las secuencias de ARN.

Ventajosamente, la identidad o la homología de la secuencia tal como la identidad o la homología de la secuencia de aminoácido se pueden determinar utilizando el programa BlastP (Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402, incorporado aquí como referencia) y disponible en NCBI, así como también el mismo u otros programas disponibles por vía de Internet en sitios de esta tales como el sitio NCBI.

Los siguientes documentos (cada uno incorporado aquí como referencia) suministran algoritmos para comparar la identidad o la homología relativa de la secuencia tal como los residuos de aminoácido de dos proteínas, y adicionalmente o alternativamente con respecto a lo anterior, las enseñanzas en estas referencias se pueden utilizar para determinar la homología o identidad porcentual: Needleman SB y Wunsch CD, "A general method aplicable to the search for similarities in the amino

acid sequences of two proteins", J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970); Smith TF y Waterman MS, "Comparison of Bio-sequences", Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981); Smith TF, Waterman MS y Sadler JR, "Statistical characterization of nucleic acid sequence functional domains", Nucleic Acids Res., 11: 2205-2220 (1983); Feng DF y Dolittle RF, "Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees", J. of Molec. Evol., 25: 351-360 (1987); Higgins DG y Sharp PM, "Fast and sensitive multiple sequence alignment on a microcomputer", CABIOS, 5: 151-153 (1989); Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ, "ClusterW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions-specific gap penalties and weight matrix choice", Nucleic Acids Res., 22: 4673-480 (1994); y, Devereux J, Haeberlie P y Smithies O, "A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX", Nucl. Acids Res. 12: 387-395 (1984). Y, sin experimentación indebida, el experto puede consultar muchos otros programas o referencias para determinar la homología porcentual.

La invención se relaciona con la mutación de las secuencias de nucleótido o los polipéptidos o proteínas

que codifican genes que tienen la misma función biológica. La similaridad de la función se puede analizar o identificar o determinar o revisar mediante la conservación de los sitios activos. Esto se puede hacer mediante la investigación NCBI DART (Domain Architecture Retrieval Tool).

La presente invención suministra así mutantes atenuados de una bacteria como se describe aquí, que comprende una mutación atenuante como se definió aquí.

Los mutantes de bacteria gram negativa atenuados incluyen una mutación, en donde todo o parte de al menos un gen específico o una secuencia de ácido nucleico es mutada como se discutió aquí. El gen específico o la secuencia de ácido nucleico incluye aquellas que comprenden, o son homólogas a (por ejemplo, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% homólogas a), la secuencia ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 o 93, o sus regiones regulatorias. Ventajosamente, el gen específico o la secuencia de ácido nucleico incluye aquellas que comprenden o son homólogas a, la secuencia ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 25, 31, 37,

40, 43, 46, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 o 93, o sus regiones regulatorias. Más ventajosamente, el gen específico o la secuencia de ácido nucleico incluyen aquellas que comprenden, o son homólogas a, la secuencia ID de Sec. No.: 6, 12, 25, 31, 37, 40, 46, 70, 75, 84, 87, 90 o 93, o sus regiones regulatorias. Y aún más ventajosamente, el gen específico o la secuencia de ácido nucleico incluyen aquellas que comprenden, o son homólogas a, la secuencia ID de Sec. No.: 37, 40, 75, 90 o 93, o sus secuencias de nucleótido homólogas. Preferiblemente, el mutante es una *Pasteurela*, tal como una *P. multocida*, por ejemplo la P-1059 o la PM70.

Las mutaciones pueden ser introducidas en el microorganismo utilizando cualquier técnica conocida, tal como, por ejemplo, tecnología de ADN recombinante, con el fin de introducir una mutación bien definida en el gen seleccionado o en la secuencia de ácido nucleico (mutagénesis dirigida). Tal mutación puede ser una inserción de una secuencia de ácido nucleico homóloga o heteróloga, una supresión, un reemplazo, por ejemplo, un reemplazo de al menos un nucleótido mediante otro o una combinación de estos. En una modalidad, la mutación es una mutación de supresión, donde la alteración del gen o

la secuencia de ácido nucleico son originadas por la supresión de parte, y ventajosamente la supresión de la secuencia de ácido nucleico entera o el gen. La supresión de los ácidos nucleicos evita la reversión a patogenicidad. En otra modalidad la mutación en una inserción en el locus que corresponde a los locus de inserción del transposón descritos aquí, por ejemplo, en los ejemplos. Estos locus, con referencia a la cepa P-1059, están ventajosamente localizados inmediatamente en el extremo 5' de la secuencias 1, 8, 11, 14, 15, 27, 33, 42, 54, 57, 66, 72, 73, 77, 80, 95 y 97, e inmediatamente en el extremo 3' de las secuencias 4, 5, 18, 21, 24, 30, 36, 39, 45, 48, 51, 60, 63, 69, 83, 86, 89 y 96. Estos locus también son aquellos localizados en la cepa PM70 entre: los nucleótidos 180-181 o 182-183 o 190-191 en ID de Sec. No.: 2, 77-78 o 1026-1027 o 1027-1028 en ID de Sec. No.: 6, 416-417 en ID de Sec. No.: 9, 389-390 en ID de Sec. No.: 12, 381-382 en ID de Sec. No.: 16, 219-220 en ID de Sec. No.: 19, 1353-1354 en ID de Sec. No.: 22, 136-137 en ID de Sec. No.: 25, 384-385 en ID de Sec. No.: 28, 222-223 o 225-226 en ID de Sec. No.: 31, 217-218 en ID de Sec. No.: 34, 1411-1412 en ID de Sec. No.: 37, 943-944 en ID de Sec. No.: 40, 855-856 en ID de Sec. No.: 43, 369-370 en ID de Sec. No.: 46, 111-112 en ID de Sec. No.:

49, 443-444 en ID de Sec. No.: 52, 4-5 en ID de Sec. No.: 55, 573-574 en ID de Sec. No.: 61, 875-876 en ID de Sec. No.: 64, 218-219 en ID de Sec. No.: 70, 1072-1087 en ID de Sec. No.: 75, 64-65 en ID de Sec. No.: 78, 282-283 en ID de Sec. No.: 81, 1431-1432 en ID de Sec. No.: 84, 974-975 en ID de Sec. No.: 87, 802-803 en ID de Sec. No.: 90, 850-851 en ID de Sec. No.: 92; o, inmediatamente corriente arriba del nucleótido 1 en ID de Sec. No.: 58; o inmediatamente corriente arriba del nucleótido 1 en la ID de Sec. No.: 67. Estos locus también son allí localizados entre pares similares de nucleótidos (de los citados para la PM70) en las secuencias de nucleótidos de otra bacteria gram negativa, tal como un miembro de la familia *Pasteurelacea*, por ejemplo, *P. multocida*, *P. hemolítica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumonie*, que codifica una secuencia de aminoácido homóloga como se definió aquí con su porcentaje de identidad. Así, los mutantes pueden ser bacterias gram negativas y son ventajosamente una *Pasteurela*, tal como *P. multocida*, *P. hemolítica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumonie*, por ejemplo una *P. multocida*, tal como P-1059 o PM70.

Por definición, los mutantes con supresión comprenden al menos una supresión de o en una secuencia de nucleótido

de acuerdo con la invención. Estos mutantes con supresión incluyen aquellos en donde todo o parte de una secuencia de gen específica o una secuencia de nucleótido específica es suprimida. En un aspecto, la mutación da como resultado la supresión de al menos un ácido nucleico, de al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% del gen o la secuencia de nucleótido específica. Preferiblemente el gen completo o la secuencia de nucleótido específica son suprimidos.

Los mutantes pueden comprender más de una mutación, que puede dar como resultado la adición o los grados sinérgicos de atenuación, y puede dar como resultado una mejor prevención de la atenuación.

Estas mutaciones múltiples pueden asociar mutación(es) en las secuencias de nucleótido o los genes conocidos por sus propiedades atenuantes tales como los genes *aro*, por

ejemplo *aroA* (Homchampa P. et al., *Veterinary Microbiology*, 1994, 42: 35-44), y mutaciones en las secuencias de nucleótido o genes de acuerdo con la invención.

En una modalidad los mutantes incluyen al menos dos mutaciones, en donde para cada mutación todo o parte de un gen específico o una secuencia de aminoácido es mutada como se discutió aquí. Estos genes específicos o secuencias de ácido nucleico incluyen aquellas que comprenden, o son homólogas a, las secuencias ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 o 93, o sus regiones regulatorias. Así, los mutantes que tienen dos o más de las secuencias anteriores mutadas, por ejemplo, suprimidas como se discutió aquí, son previstos por la invención. Ventajosamente, los mutantes tienen dos o más de las siguientes secuencias o secuencias que comprenden, o son homólogas a, las siguientes secuencias mutadas, por ejemplo, suprimidas, como se discutió aquí: ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 25, 31, 37, 40, 43, 46, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 o 93, o sus regiones regulatorias. Más ventajosamente los genes específicos o las secuencias de ácido nucleico que son

mutadas (por ejemplo, las dos o más que son mutadas) incluyen aquellas que comprenden, o son homólogas a, las secuencias ID de Sec. No.: 6, 12, 25, 31, 37, 40, 46, 70, 75, 84, 87, 90 o 93, o sus regiones regulatorias. El mutante puede ser una bacteria gram negativa, y ventajosamente el mutante es una *Pasteurela*, tal como una *P. multocida*, por ejemplo P-1059 o PM70.

Ventajosamente los mutantes que tienen dos o más de las siguientes secuencias, o sus regiones regulatorias, mutadas, por ejemplo, suprimidas como se discutió aquí, son previstas por la invención: ID de Sec. No.: 37, 40, 75, 90 y 93, o sus secuencias de nucleótido homólogas.

Varias modalidades incluyen mutantes que tienen supresiones de o en los genes o secuencias de ácido nucleico que comprenden, o son homólogas a, las secuencias ID de Sec. No.: 37 y 40; ID de Sec. No.: 37 y 75; ID de Sec. No.: 37 y 90; ID de Sec. No.: 37 y 93; ID de Sec. No.: 40 y 75; ID de Sec. No.: 40 y 90; ID de Sec. No.: 40 y 93; ID de Sec. No.: 75 y 90; ID de Sec. No.: 75 y 93; ID de Sec. No.: 90 y 93, o sus regiones regulatorias. El mutante puede ser una bacteria gram

negativa y ventajosamente el mutante es una *Pasteurela*, tal como una *P. multocida*, por ejemplo P-1059 o PM70.

Los métodos para introducir las mutaciones en las regiones genómicas específicas son conocidos y serán evidentes para aquellas personas expertas de la descripción y el conocimiento de la técnica. Por ejemplo, el gen o la secuencia completa a ser mutada o un fragmento es clonado en un vector y modificado con el fin de abolir su expresión y/o su actividad biológica. El vector es introducido en la bacteria, por ejemplo, mediante electroporación (por ejemplo Jablonski L. et al., *Microbial Patogénesis*, 1992, 12, 63-68), o mediante conjugación (Lee M. D. et al., *Vet. Microbiol.*, 1996, 50, 143-148). El fragmento de ADN modificado es reintroducido en el genoma bacterial mediante recombinación genética, ventajosamente mediante recombinación homóloga entre el cromosoma bacterial y el vector. Como un ejemplo del vector puede estar un plásmido suicida como el descrito en Cardenas (Cardenas M et al., *Vet Microbiol* 2001 May 3; 80(1): 53-61). Ventajosamente este vector adicionalmente comprende, entre los dos brazos o regiones de flaqueo (que se emplean en recombinación homóloga) una secuencia poliparada (por ejemplo, 6 codones de parada, uno en cada

estructura de lectura) para bloquear cualquier traducción posible.

El microorganismo atenuado de la invención, por ejemplo la bacteria gram negativa tal como la *P. multocida*, puede comprender adicionalmente al menos una secuencia de ácido nucleico homóloga o heteróloga insertada en su genoma. Esto es útil para reproducir o replicar las moléculas de ácido nucleico heterólogas y/o para expresión de las moléculas de ácido nucleico heterólogas, bien sea *in vivo* o *in vitro*. La secuencia de ácido nucleico heteróloga ventajosamente codifica para un inmunógeno, antígeno o epítipo de un agente viral, parasítico o bacterial patogénico que es diferente de aquellos naturalmente expresados por el microorganismo atenuado. Esta secuencia heteróloga puede codificar un inmunógeno, antígeno o epítipo de otra cepa de microorganismos o bacterias, por ejemplo, otra cepa *P. multocida*. Un inmunógeno o antígeno es una proteína o polipéptido capaz de inducir una respuesta inmune contra el agente patogénico o un antígeno secretado del agente patogénico, y contiene uno o más epítopos; y el epítipo es un péptido o polipéptido que es capaz de inducir una respuesta inmune contra el

agente patogénico o un antígeno secretado del agente patogénico.

Las secuencias de ácido nucleico heterólogas que son adecuadas para este uso en tal vector serán evidentes para la persona experta (Fedorova ND y Highlander SK, Infect Immun 1997, 65(7): 2593-8) e incluyen por ejemplo aquellas que vienen de los miembros de la familia *Pasteurelacea* (notablemente *Pasteurela multocida*, *Pasteurela hemolítica*, *Pasteurela anatipestifer*, *Actinobacillus pleuropneumonie*), o de bacterias similares a *E. coli*, *Salmonela*, *Campilobacter*.

La secuencia heteróloga es ventajosamente insertada con el fin de ser expresada mediante el microorganismo en el huésped cuando se administra con el fin de desarrollar una respuesta inmune contra ambos el microorganismo atenuado y dicho inmunógeno expresado. La secuencia heteróloga es ventajosamente insertada con u operablemente ligada a o corriente debajo de los elementos regulatorios que permiten su expresión, tal como un promotor. La secuencia de nucleótido útil para la dirección y la secreción de la proteína también se pueden agregar. De acuerdo con esto, las secuencias líder o de

señal se pueden incluir en productos expresados para facilitar el transporte a través de la pared celular y/o la secreción.

En una modalidad la secuencia homóloga o heteróloga se inserta dentro de la secuencia de nucleótido seleccionada o el gen seleccionado utilizado para la atenuación; ventajosamente la secuencia homóloga y heteróloga se inserta en uno de los locus que corresponden al locus de inserción de transposón identificado aquí.

Para mejorar la expresión, el uso del codón se puede adaptar al vector bacterial utilizado.

Los mutantes atenuados de la invención también pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica, un alérgeno, un factor de crecimiento o una citoquina o un inmunomodulador o inmunoestimulador tal como GM-CSF, por ejemplo un GM-CSF correspondido con las especies objetivo (por ejemplo, si el vector atenuado es *P. multocida*, para administración a bovinos, el GM-CSF de bovino podría ser expresado por el vector, por ejemplo con la expresión del vector de otra

proteína heteróloga, péptido, polipéptido, antígeno, inmunógeno o epítopo).

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención los microorganismos atenuados son utilizados para producir composiciones inmunogénicas atenuadas vivas o composiciones de vacuna atenuadas vivas.

De acuerdo con un aspecto ventajoso de la invención, los microorganismos atenuados son bacterias gram negativas, tales como una *Pasteurela*, por ejemplo, una *P. multocida*, por ejemplo P-1059 o PM70, mutada de acuerdo con la invención.

Ventajosamente como se describió aquí, el microorganismo puede actuar como un vector recombinante para inmunizar y/o vacunar animales o humanos contra infecciones originadas por otros agentes diferentes de *Pasteurela*.

Las composiciones inmunogénicas o las composiciones de vacuna comprenden el mutante atenuado y un portador farmacéutica o veterinariamente aceptable, excipiente, diluyente o vehículo, y opcionalmente un estabilizador y/o un adyuvante. El mutante atenuado puede ser un vector

que adicionalmente expresa las moléculas de ácido nucleico heterólogas al vector, tal como un epítipo heterólogo, antígeno, inmunógeno, y/o factor de crecimiento, citoquina, inmunoregulador o inmunoestimulador.

El término de "composición inmunogénica" cubre aquí cualquier composición capaz, una vez que esta ha sido inyectada a los animales o a los humanos de elicitar una respuesta inmune contra el patógeno objetivo. El término de "composición de vacuna" o "vacuna" cubre aquí cualquier composición capaz, una vez esta ha sido inyectada a los animales o a un humano de inducir una respuesta inmune protectora contra el patógeno objetivo.

El vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser agua o solución salina, pero este puede, por ejemplo, también comprender medio de cultivo de bacteria.

Las bacterias atenuadas vivas de acuerdo con la invención pueden ser secadas por congelamiento ventajosamente con un estabilizador. El secado por congelamiento puede ser hecho de acuerdo con procedimientos de secado por congelamiento estándares bien conocidos. Los

estabilizadores farmacéutica o veterinariamente aceptables pueden ser carbohidratos (por ejemplo sorbitol, manitol, lactosa, sucrosa, glucosa, dextran, trealosa), glutamato de sodio (Tsvetkov T et al., Cryobiology 1983, 20(3): 318-23; Israeli E et al., Cryobiology 1993, 30(5): 519-23), proteínas tales como peptona, albúmina, lactalbúmina o caseína, agentes que contienen proteína tales como leche desnatada (Mills CK et al., Cryobiology 1988, 25(2): 148-52; Wolf E et al., Cryobiology 1990, 27(5): 569-75), y amortiguadores (por ejemplo amortiguador de fosfato, amortiguador de fosfato de metal alcalino).

Un adyuvante se puede utilizar para hacer solubles las preparaciones secadas por congelamiento.

Ejemplos de adyuvantes son emulsiones de aceite en agua, agua en aceite en agua basadas en aceite mineral y/o aceite vegetal o tensoactivos no iónicos tales como copolímeros de bloque, Tween®, Span®. Otros adyuvantes adecuados por ejemplo la vitamina E, las saponinas, y el Carbopol®, hidróxido de aluminio o el fosfato de aluminio ("Vaccine Design, The subunit and adjuvant approach",

Pharmaceutical Biotechnology, vol 6, Edited by Michael F. Powell and Mark J. Newman, 1995, Plenum Press New York).

Las bacterias atenuadas vivas pueden ser almacenadas a -70° C en un medio que contiene glicerol.

Opcionalmente, la composición inmunogénica o la vacuna se pueden combinar con uno o más inmunógenos, antígenos o epítomos seleccionados de otros microorganismos patógenos o virus o una forma inactivada o viva.

Otro aspecto de la invención son las secuencias de nucleótidos o los genes de acuerdo con la invención, tales como las secuencias de nucleótido o los genes de acuerdo con la invención designados ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 y 93, y ventajosamente aquellos designados ID de Sec. No.: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96, 97.

Otro aspecto de la invención es el uso de secuencias de nucleótido o genes de acuerdo con la invención, para la

expresión y la producción de péptidos, polipéptidos o proteínas, o más generalmente, los productos de expresión, por ejemplo inmunógenos, antígenos o epítomos. En una modalidad, los polipéptidos o péptidos o proteínas codificadas por estas secuencias de nucleótido o genes pueden ser utilizadas como inmunógenos de subunidad o antígenos o epítomos en composiciones inmunogénicas o vacunas. Los procedimientos de determinación del epítomo, tales como, generar librerías de péptido traslapantes (Hemmer B. et al., *Immunology Today*, 1998, 19(4), 163-168), Pepscan (Geysen H. M. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1985, 82(1), 178-182; Van der Zee R. et al., *Eur. J. Immunol.*, 1989, 19(1), 43-47; Geysen H. M., *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 1990, 21(4), 523-533; Multipin® Peptide Synthesis Kits de Chiron) y algoritmos (De Groot A. et al., *Nature Biotechnology*, 1999, 17, 533-561), se pueden utilizar en la práctica de la invención, sin experimentación indebida.

Los polipéptidos ventajosos son aquellos que tienen las secuencias de aminoácido identificadas como ID de Sec. No.: 3, 7, 10, 13, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 76, 79, 82, 85, 88, 91, 94, o aquellos codificados por las secuencias de

nucleótido ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93. Los epítomos de estos polipéptidos también se pueden utilizar ventajosamente.

La invención comprende los polipéptidos equivalentes de otra bacteria, tal como una bacteria gram negativa, ventajosamente un miembro de la familia *Pasteurelacea*, por ejemplo, *P. multocida*, *P. hemolítica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumonie*, y más ventajosamente en el genoma de cualquiera de las varias cepas de *P. multocida* son así incluidas mediante polipéptidos de equivalencia cuya secuencia de aminoácido tienen al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96, 97, 98 o 99% de identidad con una de las secuencias de aminoácido identificadas como ID de Sec. No.: 3, 7, 10, 13, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 76, 79, 82, 85, 88, 91, 94 y/o polipéptidos que tienen la misma función(es) biológica(s) que los polipéptidos identificados anteriormente con ID de Sec.

139

Los criterios para establecer la identidad o la misma función biológica han sido descritos anteriormente.

La invención también abarca los fragmentos de inmunogenicidad de estos polipéptidos, que tienen al menos una cadena de 10 aminoácidos del polipéptido, al menos 20, tales como al menos 30, ventajosamente al menos 50 y más ventajosamente al menos 70, por ejemplo, los fragmentos de los polipéptidos que contienen al menos 10 aminoácidos contiguos del polipéptido, ventajosamente al menos 20 aminoácidos contiguos del polipéptido, tales como al menos 30 y más ventajosamente al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido, y aún más ventajosamente al menos 70 aminoácidos contiguos del polipéptido. Por supuesto, un fragmento es menor que el polipéptido completo. Un fragmento se puede combinar con otros polipéptidos, por ejemplo, en polipéptidos de fusión, por ejemplo, un polipéptido de la invención o fragmento de este puede ser una porción de un polipéptido de fusión que incluye otra porción (otro polipéptido), por ejemplo, una porción que mejora la inmunogenicidad y/o una porción que mejora la secreción tal como una porción de lipoproteína que mejora la inmunogenicidad o una señal o porción de secuencia conductora. De acuerdo

con esto, la invención prevé la expresión de polipéptidos, proteínas, antígenos, inmunógenos o epítomos - sean secuencias identificadas aquí o fragmentos de estos o aquellas que son heterólogos a los vectores de la invención - como fusiones, por ejemplo, como una porción del polipéptido de fusión, por ejemplo, un polipéptido de fusión que ventajosamente incluye una porción de mejoramiento de inmunogenicidad tal como una porción de lipoproteína y/o una porción de mejoramiento de la secreción tal como una señal o una porción de secuencia conductora.

Los polipéptidos o fragmentos son producidos ventajosamente mediante una expresión *in vitro*. Las secuencias de nucleótido de acuerdo con la invención (por ejemplo ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93) o los fragmentos de estas son insertados en un vector, operablemente ligados a los elementos regulatorios tales como el promotor, la región unida al ribosoma y el terminador, y el codón de inicio y el codón de parada. Los vectores ventajosos son plásmidos útiles para expresión *in vitro* en bacterias es decir *Escherichia coli* (Mahona F et al., Biochimie 1994, 46(1):

9-14; Watt M A et al., Cell Stress Chaperones 1997, 2(3): 180-90; Frey J Res. Microbiol. 1992, 143(3): 263-9).

Estos polipéptidos también se pueden sintetizar químicamente (Luo Y et al., Vaccine 1999, 17(7-8): 821-31).

Un aspecto de la invención es así una composición inmunogénica o vacuna que comprende al menos un polipéptido o fragmento de acuerdo con la invención (composición inmunogénica sub-unitaria o vacuna) o al menos un vector de expresión *in vivo* como se describe aquí (composición inmunogénica recombinante viva o vacuna), y un portador farmacéutica o veterinariamente aceptable, excipiente, diluyente o vehículo, y opcionalmente un adyuvante. Ejemplos de tales ingredientes han sido descritos aquí en relación con la vacuna viva.

En otra modalidad, estas secuencias de nucleótido o sus fragmentos pueden ser insertados en vectores recombinantes para producir composiciones inmunogénicas recombinantes vivas, o vacunas capaces de expresar *in*

vivo en el huésped el polipéptido codificado por esta secuencia de nucleótido o fragmento.

El vector de expresión *in vivo* puede ser un vector de polinucleótido o plásmido (EP-A2-1001025; Chaudhuri P Res. Vet. Sci. 2001, 70(3), 255-6), virus (por ejemplo adenovirus, poxvirus tales como pox aviario (US-A-5,174,993 US-A-5,505,941 y US-A-5,766,599) o pox de canario (US-A-5,756,103)) o bacteria es decir *Escherichia coli* o *Salmonella* sp.

Los polipéptidos y fragmentos de la invención también pueden ser utilizados en terapia.

Los polipéptidos y fragmentos también pueden ser utilizados como reactivos en reacciones de antígeno de anticuerpo. De acuerdo con esto, otro aspecto de la invención es así un método de diagnóstico y/o kit para detectar la infección de bacterias gram negativas. Los kits, por ejemplo ELISA, puede incluir al menos un polipéptido o fragmento de acuerdo con la invención (por ejemplo, al menos un polipéptido identificado mediante la secuencia de aquí o un fragmento de esta como se discutió aquí).

Los anticuerpos contra los polipéptidos mencionados o los fragmentos (por ejemplo, polipéptidos identificados mediante la secuencia de aquí o los fragmentos de estos como aquí se discuten) pueden ser utilizados como un reactivo de diagnóstico o inmunización pasiva o en vacunación o en terapia. Las cantidades del anticuerpo administrado en inmunización pasiva pueden ser iguales o análogas a las cantidades utilizadas en la técnica, tales como del conocimiento de la técnica, el experto puede practicar la inmunización pasiva sin experimentación indebida.

Otro aspecto de la invención es una preparación de anticuerpo que comprende un anticuerpo específico a un polipéptido o un fragmento de acuerdo con la invención y los métodos para diagnosis utilizando los mismos. Con respecto a un anticuerpo específico a un polipéptido, esto significa que el anticuerpo se une preferencialmente al polipéptido, por ejemplo, el anticuerpo se une al polipéptido y no a otros polipéptidos o tiene una especificidad al polipéptido que es aceptablemente particular con el polipéptido de tal forma que el anticuerpo se puede utilizar para aislar el polipéptido

de la muestra o detectar su presencia en la muestra con no más del 5% de positivos falsos, utilizando técnicas conocidas en el arte o discutidas en documentos citados aquí, incluyendo Sambrook, *infra*.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales.

Los métodos para producir anticuerpos son bien conocidos por el experto.

Si se desean anticuerpos policlonales, un animal seleccionado (por ejemplo ratón, conejo, cabra, caballo, etc.), se inmuniza con un polipéptido o fragmento. El suero del animal inmunizado es recolectado y tratado de acuerdo con los procedimientos conocidos y posiblemente purificado. Ver, por ejemplo Jurgens et al., J. Chrom., 1985, 348: 363-370.

La metodología general para la elaboración de anticuerpos monoclonales al utilizar tecnología de hibridoma es bien conocida. Las líneas de célula productoras de anticuerpos inmortales pueden ser creadas mediante fusión de células, y también mediante otras técnicas tales como la transformación directa de linfocitos B con ADN

oncogénico, o la transfección con virus de Epstein-Barr. Ver, por ejemplo J.E. Liddell "A practical guide to monoclonal antibodies" ed. John Wiley and sons, 1991, p.188; S.J. de StGroth et al. J. Immunol. Methods, 1980, 35(1-2), 1-21.

Las secuencias de nucleótido de acuerdo con la invención y sus fragmentos se pueden utilizar como una sonda para la hibridización, por ejemplo en un método de diagnóstico.

Las condiciones de hibridización exigentes son ventajosamente utilizadas. Uno puede referirse a aquellas descritas por Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104. La hibridización bajo condiciones exigentes significa que una señal de hibridización positiva es aún observada después de lavar durante una hora con 1 x amortiguador SSC y 0,1% SDS al 55° C, ventajosamente a 62° C y más ventajosamente a 68° C, por ejemplo, durante 1 hora en 0,2 x amortiguador SSC y 0,1% SDS a 55° C, tal como a 62° C y ventajosamente a 68° C.

Uno también puede caracterizar secuencias de nucleótido por su capacidad de unirse bajo condiciones de hibridización exigentes. Así, la invención puede prever las secuencias de ácido nucleico identificadas aquí y las moléculas de ácido nucleico que se unen a esta bajo condiciones de hibridización exigentes.

Las secuencias de nucleótido de acuerdo con la invención y sus fragmentos se pueden utilizar como iniciadores del PCR o en un método similar que involucra amplificación y/o la hibridización, por ejemplo, para la detección de bacterias gram negativas en cualquier medio, por ejemplo muestras de tejido, fluidos biológicos, agua, alimento.

Ventajosamente se hace uso de fragmentos de secuencia de nucleótido que tienen al menos 20 ácidos nucleicos contiguos, tales como al menos 30 ácidos nucleicos contiguos, por ejemplo, al menos 50 ácidos nucleicos contiguos, por ejemplo al menos 70 ácidos nucleicos contiguos o más ventajosamente al menos 100 ácidos nucleicos contiguos de las secuencias de nucleótido o genes de acuerdo con la invención, por ejemplo, de ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37,

40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93.

Adicionalmente, la presente invención se relaciona con los métodos para inmunizar contra o evitar la infección bacterial o proteger contra infección bacterial en animales, ventajosamente en animales susceptibles a esta, tales como aves, conejos, bovinos o especies porcinas, y más ventajosamente en especies aviarias tales como pollo, pavos, o patos (incluyendo criadoras, ponedoras y de capas) o en un humano.

De acuerdo con estos métodos, (1) una composición inmunogénica atenuada viva o vacuna de la invención, o (2) una composición inmunogénica sub-unitaria o vacuna de la invención, o (3) una composición inmunogénica recombinante viva o vacuna de la invención, o combinaciones de estas, son administradas. Por supuesto, las modalidades de la invención se pueden emplear con otras vacunas o composiciones inmunogénicas que no son de la invención, por ejemplo, en procesos de primer paso, tales como donde una vacuna o composición inmunogénica de la invención se suministra primero y una vacuna o

composición inmunogénica diferente se administra después, o viceversa.

La administración puede ser notablemente hecha mediante administración intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC) o por vía intranasal, intratraqueal u oral. La composición inmunogénica o la vacuna de acuerdo con la invención es ventajosamente administrada mediante una jeringa, aparato sin aguja (como por ejemplo Pigjet, Avijet, Dermojet o Bioyector (Bioject, Oregon, USA)), rociado, embebido en agua, gotas de ojo.

Las administraciones ventajosas para composición inmunogénica viva atenuada o la vacuna son *in ovo*, vía oral (por ejemplo agua para beber, rociado de cuerpo completo), ocular (por ejemplo gotas de ojo, rociado de cuerpo completo), traqueal (por ejemplo rociado), intradérmica, subcutánea (SC) o rutas intramusculares (IM).

La cantidad de microorganismos atenuados vivos se puede determinar y optimizar por el experto en la técnica, sin experimentación indebida de esta descripción y el conocimiento en la técnica. - Generalmente un animal

(incluyendo un humano) se le puede administrar aproximadamente 10^4-10^9 CFU, ventajosamente aproximadamente 10^5-10^8 CFU y más ventajosamente aproximadamente 10^6-10^7 CFU en una unidad de dosis simple.

Por ruta intramuscular a un animal aviario se le puede administrar aproximadamente 10^4-10^7 CFU, ventajosamente aproximadamente 10^5-10^6 CFU en una unidad de dosis simple.

El volumen de una unidad de dosis simple puede estar entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 0,5 ml y ventajosamente aproximadamente 0,3 ml. Por ruta oral, traqueal u ocular a un animal aviario se le puede administrar aproximadamente 10^5-10^8 CFU, ventajosamente aproximadamente 10^6-10^7 CFU en una unidad de dosis simple.

Para administración por rociado el volumen es ajustado al aparato y tamaño de gotas, desde aproximadamente 30 a aproximadamente 600 ml para aproximadamente 1000 animales y ventajosamente aproximadamente 0,2 ml por animal.

Para animales bovinos y porcinos, las rutas ventajosas son IM y SC. Al animal se le puede administrar aproximadamente 10^4-10^9 CFU, ventajosamente aproximadamente 10^5-10^8 CFU en una unidad de dosis simple. El volumen de una unidad de dosis simple puede estar

entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 5,0 ml y ventajosamente entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 2,0 ml y más ventajosamente aproximadamente 1,0 ml.

A los conejos se les puede administrar por vía de ruta IM o SC aproximadamente 10^4 - 10^8 CFU, ventajosamente aproximadamente 10^5 - 10^7 CFU en una unidad de dosis simple.

El volumen de una unidad de dosis simple puede estar entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 0,5 ml y ventajosamente aproximadamente 0,5 ml.

A ellos también se les puede administrar por vía de la ruta ID aproximadamente 10^4 - 10^8 CFU, ventajosamente aproximadamente 10^5 - 10^7 CFU en una unidad de dosis simple.

El volumen de una unidad de dosis simple puede estar entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 0,2 ml.

La invención será adicionalmente descrita por vía de los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción de una librería de mutantes transposón *P. multocida* de firma etiquetada (selección STM)

Construcción de los transformantes SM10 λ pir pLOF/km etiquetados

Fueron producidas etiquetas como se describió en Hensel et al., (Science, 1995, 269: 400-403). Inicialmente los plásmidos pUTminiTn5Km2 etiquetados fueron seleccionados para contener etiquetas que hibridizan bien pero no hibridizan cruzado uno con el otro. El transposón mini-Tn5 en el vector pUTminiTn5Km2 etiquetado fue encontrado que no se transponía en varias cepas de *Pasteurella multocida*. Como contraste el transposón mini-Tn10 ha mostrado que funciona en *P. multocida* (Lee et al., Vet Microbiol, 1996, 50: 143-8). Las etiquetas pre-seleccionadas fueron por lo tanto transformadas de los vectores pUTminiTn5 en los mini-Tn10 que contienen plásmido pLOF/Km (Herrero et al., J. Bacteriology, 1990, 172: 6557-6567). Las etiquetas fueron amplificadas mediante PCR utilizando iniciadores que se unen al vector

150

pUTminiTn5Km2, a cualquier lado del sitio KpnI en el cual las etiquetas son clonadas. Estos iniciadores incluyeron secuencias para la enzima de restricción SalI. Los productos de PCR fueron entonces digeridos con SalI y clonados en el sitio SalI de una versión modificada del vector pLOF/Km, en el cual el sitio SalI ha reemplazado el único sitio de clonación SfiI. Los plásmidos pLOF/Km etiquetados fueron transformados en cepas de *E. coli* SM10λpir (Km^r, *thi*, *thr*, *leu*, *tonA*, *lacY*, *supE*, *recA::RP4-2-Tc::Muλpir*) (Miller V.L. et al., J. Bacteriol., 1988, 170: 2575-83). Esta cepa puede movilizar plásmidos tales como pLOF/Km en bacterias receptoras mediante conjugación.

Métodos para seleccionar y contra-seleccionar

El proceso de conjugación requiere un método para seleccionar el *P. multocida* receptor, que ha adquirido el plásmido pLOF/KM y un método para contra-selección contra el donador *E. coli* SM10λpir.

En el método para seleccionar el receptor *P. multocida* son seleccionadas para utilizar canamicina, que es codificada por el mini-Tn10 transposón.

Inicialmente para contra-selección contra el donador *E. coli* en conjugaciones, un mutante resistente espontáneamente estreptomicina de la cepa *Pasteurela* P-1059 fue utilizado. Sin embargo, pareció que la cepa fue atenuada en virulencia para los pavos y así no fue útil aquí. Las cepas de *Pasteurela multocida* pueden crecer sobre un medio químicamente definido (CDM) (Hu et al., Infection and immunity 1986, 804-810). Una versión modificada de este medio químicamente definido que contiene agar pero que no contiene leucina fue utilizada para permitir la contra-selección contra el donador *E. coli*. La cepa de *Pasteurela* fue capaz de crecer sobre este medio, cuya composición está dada en la tabla 1, mientras que la cepa de *E. coli* SM10λpir, que es una leucina auxótrofa no lo fue.

Tabla 1:

Componente	Concentración g/litro
Agar noble	20
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	32.31
KH ₂ PO ₄	1.368
NaCl	1.196
Glucosa	6.0
Clorhidrato de L-Arginina	0.24
Clorhidrato de L-Cisteína	0.12
L-Serina	0.2
Ácido L-glutámico	0.15
L-isoleucina	0.064
L-fenilalanina	0.095
Ácido L-Aspártico	1.6
L-tirosina	0.08
Clorhidrato de tiamina	0.0002
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.246
Pantotenato de calcio	0.004
Nicotinamida	0.01
Ácido orótico	0.003

Pasando de la cepa *P. multocida* sobre medio CDM

Una ampolla liofilizada de la cepa *P. multocida* (USDA P-1059, disponible del American Type Culture Collection, número de acceso ATCC 15742) fue recibida por la adición de 200 µl de BHI (infusión cerebro-corazón) y una

alícuota de la suspensión abigarrada sobre un plato de agar BHI y el plato incubado a 37° C durante toda la noche. El material de colonia de este plato se utilizó para inocular un caldo de cultivo BHI, que fue incubado con agitación a 37° C durante toda la noche. Se agregó glicerol a una concentración final de 15% v/v y fueron almacenadas alícuotas congeladas a -80° C. Una muestra de una de estas alícuotas congeladas fue abigarrada sobre un plato de agar BHI e incubada durante toda la noche. El material de la colonia de este plato BHI fue entonces abigarrado sobre unos platos de agar CDM con la composición dada en la tabla 1 e incubada a 37° C durante 3 días. El material de la colonia de este plato CDM fue inoculado en un caldo de cultivo BHI e incubado con agitación a 37° C durante toda la noche. Se agregó glicerol a este cultivo concentración final de 15% v/v y alícuotas congeladas a -80° C. Esta cepa fue llamada 16084 (CDM).

Construcción del banco mutante

Los transformantes marcados SM10 λ pir pLOF/km fueron conjugados con la cepa *P. Multicida* 16084 (CDM). Para

minimizar el aislamiento de los mutantes hermanos (mutantes con el transposón localizado en la misma posición que surge debido a la replicación del mutante durante el procedimiento de conjugación) cada transformante marcado SM10λpir fue conjugado con la cepa de *P. Multocida* en por lo menos tres conjugaciones separadas. Los mutantes transposones *Pasteurella* fueron seleccionados en placas agar CDM suplementadas con 50µg/ml de canamicina.

Los mutantes resistentes a la canamicina para cada uno de los transposones marcados fueron entonces unidos para formar colonias únicas dos veces en placas agar con 50µg/ml de BIH canamicina. Las colonias únicas fueron entonces inoculadas en cultivos de caldos en BHI, crecidos durante la noche a 37°C con agitación. Entonces se agregó glicerol a una concentración final de 15% v/v y los mutantes se almacenaron a -80° C en frascos individuales.

Ejemplo 2: Tamizado del banco mutante *Pasteurella* marcado y firmado para los mutantes atenuados en su virulencia para pavos.

Los cultivos de mutantes de *P. Multocida* fueron crecidos para su inoculación en pavos Por medio de mezclar 20µl de cada uno de los productos almacenados con glicerol de los mutantes obtenidos en el ejemplo I con 200µl de medio de cultivo BHIU, suplementados con 50µg/ml de canamicina, y colocados platos de microtítulo de 96 posos. Estos platos microtítulo fueron incubados en condiciones estáticas durante cerca de 18 horas a 37° C. Entonces alícuotas de 10µl de los cultivos de 18 horas de cada mutante fueron mezclados con 200µl del medio de cultivo BHI suplementado con 50µg/ml de canamicina en un a placa microtítulo fresca y la placa fue incubada a 37° C durante aproximadamente 4 horas. Los cultivos fueron detenidos en la fase exponencial de crecimiento y 100µl de los cultivos de cada mutante fueron transferidos a una placa microtítulo fresca y usados para la determinación de la densidad óptica (OD) a 650nm.

La inoculación o pozos de entradas fueron formados por medio de mezclar los 100µl restantes de los cultivos de 4 horas. Cada pozo de entrada consistió de 48 mutantes diferentes. El título de estas suspensiones en pozos

fueron determinados por análisis FACS (clasificador de células activado por fluorescencia) de alícuotas de 100µl. Alícuotas (1ml) de la suspensión separada en partes pequeñas fueron entonces diluidas en agua amortiguada fisiológicamente para obtener una suspensión con un título de $2,10^7$ cfu/ml. Grupos de 5 pavos de tres semanas fueron entonces inoculados intramuscularmente con alícuotas de 0,5ml de esta suspensión (10^7 cfu por animal). El estado serológico de los pavos antes de la inoculación fue determinado para tamizar la presencia de anticuerpos de la *Pasteurella* en muestras de sangre tomadas un día antes de la inoculación. Las células del restante de los pozos de entrada fueron cosechados por centrifugación y se extrajo el DNA cromosomal de las partículas de células.

Aproximadamente 14 horas después de la inoculación muestras de 1ml de sangre fueron tomadas de 3 de los 5 pavos. Series de dilución (10^{-1} a 10^{-7}) de las muestras de sangre fueron puestas en placas en placas de agar Columbia suplementadas con 5 % de sangre de ovejas. Las placas fueron incubadas a 37° C durante 24 horas después de lo cual aproximadamente 10000 colonias de *Pasteurella*

fueron resuspendidas en medio BHI. Estas suspensiones que son llamadas pozo de salida, fueron entonces centrifugadas y se extrajo el DNA cromosomal de las partículas celulares.

Los mutantes de *Pasteurella* que estuvieron presentes en el pozo de entrada pero que no se reaislaron de los pavos fueron identificados por amplificación PCR de las marcas de firma presentes en las muestras DNA de los pozos de entrada y salida, y la hibridización de los productos amplificados por PCR contra manchas de punto cargadas de DNA que codifica las marcas de firma, como se describió en Hensel et al. (Science 1995,269:400-403). Estos mutantes fueron considerados como potencialmente atenuados en su virulencia. Esta atenuación fue confirmada por el tamizado en cuanto a la falta de mortalidad después de las infecciones únicas de los mutantes potencialmente en los pavos.

Ejemplo 3: Confirmación de la atenuación en la virulencia para los pavos de los mutantes de *P. Multocida*.

Los mutantes transposones identificados como atenuados potencialmente en el ejemplo 2 o los mutantes que tienen

habilidad limitada para crecer en cultivos, fueron revividos mezclando 20µl de partidas de glicerol con 200µl de medio de cultivo BHI suplementado con 50µg/ml de canamicina en platos microtítulo. Estos platos microtítulo fueron incubados en condiciones estáticas durante 18 horas a 37° C. Entonces alícuotas de 10µl de cada mutante de estos cultivos fueron tomadas y mezcladas con 200µl de medio BHI, suplementadas con 50µg/ml de canamicina en una placa microtítulo fresca y esta placa fue incubada en condiciones estáticas durante cerca de 4 horas. Los cultivos fueron detenidos en la fase exponencial de crecimiento y 100µl de los cultivos de cada mutante fueron transferidos a una placa microtítulo fresca y usados para la determinación de la densidad óptica (OD) a 650nm.

Los cultivos de cada uno de los mutantes fueron diluidos en agua 10000 amortiguada fisiológicamente para obtener una concentración de aproximadamente $2,14^4$ cfu/ml. (0,5 ml) de estas diluciones fueron entonces inoculadas intramuscularmente en 2 pavos de 5 semanas (10^4 cfu por animal). Los estados serológicos de unos pocos animales de cada grupo de pavos fueron determinados a partir de

muestras de sangre tomadas el día antes de la inoculación. Los pavos fueron monitoreados durante los siguientes 7 días en cuanto a mortalidad. De los mutantes ensayados 72 no resultaron en mortalidad en cada uno de los dos pájaros inoculados. Estos 72 mutantes fueron considerados atenuados en virulencia.

Ejemplo 4: Caracterización de mutantes de transposones de inserción identificados después del tamizado en los pavos.

Los sitios de inserción del transposón en el genoma de mutantes de *P. Multocida* atenuados fueron identificados por la clonación del DNA flanqueado aun lado de la inserción del transposón, sea por PCR inverso o por PCR cebado arbitrariamente.

Estos mutantes fueron revividos a partir de las partidas de glicerol a -80° C por medio de unir una alícuota en placas de agar de 50µg/ml de BHI canamicina. Estas colonias únicas fueron entonces usadas para inocular cultivos de caldo de BHI a partir del cual el DNA cromosomal fue preparado.

160

Para el PCR inverso el DNA cromosomal fue digerido con una encima de restricción que tiene un sitio de reconocimiento de 4 pares base, tal como Tsp509I, α TaqI o RsaI. El DNA es entonces ligado en un gran volumen para promover la ligación intramolecular. El DNA que flanqueó el transposón es entonces amplificado a partir de esta plantilla de DNA ligada usando imprimadores exteriores que anillan o que templan para la secuencia conocida del transposón tal como Stipj (ID de Sec. No.: 98,20 mer) (5'ATC TGA TCC TTC AAC TCA GC 3'), Stip A (ID de Sec. No.:99,19 mer) (5'CGC AGG GCT TTA TTG ATT C 3'), KTGRI (SEQ IN NO:100,27 mer) (5'GCG GAA TTC GAT GAA TGT TCC GTT GCG 3'), TNLOIRL (ID de Sec. No.: 101,20 mer) (5'TTT ACC AAA ATC ATT AGG GG 3') y TNLOIR4 (ID de Sec. No.: 102,19 mer) (5'GAT CAT ATG ACA AGA TGT G 3'). Estos productos de PCR inverso son entonces clonado y secuenciados.

Para un PCR cebado arbitrariamente el DNA cromosomal fue usado como una plantilla en una primera ronda de reacción PCR con un cebador exterior que templea al transposón, tal como StipA, y un cebador arbitrario, tal como arb1 (ID de Sec. No.: 103, 35 mer) (5'GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN GAT AT 3') o arb6 (ID de Sec.

No.: 104, 35 mer) (5'GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN CAG CC 3'). La temperatura de templado de esta primera ronda de reacción PCR se establece inicialmente muy baja, con la temperatura del templado elevada en ciclos subsecuentes. Una porción de los productos de esta primer ronda PCR es entonces usada como una plantilla en una segunda ronda PCR. Esta segunda ronda PCR utiliza otro cebador exterior, tal como KTGRI, el cual templea al transposón en una posición que es más cercana al extremo del transposón que al cebador usado en la primera ronda PCR. El otro cebador usado en esta segunda ronda PCR tiene la misma secuencia que las 20 bases de la secuencia conocida en el extremo 5' del cebador arbitrario usado en la primera ronda PCR, tal como arb2 arb2 (ID de Sec. No.: 105,20 mer) (5'GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC 3'). Los productos PCR de este segundo PCR son entonces clonados y secuenciados.

Las secuencias obtenidas fueron entonces analizadas para identificar marcos de lectura abiertos (ORF), los cuales pueden ser rotos por el transposón y fueron también usados para buscar secuencias similares disponibles actualmente en la base de datos EMBL y en la secuencia del genoma de la cepa PM70 de la *Pasteurella multocida*,

determinada por la Universidad de Minnessota (May BJ et al, Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98(6):3460-5).

Para información, en las siguientes secuencias de nucleótido, N es correspondiente a cualquier ácido nucleico (A o C o G o T).

Mutantes 1G4, 3F4, 3G12, 12D6 Y 14C10

Los mutantes 1G4, 3F4 y 12D6 tiene exactamente el mismo sitio de inserción del transposón, La secuencia de DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.:1 (775 mer). El transposón es insertado inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

Un codón de partida está localizado en las posiciones 179-181 de la ID de Sec. No.: 1.

Para el mutante 3G12, la secuencia de DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dado en la ID de Sec. No.: 95 (101 mer).El transposón es insertado inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

Para el mutante 14C10, la secuencia de DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón esta dada en la ID de Sec. No.:96 (220 mer). El transposón es insertado inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

Cuatro otras proteínas *Pasteurellaceae* y genes de ella fueron identificados por ráfagas hechas con una secuencia de aminoácido 60 codificada por la ID de Sec. No.:1.

Cepa	Gen(referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	Porcentaje de identidad
Taxón 747 de <i>P. multocida</i>	PhyA (AF067175)	PhyA (AAC67248)	100% sobre 60 aminoácidos
PM 70 de <i>P. multocida</i>	PM0773 (AE006115)	PhyA (AAK02857)	98% sobre 60 aminoácidos
P4218 de <i>P. multocida</i>	PhyA (AF302467)	PhyA (AAK17919)	98% sobre 60 aminoácidos
P934 de <i>P. multocida</i>	PhyA (AF302465)	PhyA (AAK17907)	95% sobre 60 aminoácidos.

La localización del transposón en los mutantes 1G4, 3F4 y 12D6 corresponde a la posición 8507-8508 de la secuencia del genoma PM 70 *Pasteurella multocida*, número de acceso del Genbank AE006115. La localización del transposón en el mutante 3G12 corresponde a la posición 8609-8610 de la secuencia AE006115. la localización del transposón en el mutante 14C10 corresponde a la posición 8517-8518 de la secuencia AE006115. El transposón rompe un homólogo del

gen PM70 PM0773, PhyA. El gen PhyA fue predicho de que se involucra en síntesis de cápsula. La secuencia del nucleótido del PM0773 se ha identificado aquí como la ID de Sec. No.:2 y su secuencia de aminoácido como la ID de Sec. No.:3.

Mutantes IG8, 9D1 y 9D8

En el mutante IG8, el transposón es insertado inmediatamente en el extremo 3' de la secuencia ID de Sec. No.:4 (226 mer). Esta secuencia tiene dos marcos de lectura abiertos (+2 Y -2) que codifican proteínas de potencial más largas. El ORF de acuerdo la invención está en el cuadro -2.

El transposón insertado en el mutante 9D1 es inmediatamente en el extremo 3' de la secuencia ID de Sec. No.:5 (87 mer).

El transposón insertado en el mutante 9D8 es posicionado después en la posición 225 de la secuencia ID de Sec. No.:4.

Los transposones en los mutantes 1G8, 9D1 y 9D8 rompen un homólogo del gen PM70, PM0871. Las localizaciones de los transposones en estos mutantes corresponde a las posiciones 9849-9850 (mutante 1G8), 8899-8900 (mutante 9D1) o 9848-9849 (mutante 9D8) de la secuencia del genoma PM70 de la *Pasteurella multocida* con número de acceso Genbank AE006125. La secuencia del nucleótido del PM0871 se ha identificado aquí como la ID de Sec. No.:6 y su secuencia de aminoácido como la ID de Sec. No.:7.

Otro gen/proteína Pasteurellaceae fue identificada por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.:7 Este es *Hemofilus influenzae* HI1586 (números de acceso Genbank U32832 y AAC23234). Encontramos una identidad de 72% sobre 507 aminoácidos entre PM0871 y HI1586.

Mutante 2F2

La secuencia DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.:8 (78 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia. Esta secuencia tiene tres cuadros de lectura abiertos (+1,+2 y -1) que codifican proteínas de potencial

más largo. El ORF de acuerdo con la invención está en el cuadro +2.

El transposón en el mutante 2F2 interrumpe un gen homólogo del gen PM1727 del PM70. Este transposón está localizado en una posición que corresponde a 644-645 de la secuencia PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006210 (PM1727). La secuencia del nucleótido de PM1727 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.:9 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.:10.

Otro gen /proteína pasteurellaceae fue identificado por ráfagas hechas con las ID de Sec. No.:10. Esta es la *Hemofilus influenzae* HI0624 (números de acceso Genbank U32744 y AAC22281). Encontramos una identidad de 77% sobre 183 aminoácidos entre PM1727 y HI0621.

El PM1727 es un miembro de una super familia de hidrolasas, en particular está relacionada con histidinol fosfato fosfatazas.

Mutante 3A2

La secuencia de DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.:11 (467 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

Un codón de finalización está localizado en las posiciones 428-430.

El transposón en el mutante 3A2 está localizado en una posición que corresponde a 5103-5104 de la secuencia de PM70 de *pasteurella multocida*, número de acceso Genbank AE006094 (PM0586). La secuencia de nucleótido del PM0586 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.:12 y su secuencia amino como ID de Sec. No.:13.

Dos otros genes y proteínas pasteurellaceae fueron identificados por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.: 13. Estos genes y proteínas son *pasteurella hemolítica* Al PlpD (números de acceso a Genbank AF058703 y AAC32565) y *Hemofilus Sommus* 31 kDa (números de acceso a Gnenbank L07795 y AAA24941). Encontramos una identidad de 73% sobre 276 aminoácidos entre Pm0586 y PlpD de P.

hemolítica y 71% sobre 273 aminoácidos entre PM0586 y 31kDa *H. Sommus*.

El PlpD y PM0586 son miembros de la familia de la proteína ompA.

Mutante 3D3

Las secuencias de DNA que flanquean ambos lados del sitio de inserción del transposón están dadas en la ID de Sec. No.:14 (204 mer, transposón en el extremo 5') y la ID de Sec. No.:15 (35 mer, transposón en el extremo 5').

Un codón de finalización esta localizado en las posiciones 7-9 de la ID de Sec. No.:14 y en las posiciones 33-35 de la ID de Sec. No.:15.

Otro gen7proteína *Pasteurellaceae* fue identificado por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.:14 y su secuencia de aminoácidos codificada (65 aminoácidos). Encontramos una identidad de 100% sobre 65 aminoácidos con la proteína PM0064. La localización del transposón en el mutante 3D3 corresponde a las posiciones 4778.4779 o 4787-4788 de la secuencia del genoma de PM70 *pasteurella multocida*,

número de acceso Genbank AE006042, posiciones deducidas de la ID de Sec. No.: 14 Y 15 respectivamente. Esta diferencia es similarmente debida a la inserción del transposón resultante en la duplicación de unos pocos nucleótidos en el sitio de inserción del transposón. La posición 4788 está localizada en el gen PM0064. La posición 4778 es 6bp aguas abajo del codón de finalización del PM0064. La secuencia de nucleótido del PM0064 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.:16 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.:17.

Otros Genes y proteínas de bacteria gram negativo fueron identificados por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.:17.

Sepa	Gen(referencia Gnebak)	Proteína (referencia Genbank)	Porcentaje de identidad
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI0017 (U32687)	HI0017 (AAC21695)	81% sobre 127 aminoácidos
<i>Escherichia coli</i> K12	YfiD (AE000344)	YfiD (AAC75632)	81% sobre 127 aminoácidos
<i>Salmonella tiphy</i>	STY2839 (AL627275)	YfiD (CAD02795)	81% sobre 127 aminoácidos
<i>Salmonella typhimurium</i>	STM2646 (AE008820)	YfiD (AAL21540)	81% sobre 127 aminoácidos
<i>Serratia liquefacines</i>	OrfX (X66505)	OrfX (CAA47136)	79% sobre 127 aminoácidos
<i>Yersinia pestis</i>	YPO2705 (AJ414153)	YPO2705 (CAC92944)	79% sobre 127 aminoácidos
<i>Vibrio cholerae</i>	VC2361 (AE004306)	VC2361 (AAF95504)	73% sobre 127 aminoácidos

170

Mutante 3D8

La secuencia del DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 18 (75 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

La localización del transposón en el mutante 3D8 corresponde entre las posiciones 7769-7770 de la secuencia del genoma PM70 de la *Pasteurella multocida*, número de acceso Genbank AE006080. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM0445 del PM70. La secuencia del nucleótido del PM0445 está identificada aquí ID de Sec. No.:19 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.:20.

Mutante 3E1

La secuencia del DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón esta dada en la ID de Sec. No.:21 (229 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

La localización del transposón en el mutante 3E1 corresponde entre las posiciones 9195-9196 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Gnebank AE006133. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM0940 del PM70. La secuencia del nucleótido del PM0940 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.:22 y sus secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.:23.

Otros genes y proteínas de bacteria gram negativa fueron identificados por ráfagas hechas con ID de Sec. No.:17.

Sepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	Porcentaje de identidad
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI0075 (U32693)	nrdD (AAC21751)	87% sobre 713 aminoácidos
<i>Escherichia coli K12</i>	NrdD (AE000495)	nrdD (AAC77195)	76% sobre 709 aminoácidos
<i>Salmonella typhi</i>	STY4791 (AL627283)	nrdD (CAD06912)	76% sobre 709 aminoácidos
<i>Salmonella typhimurium</i>	STM4452 (AE008908)	nrdD (AAL23272)	76% sobre 709 aminoácidos
<i>Yersinia pestis</i>	YPO3464 (AJ414157)	nrdD (CAC92683)	75% sobre 709 aminoácidos
<i>Vibro cholerae</i>	VCA0511 (AE004381)	VCA 0511 (AAF96414)	74% sobre 709 aminoácidos

Mutante 3H2

122

La secuencia del DNA que flaquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 24 (58 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia. Esta secuencia tiene dos cuadros de lectura abierta (+1 y -3) que codifican proteínas de potencial más largo. El ORF de acuerdo con la invención está en el cuadro +1.

Otro gen Pasteurellaceae fue identificado por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.: 24 y con su secuencia codificada de aminoácidos (19 aminoácidos). Encontramos una identidad de 100% sobre 19 aminoácidos con la proteína PM1951. La localización del transposón en el mutante 3H2 corresponde entre las posiciones 9418-9419 de la secuencia PM70 de *Pasteurella multocida*, número de acceso Gnebank AE006231 (PM1951, uvrA). La secuencia del nucleótido del PM1951 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.:25 y sus secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.:26.

Otros genes y proteínas de bacteria gram negativa fueron identificados por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.:26.

cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	Porcentaje de identidad
<i>Haemophilus influenzae</i>	UvrA (U32711)	UvrA (AAC21915)	89% sobre 943 aminoácidos
<i>Escherichia coli</i> K12	UvrA (AE000479)	UvrA (AAC77028)	80% sobre 940 aminoácidos
<i>Yersinia pestis</i>	UvrA (AJ414142)	UvrA (CAC89185)	80% sobre 943 aminoácidos
<i>Vibro Cholerae</i>	UvrA (AE004127)	UvrA (AAF93567)	80% sobre 940 aminoácidos
<i>Salmonella typhi</i>	UvrA (AL627282)	UvrA (CAD09238)	80% sobre 941 aminoácidos
<i>Salmonella typhimurium</i>	UvrA (AE008898)	UvrA (AAA27250)	80% sobre 941 aminoácidos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UvrA (AE004840)	UvrA (AAG07622)	75% sobre 943 aminoácidos

El UvrA es una nucleasa de excisión del ABC de reparación del DNA.

Mutante 4D6

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 27 (54 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia. Esta secuencia tiene dos cuadros de lectura abiertos (+1 y -2) que codifican proteínas de potencial más largo. El ORF de acuerdo con la invención está en el cuadro +1.

La localización del transposón en el mutante 4D6 corresponde entre las posiciones 6492-6493 de la secuencia PM70 de *Pasteurella multocida*, número de acceso Genbank AE006036. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM0032 o hktE del PM70. La secuencia del nucleótido del PM0032 está identificada aquí como ID de Sec. No.:28 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.:29.

Otro gen/proteína Pasteurellace fue identificado por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.: 29. esto es *Actinobacillus actinomycetemcomitans* catalasa (números de acceso Genbank AF162654 y AAF17882). Encontramos una identidad de 85% sobre 482 aminoácidos entre PM0032 y A. *Actinomycetemcomitans* catalasa.

HktE es una catalasa.

Mutante 4F4 y 12A5

Para el mutante 4F4, la secuencia del DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 30 (172 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

Para el mutante 12A5, la secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.:97 (546 mer). El transposón está insertado inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

Cuatro otros genes y proteínas Pasteurellaceae fueron identificados por ráfagas hechas con la secuencia de 57 aminoácidos codificada por la ID de Sec. No.:30.

cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	Porcentaje de identidad
P. multocida taxon 747	HyaC (AF067175)	HyaC (AAC67251)	96% sobre 57 aminoácidos
P. multocida PM70	PM0776 (AE006116)	AAK02860	96% sobre 57 aminoácidos
P. multocida P4218	FcbC (AF302467)	FcbC (AAK17922)	91% sobre 57 aminoácidos
P. multocida P934	DcbC (AF302465)	DcbC (AAK17904)	88% sobre 57 aminoácidos

La localización del transposón en el mutante 4F4 corresponde entre las posiciones 5272-5273 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida*, número de acceso Genbank AE006116. La localización del transposón en el mutante 12A5 corresponde entre las posiciones 5275-5276 de la secuencia AE006116. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM0776 del

PM70. La secuencia del nucleótido del PM0776 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 31 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.:32. Estas proteínas son UDP glucosas dehidrogenasas.

Mutante 4F12

La secuencia del DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 33 (226mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

La localización del transposón en el mutante 4F12 corresponde entre las posiciones 9263-9264 de la secuencia PM70 de *Pasteurella multocida*, Número de acceso Genbank AE006038. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM0048 o FadR del PM70. La secuencia del nucleótido del PM048 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.:34 y sus secuencias de aminoácido como ID de Sec. No.: 35. El FadR es un homólogo de una proteína E. Coli que es un regulador de transcripción del metabolismo de ácidos grasos, que afectan varias biosíntesis de ácidos grasos (fab) y genes de degradación de ácidos grasos (fad).

Mutante 4G11

La secuencia del DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 36 (214 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

Otro gen Pasteurellaceae fue identificado con ráfagas hechas por la ID de Sec. No.:36 y su secuencia codificada de aminoácidos (70 aminoácidos). Encontramos una identidad de 100% sobre 70 aminoácidos con la proteína PM1024. La localización del transposón en el mutante 4G11 corresponde entre las posiciones 3532-3533 de la secuencia del genoma PM70 del *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006143. El transposón interrumpe un homólogo del gen Pm1024 o HtpG del Pm70. La secuencia de nucleótido del PM1024 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 37 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 38.

Otros genes y proteínas de bacteria gram negativo fueron identificados por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.:38.

cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	Porcentaje de identidad
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	HtpG (U26968)	HtpG (AAC44732)	88% sobre 625 aminoácidos
<i>Haemophilus influenzae</i>	HtpG (U32695)	HtpG (AAC21778)	86% sobre 625 aminoácidos
<i>Escherichia coli</i> K12	HtpG (AE000153)	HtpG (AAC73575)	76% sobre 621 aminoácidos
<i>Yersinia pestis</i>	HtpG (AJ414155)	HtpG (CAC92355)	76% sobre 622 aminoácidos
<i>Salmonella typhi</i>	STY0531 (AL627267)	HtpG (CAD04972)	76% sobre 621 aminoácidos
<i>Salmonella typhimurium</i>	HtpG (AE008718)	HtpG (AAL19441)	75% sobre 621 aminoácidos

El HtpG es una proteína de choque térmico.

El mutante 4G11 fue depositado bajo tratado de Budapest en el Pasteur Institute Collection y está disponible bajo el número de acceso CNCMI-2999.

Mutante 5D5

La secuencia del DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 39 (252

mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

La localización del transposón en el mutante 5D5 corresponde entre las posiciones 5695-5696 de la secuencia del genoma PM70 del *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006188. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM15147 o PlpE) del Pm70. La secuencia de nucleótido del PM1517 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 40 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 41.

El PlpE a predicho como que es una membrana de lipoproteína.

El mutante 5D5 fue depositado bajo el tratado de Budapest en el Pasteur Institute Collection y esta disponible bajo el número de acceso CNCmI-3000.

Mutante 5F11

La secuencia del DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 42 (546

180

mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

Un codón de finalización esta localizado en las posiciones 148-150.

La localización del transposón en el mutante 5F11 corresponde entre las posiciones 572-573 del genoma PM70 del *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006150. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM1087 o NifR3. del PM70. La secuencia de nucleótido del PM1087 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 43 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 44.

Otro gen/proteína Pasteurellaceae fue identificado por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.:44. Este es el *Hemophilus influenzae* HI0979 (Número de acceso Gnebank U32778 y AAC22639). Encontramos una identidad de 78% sobre 332 aminoácidos entre PM1087 y HI0979.

El NifR3 es un gen regulatorio de la nitrogenasa.

Mutante 5G9

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 45 (43 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

Esta secuencia tiene 3 cuadros de lectura abiertos (+2,+3 y -1) que codifican proteínas de potencial más largo. El ORF de acuerdo con la invención está en el cuadro +2.

Cuatro otros genes y proteínas Pasteurellaceae fueron identificados por ráfagas hechas con la secuencia de 14 aminoácidos codificada por la ID de Sec. No.:45.

cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	Porcentaje de identidad
<i>P. multocida</i> <i>P4218</i>	FcbE (AF302467)	FcbE (AAK17920)	100% sobre 14 aminoácidos
<i>P.multocida</i> <i>PM70</i>	PM0774 (AE006116)	HyaE (AAK02858)	100% sobre 14 aminoácidos
<i>P.multocida</i> <i>taxon 747</i>	HyaE (AF067175)	HyaE (AAC67249)	100% sobre 14 aminoácidos
<i>P.multocida</i> <i>P934</i>	DcbE (AF302465)	DcbE (AAK17906)	71% sobre 14 aminoácidos

La localización del transposón en el mutante 5G9 corresponde entre las posiciones 573-574 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida*, número de acceso Genbank Ae006116. El transposón interrumpe un

homologo del gen PM0774 o HyaE del PM70. La secuencia del nucleótido del PM074 se ha identificado aquí como la ID de Sec. No.: 46 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 47. Estos genes están involucrados en la síntesis de cápsula.

Mutante 6E5

La secuencia del DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 48 (279 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

Un codón de partida de inicio está localizado en las posiciones 169-171.

La localización del transposón en el mutante 6E5 corresponde entre las posiciones 6673-6674 del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006182. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM1459 o PgtB del Pm70. La secuencia de nucleótido del PM1459 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 49 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 50.

El PgtB es una proteína regulatoria del transporte de fosfoglicerato.

Mutante 6E6

La secuencia del DNA que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 51 (93 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

Un codón de finalización está localizado en las posiciones 2-14.

La localización del transposón en el mutante 6E6 corresponde entre las posiciones 9051-9052 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006096 El transposón interrumpe un homólogo del gen 0605 del Pm70. La secuencia de nucleótido del PM0605 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 52 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 53.

Mutante 6F12

194

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 54 (772 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

Un codón de partida o inicio está localizado en las posiciones 2-4.

La localización del transposón en el mutante 6F12 corresponde entre las posiciones 5362-5363 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006192. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM1556 o gen comF del Pm70. La secuencia de nucleótido del PM1556 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 55 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 56.

El ComF es una proteína F de competencia.

Mutante 6G4

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 57 (700



mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

La localización del transposón en el mutante 6G4 corresponde entre las posiciones 3758-3759 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006206. La inserción está entre los genes PM1696 y PM1697. El transposón es insertado entre la región promotora y el codón de inicio del PM1696.

El codón de inicio del PM1696 está localizado en las posiciones 26-28 en la ID de Sec. No.:57.

La secuencia de nucleótido del PM1696 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 58 y su secuencia de aminoácido como DID de Sec. No.: 59.

Otros genes y proteínas de la bacteria gram negativa fueron identificados por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.: 59.

105

cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	Porcentaje de identidad
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI0266 (U32713)	HI0266 (AAC21932)	87% sobre 184 aminoácidos
<i>Salmonella typhi</i>	STY3386 (AL627278)	STY3386 (CAD07732)	71% sobre 185 aminoácidos
<i>Salmonella typhimurium</i>	STM3207 (AE008847)	YgiH (AAL22081)	71% sobre 185 aminoácidos

Mutante 6H1

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 60 (188 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

La localización del transposón en el mutante 6H1 corresponde entre las posiciones 4139-4140 de la secuencia del genoma PM70 del *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006119. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM0806 o gen *speF* del Pm70. La secuencia de nucleótido del PM0806 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 61 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 62.

Dos otros genes de Pasteurellaceae y Vibrionaceae fueron identificados por ráfagas hechas con la ID de Sec.

No.:62. Estos genes son el *Hemofilus influenzae* (números de acceso Genbank U32740 y AAC22248) y *Vibrio colerae* ornitine decarboxilasa (AE004431 y AAF96957). Encontramos una identidad de 83% sobre 719 aminoácidos entre PM0806 y speF. H. Influenzae.

SpeF es una ornitina decarboxilasa.

Mutante 6H6

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 63 (101 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

Esta secuencia tiene dos cuadros de lectura abiertos (+1 y -1) que codifican proteínas de potencial más largo. El ORF de acuerdo con la invención está en el cuadro +1.

La localización del transposón en el mutante 6H6 corresponde entre las posiciones 983-984 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006155 El transposón interrumpe un homólogo del gen PM1138 de Pm70. La secuencia de nucleótido del PM1138

se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 64 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 65.

Mutante 7A7

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 66 (222 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia. La localización del transposón en el mutante 7A7 corresponde entre las posiciones 7853-7854 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006170 (en la región intergénica entre PM1321 y PM1322). El transposón es insertado entre la región terminator y el codón de finalización del PM1322.

El codón de finalización está localizado en las posiciones 25-27 en la ID de Sec. No.: 66. La secuencia de nucleótido del PM1322 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 67 y su secuencia de aminoácido ID de Sec. No.: 68.

Mutante 7F8

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 69 (55 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia. Esta secuencia tiene tres cuadros de lectura abiertos (+1,+3 y -3) que codifican proteínas de potencial más largo. El ORF de acuerdo con la invención está en el cuadro +3.

La localización del transposón en el mutante 7F8 corresponde entre las posiciones 8292-8293 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006224 El transposón interrumpe un homólogo del gen PM18660 del Pm70. La secuencia de nucleótido del PM1866 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 70 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 71.

Mutante 9C8

Las secuencias del ADN que flanquean ambos lados del sitio de inserción del transposón están dadas en la ID de Sec. No.: 72 (598 mer, transposón en el extremo 5') y ID de Sec. No.:73 (561 mer, transposón en el extremo 5').

Un codón de finalización está localizado en las posiciones 26-28 de la ID de Sec. No.:72. Las secuencias ID de Sec. No.: 72 Y 73 están combinadas juntas y limitadas al ORF. La secuencia resultante está designada como ID de Sec. No.: 74 (575 mer).

La localización del transposón en el mutante 9C8 corresponde entre las posiciones 2224-2225 o 2210-2211 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006132, posiciones deducidas de las ID de Sec. No.: 72 Y 73 respectivamente. Ambas posiciones están al interior del gen PM0926 (fimA). La secuencia del nucleótido del PM0926 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 75 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 76.

Otro gen /proteína de Pasteurellaceae fue identificado por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.: 76. Esta Es la fimA *Hemofilus influenzae* (números de acceso Genbank AF053125 y AAC08991). Encontramos una identidad de 77% sobre 171 aminoácidos entre PM0926 y FimA H. Influenzae.

El FimA es una adhesina, una proteína fimbrial.

El mutante 9C8 fue depositado bajo el tratado de Budapest en el Pasteur Institute Collection y está disponible bajo el número de acceso CNCMI-3001.

Mutante 9H4

Las secuencias del ADN que flanquean ambos lados en el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 92 (1391 mer). El transposón fue insertado en la posición 850-851 de esta secuencia. Esta secuencia tiene solamente un cuadro de lectura. El ORF de acuerdo con la invención está en el cuadro -2.

Un codón de inicio está localizado en las posiciones 1318-1316 y un codón de finalización está localizado en las posiciones 29-31 de la ID de Sec. No.: 92. La secuencia ORF resultante está designada como ID de Sec. No.: 93 (1290 MER) y su secuencia de aminoácido está designada como ID de Sec. No.: 94

Las ráfagas hechas con las secuencias ID de Sec. No.: 92 Y ID de Sec. No.:94 no identificaron ningún gen o proteínas homólogos.

El mutante 9H4 fue depositado bajo el tratado de Budapest en el Pasteur Institute Collection y está disponible bajo el número de acceso CNCMI-3002.

Mutante 10G11

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 77 (70 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

Un codón de inicio está localizado en las posiciones 62-64.

La localización del transposón en el mutante 10G11 corresponde entre las posiciones 2938-2939 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006056. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM0220 (rpL31_1) del PM70. La secuencia de nucleótido del PM0220 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 78 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 79.

RpL31_1 es unja proteína 50S ribosomal.

Mutante 11E8

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 80 (506 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

Un codón de inicio está localizado en las posiciones 195-197 de la ID de Sec. No.:80.

La localización del transposón en el mutante 11E8 corresponde entre las posiciones 282-283 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006085. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM0488 del Pm70. La secuencia de nucleótido del PM0488 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 81 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 82.

Mutante 12A1

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 83 (243

mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

Otro gen *Pasteurellaceae* fue identificado por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.: 83 y sus secuencia de aminoácido codificada (81 aminoácido). Encontramos una identidad de 100% sobre 81 aminoácidos con la proteína PM0063. La localización del transposón en el mutante 12A1 corresponde entre las posiciones 2880-2881 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006042 El transposón interrumpe un homólogo del gen PM0063 o gen lepA del Pm70. La secuencia de nucleótido del PM0063 se ha identificado aquí como ID de Sec. No.: 84 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 85.

Otros genes y proteínas de bacteria gram negativa fueron identificados por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.: 85.

cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	Porcentaje de identidad
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI0016 (U32687)	LepA (AAC21694)	95% sobre 598 aminoácidos
<i>Yersinia pestis</i>	YPO2716 (AJ414153)	LepA (CAC92955)	88% sobre 597 aminoácidos
<i>Escherichia coli</i> K12	LepA (AE000343)	LepA (AAC75622)	89% sobre 597 aminoácidos
<i>Salmonella typhi</i>	STY2829 (AL627275)	LepA (CAD02785)	89% sobre 597 aminoácidos
<i>Salmonella typhimurium</i>	LepA (AE008817)	LepA (AAL21477)	89% sobre 597 aminoácidos
<i>Vibro choleare</i>	VC2463 (AE004316)	LepA (AAF95605)	84% sobre 597 aminoácidos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA0767 (AE004511)	LepA (AAG04156)	75% sobre 594 aminoácidos

El LepA es una proteína de membrana que liga el GTP.

Mutante 12B3

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 86 (147 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

La localización del transposón en el mutante 12B3 corresponde entre las posiciones 4028-4029 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número de acceso Genbank AE006152. El transposón interrumpe un homólogo del gen PM112 o gen deaD del Pm70. La secuencia de nucleótido del PM112 se ha identificado aquí como ID

de Sec. No.: 87 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 88.

Otro gen/proteína Pasteurellaceae fue identificad por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.: 88. Esta el la HI0231 *Hemofilus Influenzae* (números de acceso Genbank U32709 y AAC21900). Encontramos una identidad de 80% sobre 605 aminoácidos entre PM112 y HI0231.

La DeaD es una RNA helicasa.

Mutante 13E1

La secuencia del ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón está dada en la ID de Sec. No.: 89 (187 mer). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia. Esta secuencia tiene dos cuadros de lectura abiertos (+1 y -3) que codifican proteínas de potencial más largo. El ORF de acuerdo con la invención está en el cuadro -3.

La localización del transposón en el mutante 13E1 corresponde entre las posiciones 2173-2174 de la secuencia del genoma PM70 de *Pasteurella multocida* número

de acceso Genbank AE006138 (PM0989). La secuencia del nucleótido PM0989 está identificada aquí como ID de Sec. No.: 90 y su secuencia de aminoácido como ID de Sec. No.: 91.

Otro gen/proteína Pasteurellaceae fue identificado por ráfagas hechas con la ID de Sec. No.: 91. Esta es la HI0325 *Hempholus influenzae* (números de acceso Genbank U32717 y AAC21988). Encontramos una identidad de 79% sobre 414 aminoácidos entre PM0989 y HI0325.

El mutante 13E1 fue depositado bajo el tratado de Budapest en el Pasteur Institute Collection y esta disponible bajo el número de acceso CNCMI-3003.

Ejemplo 5: Selección PCR de los mutantes de inserción de transposón

El transposón puede insertarse en cualquier parte en el genoma de la bacteria. Pero una selección de los mutantes derechos puede ser hecha usando PCR.

Un par de cebadores son usados, uno específico para el transposón tal como Tn10IR1 (ID de Sec. No.:101), Tn101R4

(ID de Sec. No.:102), KTGRI (ID de Sec. No.: 100), StipA (ID de Sec. No.:99) Y sTIPJ (ID de Sec. No.: 98), y uno específico para el gen o la secuencia que va ser mutada. La secuencia de nucleótido de este gen o parte del mismo (por ejemplo las secuencias de la región cercana al locus de inserción o al sitio de inserción del transposón como se secuenció anteriormente) es de ayuda al diseño de tales cebadores. Esto puede ser adaptado a genes o secuencias de nucleótidos de otras cepas de *Pasteurella multocida* u otra bacteria gram negativa, tal como la bacteria de la familia *Pasteurellaceae*, particularmente la *pasteurella* hemolítica, *Pasteurella anatipestifer* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

El conocimiento del gen correspondiente o del ORF y/o sus regiones de regulación en la cepa PM70 o P-1059 de la *Pasteurella multocida* (ejemplo 4) tal como su tamaño es usado para tamizar o seleccionar los fragmentos PCR amplificados y para detectar aquellos que tengan un tamaño correspondiente a un transposor insertado en el gen o la secuencia que va a ser mutada. Si el transposón fue insertado por fuera del gen, este puede que no tenga fragmento PCR amplificado o puede amplificar fragmentos

con un tamaño muy largo. Así el PCR permite la selección de los mutantes.

Para la cepa P-1059 de *Pasteurella multocida*, tales cebadores específicos de gen pueden ser:

Mutante	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SED ID NO:
13 E1	13E1C	5' TACGTTAACGCCACCCGTTG	106 (20 mer)
3A2	3°2C	5' GCTTCCATACCTTGTGAACC	107 (20 mer)
2F2	2F2C	5' GGGTGTACGCCTTCTGCTG	108 (19 mer)
9C8	9C8C	5' ATTGCAGTCATTGCGGATGC	109 (20 mer)
12°1	12A1C	5' CGATATGGTACGTGTCGAC	110 (19 mer)
5F11	5F11C	5' AAAAGGCGGACCTAAGTCCG	111 (20 mer)
5D5	5D5C	5' CCGCACAACATGACAATGGAG	112 (20 mer)
4G11	4G11C	5' TTTGCAGTGGCTTACCGTC	113 (19 mer)
12B3	12B3C	5' CCTGACGACCAATACGGTG	114 (19 mer)
5G9	5G9C	5' GGATGGTCTGATCCTAATGC	115 (20 mer)
9H4	9H4C	5' CGTTCATCAGATGACGCTGC	116 (20 mer)
3H2	3H2C	5' GTGATTACGGGATTATCGGG	117 (20 mer)
10G11	10G11C	5' TGAAGTGGTAACGAGGCTTG	118 (20 mer)

En el caso de los mutantes obtenidos anteriormente, el PCR fue llevado a cabo con los siguientes pares de cebadores y los fragmentos PCR amplificados tenían un tamaño de:

200

Cebador específico de gen	Cebador específico de trnasposón	TAMAÑO PCR (bp)
13E1C	Tn 10Ir4	250
13E1C	Stip A	320
13E1C	Stip J	1720
3*2C	KTGRI	510
2F2C	Tn10IR1	105
2F2C	Stip J	1710
9C8C	Tn10IR4	500
12A1C	Tn10IR4	310
5F11C	TN10IR4	560
5D5C	StipJ	1705
4G11C	StipJ	1680
12B3C	StipJ	1720
5G9C	StipJ	1660
9H4C	Tn10IR4	585
3H2C	StipJ	1690
10G11C	Tn10IR4	395

Ejemplo 6: Eficacia y protección de los mutantes de inserción de transposón contra el reto homólogo.

Los mutantes de inserción de transposón derivados de la cepa 16084 de *Pasteurella multocida* (ejemplo 1) fueron administrados como gotas para los ojos a pavos de tres semanas convencionales. La eficacia fue estudiada contra

un reto homólogo ocular con la cepa 16084 de *Pasteurella multocida*.

24 grupos de pavos convencionales de tres semanas de edad fueron preparados. En D0, los grupos fueron inoculados con gotas para los ojos con cerca de 10^8 CFU de los mutantes como se indicó en la siguiente tabla.

Un grupo de pavos convencionales de 3 semanas permaneció sin ser vacunados y sirvieron como control (grupo 25).

Todos los pavos fueron retados en D23 usando la cepa 16084 *Pasteurella multocida* administrada por gotas de ojos a 10^8 CFU por pájaro.

La mortalidad fue registrada diariamente durante 2 semanas después del reto. Al final del estudio (D37), un examen clínico fue llevado a cabo para determinar el estado de salud de los pájaros sobrevivientes.

La rata de protección fue calculada considerando el número de pájaros retados y el número de pájaros sanos en D37.

202

Grupo	Mutante	Número de pájaros	Rata de protección
Grupo 1	1G4	8	25%
Grupo 2	4F4	10	40%
Grupo 3	3*2	6	67%
Grupo 4	1G8	10	50%
Grupo 5	13E1	22	82%
Grupo 6	5D5	22	68%
Grupo 7	7F8	10	40%
Grupo 8	11E8	10	20%
Grupo 9	9C8	22	82%
Grupo 10	4G11	20	100%
Grupo 11	12B3	6	100%
Grupo 12	10G11	10	20%
Grupo 13	5G9	8	63%
Grupo 14	12*1	10	50%
Grupo 15	2F2	10	20%
Grupo 16	5F11	10	30%
Grupo 17	9H4	7	100%
Grupo 18	3H2	10	40%
Grupo 19	Control	41	7%

Para algunos grupos, estos experimentos han sido reproducidos y la rata de protección es el resultado acumulativo. Algunos mutantes de la invención no fueron ensayados en estos experimentos.

Ejemplo 7: Eficacia y protección de los mutantes de inserción de transposón contra reto heterólogo

Los mutantes de inserción de transposón derivados de la cepa 16084 de *Pasteurella multocida* (ejemplo 1) fueron administrado por medio de gotas a los ojos a pavos de tres se manas de nacidos convencionales. La eficacia fue

estudiada contra un reto heterólogo ocular con la cepa X73 de *Pasteurella multocida* (USDA).

Cinco grupos de 10 pavos convencionales de 3 semanas fueron preparados. En D0, los grupos fueron inoculados por gotas para ojos con cerca de 10^8 CFU de los mutantes según se indicó en la siguiente tabla.

Un grupo de 10 pavos convencionales de 3 semanas permaneció sin vacuna y sirvió como controles (grupo 6).

Todos los pavos fueron retados en D21 usando la cepa X73 *Pasteurella multocida* administrada por gotas para ojos en cantidad de 10^6 CFU por pájaro.

La mortalidad fue registrada diariamente durante 2 semanas después del reto. Al final del estudio (D36), un examen clínico fue llevado a acabo para determinar el estado de salud de los pájaros sobrevivientes.

La rata de protección fue calculada considerando el número de pájaros retados y el número de pájaros saludables en D36.

Grupo	Mutante	Número de pájaros	Rata de protección
Grupo 1	13E1	10	70%
Grupo 2	5D5	10	80%
Grupo 3	9C8	10	100%
Grupo 4	4G11	10	100%
Grupo 5	9H4	10	50%
Grupo 6	Control	10	20%

Ejemplo 8: construcción de mutantes de eliminación definidos por conjugación

Inicialmente, el gen objetivado más las secuencias de ADN de flanco son amplificadas por PCR usando polimerasa de alta fidelidad y clonados en un vector de clonación adecuado. Los cebadores de PCR están diseñados los cuales eliminan el gen cuando es usado en PCR inverso para generar una construcción inicial. Los cebadores de PCR contienen un sitio XbaI para introducir un nuevo sitio de restricción y así suministrar un marcador para la eliminación del gen. Las construcciones de eliminación son entonces transferidas a un vector suicida pCVD442 (Donnenberg et.al., Infection and Immunity, 1991, 59:4310-4317) para transferir el cromosoma de *Pasteurella*. Los plásmidos pCVD442 son entonces transformados en la

cepa SM10 λ pir de E. Coli. Esta construcción es introducida en la cepa 16084 (CDM) de *P. multocida* por conjugación con la SM10 λ pir/pCVD442 de E.coli. Los transformantes y recombinantes que contenían el plásmido integrado en el cromosoma en el sitio homólogo (merodiploides) son seleccionados usando el marcador de resistencia al antibiótico presente en el plásmido pCVD442 (gen resistente a la ampicilina). Los mutantes de *Pasteurella* son seleccionados en placas agar BHI suplementadas con 1 μ g/ml de ampicilina.

El plásmido pCVD442 requiere la proteína Pir para la replicación. Esta proteína es codificada por el gen Pir, el cual está presente como lambda fago lisógeno en la cepa donora SM10 λ pir, pero no en el receptor de *P. multocida*. Así el plásmido pCVD442 no se replica en la cepa receptora de *P. multocida*: las colonias resistentes al antibiótico son por lo tanto obtenidas solamente si el plásmido se integra dentro del cromosoma. Este vector suicida también contiene el gen sacB que codifica la enzima levansucrasa, que es tóxica a la mayoría de las bacterias gram negativa en la presencia de la sacarosa. La selección se sacarosa puede por lo tanto ser empleada

como una selección contadora para aislar las colonias en las cuales un segundo evento de recombinación ha ocurrido, resultando en la pérdida del plásmido desde el cromosoma. Este segundo evento de recombinación puede resultar en dos resultados, regeneración del tipo nativo allele o generación de un mutante de eliminación. Las colonias que contienen la mutación de eliminación son identificadas por la colonia PCR.

Ejemplo 9: Construcción de mutantes de eliminación definidos por electroporación

Inicialmente, el gen objetivado más las secuencias de ADN de flaqueo son amplificadas por el PCR usando polimerasa de alta fidelidad y clonadas en un vector de clonación adecuado. Los cebadores PCR son diseñados los cuales eliminan el gen cuando se usa en PCR inverso para generar una construcción inicial. Los cebadores PCR contienen un sitio XbaI para introducir un nuevo sitio de restricción y así suministrar un marcador para la eliminación del gen. Las construcciones de eliminación son entonces transferidas a un vector suicida pCVD442 para transferirla al cromosoma *Pasteurella*. Esta construcción es introducida en la cepa 16084 (CDM) de *P. multocida* por

electroporación Para remover la cápsula extracelular sustancial de 16084, las células de fase estacionaria son tratadas con hialurodinasa testicular ovina (tipo V, filtrada esterilizada antes del uso, concentración final 25µg/ml) durante 1 hora antes de cosechar y lavar las células. El pCVD442 (1,5µg) es mezclado con la suspensión de células en 10% de glicerol (0,05 ml, 10^{10} células/ml) justo antes de pipetear la mezcla en cubetas de electroporación enfriadas con hielo de 1-mm (Biorad, Hercules, CA, USA). El Gene Pulser (Biorad) es usado para pulsar las células (12,5kV/cm, 250omios, 40µF). Inmediatamente después del pulso, las células son diluidas con 1 ml de BHI y porciones de cultivo (5-50µl)son rápidamente (dentro de 1-5 minutos)esparcidas en placas agar de BHI que contienen 1µg/ml de ampicilina. Los recombinantes que contienen el plásmido integrado en el cromosoma en el sitio homólogo (merodiploides) son seleccionados usando el marcador de resistencia al antibiótico presente en el plásmido (gen de sesistencia a la ampicilina).

El plásmido pcVD442 no se replica en la cepa receptora de *P.multocida*: las colonias resistentes al antibiótico son

por lo tanto obtenidas solamente si el plásmido se integra en el cromosoma. Este vector suicida también contiene el gen *sacB* que codifica la enzima levansucrasa, que es tóxica a la mayoría de las bacterias gram negativas en la presencia de sacarosa. La selección de sacarosa puede por lo tanto ser empleada como una selección contadora para aislar las colonias en donde un segundo evento de recombinación ha ocurrido, resultando en la pérdida del plásmido del cromosoma. Este segundo evento de recombinación puede resultar en dos salidas, regeneración de tipo natural allele o generación de un mutante de eliminación.

Las colonias parecen luego de la incubación a 37° C durante 2 a 4 días. Uniendo las colonias en placas similares aísla los transformantes individuales. Las colonias que contienen la mutación de eliminación son identificadas por la colonia PCR.

Ejemplo 10: Vacuna y ensayo de eficacia

Los mutantes de eliminación atenuados obtenidos en los ejemplos 8 o 9 son cultivados en un medio de cultivo CDM

(HU et. al., Infection and Immunity 1986, 804-810) bajo condiciones de agitación durante 24 a 48 horas.

El cultivo es cosechado cuando los retenes o las detenciones de crecimiento, que son seguidas por densidad óptica (OD) o mediciones de pH.

La concentración bacterial es determinada por densidad óptica y cuando es necesaria la concentración es ajustada a una concentración final de 10^9 CFU por ml en medio de cultivo fresco.

La eficacia de la vacuna es ensayada en pavos de 3 semanas por medio de vacunación y luego reto.

Los pavos son verificados antes de la vacunación en cuanto a ausencia de anticuerpos de *Pasteurella* por muestras de sangre por el sistema ELISA.

Un primer grupo de pavos es vacunado por medio de inyectar 10^8 CFU en 0,1 ml por ruta ocular.

Un segundo grupo permaneció sin vacunar (grupo de control).

~~210~~
210

Todos los animales fueron retados en D21 o D23 con las cepa P-1059 de *P. multocida* por vía ocular (10^8 CFU en 0,1 por animal).

La mortalidad es observada cada día hasta el D35.

Una mortalidad inferior es observada en los animales vacunados en comparación con los controles.

La invención se describe adicionalmente por los siguientes párrafos:

1. Un mutante de una bacteria gram negativa, en donde dicha bacteria tiene una mutación en una secuencia de nucleótido que codifica para un polipéptido que tiene una identidad que es igual o mayor que 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido selecciona del grupo que consiste de las secuencias de nucleótido identificadas como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55,

58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93 dicha mutación resulta en virulencia atenuada de la bacteria.

2. El mutante del parágrafo 1, en donde la bacteria es una *Pasteurellaceae*.
3. El mutante del parágrafo 2 en donde la bacteria es escogida entre el grupo de: *Pasteurella multocida*, *Pasteurella hemolítica*, *Pasteurella anatipestifer* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
4. El mutante del parágrafo 3, en donde la bacteria es *Pasteurella multocida*.
5. El mutante de una cualquiera de los parágrafos 1 a 4, en donde la mutación es una eliminación en la secuencia del nucleótido, o una inserción en esta o un reemplazo de ácidos nucleicos.
6. El mutante del parágrafo 5, en donde la mutación es la eliminación de la secuencia de nucleótido completa.

212

7. El mutante del párrafo 5, en donde la inserción es hecha entre: nucleótido 180-181 o 182-183 o 190-191 en la ID de Sec. No.: 2, 77-78 o 1026-1027 o 1027-1028 en la ID de Sec. No.: 6, 416-417 en la ID de Sec. No.: 9, 389-390 en la ID de Sec. No.: 12, 381-382 en la ID de Sec. No.: 16, 219-220 en la ID de Sec. No.: 19, 1353-1354 en la ID de Sec. No.: 22, 136-137 en la ID de Sec. No.: 25, 384-385 en la ID de Sec. No.: 28, 222-223 o 225-226 en la ID de Sec. No.: 31, 217-218 en la ID de Sec. No.: 34, 1411-1412 en la ID de Sec. No.: 37, 943-944 en la ID de Sec. No.: 40, 855-856 en la ID de Sec. No.: 43, 369-370 en la ID de Sec. No.: 46, 111-112 en la ID de Sec. No.: 49, 443-444 en la ID de Sec. No.: 52, 4-5 en la ID de Sec. No.: 55, inmediatamente aguas arriba del nucleótido 1 en la ID de Sec. No.: 58, 573-574 en la ID de Sec. No.: 61, 875-876 en la ID de Sec. No.: 64, inmediatamente aguas arriba del nucleótido 1 en la ID de Sec. No.: 67, 218-219 en la ID de Sec. No.: 70, 1072-1087 en la ID de Sec. No.: 75, 64-65 en la ID de Sec. No.: 78, 282-283 en la ID de Sec. No.: 81, 1431-1432 en la ID de Sec. No.: 84, 974-975 en la ID de Sec. No.: 87, 802-803 en la ID de Sec. No.: 90, 850-851 en la ID de Sec. No.: 92.

8. El mutante de un cualquiera de los párrafos 1 a 7, que comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica para un inmunogen a partir de un viral patogénico, un agente parasítico o bacterial, para una proteína terapéutica, para un alergénico, para un factor de crecimiento o para una citoquina.
9. Una composición inmunogénica que comprende un mutante atenuado de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 8, y un diluyente, portador vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. La composición inmunogénica del párrafo 9 que comprende adicionalmente un adyuvante.
11. Una vacuna que comprende un mutante atenuado de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 8, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. La vacuna del párrafo 11 que comprende adicionalmente un adyuvante.

13. Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que tiene una identidad que es igual o mayor a 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido selecciona del grupo que consiste de las secuencias de nucleótido identificadas como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93 y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante.

14. Una preparación de anticuerpo que comprende un anticuerpo específico a un polipéptido que tiene una identidad que es igual o mayor a 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido selecciona del grupo que consiste de las secuencias de nucleótido identificadas como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93

15. Método de diagnóstico para detectar la infección por una bacteria gram negativa, usando un polipéptido que tiene una identidad que es igual o mayor a 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido selecciona del grupo que consiste de las secuencias de nucleótido identificadas como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93 o un anticuerpo específico a dicho polipéptido.

16. El uso de una preparación de anticuerpo de acuerdo con el parágrafo 14 para la producción de una composición de inmunización pasiva o una composición terapéutica contra la bacteria gram negativa.

17. El uso de una secuencia de nucleótido del grupo que consiste de las secuencias de nucleótido identificadas como identificadas como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78,

81, 84, 87, 90, 93, o un fragmento de por lo menos 20 nucleótidos, como cebadores de PCR para la detección de bacteria gram negativa en un medio.

Habiendo descrito así en detalle las modalidades preferidas de la presente invención, debe entenderse que la invención definida por los anteriores párrafos no está limitada a detalles particulares establecidos en la descripción anterior como variaciones evidentes de la misma ya que variaciones evidentes de la misma son posibles sin salirse del espíritu o alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un mutante de una bacteria gram negativa que tiene una mutación en una primer secuencia de nucleótido que codifica para un primer polipéptido y resulta en la bacteria con una virulencia atenuada, en donde:

El primer polipéptido tiene una secuencia de aminoácido

Un segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido identificada como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93

La secuencia de aminoácido del primer polipéptido es la misma que la del segundo polipéptido, o la secuencia de aminoácido del primer polipéptido tiene una identidad que es igual o mayor a 70%, 75%, 80%,

218

85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácido del segundo polipéptido.

2. El mutante de la reivindicación 1, en donde la bacteria es una *Pasteurellaceae*
3. El mutante de la reivindicación 2, en donde la bacteria es *Pasteurella multocida*, *pasteurella hemolítica*, *pasteurella anatipestifer* o *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
4. El mutante de la reivindicación 3, en donde la bacteria es *Pasteurella multocida*.
5. El mutante de la reivindicación 1, en donde la mutación es una eliminación en la primera secuencia, o una inserción dentro de ésta o un remplazo de ácidos nucleicos.
6. El mutante de la reivindicación 5, en donde la mutación es la eliminación de la primera secuencia de nucleótido completa.
7. El mutante de la reivindicación 5, en donde la mutación es una inserción entre: nucleótidos 180-

181 o nucleótidos 182-183 o nucleótidos 190-191 en la ID de Sec. No.: 2, nucleótidos 77-78 o nucleótidos 1026-1027 o nucleótidos 1027-1028 en la ID de Sec. No.: 6, nucleótidos 416-417 en la ID de Sec. No.: 9, nucleótidos 389-390 en la ID de Sec. No.: 12, nucleótidos 381-382 en la ID de Sec. No.:16, nucleótidos 219-220 en la ID de Sec. No.:19, nucleótidos 1353-1354 en la ID de Sec. No.:22, nucleótidos 136-137 en la ID de Sec. No.:25, nucleótidos 384-385 en la ID de Sec. No.:28, nucleótidos 222-223 o nucleótidos 225-226 en la ID de Sec. No.: 31, nucleótidos 217-218 en la ID de Sec. No.:34, nucleótidos 1411-1412 en la ID de Sec. No.: 37, nucleótidos 943-944 en la ID de Sec. No.:40, nucleótidos 855-856 en la ID de Sec. No.:43, nucleótidos 369-370 en la ID de Sec. No.:46, nucleótidos 111-112 en la ID de Sec. No.:49, nucleótidos 443-444 en la ID de Sec. No.:52, nucleótidos 4-5 en la ID de Sec. No.:55, nucleótidos 573-574 en la ID de Sec. No.:61, nucleótidos 875-876 en la ID de Sec. No.:64, nucleótidos 218-219 en la ID de Sec. No.:70, nucleótidos 1072-1087 en la ID de Sec. No.:75, nucleótidos 64-65 en la ID de Sec. No.:78,

nucleótidos 282-283 en la ID de Sec. No.:81,
nucleótidos 1431-1432 en la ID de Sec. No.:84,
nucleótidos 974-975 en la ID de Sec. No.:87,
nucleótidos 802-803 en la ID de Sec. No.:90,
nucleótidos 850-851 en la ID de Sec. No.:92; o
nucleótido 1 inmediatamente aguas arriba en la ID
de Sec. No.: 58; o nucleótido 1 inmediatamente
aguas arriba en la ID de Sec. No.: 67.

8. .El mutante de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo.
9. El mutante de la reivindicación 9, en donde la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica para un inmunogen a partir de un agente viral parasítico o bacterial patogénico, una proteína terapéutica, un alergénico, o un factor de crecimiento o una citosina.
10. Una composición inmunogénica o vacuna que comprende un mutante de acuerdo con la reivindicación 1 y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.

221

11. Una composición o vacuna inmunogénica de la reivindicación 10 que comprende adicionalmente un adyuvante.

12. Una composición inmunogénica o vacuna que comprende un mutante de acuerdo con la reivindicación 9, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.

13. La composición inmonogénica o vacuna de la reivindicación 12 que comprende adicionalmente un adyuvante.

14. Un primer polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácido en donde hay:

Un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido identificada como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93; y la secuencia de aminoácido del primer polipéptido es la misma que la del segundo polipéptido, o la secuencia de aminoácido del primer polipéptido tiene una identidad que es igual o mayor

222

a 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácido del segundo polipéptido.

15. Una composición inmunogénica o vacuna que contiene el primer polipéptido aislado de la reivindicación 14, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante

16. Una preparación de anticuerpo que comprende un anticuerpo específico al primer polipéptido aislado de la reivindicación 14.

17. Un método de diagnóstico para detectar la infección por una bacteria gram negativa, que comprende detectar en una muestra el primer polipéptido aislado de la reivindicación 14 o un anticuerpo específico a este primer polipéptido aislado.

18. Un método de inmunización pasiva que comprende administrar la preparación de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 16.

19. Una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia identificada como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 o 93;
20. Un cebador PCR para detectar la bacteria gram negativa que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia que es por lo menos 10 ácidos nucleicos contiguos de una secuencia de nucleótido identificada como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 o 93;
21. El mutante de la reivindicación 1 en donde el mutante es un mutante de bacteria gram negativa que tiene una mutación en una secuencia de nucleótido que codifica para un polipéptido y resulta en la bacteria con una virulencia atenuada, en donde: el, polipéptido tiene una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido identificada como ID de Sec. No.: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 o 93

224

22.El polipéptido aislado de la reivindicación 14 que tiene una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido identificada como SEQ IDNO: 2, 6, 9, 12, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 o 93

23.El mutante de la reivindicación 1 que es el 4G11 mutante disponible bajo el número de acceso CNCMI-2999, o una bacteria que tiene todas las características identificables del mismo; el mutante 5D5 disponible bajo el número de acceso CNCMI-3000 o una bacteria que tiene todas las características que identifican al mismo; el mutante 9C8 disponible bajo el número de acceso CNCMI-3001, o una bacteria que tenga todas las características que lo identifican; el mutante 9H4 disponible bajo el número de acceso CNCMI-3002, o una bacteria que tenga todas las características que lo identifican; o el mutante 13E1 disponible bajo el número de acceso CNCMI-3003, o una bacteria que tenga todas las características que lo identifican.

225

24. Una molécula de ácido nucleico aislado que tiene una secuencia identificada como ID de Sec. No.: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96 o 97

25. Un cebador PCR para detectar bacterias gram negativas que comprende una molécula de ácido nucleico aliada que tiene una secuencia que es por lo menos 10 ácidos nucleicos contiguos de una secuencia de nucleótido identificada como ID de Sec. No.: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96 o 97

26. Una bacteria mutante gram negativa que tiene una mutación en una secuencia de nucleótido identificada como ID de Sec. No.: 1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 73, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 96 o 97

27.El mutante de la reivindicación 26 que es una *Pasteurellaceae*

28.El mutante de la reivindicación 26 en donde la bacteria es *Pasteurella multocida*, *pasteurella hemolítica*, *pasteurella anatipestifer* o *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

29.El mutante de la reivindicación 26 en donde la bacteria es *Pasteurella multocida*.

30.El mutante de la reivindicación 26, que comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo

31.El mutante de la reivindicación 30 en donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica para un inmunogen a partir de un agente viral, parasítico o bacterial patogénico, una proteína terapéutica, un alergénico, un factor de crecimiento o una citosina

32.Una composición inmunogénica o vacuna que comprende un mutante de acuerdo con la reivindicación 26 y un

227

diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.

33. La composición inmunogénica o vacuna de la reivindicación 32 que comprende adicionalmente un adyuvante.

34. Una composición inmunogénica o vacuna que comprende un mutante de acuerdo con la reivindicación 30, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.

35. La composición inmunogénica o vacuna de la reivindicación 34 que comprende adicionalmente un adyuvante.

36. Un polipéptido aislado codificado por una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 24.

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 95,338
FECHA : NOVIEMBRE 2 DE 2004

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 04111185 00000000 Folios: 228
Fecha (MM): 2004-11-04 17:16:49
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INICI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	32758693	02/11/2004	41,143,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 14522-841-001-8

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 04111115 0000000
Fecha (CND): 2004-11-04 17:10:49
Folios: 228
Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2829 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTAR
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓		
MODELO DE UTILIDAD	()	()
Indicación de que se solicita la concesión de una patente	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Descripción de la invención.	()	()
Dibujos de partes pertinentes. ✓	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable

Claudia M Nueva

Fecha

2020

Bogotá D C

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)
MERIAL LLC.

10881

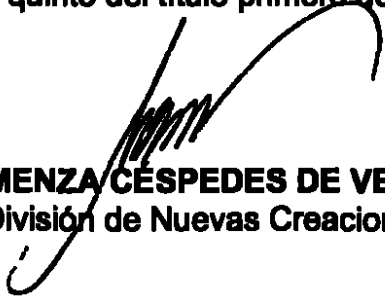
REFERENCIA:	Radicación N°	04-111105
	Solicitud internacional	PCT/US03/10308
	Fecha inicio fase nacional	2004-11-5
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k Decisión 486).
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica.
- El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al Capítulo I ó II del PCT, en caso que se trate de capítulo II y el examen preliminar contenga anexos, estos deben ser presentados junto con su traducción.

- Depósito?

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,

26 NOV. 2004
202063

231
230

2020
Bogotá D C

Doctor(a) A
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)
MERIAL LLC

11147

REFERENCIA:	Radicación N°	04-111105
	Solicitud Internacional	PCT US03/10308
	Fecha inicio fase nacional	2004-11-05
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, mediante oficio No 10881 notificado por fijación en lista de fecha 26 de noviembre de 2004, requirió al doctor(a) **EMILIO FERRERO**

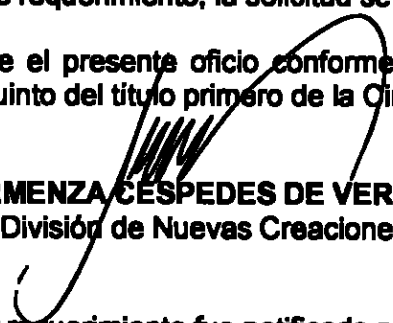
para que complementara la solicitud de acuerdo con las normas citadas.

Sin embargo, el mencionado requerimiento no cumplió con los presupuestos establecidos en el artículo 39 de la Decisión 486, es decir no se indicó al solicitante el plazo en el cual se debía presentar la respuesta al mismo, por lo que es procedente revocar en su totalidad el oficio No 10881 de fecha 26 de noviembre de 2004 y en su lugar efectuar un nuevo requerimiento en los siguientes términos:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica
- El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al Capítulo I ó II del PCT, en caso que se trate de capítulo II y el examen preliminar contenga anexos, estos deben ser presentados junto con su traducción
- La solicitud no contiene el certificado de depósito de material biológico (Art.26-j Decisión 486).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 26 de noviembre de 2004
202063