

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 498**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/31** (2006.01)  
**C07K 14/285** (2006.01)  
**A61K 39/102** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03719577 .3**  
96 Fecha de presentación: **04.04.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1575483**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **BACTERIAS GRAM NEGATIVAS ATENUADAS.**

30 Prioridad:  
**05.04.2002 US 370282 P**  
**03.04.2003 US 406686**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.01.2012**

73 Titular/es:  
**MERIAL LLC**  
**3239 SATELLITE BLVD.**  
**DULUTH, GA 30096-4640, US**

72 Inventor/es:  
**CROOKE, Helen Rachel;**  
**SHEA, Jacqueline Elizabeth;**  
**FELDMAN, Robert Graham;**  
**COUTEBROZE, Sylvain Gabriel y**  
**LEGROS, François-Xavier**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 371 498 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Bacterias gram negativas atenuadas

5 SOLICITUDES RELACIONADAS/INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de Serie No. No. 60/370,282, solicitada el 5 de abril de 2002.

10 CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0002] La presente invención se refiere a bacterias gram negativas atenuadas vivas. Las bacterias gram negativas atenuadas se pueden utilizar en composiciones inmunogénicas o en composiciones de vacuna, por ejemplo, para la prevención de infecciones bacterianas, así como en investigación, como cepas atenuadas presentan un mayor grado de seguridad para los investigadores y para aquellos (por ejemplo, animales, humanos) con los que pueden entrar en contacto.

[0003] La presente invención por consiguiente se refiere a composiciones inmunogénicas o de vacuna que comprenden bacterias gram negativas de la invención; por ejemplo, bacterias gram negativas atenuadas vivas. Las bacterias también se podrían estar inactivadas en las composiciones; pero puede ser ventajoso que las bacterias sean bacterias gram negativas atenuadas vivas. Por lo tanto, la descripción se refiere además a métodos para preparar y/o formular dichas composiciones; por ejemplo, cultivar o desarrollar o propagar las bacterias en un medio adecuado, recoger las bacterias, inactivando opcionalmente las bacterias, y mezclar con un portador, excipiente, diluyente o vehículo veterinariamente o farmacéuticamente aceptable adecuado y/o un adyuvante y/o estabilizante; o, mezclar las bacterias con un portador, excipiente, diluyente o vehículo veterinariamente o farmacéuticamente aceptable adecuado y/o un adyuvante y/o estabilizante. De este modo, la descripción también se refiere a la utilización de las bacterias en la formulación de dichas composiciones.

[0004] 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 las bacterias atenuadas, 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. La utilización de bacterias atenuadas como vector también proporciona un mayor grado de seguridad a los investigadores o técnicos que trabajan con los vectores atenuados y aquellos (por ejemplo, animales, humanos) con los que pueden entrar en contacto.

[0005] Por lo tanto, la descripción se refiere además a métodos para preparar dichos vectores, por ejemplo, transformando las bacterias de manera que la bacteria contenga y opcionalmente comprende una molécula de ácido nucleico heteróloga.

[0006] La descripción también se refiere a las utilizaciones de dichos vectores; por ejemplo, un método para producir un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, tal como un inmunógeno, epítipo o antígeno, heterólogo a las bacterias que comprende cultivar, desarrollar o propagar bacterias transformadas para contener expresar una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica el producto génico bajo condiciones adecuadas para la expresión, y opcionalmente recoger o aislar o separar el producto génico; o, recoger o aislar o separar el producto génico de las bacterias transformadas para expresarlo; o, un método para obtener una respuesta inmunológica o una respuesta inmunogénica contra un producto génico y/o las bacterias o una respuesta inmune protectora con respecto a un patógeno del que deriva o se obtiene el producto génico y/o las bacterias que comprenden administrar a un sujeto, por ejemplo, un animal, tal como un animal susceptible de infección por el patógeno y/o las bacterias, por ejemplo, un animal bovino o un pavo, bacterias transformadas para expresar el producto génico; o un método para preparar una composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna que comprende mezclar el vector o las bacterias transformadas con un portador, excipiente, diluyente o vehículo veterinariamente o farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante y/o estabilizante

[0007] La descripción también se refiere a dianas para la atenuación de bacterias por ejemplo, secuencias de nucleótidos o genes mutados que codifican las dianas para la atenuación de bacterias, y métodos para dirigir polipéptidos para la atenuación de bacterias y métodos para generar bacterias atenuadas. Las dianas para la atenuación se pueden utilizar como compuestos inmunogénicos, por ejemplo, en composiciones inmunogénicas o en composiciones de vacuna, o para generar epítipos para utilizar en composiciones inmunogénicas o de vacuna. De este modo, la descripción se refiere a la utilización de dianas para la atenuación en la preparación en composiciones, por ejemplo, mezclando con un portador, excipiente, diluyente o vehículo veterinariamente o farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante y/o estabilizante.

5 [0008] La descripción se refiere además a 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 una bacteria gram negativa, tal como una *Pasteurella*, por ejemplo, un pavo o un animal bovino, que comprende administrar al animal una vacuna o composición inmunogénica de la invención.

10 [0009] Incluso además la descripción se refiere a preparar dichas bacterias atenuadas, por ejemplo, bacterias gram negativas, tales como *Pasteurella*; por ejemplo, que comprende introducir uno o más elementos transposables en la bacteria y aislar la bacteria que contiene el elemento transposable que no causa mortalidad en una especie diana (y, por tanto, atenuada). Se pueden identificar opcionalmente las mutaciones en las bacterias, permitiendo así medios alternativos para producir las bacterias atenuadas.

15 [0010] La descripción se refiere además a dichos medios alternativos para producir bacterias atenuadas. Dado que las mutaciones se identifican o caracterizan, las mutaciones se pueden introducir en bacterias a través de técnicas diferentes a introducir uno o más elementos transposables en la bacteria, tal como mediante recombinación homóloga, por ejemplo, recombinación homóloga mediante la cual una parte del genoma bacteriano da lugar a por lo menos una adición a la misma (inserción) o una delección de la misma (también se prevén dos o más adiciones y/o delecciones) o una sustitución (tal como una sustitución de por lo menos un nucleótido por otro). Por consiguiente, la descripción se refiere a un método para producir una bacteria atenuada que contiene una modificación o mutación conocida o identificada previamente, por ejemplo, una modificación o mutación identificada en la presente invención, que comprende introducir una delección o inserción o sustitución en el genoma bacteriano, de manera ventajosa, a través de la recombinación y opcionalmente la identificación y/o aislamiento de las bacterias que contienen la modificación o mutación.

25 [0011] De este modo, la descripción se refiere además a un mutante de una bacteria gram negativa, donde dicha bacteria tiene por lo menos una mutación en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad que es igual o superior al 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos identificadas como SEC 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; dando lugar dicha mutación a una virulencia atenuada de la bacteria. La descripción se refiere a utilizaciones, composiciones y métodos que implican dicha bacteria tal como se ha descrito en la invención.

### 35 ANTECEDENTES

40 [0012] Está bien establecido que los microorganismos vivos atenuados pueden ser vacunas muy eficaces; las respuestas inmunes obtenidas por dichas vacunas son a menudo de mayor magnitud y de duración más larga que las producidas por inmunógenos no replicantes. Una explicación de esto puede ser que las cepas vivas atenuadas establecen infecciones limitadas en el huésped e imitan las etapas tempranas de la infección natural. Adicionalmente, a diferencia de las preparaciones muertas o inactivadas, las vacunas vivas son capaces de inducir potentes respuestas mediadas por células que se pueden relacionar con su capacidad para replicarse en células presentadoras antígenos, tales como los macrófagos.

45 [0013] Existe una larga historia del uso de vacunas atenuadas vivas en animales y seres humanos, usando especialmente técnicas de mutagénesis química. Sin embargo, las vacunas empíricamente atenuadas pueden revertir a virulentas.

50 [0014] Las técnicas modernas de la biología molecular, junto con el aumento del conocimiento de la patogénesis bacteriana, han conducido a la identificación de varios genes que están implicados en el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos in vivo. Esto ha proporcionado nuevos genes diana para la atenuación y al concepto de que se podrían atenuar "racionalmente" futuras cepas de vacuna introduciendo mutaciones no revertientes definidas en genes seleccionados conocidos por estar implicados en la virulencia, véanse por ejemplo los documentos Wo-A-00161724, Wo-A-00/68261 y EP-A-0889120.

55 [0015] Aunque se han producido muchas cepas atenuadas en laboratorios, sólo unas pocas se han calificado como potenciales vacunas candidatas para uso en animales. Esto puede ser debido en parte a la necesidad de equilibrar la inmunogenicidad de la vacuna con la posibilidad del microorganismo de revertir, volviéndose reactivo y patogénico.

60 [0016] Es evidente que la selección de los genes apropiados para la atenuación, que darán lugar a una vacuna candidata adecuada, no es sencilla y no se puede predecir fácilmente. Muchos factores pueden tener influencia

sobre la aceptabilidad del mutante atenuado como vacuna, y en consecuencia, se requiere un esfuerzo de investigación para identificar y seleccionar genes atenuantes adecuados. Se llevaron a cabo muchos experimentos de atenuación únicamente in vitro y sus resultados no se pueden extrapolar in vivo, especialmente, en relación con la patogenicidad residual de los mutantes resultantes para los animales vacunados.

- 5  
**[0017]** 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.  
 10 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.  
 15 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., Transposon 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 y molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from Pasteurella multocida. J Biol chem. 1998b Apr 3;273(14):8454-8.  
 20 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 y apparently forms cointegrates in Pasteurella multocida. Mol Microbiol. 1990 Jan;4(1):107-17.  
 25 Stocker patentes de Estados Unidos Nos. 4,550,081, 4,837,151, 5,210,035 y 5,643,771.  
 Highlander Patente de Estados Unidos No. 6,180,112.

- [0018]** Kachlany implicó genes de Tad. No existe relación entre los genes de Tad mutados en Kachlany y la atenuación. No hay pruebas en animales en Kachlany y los genes de Tad no están seleccionados en la presente invención. Los artículos de Fuller implican secuencias que no se seleccionan en la presente invención. Kehrenberg no implicó un mutante atenuado, o una Mutagénesis Etiquetada con Firma o técnica STM; sino que, Kahrenberg implicaba la inserción dirigida de un transposón (utilización de elemento de inserción idéntico). DeAngelis 1998a proporciona solo una descripción general de una técnica STM y nada sobre mutantes, per se. DeAngelis 1998b implicó la utilización de una técnica STM para insertar un transposón en el locus de la biosíntesis de HA (Banco de genes AF036004). Esta secuencia es un homólogo a la secuencia Pm0775 de PM70. La secuencia que codifica Pm0775 no está seleccionada en la presente invención. Lee se refiere a la utilización de una técnica STM con un transposón Tn10; Lee no describe ni sugiere ningún test en animales ni ninguna investigación para mutantes atenuados; sino que, Lee implicó únicamente mutantes autotróficos. Mientras que Choi cita un mutante de inserción de transposón de *Pasteurella multocida*, y puede no haber habido mortalidad inducida por este mutante, Choi no contiene detalles sobre la localización de la inserción del transposón y, por lo tanto, no se puede decir que sea reproducible. De forma similar, Nnalue no enseña ni describe la presente invención. Las patentes de Stocker implicaron la inserción de un transposón Tn10 en el gen aroA. El gen aroA no está seleccionado en la presente invención. Highlander se refiere a la inserción de un transposón Tn1545 en el gen lktc para inactivar leucotoxina. El gen lktc no está seleccionado en la presente invención. Por consiguiente, se cree verdaderamente que la presente invención no está descrita o sugerida en la técnica.

- [0019]** Además, es deseable caracterizar genes o secuencias de ácidos nucleicos implicadas en la atenuación y en base a esto desarrollar bacterias atenuadas, así como composiciones de vacunas o inmunogénicas atenuadas, tales como las que tienen un grado elevado de inmunogenicidad y que muestran un buen perfil de seguridad con efectos secundarios limitados o ausentes.

#### DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

- 55 **[0020]** La presente invención proporciona un mutante de una bacteria gram negativa, donde dicha bacteria presenta una mutación en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad que es igual o superior a 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% con una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID No: 75, dando lugar dicha mutación a una virulencia atenuada de la bacteria, donde la mutación es una inserción entre los nucleótidos 1072-1087 en SEC ID No: 75.

- 60 **[0021]** En otro aspecto, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un mutante atenuado según

la presente invención y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

**[0022]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un mutante atenuado según la presente invención, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

**[0023]** Además, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia SEC ID No: 75 con una inserción entre los nucleótidos 1072-1087.

**[0024]** La presente invención proporciona, en otro aspecto, la utilización de un mutante según la presente invención en la producción de una composición o inmunogénica atenuada viva o una preparación de una composición de vacuna atenuada viva.

**[0025]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un mutante según la presente invención, una vacuna según la presente invención, o una composición inmunogénica según la presente invención, para utilizar en la inmunización contra o la prevención de infección bacteriana en un animal.

**[0026]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona la utilización de un mutante de una bacteria gram negativa según la presente invención, una vacuna según la presente invención, o una composición inmunogénica según la presente invención, en la preparación de un medicamento para la inmunización contra o la prevención de la infección bacteriana en un animal.

**[0027]** La descripción proporciona un mutante de una bacteria gram negativa que presenta una mutación en una primera secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido y da lugar a la bacteria que tiene una virulencia atenuada, donde:

el primer polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos;

un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos identificada como SEC 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, ó 93; y la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido es la misma que la del segundo polipéptido, o la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido tiene una identidad que es igual o superior a 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% con la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido.

**[0028]** La bacteria mutante pueden ser una Pasteurellaceae, por ejemplo la bacteria puede ser: *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* o *Actinobacillus pleuropneumoniae*; de manera ventajosa *Pasteurella multocida*.

**[0029]** La mutación puede ser una deleción en la primera secuencia de nucleótidos, o una inserción en la misma o una sustitución de ácidos nucleicos, tales como una deleción de toda la primera secuencia de nucleótidos; o una inserción entre: los nucleótidos 180-181 o los nucleótidos 182-183 o los nucleótidos 190-191 en SEC ID No: 2, los nucleótidos 77-78 o los nucleótidos 1026-1027 o los nucleótidos 1027-1028 en SEC ID No: 6, los nucleótidos 416-417 en SEC ID No: 9, los nucleótidos 389-390 en SEC ID No: 12, los nucleótidos 381-382 en SEC ID No: 16, los nucleótidos 219-220 en SEC ID No: 19, los nucleótidos 1353-1354 en SEC ID No: 22, los nucleótidos 136-137 en SEC ID No: 25, los nucleótidos 384-385 en SEC ID No: 28, los nucleótidos 222-223 o los nucleótidos 225-226 en SEC ID No: 31, los nucleótidos 217-218 en SEC ID No: 34, los nucleótidos 1411-1412 en SEC ID No: 37, los nucleótidos 943-944 en SEC ID No: 40, los nucleótidos 855-856 en SEC ID No: 43, los nucleótidos 369-370 en SEC ID No: 46, los nucleótidos 111-112 en SEC ID No: 49, los nucleótidos 443-444 en SEC ID No: 52, los nucleótidos 4-5 en SEC ID No: 55, los nucleótidos 573-574 en SEC ID No: 61, los nucleótidos 875-876 en SEC ID No: 64, los nucleótidos 218-219 en SEC ID No: 70, los nucleótidos 1072-1087 en SEC ID No: 75, los nucleótidos 64-65 en SEC ID No: 78, los nucleótidos 282-283 en SEC ID No: 81, los nucleótidos 1431-1432 en SEC ID No: 84, los nucleótidos 974-975 en SEC ID No: 87, los nucleótidos 802-803 en SEC ID No: 90, los nucleótidos 850-851 en SEC ID No: 92; o inmediatamente en dirección 5' del nucleótido 1 en SEC ID No: 58; o inmediatamente en dirección 5' del nucleótido 1 en SEC ID No: 67.

**[0030]** El mutante puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga, tal como una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un inmunógeno de un agente viral, parasítico o bacteriano patogénico, una proteína terapéutica, un alérgeno, un factor de crecimiento o una citoquina.

**[0031]** La presente invención también proporciona una composición inmunogénica o una vacuna que comprende un mutante según la presente invención, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéuticamente o veterinariamente aceptable, y que comprende opcionalmente además un adyuvante.

[0032] La descripción proporciona además un primer polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos, en la que existe:

un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos codificada como SEC 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, o 93; y la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido es la misma que la del segundo polipéptido, o la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido tiene una identidad que es igual o superior a 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido.

[0033] La descripción prevé una composición inmunogénica o de vacuna que contiene el primer polipéptido aislado, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéuticamente o veterinariamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante.

[0034] Además, la descripción prevé una preparación de anticuerpos que comprende un anticuerpo específico para el primer polipéptido aislado.

[0035] La descripción también implica un método de diagnóstico para detectar la infección por una bacteria gram negativa, que comprende detectar en una muestra el primer polipéptido aislado o un anticuerpo específico a ese primer polipéptido aislado.

[0036] La descripción se refiere además a un método de inmunización pasiva que comprende administrar la preparación de anticuerpos.

[0037] La descripción también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia identificada como SEC 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, o 93, o identificada como SEC 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, ó 97, así como un cebador PCR para detectar bacterias gram negativas 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 nucleótidos identificada como SEC 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, o 93, o identificada como SEC 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, ó 97. Una sonda o cebador puede ser cualquier tramo de por lo menos 8, preferiblemente por lo menos 10, más preferiblemente por lo menos 12, 13, 14, ó 15, tales como por lo menos 20, por ejemplo, por lo menos 23 ó 25, por ejemplo por lo menos 27 ó 30 nucleótidos que son únicos a la secuencia que se desea amplificar o que están en la secuencia que se desea amplificar y están menos conservadas, por ejemplo, conservadas entre las bacterias gram negativas o entre una familia o especie particular de bacterias gram negativas, tales como entre *Pasteurella*, o entre cualquiera de *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* o *Actinobacillus pleuropneumoniae*; de manera ventajosa *Pasteurella multocida*. En cuanto a la PCR o cebadores o sondas de hibridación y longitudes óptimas para los mismos, se hace referencia también a Kajimura et al., GATA 7(4):71-79 (1990).

[0038] Los términos "composición inmunogénica" y "composición inmunológica" y "composición inmunogénica o inmunológica" cubren cualquier composición que obtiene una respuesta inmune contra el patógeno reconocido; por ejemplo, después de la administración o inyección en el animal (tal como un ave, por ejemplo, pavo o animal bovino, por ejemplo, una vaca), obtiene una respuesta inmune contra el patógeno reconocido (por ejemplo, *Pasteurella multocida*). Los términos "composición vacunal" y "vacuna" y "composición de vacuna" cubre cualquier composición que induce una respuesta inmune protectora contra el patógeno reconocido o que protege de forma eficaz contra el patógeno, por ejemplo, después de la administración o inyección en el animal (por ejemplo, un ave, tal como pavo o animal bovino, tal como una vaca), obtiene una respuesta inmune protectora contra el patógeno reconocido o proporciona una protección eficaz contra el patógeno (por ejemplo, *P. multocida*). Una subunidad de un patógeno, por ejemplo un antígeno o inmunógeno o epítipo aislado del patógeno, por ejemplo, bacterias, tales como una bacteria gram negativa, por ejemplo, *P. multocida*; y, una composición de subunidades comprende o consiste esencialmente en uno o más antígenos, inmunógenos o epítipos aislados del patógeno, por ejemplo, bacterias, tales como una bacteria gram negativa, por ejemplo, *P. multocida*.

[0039] Cabe indicar que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones, los términos, tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado atribuido según la ley de patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye" incluido", "que incluye", y similares; y términos, tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tiene el significado según la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no indicados explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en el estado de la técnica o que afectan a una característica básica o nueva de la invención.

[0040] Estas y otras realizaciones se describen o son obvias y están comprendidas por la siguiente descripción detallada.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 5
- [0041] La presente descripción proporciona secuencias de nucleótidos y genes implicados en la atenuación de un microorganismo, tal como bacterias, por ejemplo, bacterias gram negativas, por ejemplo, *Pasteurella multocida*, productos (por ejemplo, proteínas, antígenos, inmunógenos, epítomos) codificados por la secuencia de nucleótidos, métodos para producir dichas secuencias de nucleótidos, productos, microorganismos, y utilizados de los mismos, tales como para preparar composiciones de vacuna o inmunogénicas o para obtener una respuesta inmunológica o inmune o como un vector, por ejemplo, como un vector de expresión (por ejemplo, en un vector de expresión in vitro o in vivo).
- 10
- [0042] Las mutaciones introducidas en las secuencias de nucleótidos y genes de microorganismos producen mutantes atenuados nuevos y no obvios. Estos mutantes son útiles para la producción de composiciones inmunogénicas atenuadas vivas o vacunas atenuadas vivas que tienen un grado elevado de inmunogenicidad.
- 15
- [0043] Estos mutantes también son útiles como vectores que pueden ser útiles para la expresión in Vitro de productos de expresión, así como para la reproducción o replicación de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, la replicación de ADN) y para productos de expresión in vivo.
- 20
- [0044] La identificación de las mutaciones proporciona secuencias de nucleótidos y genes nuevos y no obvios, así como productos génicos codificados por la secuencia de nucleótidos y genes nuevos y no obvios.
- 25
- [0045] Dichos productos génicos proporcionan antígenos, inmunógenos y epítomos y son útiles como productos génicos aislados.
- [0046] Dichos productos génicos aislados, así como los epítomos de los mismos, también son útiles para generar anticuerpos, que son útiles en aplicaciones de diagnóstico.
- 30
- [0047] Dichos productos génicos, que pueden proporcionar o generar epítomos, antígenos o inmunógenos, también son útiles para composiciones inmunogénicas o inmunológicas, así como vacunas.
- [0048] En un aspecto, la descripción proporciona bacterias que contienen una mutación atenuante en una secuencia de nucleótidos o un gen, en los que la mutación modifica, reduce o suprime la expresión y/o la actividad biológica de un polipéptido o proteína codificados por un gen, dando lugar a una virulencia atenuada de la bacteria.
- 35
- [0049] La mutación no se localiza necesariamente en una secuencia codificante o gen para alterar su función, conduciendo a la atenuación. La mutación también se puede producir en secuencias de nucleótidos implicadas en la regulación de la expresión del gen, por ejemplo, en regiones que regulan la transcripción, iniciación, traducción y terminación de la transcripción. De este modo, también se incluyen promotores y regiones de unión a ribosoma (en general, estos elementos reguladores se encuentran aproximadamente entre 60 y 250 nucleótidos en dirección 5' del codón de partida de la secuencia codificante o gen; 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), terminadores de la transcripción (en general el terminador se localiza en aproximadamente 50 nucleótidos en dirección 3' del codón de detención de la secuencia codificante o gen; Ward c K et al., Infect. Imm. 1998,66(7):3326-36). En el caso de un operón, dichas regiones reguladoras se puede localizar en una mayor distancia en dirección 5' del gen o secuencia codificante. Una mutación en una región intergénica también puede conducir a la atenuación.
- 40
- [0050] Una mutación en dichas secuencias reguladoras asociadas con la secuencia codificante o gen, de manera que la mutación de esta secuencia de nucleótidos modifica, inhibe o suprime la expresión y/o la actividad biológica del polipéptido o la proteína codificada por el gen, que da lugar a una virulencia atenuada de la bacteria, sería equivalente a una mutación en un gen o secuencia codificante identificada en la presente descripción.
- 45
- [0051] La atenuación reduce o suprime la patogenicidad de las bacterias y la gravedad de las señales clínicas o lesiones, disminuye la velocidad de crecimiento de las bacterias y previene la muerte de las bacterias.
- 50
- [0052] La descripción se refiere a microorganismos, tales como bacterias, por ejemplo, bacterias gram negativas, tales como bacterias de la familia de *Pasteurellaceae*, por ejemplo, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. De manera ventajosa, las bacterias son *Pasteurella multocida*.
- 55
- 60

[0053] La *Pasteurella multocida* es una bacteria gram negativa, que es el agente causante de varias enfermedades de animales de producción y un patógeno humano oportunista. Es el agente etiológico de la pasteurelosis severa, tal como la cólera de ave de corral en aves domésticas y salvajes, septicemia hemorrágica bovina y rinitis atrófica porcina (Hunt ML et al., Vet Microbiol 2000, 72(1-2): 3-25). Los aislados se pueden agrupar serológicamente en base a los antígenos capsulares en serogrupos (A, B, D, E y F) o en 16 serotipos en base a antígenos LPS somáticos.

[0054] Las potenciales secuencias de nucleótidos implicadas en la atenuación de bacterias se han identificado utilizando la Mutagénesis Etiquetada con Firma (STM). Este método se discute en los documentos citados en la presente invención y se menciona también en Wo-A-96/17951.

[0055] STM implica la inserción de un transposón único etiquetado con firma en el genoma de un microorganismo.

[0056] En el locus de la inserción, se altera la secuencia de nucleótidos del genoma. En la presente descripción, se analiza la mutación resultante (y por tanto, el mutante que porta la mutación) para la atenuación.

[0057] La secuencia de la región alterada (por ejemplo, gen o secuencia codificante o marco de lectura abierta (ORF)) para cada mutante atenuado se determina mediante amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), clonación y secuenciación de las regiones de ADN que flanquean el transposón.

[0058] En una realización de la presente descripción, el método STM descrito en WO-A-96/17951 se adaptó para que fuera funcional en *Pasteurella multocida*. Estas adaptaciones incluyen de forma destacada la utilización del transposón Tn10 en lugar de Tn5, y la utilización para la selección de un medio CDM sin leucina en lugar de una selección por resistencia a estreptomina. Se dan más detalles en los ejemplos.

[0059] Una selección adicional de genes o secuencias de nucleótidos implicados en la atenuación a partir de genes potenciales identificados por el método STM se basa en la ausencia de mortalidad después de la inoculación de la bacteria mutante en animales.

[0060] Para aplicaciones veterinarias, un aspecto ventajoso de la descripción comprende la implementación de una selección experimental directamente en el animal diana, en lugar de un modelo animal. Este método permite una selección más precisa para mutaciones apropiadas de las bacterias mutantes. Para *Pasteurella multocida*, los experimentos se realizan directamente en pavos, uno de los huéspedes diana naturales *Pasteurella multocida*.

[0061] Los pavos se inoculan intramuscularmente con una cantidad suficiente de grupos de mutantes de *P. multocida* etiquetados con firma (por ejemplo, 0,5 ml,  $10^7$  CFU por animal). Los mutantes que no se reaíslan en un cierto tiempo después de la inoculación se consideran como potencialmente atenuados. Los mutantes que no se reaíslan se diferencian de los del grupo en que se reaíslan mediante amplificación por PCR y análisis de las etiquetas firma.

[0062] A continuación, cada mutante potencialmente atenuado se inyecta mediante vía intramuscular en pavos (por ejemplo 0,5 ml,  $10^4$  CFU por animal). La mortalidad de los pavos se registra diariamente durante 7 días después de la inoculación. Los mutantes que no conducen a la muerte se consideran como atenuados.

[0063] El método específico se ha llevado a cabo en la cepa P-1059 de *Pasteurella multocida* se ha obtenido un conjunto de mutantes atenuados. Cinco de ellos se han depositado el 1 de abril de 2003 en la CNCM (Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos) del Instituto Pasteur de París, Francia. El mutante 4G11 está disponible bajo el número de acceso CNCM 1-2999. El mutante 5D5 está disponible bajo el número de acceso CNCM 1-3000. 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 CNCMI-3003.

[0064] Las secuencias de nucleótidos que flanquean el locus de la inserción del transposón se designan como SEC 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.

[0065] Los transposones se insertaron en la cepa P-1059 de *Pasteurella multocida* 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 se insertó entre los nucleótidos en las posiciones 850-851 de la secuencia SEC ID No: 92.

[0066] Un aspecto particular de la descripción son mutantes atenuados de la cepa P-1059 de *Pasteurella multocida*



que tiene una mutación atenuante en el gen u ORF y/o sus regiones reguladoras que comprenden una secuencia seleccionado entre las secuencias SEC 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, y 97.

5 **[0067]** Realizaciones particulares adicionales de la descripción incluyen mutantes atenuados según la descripción, tales como los mutantes atenuados mencionados de la presente invención depositados en la CNCM bajo los términos del Tratado de Budapest.

10 **[0068]** Los mutantes de P-1059 atenuados se pueden obtener, por ejemplo, mediante la inserción de transposones o mediante mutagénesis dirigida (delección, inserción, sustitución). La mutación atenuante se puede realizar en estas secuencias de nucleótidos o genes, así como en las secuencias complementarias de las mismas. La mutación atenuante también se puede realizar en las secuencias de nucleótidos implicadas en la región reguladora de dichos genes o secuencias de nucleótidos.

15 **[0069]** Las secuencias anteriores o partes de las mismas (tales como, por lo menos 10, 15 ó 20 nucleótidos de las mismas, por ejemplo, por lo menos 10 nucleótidos contiguos de las mismas, o por lo menos 15 nucleótidos contiguos de las mismas y de manera más ventajosa por lo menos 20 nucleótidos contiguos de las mismas, hasta la longitud completa de las secuencias) se pueden utilizar como cebadores de PCR para detectar y seleccionar los mutantes de inserción de transposón. La PCR puede implicar una pareja de cebadores, por ejemplo, uno específico al transposón y el otro específico al gen o secuencia de nucleótidos a mutar. En base al tamaño esperado de los productos amplificados por PCR, el método permite la amplificación y/o detección de los fragmentos de PCR. El conocimiento del gen o ORF correspondiente y/o sus regiones reguladoras en el organismo, por ejemplo, bacterias gram negativas, tales como *Pasteurella*, por ejemplo, *Pasteurella multocida*, por ejemplo *Pasteurella multocida* cepa PM70 o P-1059 (véase, por ejemplo, infra); por ejemplo, el tamaño del correspondiente gen u ORF y/o sus regiones reguladoras se puede utilizar para diseñar cebadores de PCR, para cribar fragmentos de PCR amplificados y para detectar aquellos que tienen el tamaño correcto que permiten la selección de los mutantes.

20 **[0070]** El genoma completo de la cepa PM70 de *Pasteurella multocida* 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 "Blasts" realizados con las secuencias SEC 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 permitió localizar las secuencias homólogas en el genoma de PM70 y a continuación determinar los correspondientes genes u ORF en PM70.

25 **[0071]** Estas secuencias de nucleótidos en la cepa PM70 de *Pasteurella multocida* se designan como SEC 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.

**[0072]** Para el mutante 9h4 de la cepa P-1059, no se halló secuencia homóloga en PM70. El ORF de P-1059 se ha secuencia y designado como SEC ID No: 93.

35 **[0073]** Otro aspecto de la descripción son mutantes atenuados de la cepa PM70 que tiene por lo menos una mutación atenuante en un gen u ORF que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre SEC 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 y 90 y/o sus regiones reguladoras.

40 **[0074]** La mutación atenuante se puede realizar en estas secuencias de nucleótidos o genes, así como en las secuencias complementarias de las mismas. La mutación atenuante también se puede realizar en las secuencias de nucleótidos implicadas en la región reguladora de dichos genes. Los mutantes se pueden obtener, por ejemplo, mediante la inserción de transposón o mediante mutagénesis dirigida (delección, inserción, sustitución).

45 **[0075]** El término de "complementario" significa aquí la secuencia de nucleótidos de la otra cadena en el genoma de doble cadena, de manera que cubre la cadena antisentido como complemento de la cadena de sentido, y al revés. El término "nucleótido" también comprende desoxirribonucleótido (constituido con ácidos desoxirribonucleicos o ADN), ribonucleótido (constituido con ácidos ribonucleicos o ARN) y ribonucleótido mensajero (ARNm).

50 **[0076]** De manera más general, se pueden introducir mutaciones atenuantes en el genoma de una bacteria, tal como una bacteria gram negativa, por ejemplo una bacteria de la familia *Pasteurellaceae*, por ejemplo *P. multocida*, *P. haemolytica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumoniae*, de manera ventajosa una bacteria en el genoma de cualquiera de las diversas cepas de *P. multocida* (por ejemplo, la cepa P-1059, la cepa PM70), mutaciones en por lo menos una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 70% de identidad, por lo menos aproximadamente un 75% de identidad, por lo menos aproximadamente un 80% de identidad, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 90% de identidad, y de

manera ventajosa por lo menos aproximadamente un 95, 96, 97, 98, ó 99% o más de identidad con una de las secuencias de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos identificada como SEC 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. La mutación atenuante se puede realizar en estas secuencias de nucleótidos o genes, así como en las secuencias complementarias de las mismas. La mutación atenuante también se puede realizar en secuencias de nucleótidos implicadas en la región reguladora de dichos genes. Los mutantes atenuados se pueden obtener, por ejemplo, mediante la inserción de transposón o mediante mutagénesis dirigida (delección, inserción, sustitución). Los mutantes atenuados obtenidos son realizaciones de la descripción. Las realizaciones particulares son los mutantes atenuados de P-1059.

**[0077]** El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede establecer mediante el blast por parejas y la matriz blosum62 de NCBI (Centro Nacional para la Información en Biotecnología), utilizando los parámetros estándar (es decir, cabe indicar el algoritmo BLAST o BLASTX disponible en el servidor del "Centro Nacional para la Información en Biotecnología" (NCBI, Bethesda, Md.,USA), así como en Altschul et al. J. Mol. Biol. 1990. 215. 403-410; y de este modo, este documento habla de utilizar el algoritmo o el BLAST o BLASTX y la matriz BLOSUM62 mediante el término "blasts").

**[0078]** El verbo "codificar" utilizado en la presente invención no significa que la secuencia de nucleótidos está limitado a una secuencia codificante real, sino que comprende también el gen completo que incluye sus secuencias reguladoras que son secuencias no codificantes.

**[0079]** La homología o identidad de secuencia, tal como la homología de la secuencia de nucleótidos también se puede determinar utilizando el programa "Align" de Myers y Miller, ("Optimal Alignments in Linear Space", CABIOS 4, 11-17, 1988 y disponible en NcBI, así como el mismo u otros programas disponibles a través de Internet en los sitios del mismo, tal como el sitio de NCBI.

**[0080]** Alternativamente o adicionalmente, el término "homología" o "de identidad", por ejemplo, con respecto a una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, puede indicar una medición cuantitativa de homología entre dos secuencias. El porcentaje de homología de secuencia se puede calcular como  $(N_{ref} - N_{dif}) * 100 / N_{ref}$ , donde  $N_{dif}$  es el número total de residuos no idénticos en las dos secuencias cuando se alinean y donde  $N_{ref}$  es el número de residuos en una de las secuencias. Por tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una secuencia de identidad del 75% con la secuencia AATCAATC ( $N_{ref} = 8$ ;  $N_{dif} = 2$ ).

**[0081]** Alternativamente o adicionalmente, "homología" o "de identidad" con respecto a las secuencias se puede referir al número de posiciones con idénticos nucleótidos o aminoácidos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las dos secuencias en las que se puede determinar la alineación de las dos secuencias según el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman, 1983 PNAS USA 80:726, por ejemplo, utilizando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, un tamaño de palabra de 4 nucleótidos, y una penalización por espacio de 4, y se puede realizar convenientemente un análisis asistido por ordenador y la interpretación de los datos de la secuencia utilizando programas disponibles comercialmente (por ejemplo, Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc. CA). Cuando se dice que las secuencias de ARN son similares, o presentan un grado de identidad u homología de secuencia, con las secuencias de ADN, se considera que la timidina (T) en la secuencia de ADN es igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN. De este modo, las secuencias de ARN están dentro del alcance de la descripción y pueden derivar de secuencias de ADN, considerando que la timidina (T) en la secuencia de ADN es igual a uracilo (U) en las secuencias de ARN.

**[0082]** De manera ventajosa, la identidad u homología de secuencia, tal como la identidad u homología de la secuencia de aminoácidos se puede determinar utilizando el programa BlastP (Altschul et al., Nucl. Acids res. 25, 3389-3402) y disponible en NcBI, así como el mismo u otros programas disponibles a través de Internet en los sitios del mismo, tal como el sitio de NCBI.

**[0083]** Los siguientes documentos proporcionan algoritmos para comparar identidad u homología relativa de secuencias, tales como residuos de aminoácidos de dos proteínas, y adicionalmente o alternativamente con respecto a lo anterior, se pueden utilizar las enseñanzas en estas referencias para determinar el porcentaje de homología o identidad: Needleman SB y 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 y Waterman MS, "comparison of Bio-secuencias," 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 corrects phylogenetic trees," J. of Molec. Evol., 25:351-360 (1987); Higgins DG y Sharp PM, "Fast y 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 y weight matrix choice," Nucleic Acid res., 22:4673-480 (1994); y, Devereux J, Haeblerle P y Smithies o, "A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX," Nucl. Acids res., 12: 387-395 (1984). Y, sin una gran experimentación, el experto en la materia puede consultar muchos otros programas o referencias para determinar el porcentaje de homología.

**[0084]** La descripción se refiere a la mutación de las secuencias de nucleótidos o genes que codifican polipéptidos o proteínas que tienen la misma función biológica. La similitud de función se puede analizar o identificar o determinar o revisar mediante la conservación de sitios activos. Esto se puede realizar mediante una búsqueda DART de NCBI (Herramienta de recuperación de la Arquitectura del Dominio).

**[0085]** La presente descripción proporciona de este modo mutantes atenuados de una bacteria tal como se describen aquí, que comprende una mutación atenuante tal como se define aquí.

**[0086]** Los mutantes de bacterias gram negativas atenuadas incluyen una mutación, en la que se muta toda o parte de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos o gen específico tal como se describe aquí. El gen o secuencia de ácidos nucleicos específica incluye aquellas que comprenden, o son homólogas a (por ejemplo, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% homólogas), la secuencia SEC 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 ó 93, o sus regiones reguladoras. De manera ventajosa, el gen o secuencia de ácidos nucleicos específica incluye aquellas que comprenden, o son homólogas a la secuencia SEC ID No: 2, 6, 9, 12, 25, 31, 37, 40, 43, 46, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 ó 93, o sus regiones reguladoras. De manera más ventajosa, el gen o secuencia de ácidos nucleicos específica incluye aquellas que comprenden, o son homólogas a la secuencia SEC ID No: 6, 12, 25, 31, 37, 40, 46, 70, 75, 84, 87, 90 ó 93, o sus regiones reguladoras. E incluso de manera más ventajosa, el gen o secuencia de ácidos nucleicos específica incluye aquellas que comprenden, o son homólogas a la secuencia SEC ID No: 37, 40, 75, 90 ó 93, o sus secuencias de nucleótido homólogas. Preferiblemente, el mutante es una *Pasteurella*, tal como una *P. multocida*, por ejemplo P-1059 o PM70.

**[0087]** Las mutaciones se pueden introducir en el microorganismo utilizando cualquier técnica conocida, tal como, por ejemplo, tecnología de ADN recombinante, a efectos de introducir una mutación bien definida en el gen la secuencia de ácidos nucleicos seleccionada (mutagénesis dirigida). Dicha mutación puede ser una inserción de una secuencia de ácidos nucleicos homóloga o heteróloga, una delección, una sustitución, por ejemplo, una sustitución de por lo menos un nucleótido por otro o una combinación de los mismos. En una realización, la mutación es una mutación por delección, donde la alteración del gen o la secuencia de ácidos nucleicos está causada por la delección de parte, y de manera ventajosa, por la delección de la secuencia de ácidos nucleicos o gen completo. La delección de ácidos nucleicos evita la inversión a patogenicidad. En otra realización, la mutación es una inserción en un locus que corresponde a los locus de la inserción de transposón descritos aquí, por ejemplo, en los ejemplos. Estos locus, con referencia a la cepa P-1059, se localizan de manera ventajosa 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. Estos locus también se localizan en la cepa PM70 entre: los nucleótidos 180-181 ó 182-183 ó 190-191 en la SEC ID No: 2, 77-78 ó 1026-1027 ó 1027-1028 en la SEC ID No: 6,416-417 en la SEC ID No: 9,389-390 en la SEC ID No: 12,381-382 en la SEC ID No: 16,219-220 en la SEC ID No: 19, 1353-1354 en la SEC ID No: 22,136-137 en la SEC ID No: 25, 384-385 en la SEC ID No: 28, 222-223 ó 225-226 en la SEC ID No: 31,217-218 en la SEC ID No: 34, 1411-1412 en la SEC ID No: 37, 943-944 en la SEC ID No: 40, 855-856 en la SEC ID No: 43, 369-370 en la SEC ID No: 46, 111-112 en la SEC ID No: 49,443-444 en la SEC ID No: 52,4-5 en la SEC ID No: 55, , 573-574 en la SEC ID No: 61, 875-876 en la SEC ID No: 64,218-219 en la SEC ID No: 70,1072-1087 en la SEC ID No: 75, 64-65 en la SEC ID No: 78,282-283 en la SEC ID No: 81, 1431-1432 en la SEC ID No: 84, 974-975 en la SEC ID No: 87, 802-803 en la SEC ID No: 90, 850-851 en la SEC ID No: 92; o, inmediatamente en dirección 5' del nucleótido 1 en la SEC ID No: 58; o inmediatamente en dirección 5' del nucleótido 1 en la SEC ID No: 67. Estos locus también son aquellos localizados entre parejas similares de nucleótidos (a los indicados para PM70) en secuencias de nucleótidos de otra bacteria gram negativa, tal como un miembro de la familia de *Pasteurellaceae*, por ejemplo *P. multocida*, *P. haemolytica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumoniae*, que codifica una secuencia de aminoácidos homóloga tal como se define en la presente invención con su porcentaje de identidad. De este modo, los mutantes pueden ser bacterias gram negativas y son de manera ventajosa una *Pasteurella*, tal como una *P. multocida*, *P. haemolytica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumoniae*, por ejemplo, una *P. multocida*, tal como P-1059 o PM70.

**[0088]** Por definición, los mutantes por delección comprenden por lo menos una delección de o en una secuencia de nucleótidos según la descripción. Estos mutantes por delección incluyen aquellos en los que se elimina toda o parte de la secuencia génica o secuencia de nucleótidos específica. En un aspecto, la mutación da lugar a la delección de por lo menos un ácido nucleico, de por lo menos aproximadamente el 10%, por lo menos aproximadamente el 20%,

por lo menos aproximadamente el 30%, por lo menos aproximadamente el 40%, por lo menos aproximadamente el 50%, por lo menos aproximadamente el 60%, por lo menos aproximadamente el 70%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 90%, por lo menos aproximadamente el 95%, por lo menos aproximadamente el 98%, o por lo menos aproximadamente el 99% del gen o la secuencia de nucleótidos específica. Preferiblemente, se elimina el gen completo o la secuencia de nucleótidos específica.

[0089] Los mutantes pueden comprender más de una mutación, que pueden dar lugar a grados aditivos o sinérgicos de atenuación, y puede dar lugar a una mejor prevención de la inversión de la atenuación.

[0090] Estas mutaciones múltiples se pueden asociar con una mutación o mutaciones en las secuencias de nucleótidos o genes conocidos por sus propiedades atenuantes, tales como genes *aro*, por ejemplo, *aroA* (Homchampa P. et al., Veterinary Microbiology, 1994, 42: 35-44), y mutaciones en las secuencias de nucleótidos o genes según la descripción.

[0091] En una realización, los mutantes incluyen por lo menos dos mutaciones, en las que para cada mutación toda o parte de un gen o secuencia de ácidos nucleicos específica se muta tal como se describe aquí. Estos genes o secuencias de ácidos nucleicos específicas incluyen aquellas que comprenden, o son homólogas a, las secuencias SEC 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 ó 93, o sus regiones reguladoras. De este modo, los mutantes que tienen dos o más de las secuencias mutadas anteriores, por ejemplo, eliminadas tal como se describe aquí, están previstos por la descripción. De manera ventajosa, los mutantes tienen dos o más de las siguientes secuencias o secuencias que comprenden, o son homólogas a, las siguientes secuencias mutadas, por ejemplo, eliminadas, tal como se describe aquí: SEC ID No: 2, 6, 9, 12, 25, 31, 37, 40, 43, 46, 70, 75, 78, 81, 84, 87, 90 ó 93, o sus regiones reguladoras. De manera más ventajosa, los genes o las secuencias de ácidos nucleicos específicas que son mutadas (por ejemplo, las dos o más que son mutadas) incluyen aquellas que comprenden, o son homólogas a, las secuencias SEC ID No: 6, 12, 25, 31, 37, 40, 46, 70, 75, 84, 87, 90 ó 93, o sus regiones reguladoras. El mutante puede ser una bacteria gram negativa, y de manera ventajosa, el mutante es una *Pasteurella*, tal como una *P. multocida*, por ejemplo P-1059 o PM70.

[0092] De manera ventajosa, los mutantes que tienen dos o más de las siguientes secuencias, o sus regiones reguladoras, mutadas, por ejemplo, eliminadas tal como se describe aquí, están previstos por la descripción, SEC ID No: 37, 40, 75, 90 y 93, o sus secuencias de nucleótidos homólogas.

[0093] Varias realizaciones incluyen los mutantes que presentan deleciones de, o en los genes o secuencias de ácidos nucleicos, que comprenden, o son homólogas a, las secuencias SEC ID No: 37 y 40; SEC ID No: 37 y 75; SEC ID No: 37 y 90; SEC ID No: 37 y 93; SEC ID No: 40 y 75; SEC ID No: 40 y 90; SEC ID No: 40 y 93; SEC ID No: 75 y 90; SEC ID No: 75 y 93; SEC ID No: 90 y 93, o sus regiones reguladoras. El mutante puede ser una bacteria gram negativa y de manera ventajosa el mutante es una *Pasteurella*, tal como una *P. multocida*, por ejemplo P-1059 o PM70.

[0094] Se conocen bien los métodos para introducir las mutaciones en las regiones genómicas específicas y serán evidentes para el experto en la materia a partir de esta descripción y el conocimiento de la técnica. Por ejemplo, el gen o secuencia completa que se va a mutar o un fragmento se clonan en un vector y se modifican con el fin de suprimir su expresión y/o su actividad biológica. El vector se introduce en las bacterias, por ejemplo, mediante electroporación (por ejemplo, Jablonski L. et al., Microbial Pathogenesis, 1992, 12, 63-68), o mediante conjugación (Lee M. D. et al., Vet. Microbiol., 1996, 50, 143-148). El fragmento de ADN modificado se reintroduce en el genoma bacteriano mediante recombinación genética, de manera ventajosa mediante recombinación homóloga entre el cromosoma bacteriano y el vector. Como ejemplo, el vector puede ser un plásmido suicida según se describe en Cardenas (Cardenas M et al., Vet Microbiol 3 de Mayo de 2001; 80(1): 53-61). Ventajosamente, este vector comprende adicionalmente entre los dos brazos o regiones flanqueantes (utilizadas en la recombinación homóloga) una secuencia de polidetención (por ejemplo, 6 codones de detención, uno en cada marco de lectura) para bloquear una posible traducción.

[0095] El microorganismo atenuado de la descripción, por ejemplo, bacterias gram negativas, tales como *P. multocida*, puede comprender adicionalmente por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos homóloga o heteróloga insertada en su genoma. Esto es útil para reproducir moléculas de ácido nucleico heterólogas y/o para la expresión de moléculas de ácido nucleico heterólogas, ya sea in vivo o in vitro. La secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codifica de manera ventajosa un inmunógeno, antígeno o epítipo de un agente patogénico viral, parasítico o bacteriano que es diferente de los expresados de forma natural por el microorganismo atenuado. Esta secuencia heteróloga puede codificar un inmunógeno, antígeno o epítipo de otra cepa del microorganismo o bacteria, por ejemplo, otra cepa de *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 epítomos; y epítomo es un péptido o polipéptido que es capaz de inducir una respuesta inmune contra el agente patogénico o un antígeno secretado del agente patogénico.

5 [0096] Las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas que son adecuadas para este uso en dicho vector serán evidentes para el experto en la materia (Fedorova ND y Highlander SK, Infect Immun 1997, 65(7): 2593-8) e incluyen, por ejemplo, aquellas que provienen de los miembros de la familia de *Pasteurellaceae* (de manera destacada, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*), o de bacterias como *E. coli*, *Salmonella*, *campylobacter*.

10 [0097] La secuencia heteróloga se inserta de manera ventajosa de tal manera que el microorganismo la expresa cuando se administra en el huésped con el fin de desarrollar una respuesta inmune contra el microorganismo atenuado y contra dicho inmunógeno expresado. La secuencia heteróloga se inserta o se une operativamente de manera ventajosa en dirección 3' respecto a los elementos reguladores permitiendo su expresión, tal como un promotor. Se pueden añadir también secuencia de nucleótidos útiles para la dirección y la secreción de la proteína. Por consiguiente, se pueden incluir secuencias líder o señal en los productos expresados para facilitar el transporte a través de la pared celular y/o la secreción.

15 [0098] En una realización la secuencia homóloga o heteróloga se inserta en la secuencia de nucleótidos seleccionada o el gen seleccionado utilizados para la atenuación; de manera ventajosa la secuencia homóloga o heteróloga se inserta en uno de los locus correspondientes con los locus de inserción de transposón identificados aquí.

[0099] Para mejorar la expresión, el uso de los codones se puede adaptar a los vectores bacterianos utilizados.

25 [0100] Los mutantes atenuados de la descripción también pueden comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína terapéutica, un alérgeno, un factor de crecimiento o una citoquina o un inmunomodulador o inmunostimulador, tal como un GM-CSF, por ejemplo, un GM-CSF adaptado a las especies diana (por ejemplo, si el vector atenuado es *P. multocida*, para la administración a animales bovinos, el GM-CSF bovino podría ser expresado por el vector, por ejemplo, con la expresión por el vector de otra proteína, péptido, polipéptido, antígeno, inmunógeno o epítomo heterólogos).

[0101] Según un aspecto adicional de la descripción, los microorganismos atenuados se utilizan para producir composiciones inmunogénicas atenuadas vivas o composiciones de vacuna atenuadas vivas.

35 [0102] Según un aspecto ventajoso de la descripción, el microorganismo atenuado es una bacteria gram negativa, tal como una *Pasteurella*, por ejemplo, una *P. multocida*, por ejemplo P-1059 o PM70, mutada según la presente invención.

40 [0103] De manera ventajosa, tal como se describe aquí, el microorganismo puede actuar como un vector recombinante para inmunizar y/o vacunar animales o humanos contra infecciones causadas por otros agentes diferentes a *Pasteurella*.

45 [0104] Las composiciones inmunogénicas o las composiciones de vacuna comprenden el mutante atenuado y un portador, excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable, y opcionalmente un estabilizador y/o un adyuvante. El mutante atenuado puede ser un vector que expresa adicionalmente moléculas de ácido nucleico heterólogas al vector, tal como un epítomo, antígeno, inmunógeno y/o factor de crecimiento, citoquina, inmunoregulador o inmunostimulador heterólogos.

50 [0105] El término de "composición inmunogénica" cubre en el presente documento cualquier composición capaz, una vez se ha inyectado a animales o a un ser humano, de obtener una respuesta inmune contra el patógeno diana. El término de "composición de vacuna" o "vacuna" cubre en el presente documento cualquier composición capaz, una vez se ha inyectado a animales o a un ser humano de inducir una respuesta inmune protectora contra el patógeno diana.

55 [0106] El vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable puede ser agua o solución salina, pero puede, por ejemplo, comprender también un medio de cultivo de bacterias.

60 [0107] La bacteria atenuada viva según la invención puede liofilizarse, de manera ventajosa con un estabilizante. Se puede llevar a cabo la liofilización según los procedimientos de liofilización normalizados bien conocidos. Los estabilizantes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables pueden ser carbohidratos (por ejemplo, sorbitol, manitol, lactosa, sacarosa, glucosa, dextrano, trehalosa), 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, lactoalbúmina o caseína, proteínas que contienen agentes tales como leche desnatada (Mills CK et al., *Cryobiology* 1988, 25(2): 148-52; Wolff E et al., *Cryobiology* 1990, 27(5): 569-75), y tampones (por ejemplo, tampón fosfato, tampón fosfato de metal alcalino).

5

**[0108]** Se puede usar un adyuvante para hacer solubles las preparaciones liofilizadas.

**[0109]** Ejemplos de adyuvantes son aceite en agua, emulsiones de agua en aceite en agua basadas en aceite mineral y/o aceite vegetal y tensoactivos no iónicos, tales como copolímeros en bloque, Tween®, Span®. Otros adyuvantes adecuados son por ejemplo la vitamina E, las saponinas, y Carbopol®, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio ("Vaccine Design, The subunit and adjuvant approach", *Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 6, editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, 1995, Plenum Press Nueva York).

10

**[0110]** Se pueden almacenar las bacterias atenuadas vivas a -70°C en un medio que contiene glicerol.

15

**[0111]** Opcionalmente, la composición inmunogénica o de vacuna se puede combinar con uno o más inmunógenos, antígenos o epítopos seleccionados entre otros microorganismos o virus patógenos en una forma inactivada o viva.

**[0112]** Otro aspecto de la descripción es la secuencia de nucleótido o gen según la descripción, tal como las secuencias de nucleótidos o genes según la descripción designadas como SEC 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 y 93, y de manera ventajosa aquellas designadas como SEC 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.

20

**[0113]** Otro aspecto de la descripción es el uso de las secuencias de nucleótidos o los genes según la descripción, para la expresión y la producción de péptidos, polipéptidos o proteínas, o más generalmente, productos de expresión, por ejemplo, inmunógenos, antígenos o epítopos. En una realización, se pueden usar los polipéptidos o péptidos o proteínas codificados por estas secuencias de nucleótidos o los genes como subunidades de inmunógenos antígenos o epítopos en las composiciones inmunogénicas o vacunas. Se pueden utilizar en la práctica de la descripción, sin una gran experimentación, procedimientos de determinación de epítopos, tales como la generación de bibliotecas de péptidos solapantes (Hemmer B. Et al., *Immunology Today*, 1998, 19 (4), 163-168), Pepsan (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) y algoritmos (De Groot A. et al., *Nature Biotechnology*, 1999, 17, 533-561).

25

30

35

**[0114]** Los polipéptidos ventajosos son aquellos que tiene las secuencias de aminoácidos identificadas como SEC 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, o las codificadas por las secuencias de nucleótidos SEC 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. También se pueden utilizar de manera ventajosa los epítopos de estos polipéptidos.

40

**[0115]** La descripción comprende los polipéptidos equivalentes de otra bacteria, tal como una bacteria gram negativa, de manera ventajosa un miembro de la familia de *Pasteurellaceae*, por ejemplo *P. multocida*, *P. haemolytica*, *P. anatipestifer*, *A. pleuropneumoniae*, y de manera más ventajosa en el genoma de cualquiera de las diversas cepas de *P. multocida* están de este modo incluidas por polipéptidos de equivalencia cuyas secuencias de aminoácidos tienen por lo menos aproximadamente un 70%, por lo menos aproximadamente un 75%, por lo menos aproximadamente un 80%, por lo menos aproximadamente un 85%, por lo menos aproximadamente un 90%, por lo menos aproximadamente un 95%, y por lo menos aproximadamente un 96, 97, 98 ó 99% de identidad con una de las secuencias de aminoácidos identificadas como SEC 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 y/o polipéptidos que tiene la misma función o funciones biológicas que los polipéptidos identificados anteriormente con las secuencias. El criterio para establecer la identidad o la misma función biológica se ha descrito anteriormente.

45

50

**[0116]** La descripción también comprende los fragmentos inmunogénicos de estos polipéptidos, que tienen por lo menos una cadena de 10 aminoácidos del polipéptido, por lo menos 20, tal como por lo menos 30, de manera ventajosa por lo menos 50 y de manera más ventajosa por lo menos 70, por ejemplo, fragmentos de los polipéptidos que contienen por lo menos 10 aminoácidos contiguos del polipéptido, de manera ventajosa por lo menos 20 aminoácidos contiguos del polipéptido, tal como por lo menos 30 y de manera más ventajosa por lo menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido, e incluso de manera más ventajosa por lo menos 70 aminoácidos contiguos del polipéptido. Naturalmente, un fragmento es menor que el polipéptido completo. Un fragmento se puede combinar

60

con otros polipéptidos, por ejemplo, en polipéptidos de fusión; por ejemplo, un polipéptido de la descripción o fragmento del mismo puede ser una parte de un polipéptido de fusión que incluye otra parte (otro polipéptido), por ejemplo, un parte que aumenta la inmunogenicidad y/o una parte que aumenta la secreción, tal como una parte lipoproteica que aumenta la inmunogenicidad o una parte de secuencia señal o líder. Por consiguiente, la descripción prevé la expresión de polipéptidos, proteínas, antígenos, inmunógenos o epítomos – ya sean las secuencias o fragmentos de las mismas identificadas aquí o aquellas que son heterólogas a los vectores de la descripción – como fusiones, por ejemplo, como parte de un polipéptidos de fusión, por ejemplo, un polipéptido de fusión que de manera ventajosa incluye una parte que aumenta la inmunogenicidad, tal como una parte lipoproteica y/o una parte que aumenta la secreción, tal como una parte de secuencia señal o líder.

[0117] Los polipéptidos o fragmentos se producen de manera ventajosa mediante expresión *in vitro*. Las secuencias de nucleótidos según la descripción (por ejemplo SEC 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) o fragmentos de las mismas se insertan en un vector, unidas operativamente a elementos reguladores, tal como promotor, región de unión a ribosoma y terminador, y codón de partida y codón de detención. Los vectores ventajosos son plásmidos útiles para la 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).

[0118] Estos polipéptidos también se pueden sintetizar químicamente (Luo Y et al., *Vaccine* 1999, 17(7-8): 821-31).

[0119] Un aspecto de la descripción es de este modo una composición inmunogénica o de vacuna que comprende por lo menos un polipéptido o fragmento según la descripción (subunidad de la composición inmunogénica o de vacuna) o por lo menos un vector de expresión *in vivo*, tal como se describe aquí (composición inmunogénica o de vacuna recombinante viva), y un portador, excipiente, diluyente o vehículo veterinariamente o farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante. Ejemplos de dichos ingredientes se han descrito aquí en relación con la vacuna viva.

[0120] En otra realización, estas secuencias de nucleótidos o sus fragmentos se pueden insertar en vectores recombinantes para producir composiciones inmunogénicas o de vacuna recombinantes vivas capaces de expresar *in vivo* en el huésped el polipéptido codificado por esta secuencia de nucleótidos o fragmento.

[0121] El vector de expresión *in vivo* puede ser un vector de polinucleótidos o plásmido (EP-A2-1001025; Chaudhuri P res. *Vet. Sci.* 2001, 70(3), 255-6), virus (por ejemplo adenovirus, poxvirus, tal como la viruela aviar (US-A-5,174,993 US-A-5,505,941 y US-A-5,766,599) o la viruela de canario (US-A-5,756,103)) o bacterias, es decir, *Escherichia coli* o *Salmonella* sp.

[0122] Los polipéptidos y fragmentos de la descripción también se pueden utilizar en terapia.

[0123] Los polipéptidos y fragmentos también se pueden utilizar como reactivos en reacciones anticuerpo-antígeno. Por consiguiente, otro aspecto de la descripción es de este modo un método de diagnóstico y/o un kit para detectar la infección por la bacteria grama negativa. Los kits, por ejemplo, ELISA, pueden incluir por lo menos un polipéptido o fragmento según la descripción (por ejemplo, por lo menos un polipéptido identificado por la secuencia en la presente invención o un fragmento de la misma tal como se describen aquí).

[0124] Los anticuerpos contra los polipéptidos o fragmentos de la presente invención (por ejemplo, polipéptidos identificados por la secuencia de la presente invención o fragmentos de la misma tal como se describen aquí) se pueden utilizar como reactivo de diagnóstico o en inmunización pasiva o vacunación o en terapia. Las cantidades de anticuerpo administradas en inmunización pasiva pueden ser las mismas o análogas a las cantidades utilizadas en la técnica, tales como las del conocimiento en la técnica, el experto en la materia puede realizar la inmunización pasiva sin demasiada experimentación.

[0125] Otro aspecto de la descripción es una preparación de anticuerpos que comprende un anticuerpo específico para un polipéptido o un fragmento según la descripción y métodos de diagnóstico que utilizan el mismo. Con respecto a un anticuerpo específico para un polipéptido, se entiende que el anticuerpo se une preferiblemente 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 para el polipéptido, de manera que el anticuerpo se puede utilizar para aislar el polipéptido de una muestra o detectar su presencia en una muestra con no más de un 5% de falsos positivos, utilizando técnicas conocidas en el sector o descritas en documentos citados aquí, incluyendo Sambrook, *infra*.

[0126] Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales.

[0127] Los métodos para producir anticuerpos son conocidos por el experto en la materia.

5 [0128] Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un animal seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un polipéptido o un fragmento. Se recoge el suero del animal inmunizado y se trata según procedimientos conocidos y posiblemente se purifica. Véase, por ejemplo Jurgens et al. J. Chrom., 1985, 348: 363-370.

10 [0129] La metodología general para producir anticuerpos monoclonales mediante la utilización de la tecnología de hibridoma es conocida. Se pueden crear líneas celulares productoras de anticuerpos inmortales mediante la fusión celular, y también mediante otras técnicas, tales como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con virus de Epstein-Barr. Véase, por ejemplo J. E. Liddell "A practical guide to monoclonal antibodies" ed. John Wiley y sons, 1991, p.188; S. J. de StGroth et al. J. Immunol. Methods, 1980, 35(1-2), 1-21.

15 [0130] Las secuencias de nucleótidos según la presente invención y sus fragmentos se pueden utilizar como sondas para hibridación, por ejemplo en un método de diagnóstico.

20 [0131] Se utilizan de manera ventajosa condiciones de hibridación rigurosa. Se puede hacer referencia a las descritas por Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104. La hibridación bajo condiciones rigurosas significa que aún se observa una señal positiva de hibridación después del lavado durante 1 hora con 1 x tampón SSC y SDS al 0,1% a 55°C, de manera ventajosa a 62°C y de manera más ventajosa a 68°C, por ejemplo, durante 1 hora en 0,2 x tampón SSC y SDS al 0,1 % a 55°C, tal como a 62°C y de manera ventajosa a 68°C.

25 [0132] También se pueden caracterizar secuencias de nucleótidos por su capacidad de unirse bajo condiciones de hibridación rigurosas. De este modo, la descripción puede prever secuencias de ácidos nucleicos identificadas en la presente invención y moléculas de ácido nucleico que se unen a las mismas bajo condiciones de hibridación rigurosas.

30 [0133] Las secuencias de nucleótidos según la presente invención y sus fragmentos se pueden utilizar como cebadores para la PCR o en un método similar que implique la amplificación y/o hibridación, por ejemplo, para la detección de bacterias gram negativas en cualquier medio, por ejemplo, muestras de tejido, fluidos biológico, agua, alimentos.

35 [0134] De manera ventajosa, se utilizan fragmentos de la secuencia de nucleótidos que tienen por lo menos 20 ácidos nucleicos contiguos, tal como por lo menos 30 ácidos nucleicos contiguos, por ejemplo, por lo menos ácidos nucleicos 50 contiguos, por ejemplo por lo menos ácidos nucleicos 70 contiguos o de manera más ventajosa por lo menos 100 ácidos nucleicos contiguos de secuencias de nucleótidos o genes según la descripción, por ejemplo, de las SEC 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, 40 90, 93.

[0135] Además, la presente descripción se refiere a métodos para inmunizar contra o evitar la infección bacteriana o proteger contra la infección bacteriana en animales, de manera ventajosa animales susceptibles de la misma, tal como aves, conejo, animales bovinos, especies porcinas, y de manera más ventajosa en especies aviares, tales como pollo, pavo y pato (incluyendo reproductores, jóvenes y ponedores) o en un ser humano.

50 [0136] Según estos métodos, se administran (1) una composición inmunogénica o de vacuna atenuada viva de la descripción, o (2) una subunidad de la composición inmunogénica o de vacuna de la descripción, o (3) una composición inmunogénica o de vacuna recombinante viva de la descripción, o combinaciones de las mismas. Naturalmente, se pueden utilizar las realizaciones de la invención con otras composiciones inmunogénicas o de vacuna que no son de la invención, por ejemplo, en procesos de sensibilización y refuerzo, tales como cuando se administra primero una composición inmunogénica o de vacuna de la invención y después se administra una composición inmunogénica o de vacuna, o viceversa.

55 [0137] La administración se puede realizar de manera destacada mediante inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (Sc) o por vía intranasal, intratraqueal o administración oral. La composición inmunogénica o la vacuna según la invención se administra de manera ventajosa mediante jeringa, aparato sin aguja (como, por ejemplo Pigjet, Avijet, Dermojet o Biojector (Bioject, oregon, USA)), pulverizador, agua de beber, gotas para los ojos.

60 [0138] Las administraciones ventajosas para la composición inmunogénica o vacuna atenuada viva son *in ovo*, por



vía oral (por ejemplo, agua de beber, pulverización de todo el cuerpo), ocular (por ejemplo, gotas para los ojos, pulverización de todo el cuerpo), traqueal (por ejemplo, pulverizador), intradérmica, subcutánea (Sc) o intramuscular (IM).

5 [0139] La cantidad de microorganismos atenuados vivos se puede determinar y optimizar por el experto en la materia, sin una gran experimentación, a partir de esta descripción y el conocimiento de la técnica. En general, se puede administrar un animal (incluyendo un ser humano) con aproximadamente  $10^4$ - $10^9$  CFUs, de manera ventajosa aproximadamente  $10^5$ - $10^8$  cFUs y de manera más ventajosa aproximadamente  $10^6$ - $10^7$  CFUs en una dosis unitaria individual.

10 [0140] Mediante la ruta intramuscular, se puede administrar a un animal aviar con aproximadamente  $10^4$ - $10^7$  CFUs, de manera ventajosa aproximadamente  $10^5$ - $10^6$  CFUs en una dosis unitaria individual. El volumen de una dosis unitaria individual puede ser entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 0,5 ml y de manera ventajosa aproximadamente 0,3 ml. Por vía oral, traqueal u ocular, se puede administrar a un animal aviar con aproximadamente  $10^5$ - $10^8$  cFUs, de manera ventajosa aproximadamente  $10^6$ - $10^7$  CFUs en una dosis unitaria individual. Para la administración por pulverización, el volumen se ajusta al aparato y al tamaño de las gotas, desde aproximadamente 30 a aproximadamente 600 ml para aproximadamente 1000 animales y de manera ventajosa aproximadamente 0,2 ml por animal.

20 [0141] Para animales bovinos y porcinos, las rutas ventajosas son IM y SC. El animal se puede administrar con aproximadamente  $10^4$ - $10^9$  CFUs, de manera ventajosa con aproximadamente  $10^5$ - $10^8$  CFUs en una dosis unitaria individual. El volumen de una dosis unitaria individual puede estar entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 5,0 ml y de manera ventajosa entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 2,0 ml y de manera más ventajosa aproximadamente 1,0 ml.

25 [0142] Los conejos se pueden administrar mediante una ruta IM o SC con aproximadamente  $10^4$ - $10^8$  cFUs, de manera ventajosa aproximadamente  $10^5$ - $10^7$  CFUs en una dosis unitaria individual. El volumen de una dosis unitaria individual puede estar entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 0,5 ml y de manera ventajosa aproximadamente 0,5 ml. También se les puede administrar vía ID con aproximadamente  $10^4$ - $10^8$  CFUs, de manera ventajosa con aproximadamente  $10^5$ - $10^7$  CFUs en una dosis unitaria individual. El volumen de una dosis unitaria individual puede estar entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 0,2 ml.

[0143] A continuación se describirá la invención mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## 35 EJEMPLOS

**Ejemplo 1:** Construcción de una biblioteca de mutantes de transposón de *P. multocida* etiquetados con firma (cribado STM)

40 Construcción de transformantes pLOF/km SM10 $\lambda$ pir etiquetados

[0144] Se produjeron las etiquetas según se describe en Hensel et al., (Science, 1995, 269:400-403). Se seleccionaron inicialmente los plásmidos pUTminiTn5Km2 etiquetados que contienen etiquetas que se hibridan bien pero no se hibridan en cruzado entre sí. Se encontró que el transposón mini-Tn5 en el vector pUTminTn5Km2 etiquetado no se transponía en las diversas cepas de Pasteurella multocida. En cambio, se ha observado que el transposón mini-Tn10 funciona en *P. multocida* (Lee et al., Vet Microbiol, 1996, 50:143-8). Las etiquetas preseleccionadas se transfirieron por tanto desde los vectores pUTminiTn5 en el plásmido pLOF/Km que contenía mini-Tn10 (Herrero et al., J. Bacteriology, 1990, 172: 6557-6567). Se amplificaron las etiquetas mediante la PCR usando cebadores que se unen con el vector pUTminiTn5Km2, en cualquiera de los lados del sitio *KpnI* en el que se clonaron las etiquetas. Estos cebadores incluían las secuencias para la enzima de restricción *SaI*. A continuación se digirieron los productos de la PCR con *SaI* y se clonaron en el sitio *SaI* de una versión modificada del vector pLOF/Km, en la que un sitio *SaI* ha sustituido el único sitio de clonación *SfiI*. A continuación, se transformaron los plásmidos pLOF/Km etiquetados en la cepa 8M10 $\lambda$ pir de *E. coli* (Km<sup>r</sup>, *thi*, *thr*, *leu*, *tonA*, *lacY*, *supE*, *recA::RP4-2-Tc::Mu $\lambda$ pir*) (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.

Procesos de selección y de contraselección

60 [0145] El proceso de conjugación requiere un procedimiento de selección de la *P. multocida* receptora, que ha adquirido el plásmido pLOF/KM y un procedimiento de contraselección frente al donante SM10 $\lambda$ pir de *E. coli*.

[0146] En el procedimiento de selección, se selecciona la *P. multocida* receptora para usar kanamicina, que está codificada por el transposón mini-Tn10.

5 [0147] Inicialmente, para la contraselección en conjugaciones frente al donante de *E. coli*, se usó un mutante espontáneamente resistente a la estreptomycin de la cepa P-1059 de *Pasteurella*. Sin embargo, pareció que esta cepa atenuaba su virulencia en pavos y de esta manera no era utilizable aquí. Las cepas de *Pasteurella multocida* pueden crecer en medios químicamente definidos (CDM) (Hu et al., Infection and Immunity 1986, 804-810). Se utilizó una versión modificada de este medio químicamente definido que contenía agar pero no contenía leucina para permitir la contraselección frente al donante de *E. coli*. La cepa de *Pasteurella* fue capaz de crecer en este medio, la composición del cual se proporciona en la tabla 1, mientras que la cepa SM10λpir de *E. coli*, que es un auxótrofo de leucina, no lo fue.

Tabla 1:

Componente	Concentración g/litro
Agar noble	20
Na <sub>2</sub> BPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	32,31
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,368
NaCl	1,196
Glucosa	6,0
Clorhidrato de L-Arginine	0,24
Clorhidrato de L-cisteína	0,12
L-serina	0,2
Ácido L-glutámico	0,15
L-iso-leucina	0,064
L-fenilalanina	0,095
Ácido L-aspártico	1,6
L-tirosina	0,08
Clorhidrato de tiamina	0,0002
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,246
Pantotenato de calcio	0,004
Nicotinmida	0,01
Ácido orótico	0,003

15

Paso de la cepa de *P. multocida* en medio CDM

20 [0148] Se reavivó una ampolla liofilizada de la cepa de *P. multocida* (USDA P-1059, disponible de la American Type Culture Collection, número de acceso ATCC 15742) mediante la adición de 200 µl de BHI (infusión de cerebro-corazón) y se rayó una alícuota de la suspensión sobre una placa de agar con BHI, y se incubó la placa a 37°C durante la noche. El material de las colonias de esta placa se usó para inocular un caldo de cultivo con BHI, que se incubó con agitación a 37°C durante la noche. Se añadió glicerol hasta una concentración final de 15% v/v y se almacenaron las alícuotas congeladas a -80°C. Se rayó una muestra de una de estas alícuotas congeladas sobre una placa de agar con BHI y se incubó durante la noche. El material de las colonias de esta placa con BHI se rayó a continuación sobre placas de agar con CDM con la composición proporcionada en la tabla 1 y se incubó a 37°C durante 3 días. El material de las colonias de esta placa con CDM se inoculó en un caldo de cultivo con BHI y se incubó con agitación a 37°C durante la noche. Se añadió glicerol a este cultivo hasta una concentración final de 15% v/v y se congelaron las alícuotas a -80°C. Se denominó esta cepa 16084 como (CDM).

30

Construcción del banco de mutantes

35 [0149] Se conjugaron los transformantes pLOF/km SM10λpir etiquetados con la cepa 16084 (CDM) de *P. multocida*. 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 SM10λpir etiquetado se conjugó con la cepa *P. multocida* en al menos tres conjugaciones separadas. Se seleccionaron los mutantes de transposón de *Pasteurella* en placas de agar CDM suplementadas con 50 µg/ml de kanamicina.

40 [0150] A continuación se rayaron los mutantes resistentes a la kanamicina de cada uno de los transposones etiquetados para formar colonias únicas dos veces sobre placas de agar con BHI y con 50 µg/ml de kanamicina. A

continuación se inocularon las colonias únicas en caldos de cultivo con BHI, se hicieron crecer durante la noche a 37°C con agitación. A continuación se añadió glicerol hasta una concentración final de 15% v/v y se almacenaron los mutantes a -80°C en viales individuales.

5 **Ejemplo 2:** Cribado del banco de mutantes de *Pasteurella* etiquetada con firma para los mutantes con virulencia atenuada en pavos

10 [0151] Se hicieron crecer cultivos de mutantes de *P. multocida* para la inoculación de pavos mezclando 20 µl de cada uno de las soluciones madre son glicerol de los mutantes obtenidos en el ejemplo 1 con 200 µl de medio de cultivo con BHI, suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, y colocándolos en placas de microtitulación de 96 pocillos. Estas placas de microtitulación se incubaron en condiciones estáticas durante aproximadamente 18 horas a 37°C. A continuación, se mezclaron alícuotas de 10 µl de los cultivos de 18 horas de cada mutante con 200 µl de medio de cultivo con BHI suplementado con 50 µg/ml de kanamicina en una placa de microtitulación reciente y se incubó la placa a 37°C durante aproximadamente 4 horas. Se detuvieron los cultivos en la fase exponencial de crecimiento y se transfirieron 100 µl de los cultivos de cada mutante a una placa de microtitulación reciente y se usaron para la determinación de la densidad óptica (DO) a 650 nm.

20 [0152] Se formaron combinados de inóculos o de entrada mezclando los restantes 100 µl de los cultivos de 4 horas. Cada cultivo de entrada estaba constituido por 48 mutantes diferentes. Se determinó el título de estas suspensiones combinadas mediante análisis FACS (clasificador celular activado por fluorescencia) de alícuotas de 1000 µl. A continuación se diluyeron alícuotas (1 ml) de la suspensión combinada en agua fisiológicamente tamponada para obtener una suspensión con un título de  $2 \cdot 10^7$  cfu/ml. A continuación se inocularon grupos de 5 pavos de tres semanas de edad intramuscularmente con alícuotas de 0,5 ml de esta suspensión ( $10^7$  ufc por animal). Se determinó el estado serológico de los pavos antes de la inoculación mediante cribado para la presencia de anticuerpos de *Pasteurella* en muestras de sangre tomadas un día antes de la inoculación. Se recogieron las células del resto de combinados de entrada mediante centrifugación y se extrajo el ADN cromosómico de los residuos celulares.

30 [0153] Aproximadamente 14 horas después de la inoculación, se tomó 1 ml de muestra de sangre de 3 de los 5 pavos. Se emplacaron las diluciones en serie ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) de las muestras de sangre en placas de agar Columbia suplementado con sangre de ovejas al 5%. Se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas tras lo cual se volvieron a suspender aproximadamente 10000 colonias de *Pasteurella* en medio con BHI. Estas suspensiones, que se denominaron combinado de salida, se centrifugaron a continuación y se extrajo el ADN cromosómico procedente del residuo celular.

35 [0154] Los mutantes de *Pasteurella* que estaban presentes en el combinado de entrada pero que no se volvieron a aislar de los pavos, se identificaron mediante la amplificación por PCR de las etiquetas con firma presentes en las muestras de ADN procedentes de los combinados de entrada y salida, y se llevó a cabo la hibridación de los productos de la PCR amplificados frente a las inmunotransferencias cargadas con el ADN que codificaba las etiquetas con firma, según se describe en Hensel et al. (Science 1995, 269:400-403). Se consideraron estos mutantes como de virulencia potencialmente atenuada. Se confirmó esta atenuación mediante cribado para una ausencia de mortalidad tras las infecciones individuales de los potenciales mutantes en pavos.

### Ejemplo 3

45 Confirmación de la atenuación de la virulencia en pavos de los mutantes de *P. Multocida*

50 [0155] Se revivieron los mutantes de transposón identificados como potencialmente atenuados en el ejemplo 2 o los mutantes que tienen limitada la capacidad para crecer en el cultivo, mezclando 20 µl de las soluciones madre con glicerol con 200 µl de medio de cultivo con BHI suplementado con 50 µg/ml de kanamicina en placas de microtitulación. Se incubaron estas placas de microtitulación en condiciones estáticas durante 18 horas a 37°C. A continuación se tomaron alícuotas de 10 µl de cada mutante de estos cultivos y se mezclaron con 200 µl de medio con BHI, suplementado con 50 µg/ml de kanamicina en una placa de microtitulación reciente y se incubó esta placa en condiciones estáticas durante aproximadamente 4 horas. Se detuvieron los cultivos en la fase exponencial de crecimiento y se transfirieron 100 µl de los cultivos de cada mutante a una placa de microtitulación reciente y se usaron para la determinación de la densidad óptica (DO) a 650 nm. A continuación, se diluyeron los cultivos de cada uno de los mutantes 1 en 10000 en agua fisiológicamente tamponada para obtener una concentración de aproximadamente  $2 \cdot 10^4$  ufc/ml. A continuación, se inocularon alícuotas (0,5 ml) de estas diluciones intramuscularmente en 2 pavos de cinco semanas de edad ( $10^4$  ufc por animal). Se determinó el estado serológico de unos pocos animales de cada grupo de pavos a partir de las muestras de sangre tomadas el día antes de la inoculación. Se vigilaron los pavos durante los siguientes 7 días por la mortalidad. De los mutantes ensayados 72 no dieron como resultado mortalidad en ninguna de las dos aves inoculadas. Estos 72 mutantes se consideraron con

virulencia atenuada.

**Ejemplo 4:** Caracterización de los mutantes de inserción del transposón identificados tras el cribado en pavos.

5 [0156] Se identificaron los sitios de inserción del transposón en el genoma de los mutantes de *P. multocida* atenuados clonando el ADN que flanqueaba un lado de la inserción del transposón, tanto mediante PCR inversa como mediante PCR arbitrariamente cebada.

10 [0157] Se revivieron estos mutantes de las soluciones madre con glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$  rayando una alícuota sobre placas de agar con BHI y con 50  $\mu\text{g/ml}$  de kanamicina. A continuación se usaron las colonias individuales para inocular caldos de cultivo con BHI a partir de los cuales se preparó ADN cromosómico.

15 [0158] Para la PCR inversa, se digirió el ADN cromosómico con un enzima de restricción que tenía un sitio de reconocimiento de 4 pares de bases, tales como Tsp509I,  $\alpha\text{TaqI}$  o RsaI. A continuación se unió el ADN en un volumen grande para estimular la unión intramolecular. A continuación, se amplificó el ADN que flanqueaba el transposón procedente de esta plantilla de ADN unido usando cebadores dirigidos hacia fuera que se hibridan a la secuencia conocida del transposón, tales como StipJ (SEC ID No: 98,20 unidades) (5' ATC TGA TCC TTC AAC TCA GC 3'), StipA (SEC ID No: 99, 19 unidades) (5' CGC AGG GCT TTA TTG ATT C 3'), KTGRI (SEC ID No: 100, 27 unidades) (5' GCG GAA TTC GAT GAA TGT TCC GTT GCG 3'), Tn10Ir1 (SEC ID No: 101, 20 unidades) (5' TTT ACC AAA ATC ATT AGG GG 3') y Tn10Ir4 (SEC ID No: 102, 19 unidades) (5' GAT CAT ATG ACA AGA TGT G 3'). Estos productos de PCR inversa a continuación se clonaron y secuenciaron.

25 [0159] Para la PCR arbitrariamente cebada, se utilizó el ADN cromosómico como plantilla en un primer ciclo de reacción de PCR con un cebador dirigido hacia fuera que se hibrida al transposón, tal como StipA, y un cebador arbitrario, tal como arb1 (SEC ID No: 103, 35 unidades) (5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN GAT AT 3') o arb6 (SEC ID No: 104, 35 unidades) (5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN CAG CC 3'). La temperatura de hibridación de este primer ciclo de reacción de PCR se establece inicialmente muy baja, aumentando la temperatura de hibridación en los ciclos posteriores. A continuación, se utiliza una parte de los productos del primer ciclo de PCR como plantilla en un segundo ciclo de PCR. Este segundo ciclo de PCR utiliza otro cebador dirigido hacia fuera, tal como KTGRI, que se hibrida al transposón en una posición que está más cerca del extremo del transposón que el cebador utilizado en el primer ciclo de PCR. El otro cebador utilizado en este segundo ciclo de PCR tiene la misma secuencia que las 20 bases de la secuencia conocida en el extremo 5' del cebador arbitrario utilizado en el primer ciclo de PCR, tal como arb2 (SEC ID No: 105,20 unidades) (5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC 3'). Los productos de PCR de esta segunda PCR a continuación se clonaron y secuenciaron.

40 [0160] A continuación, las secuencias obtenidas se analizaron para identificar los marcos de lectura abiertos (ORF) que se pueden alterar por el transposón y también se utilizaron para buscar secuencias similares disponibles actualmente en la base de datos EMBL y en la secuencia de genoma de la cepa PM70 de *Pasteurella multocida*, determinada por la University of Minnesota (May BJ et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98(6): 3460-5).

[0161] Para información, en las siguientes secuencias de nucleótidos, N corresponde a cualquier ácido nucleico (A o C o G o T).

45 Mutantes 1G4, 3F4, 3G12, 12D6 y 14C10.

[0162] Los mutantes 1G4, 3F4 y 12D6 presentan exactamente el mismo sitio de inserción del transposón. La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 1 (775 unidades). El transposón está insertado inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

50 [0163] Se localiza un codón de partida en las posiciones 179-181 de la secuencia SEC ID No: 1.

[0164] Para el mutante 3G12, la secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en SEC ID No: 95 (101 unidades). El transposón está insertado inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

55 [0165] Para el mutante 14C10, la secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en SEC ID No: 96 (220 unidades). El transposón está insertado inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

60 [0166] Se identificaron otras cuatro proteínas y genes de Pasteurellaceae mediante "blasts" realizados con una secuencia de 60 aminoácidos codificada por la SEC ID No: 1.

Cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	% de identidad
taxón 747 de <i>P. multocida</i>	PhyA (AF067175)	PhyA (AAc67248)	100% sobre 60 aminoácidos
PM70 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

[0167] La localización del transposón en los mutantes 1G4, 3F4 y 12D6 corresponde a la posición 8507-8508 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank Número de Acceso 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 altera un homólogo del gen PM0773 de PM70, PhyA. Se prevé que el gen de PhyA está implicado en la síntesis en cápsulas. La secuencia de nucleótidos de PM0773 se identifica aquí como SEC ID No: 2 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 3.

Mutantes 1G8, 9D1 y 9D8

[0168] En el mutante 1G8, el transposón está insertado inmediatamente en el extremo 3' de la secuencia SEC ID No: 4 (226 unidades). Esta secuencia tiene dos marcos de lectura abiertos (+2 y -2) que codifican potenciales proteínas más largas. El ORF según la descripción está en el marco -2.

[0169] El transposón insertado en el mutante 9D1 está inmediatamente en el extremo 3' de la secuencia SEC ID No: 5 (87 unidades).

[0170] El transposón insertado en el mutante 9D8 está después de la posición 225 de la secuencia SEC ID No:4.

[0171] Los transposones en los mutantes 1G8, 9D1 y 9D8 alteran un homólogo del gen de PM70, PM0871. Las localizaciones de los transposones en estos mutantes corresponden a las posiciones 9849-9850 (mutante 1G8), 8899-8900 (mutante 9D1) o 9848-9849 (mutante 9D8) de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida* de Genbank de número de acceso AE006125. La secuencia de nucleótidos de PM0871 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 6 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 7.

[0172] Se identificó otro gen/proteína de Pasteurellaceae mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 7. Éste es *Haemophilus influenzae* HI1586 (Genbank, números de acceso U32832 y AAC23234). Se halló una identidad del 72% sobre 507 aminoácidos entre PM0871 y HI1586.

#### Mutante 2F2

[0173] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 8 (78 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia. Esta secuencia tiene tres marcos de lectura abiertos (+1, +2 y -1) que codifican potenciales proteínas más largas. El ORF según la descripción está en el marco +2.

[0174] El transposón en el mutante 2F2 altera un gen homólogo del gen de PM70 PM1727. Este transposón se localiza en una posición que corresponde a 644-645 de la secuencia de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006210 (PM1727). La secuencia de nucleótidos de PM1727 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 9 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 10.

[0175] Se identificó otro gen/proteína de Pasteurellaceae mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 10. Éste es *haemophilus influenzae* HI0621 (Genbank, números de acceso U32744 y AAC22281). Se halló una identidad del 77% sobre 183 aminoácidos entre PM1727 y HI0621.

[0176] PM1727 es un miembro de la superfamilia de hidrolasas, en particular se refiere a histidinol fosfato fosfatasas.

#### Mutante 3A2

[0177] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 11 (467 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

[0178] Se localiza un codón de detención en las posiciones 428-430.

[0179] El transposón en el mutante 3A2 se localiza en una posición que corresponde a 5103-5104 de la secuencia de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006094 (PM0586). La secuencia de nucleótidos de PM0586 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 12 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 13.

[0180] Se identificaron otros dos genes y proteínas de *Pasteurellaceae* mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 13. Estos genes y proteínas son A1 PlpD de *Pasteurella haemolytica* (Genbank, números de acceso AF058703 y AAC32565) y 31 kDa de *Haemophilus somnus* (Genbank, número de accesos L07795 y AAA24941). Se halló una identidad del 73% sobre 276 aminoácidos entre PM0586 y PlpD de *P. haemolytica* y del 71% sobre 273 aminoácidos entre PM0586 y 31 kDa de *H. somnus*.

[0181] PlpD y PM0586 son miembros de la familia de ompA.

### Mutante 3D3

[0182] Las secuencias de ADN que flanquean ambas partes del sitio de inserción del transposón se proporcionan en las SEC ID No: 14 (204 unidades, transposón en el extremo 5') y SEC ID No: 15 (35 unidades, transposón en el extremo 5').

[0183] Se localiza un codón de detención en las posiciones 7-9 de la SEC ID No: 14 y en las posiciones 33-35 de la SEC ID No: 15.

[0184] Se identificó otro gen/proteína de *Pasteurellaceae* mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 14 y su secuencia de aminoácidos codificada (65 aminoácidos). Se halló una identidad del 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 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006042, posiciones deducidas a partir de SEC ID No: 14 y 15, respectivamente. Esta diferencia es probablemente debido a la inserción del transposón que da lugar a la duplicación de varios nucleótidos en el sitio de inserción del transposón. La posición 4788 se localiza en el gen de PM0064. La posición 4778 está 6 pb en dirección 3' del codón de detención de PM0064. La secuencia de nucleótidos de PM0064 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 16 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 17.

[0185] Se identificaron otros genes y proteínas de bacterias gram negativas mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 17.

Cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	% de identidad
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI0017 (U32687)	HI0017 (AAC21695)	81% sobre 127 aminoácidos
<i>Escherichia coli K12</i>	YfiD (AE000344)	yfiD (AAC75632)	81% sobre 127 aminoácidos
<i>Salmonella typhi</i>	STY2839 (AL627275)	yfiD (CAD02795)	81% sobre 127 aminoácidos
<i>Salmonella typhimurium</i>	STM2646 (AE008820)	yfiD (AAL21540)	81% sobre 127 aminoácidos
<i>Serratia liquefaciens</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

### Mutante 3D8

[0186] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 18 (75 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

[0187] La localización del transposón en el mutante 3D8 corresponde entre las posiciones 7769-7770 de la

secuencia de genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006080. El transposón altera un homólogo del gen de PM70 PM0445. La secuencia de nucleótidos de PM0445 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 19 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 20.

5 Mutante 3E1

[0188] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en SEC ID No: 21 (229 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

10 [0189] La localización del transposón en el mutante 3E1 corresponde entre las posiciones 9195-9196 de la secuencia del genoma de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006133. El transposón altera un homólogo del gen de PM70 PM0940. La secuencia de nucleótidos de PM0940 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 22 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 23.

15 [0190] Se identificaron otros genes y proteínas de bacterias gram negativas mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 17.

Cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	% 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 (CAA92683)	75% sobre 709 aminoácidos
<i>Vibrio cholerae</i>	VCA0511 (AE004381)	VCA0511 (AAF96414)	74% sobre 709 aminoácidos

20 Mutante 3H2

[0191] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en SEC ID No: 24 (58 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia. Esta secuencia tiene dos marcos de lectura abiertos (+1 y -3) que codifican potenciales proteínas más largas. El ORF según la descripción está en el marco +1.

25 [0192] Se identificó otro gen de *Pasteurellaceae* mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 24 y con su secuencia de aminoácidos codificada (19 aminoácidos). Se halló una identidad del 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 de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006231 (PM1951, uvrA). La secuencia de nucleótidos de PM1951 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 25 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 26.

30 [0193] Se identificaron otros genes y proteínas de bacterias gram negativas mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 26.

Cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	% de identidad
<i>Haemophilus influenzae</i>	UvrA (U32711)	UvrA (AAC21915)	89% sobre 943 aminoácidos
<i>Escherichia coli K12</i>	UvrA (AE000479)	UvrA (AAC77028)	80% sobre 940 aminoácidos
<i>Yersinia pestis</i>	UvrA (AJ414142)	UvrA (CAC89185)	80% sobre 943 aminoácidos
<i>Vibrio 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

[0194] UvrA es una nucleasa de escisión ABC de reparación de ADN.

Mutante 4D6

[0195] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 27 (54 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia. Esta secuencia tiene dos marcos de lectura abiertos (+1 y -2) que codifican potenciales proteínas más largas. El ORF según la descripción está en el marco +1.

[0196] La localización del transposón en el mutante 4D6 corresponde entre las posiciones 6492-6493 de la secuencia de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006036. El transposón altera un homólogo del gen de PM70 PM0032 o hktE. La secuencia de nucleótidos de PM0032 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 28 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 29.

[0197] Se identificó otro gen/proteína de *Pasteurellaceae* mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 29. Ésta es la catalasa de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Genbank número de accesos AF162654 y AAF17882). Se halló una identidad del 85% sobre 482 aminoácidos entre PM0032 y catalasa de *A. actinomycetemcomitans*.

[0198] hktE es una catalasa.

Mutantes 4F4 y 12A5

[0199] Para el mutante 4F4, la secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 30 (172 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia. Para el mutante 12A5, la secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 97 (546 unidades). El transposón está insertado inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

[0200] Se identificaron otros cuatro genes y proteínas de *Pasteurellaceae* mediante "blasts" realizados con la secuencia de 57 aminoácidos codificada por la SEC ID No: 30.

Cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	% de identidad
taxón 747 de <i>P. multocida</i>	HyaC (AF067175)	HyaC (AAC67251)	96% sobre 57 aminoácidos
PM70 de <i>P. multocida</i>	PM0776 (AE006116)	AAK02860	96% sobre 57 aminoácidos
P4218 de <i>P. multocida</i>	FcbC (AF302467)	FcbC (AAK17922)	91% sobre 57 aminoácidos
P934 de <i>P. multocida</i>	DcbC (AF302465)	DcbC (AAK17904)	88% sobre 57 aminoácidos

[0201] La localización del transposón en el mutante 4F4 corresponde entre las posiciones 5272-5273 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006116. La localización del transposón en el mutante 12A5 corresponde entre las posiciones 5275-5276 de la secuencia de AE006116. El transposón altera un homólogo del gen de PM70 PM0776. La secuencia de nucleótidos de PM0776 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 31 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 32. Estas proteínas son UDP glucosa deshidrogenasas.

Mutante 4F12

[0202] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 33 (226 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

[0203] La localización del transposón en el mutante 4F12 corresponde entre las posiciones 9263-9264 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006038. El transposón altera un homólogo del gen de PM70, PM0048 o fadr. La secuencia de nucleótidos de PM0048 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 34 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 35. Fadr es un homólogo



de una proteína de *E. coli* que es un regulador de la transcripción del metabolismo de ácidos grasos, que afecta a los genes de la biosíntesis de ácidos grasos (fab) y a los genes de degradación de ácidos grasos (fad).

Mutante 4G11

5 [0204] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 36 (214 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

10 [0205] Se identificó otro gen de *Pasteurellaceae* mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 36 y su secuencia de aminoácidos codificada (70 aminoácidos). Se halló una identidad del 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 de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006143. El transposón altera un homólogo del gen de PM70 PM1024 o htpG. La secuencia de nucleótidos de PM1024 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 37 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 38.

15 [0206] Se identificaron otros genes y proteínas de bacterias gram negativas mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 38.

Cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	% 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 K12</i>	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

20 [0207] HtpG es una proteína de choque térmico.

[0208] El mutante 4G11 se depositó bajo el Tratado de Budapest en la colección del Instituto Pasteur y está disponible bajo el número de acceso CNCM I-2999.

25 Mutante 5D5

[0209] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 39 (252 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

30 [0210] La localización del transposón en el mutante 5D5 corresponde entre las posiciones 5695-5696 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006188. El transposón altera un homólogo del gen de PM70, PM1517 o PlpE). La secuencia de nucleótidos de PM1517 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 40 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 41.

35 [0211] PlpE se prevé que es una lipoproteína de membrana.

[0212] El mutante 5D5 se depositó bajo el Tratado de Budapest en la colección del Instituto Pasteur y está disponible bajo el número de acceso CNCM I-3000.

40 Mutante 5F11

[0213] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 42 (546 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

45 [0214] Se localiza un codón de detención en las posiciones 148-150.

[0215] La localización del transposón en el mutante 5F11 corresponde entre las posiciones 572-573 de la secuencia

del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006150. El transposón altera un homólogo del gen de PM70, PM1087 o Nifr3. La secuencia de nucleótidos de PM1087 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 43 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 44.

5 [0216] Se identificó otro gen/proteína de *Pasteurellaceae* mediante “blasts” realizados con la SEC ID No: 44. Ésta es *Haemophilus influenzae* HI0979 (Genbank números de acceso U32778 y AAC22639). Se halló una identidad del 78% sobre 332 aminoácidos entre PM1087 y HI0979. Nifr3 es un gen regulador de la nitrogenasa.

10 Mutante 5G9

[0217] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 45 (43 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3’ de esta secuencia. Esta secuencia tiene tres marcos de lectura abiertos (+2, +3 y -1) que codifican potenciales proteínas más largas. El ORF según la descripción está en el marco +2.

15 [0218] Se identificaron otros cuatro genes y proteínas de *Pasteurellaceae* mediante “blasts” realizados con una secuencia de 14 aminoácidos codificada por la SEC ID No: 45.

20

Cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	% de identidad
P4218 de <i>P. multocida</i>	FcbE (AF302467)	FcbE (AAK17920)	100% sobre 14 aminoácidos
PM70 de <i>P. multocida</i>	PM0774 (AE006116)	HyaE (AAK02858)	100% sobre 14 aminoácidos
taxón 747 de <i>P. multocida</i>	HyaE (AF067175)	HyaE (AAC67249)	100% sobre 14 aminoácidos
P934 de <i>P. multocida</i>	DcbE (AF302465)	DcbE (AAK17906)	71% sobre 14 aminoácidos

[0219] La localización del transposón en el mutante 5G9 corresponde entre las posiciones 573-574 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006116. El transposón altera un homólogo del gen de PM70, PM0774 o hyaE. La secuencia de nucleótidos de PM0774 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 46 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 47. Estos genes están implicados en la síntesis de cápsulas.

30 Mutante 6E5

[0220] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 48 (279 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3’ de esta secuencia.

35 [0221] Se localiza un codón de partida en las posiciones 169-171.

[0222] La localización del transposón en el mutante 6E5 corresponde entre las posiciones 6673-6674 del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006182. El transposón altera un homólogo del gen de PM70, PM1459 o pgtB. La secuencia de nucleótidos de PM1459 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 49 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 50.

40 [0223] PgtB es una proteína reguladora del transporte de fosfoglicerato.

Mutante 6E6

45 [0224] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 51 (93 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3’ de esta secuencia.

[0225] Se localiza un codón de detención en las posiciones 12-14.

50 [0226] La localización del transposón en el mutante 6E6 corresponde entre las posiciones 9051-9052 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006096. El transposón altera un homólogo del gen de PM70 PM0605. La secuencia de nucleótidos de PM0605 se identifica en la presente

invención como SEC ID No: 52 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 53.

Mutante 6F12

5 [0227] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 54 (772 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

[0228] Se localiza un codón de partida en las posiciones 2-4.

10 [0229] La localización del transposón en el mutante 6F12 corresponde entre las posiciones 5362-5363 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006192. El transposón altera un homólogo del gen de PM70, PM1556 o el gen de comF. La secuencia de nucleótidos de PM1556 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 55 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 56.

15 [0230] ComF es la proteína f de competencia.

Mutante 6G4

20 [0231] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 57 (700 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

25 [0232] La localización del transposón en el mutante 6G4 corresponde entre las posiciones 3758-3759 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006206. La inserción se encuentra entre los genes PM1696 y PM1697. El transposón se inserta entre la región de promotor y el codón de partida de PM1696.

[0233] El codón de partida de PM1696 se localiza en las posiciones 26-28 en la secuencia SEC ID No: 57.

30 [0234] La secuencia de nucleótidos de PM1696 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 58 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 59.

[0235] Se identificaron otros genes y proteínas de bacterias gram negativas mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 59.

Cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	% 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

35

Mutante 6H1

40 [0236] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 60 (188 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

45 [0237] La localización del transposón en el mutante 6H1 corresponde entre las posiciones 4139-4140 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006119. El transposón altera un homólogo del gen de PM70, PM0806, o el gen de speF. La secuencia de nucleótidos de PM0806 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 61 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 62.

[0238] Se identificaron otros dos genes de *Pasteurellaceae* y *Vibrionaceae* mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 62. Estos genes son speF de *Haemophilus influenzae* (Genbank, número de accesos U32740 y AAC22248) y ornitín descarboxilasa de *Vibrio cholerae* (AE004431 y AAF96957). Se halló una identidad del 83% sobre 719 aminoácidos entre PM0806 y speF de *H. influenzae*.

50

[0239] SpeF es una ornitín descarboxilasa.

Mutante 6H6

5 [0240] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 63 (101 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia. Esta secuencia tiene dos marcos de lectura abiertos (+1 y -1) que codifican potenciales proteínas más largas. El ORF según la descripción está en el marco +1.

10 [0241] La localización del transposón en el mutante 6H6 corresponde entre las posiciones 983-984 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006155. El transposón altera un homólogo del gen de PM70 PM1138. La secuencia de nucleótidos de PM1138 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 64 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 65.

#### Mutante 7A7

15 [0242] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en SEC ID No: 66 (222 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

20 [0243] La localización del transposón en el mutante 7A7 corresponde entre las posiciones 7853-7854 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006170 (en la región intergénica entre PM1321 y PM1322). El transposón se inserta entre la región del terminador y el codón de detención de PM1322.

25 [0244] El codón de detención se localiza en las posiciones 25-27 en la secuencia SEC ID No: 66. La secuencia de nucleótidos de PM1322 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 67 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 68.

#### Mutante 7F8

30 [0245] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 69 (55 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia. Esta secuencia tiene tres marcos de lectura abiertos (+1, +3 y -3) que codifica potenciales proteínas más largas. El ORF según la descripción está en el marco +3.

35 [0246] La localización del transposón en el mutante 7F8 corresponde entre las posiciones 8292-8293 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006224. El transposón altera un homólogo del gen de PM70 PM1866. La secuencia de nucleótidos de PM1866 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 70 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 71.

#### Mutante 9C8

40 [0247] Las secuencias de ADN que flanquean ambas partes del sitio de inserción del transposón se proporcionan en las SEC ID No: 72 (598 unidades, transposón en el extremo 5') y SEC ID No: 73 (561 unidades, transposón en el extremo 5').

45 [0248] Se localiza un codón de detención en las posiciones 26-28 de la SEC ID No: 72. Las secuencias SEC ID No: 72 y 73 están combinadas y limitadas al ORF. La secuencia resultante se designa como SEC ID No: 74 (575 unidades).

50 [0249] La localización del transposón en el mutante 9C8 corresponde entre las posiciones 2224-2225 ó 2210-2211 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006132, posiciones deducidas a partir de las SEC ID No: 72 y 73, respectivamente. Ambas posiciones están en el interior del gen PM0926 (FimA). La secuencia de nucleótidos de PM0926 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 75 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 76.

55 [0250] Se identificó otro gen/proteína de *Pasteurellaceae* mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 76. Ésta es FimA de *Haemophilus influenzae* (Genbank números de acceso AF053125 y AAC08991). Se halló una identidad del 77% sobre 171 aminoácidos entre PM0926 y FimA de *H. influenzae*.

[0251] FimA es una adhesina, una proteína fimbrial.

60 [0252] El mutante 9C8 se depositó bajo el Tratado de Budapest en la colección del Instituto Pasteur y está disponible bajo el número de acceso CNCM I-3001.

Mutante 9H4

5 [0253] Las secuencias de ADN que flanquean ambas partes del sitio de inserción del transposón se proporcionan en la SEC ID No: 92 (1391 unidades). El transposón se insertó en la posición 850-851 de esta secuencia. Esta secuencia sólo tiene un marco de lectura. El ORF según la descripción está en el marco -2.

10 [0254] Se localiza un codón de partida en las posiciones 1318-1316 y se localiza un codón de detención en las posiciones 29-31 de la SEC ID No: 92. La secuencia resultante del ORF se designa como SEC ID No: 93 (1290 unidades) y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 94.

[0255] Los “blasts” realizados con las secuencias SEC ID No: 92 y SEC ID No: 94 no identificaron ningún gen o proteína homóloga.

15 [0256] El mutante 9H4 se depositó bajo el Tratado de Budapest en la colección del Instituto Pasteur y está disponible bajo el número de acceso CNCM I-3002.

Mutante 10G11

20 [0257] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 77 (70 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia. Se localiza un codón de partida en las posiciones 62-64.

25 [0258] La localización del transposón en el mutante 10G11 corresponde entre las posiciones 2938-2939 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006056. El transposón altera un homólogo del gen de PM70, PM0220 (rpL31\_1). La secuencia de nucleótidos de PM0220 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 78 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 79.

30 [0259] rpL31\_1 es una proteína ribosómica 50S.

Mutante 11E8

35 [0260] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 80 (506 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 5' de esta secuencia.

[0261] Se localiza un codón de partida en las posiciones 195-197 de la SEC ID No: 80.

40 [0262] La localización del transposón en el mutante 11E8 corresponde entre las posiciones 282-283 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006085. El transposón altera un homólogo del gen de PM70 PM0488. La secuencia de nucleótidos de PM0488 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 81 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 82.

Mutante 12A1

45 [0263] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 83 (243 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

50 [0264] Se identificó otro gen de *Pasteurellaceae* mediante “blasts” realizados con la SEC ID No: 83 y su secuencia de aminoácidos codificada (81 aminoácidos). Se halló una identidad del 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 de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006042. El transposón altera un homólogo del gen de PM70 PM0063 o gen de lepA. La secuencia de nucleótidos de PM0063 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 84 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 85.

55 [0265] Se identificaron otros genes y proteínas de bacterias gram negativas mediante “blasts” realizados con la SEC ID No: 85.

Cepa	Gen (referencia Genbank)	Proteína (referencia Genbank)	% de identidad
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI0016 (U32687)	LepA (AAA21694)	95% sobre 598 aminoácidos

<i>Yersinia pestis</i>	YP02716 (AJ414153)	LepA (AAC92955)	88% sobre aminoácidos	597
<i>Escherichia coli K12</i>	Lep A (AE000343)	LepA (AAC75622)	89% sobre aminoácidos	597
<i>Salmonella typhi</i>	STY2829 (AL627275)	LepA (AAD02785)	89% sobre aminoácidos	597
<i>Salmonella typhimurium</i>	LepA (AE008817)	LepA (AAL21477)	89% sobre aminoácidos	597
<i>Vibrio cholerae</i>	VC2463 (AE004316)	LepA (AAF95605)	84% sobre aminoácidos	597
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA0767 (AE004511)	LepA (AAG04156)	75% sobre aminoácidos	594

[0266] LepA es una proteína de membrana que se une a GTP.

#### 5 Mutante 12B3

[0267] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en SEC ID No: 86 (147 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia.

10 [0268] La localización del transposón en el mutante 12B3 corresponde entre las posiciones 4028-4029 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006152. El transposón altera un homólogo del gen de PM70 PM1112 o el gen de deaD. La secuencia de nucleótidos de PM1112 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 87 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 88.

15 [0269] Se identificó otro gen/proteína de *Pasteurellaceae* mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 88. Ésta es HI0231 de *Haemophilus influenzae* (Genbank números de acceso U32709 y AAC21900). Se halló una identidad del 80% sobre 605 aminoácidos entre PM1112 y HI0231.

[0270] DeaD es una ARN helicasa.

20

#### Mutante 13E1

25 [0271] La secuencia de ADN que flanquea el sitio de inserción del transposón se proporciona en la SEC ID No: 89 (187 unidades). El transposón está inmediatamente en el extremo 3' de esta secuencia. Esta secuencia tiene dos marcos de lectura abiertos (+1 y -3) que codifican potenciales proteínas más largas. El ORF según la descripción está en el marco -3.

30 [0272] La localización del transposón en el mutante 13E1 corresponde entre las posiciones 2173-2174 de la secuencia del genoma de PM70 de *Pasteurella multocida*, Genbank número de acceso AE006138 (PM0989). La secuencia de nucleótidos de PM0989 se identifica en la presente invención como SEC ID No: 90 y su secuencia de aminoácidos como SEC ID No: 91.

35 [0273] Se identificó otro gen/proteína de *Pasteurellaceae* mediante "blasts" realizados con la SEC ID No: 91. Ésta es HI0325 de *Haemophilus influenzae* (Genbank números de acceso U32717 y AAC21988). Se halló una identidad del 79% sobre 414 aminoácidos entre PM0989 y HI0325.

[0274] El mutante 13E1 se depositó bajo el Tratado de Budapest en la colección del Instituto Pasteur y está disponible bajo el número de acceso CNCM I-3003.

#### 40 **Ejemplo 5:** Selección por PCR de los mutantes de inserción de transposón

[0275] El transposón se puede insertar en cualquier lugar en el genoma de las bacterias, No obstante, se puede realizar utilizando PCR una selección de los mutantes correctos.

45 [0276] Se utiliza una pareja de cebadores, uno específico para el transposón, tal como Tn10IR1 (SEC ID No: 101), Tn10IR4 (SEC ID No: 102), KTGR1 (SEC ID No: 100), StipA (SEC ID No: 99) y StipJ (SEC ID No: 98), y uno específico para el gen o secuencia a mutar. La secuencia de nucleótidos de este gen o una parte del mismo (por ejemplo, secuencias de la región próxima al locus de inserción del transposón secuenciado anteriormente) resulta de ayuda para el diseño de dichos cebadores. Esto se puede adaptar a genes o secuencias de nucleótidos de otras

cepas de *Pasteurella multocida*, u otras bacterias gram negativas, tales como bacterias de la familia *Pasteurellaceae*, de forma destacada *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

- 5 [0277] El conocimiento del correspondiente gen u ORF y/o sus regiones reguladoras en la cepa PM70 o P-1059 de *Pasteurella multocida* (Ejemplo 4), tal como su tamaño, se utiliza para cribar los fragmentos de PCR amplificados y para detectar aquellos que tienen un tamaño correspondiente con un transposón insertado en el gen o secuencia a mutar. Si el transposón se insertó fuera del gen, puede no tener un fragmento amplificado por PCR o puede amplificar fragmentos con un tamaño demasiado grande. De este modo, la PCR permite la selección de los mutantes.

10 Para la cepa P-1059 de *Pasteurella multocida*, dichos cebadores específicos de gen pueden ser:

Mutante	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	SEC ID No:
13E1	13E1C	5' TACGTTAACGCCACCCGTTG	106 (20 unidades)
3A2	3°2C	5' GCTTCCATACCTTGTGAACC	107 (20 unidades)
2F2	2F2C	5' GGGTGTACGCCTTCTGCTG	108 (19 unidades)
9C8	9C8C	5' ATTGCAGTCATTGCCGATGC	109 (20 unidades)
12A1	12A1C	5' CGATATGGTACGTGTGCGAC	110 (19 unidades)
5F11	5F11C	5' AAAAGGCGGACCTAAGTCCG	111 (20 unidades)
5D5	5D5C	5' CCGACAACATGACAATGGAG	112 (20 unidades)
4G11	4G11C	5' TTTGCAGTGGCTTACCGTC	113 (19 unidades)
12B3	12B3C	5' CCTGACGACCAATACGGTG	114 (19 unidades)
5G9	5G9C	5' GGATGGTCTGATCCTAATGC	115 (20 unidades)
9H4	9H4C	5' CGTTCATCAGATGACACTGC	116 (20 unidades)
3H2	3H2C	5' GTGATTACGGGATTATCGGG	117 (20 unidades)
10G11	10G11C	5' TGAAGTGTAACGAGGCTTG	118 (20 unidades)

- 15 [0278] En el caso de los mutantes obtenidos previamente, la PCR se llevó a cabo con los siguientes pares de cebadores y los fragmentos de PCR amplificados tenían el siguiente tamaño:

Cebador específico de gen	Cebador específico de transposón	Tamaño PCR (pb)
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

- 20 **Ejemplo 6:** Eficacia y protección de los mutantes de inserción de transposón frente a estimulación homóloga

[0279] Los mutantes de inserción de transposón derivados de la cepa 16084 de *Pasteurella multocida* (Ejemplo 1) se administraron en gotas en los ojos a pavos convencionales de tres semanas de vida. Se estudió la eficacia frente a una estimulación homóloga ocular con la cepa 16084 de la *Pasteurella multocida*.

- 25 [0280] Se establecieron 24 grupos de pavos convencionales de 3 semanas de vida en el día 0, los grupos se inocularon mediante gotas en los ojos con aproximadamente  $10^8$  CFU de los mutantes tal como se indican en la siguiente tabla.

[0281] Un grupo de pavos convencionales de 3 semanas de vida permanecieron sin vacunar y sirvieron como controles (Grupo 25).

5 [0282] Todos los pavos se estimularon en el día 23 utilizando la cepa 16084 de *Pasteurella multocida* administrada mediante gotas en los ojos a  $10^8$  CFU por pájaro.

[0283] La mortalidad se registró diariamente durante 2 semanas después de la estimulación. Al final del estudio (D37), se llevó a cabo un examen clínico para determinar el estado de salud de los pájaros supervivientes.

10 [0284] La tasa de protección se calculó considerando el número de pájaros estimulados y el número de pájaros sanos el día 37.

Grupo	Mutante	Número de pájaros	Tasa de protección
Grupo 1	1G4	8	25%
Grupo 2	4F4	10	40%
Grupo 3	3A2	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	12A1	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%

15 [0285] Para algunos grupos, se han reproducido estos experimentos y la tasa de protección es un resultado acumulado. Algunos de los mutantes de la descripción no se analizaron en estos experimentos.

**Ejemplo 7:** Eficacia y protección de los mutantes de inserción de transposón frente a estimulación heteróloga

20 [0286] Los mutantes de inserción de transposón derivados de la cepa 16084 de *Pasteurella multocida* (Ejemplo 1) se administraron en gotas en los ojos a pavos convencionales de tres semanas de vida. Se estudió la eficacia frente a una estimulación homóloga ocular con la cepa X73 de la *Pasteurella multocida* (USDA).

25 [0287] Se establecieron cinco grupos de 10 pavos convencionales de 3 semanas de vida en el día 0, los grupos se inocularon mediante gotas en los ojos con aproximadamente  $10^8$  CFU de los mutantes tal como se indican en la siguiente tabla.

[0288] Un grupo de 10 pavos convencionales de 3 semanas de vida permanecieron sin vacunar y sirvieron como controles (Grupo 6).

30 [0289] Todos los pavos se estimularon en el día 21 utilizando la cepa X73 de *Pasteurella multocida* administrada mediante gotas en los ojos a  $10^6$  CFU por pájaro.

[0290] La mortalidad se registró diariamente durante 2 semanas después de la estimulación. Al final del estudio (D36), se llevó a cabo un examen clínico para determinar el estado de salud de los pájaros supervivientes.

35 [0291] La tasa de protección se calculó considerando el número de pájaros estimulados y el número de pájaros sanos el día 36.

Grupo	Mutante	Número de pájaros	Tasa 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 por delección definidos mediante conjugación

5 [0292] Inicialmente, el gen diana más las secuencias de ADN flanqueantes se amplifican mediante PCR utilizando una polimerasa de alta fidelidad y se clonan en un vector de clonación adecuado. Los cebadores de PCR se diseñan de manera que eliminan el gen cuando se utiliza en PCR inversa para generar una construcción inicial. Los cebadores de PCR contienen un sitio *Xba*I para introducir un nuevo sitio de restricción y de este modo proporcionan un marcador para la eliminación del gen. Las construcciones por delección se transfieren a continuación en un vector  
10 suicida pCVD442 (Donnenberg et. al., *Infection and Immunity*, 1991, 59: 4310-4317) para la transferencia al cromosoma de *Pasteurella*. Los plásmidos pCVD442 se transforman a continuación en la cepa de *E. Coli* SM10λpir. Esta construcción se introduce en la cepa 16084 (CDM) de *P. multocida* mediante la conjugación con SM10λpir/pCVD442 de *E. coli*. Se seleccionan los transformantes y recombinantes que contienen el plásmido integrado en el cromosoma en el sitio homólogo (merodiploides) utilizando el marcador de resistencia a antibiótico  
15 presente en el plásmido pCVD442 (gen de resistencia a ampicilina). Los mutantes de *Pasteurella* se seleccionan en placas agar con BHI suplementadas con 1 µg/ml de ampicilina.

[0293] El plásmido pCVD442 requiere la proteína Pir para la replicación. Esta proteína es codificada por el gen pir, que está presente como un lisógeno de fago lambda en la cepa donante SM10λpir, pero no en la *P. Multocida* receptora. Como el plásmido pCVD442 no se replica en la cepa de *P. Multocida* receptora; las colonias resistentes a antibiótico sólo se obtienen por tanto si el plásmido se integra en el cromosoma. Este vector suicida también contiene el gen *sacB* que codifica la enzima levan sacarasa, que es tóxica para la mayoría de bacterias gram negativas en presencia de sacarosa. La selección de sacarosa se puede utilizar por tanto como una contraselección para aislar colonias en las que haya tenido lugar una segunda recombinación, dando lugar a una pérdida del plásmido del cromosoma. Esta segunda recombinación puede dar lugar a dos resultados, la regeneración del alelo de tipo natural o la generación de un mutante por delección. Las colonias que contienen la mutación por delección se identifican mediante PCR de las colonias.  
20  
25

#### Ejemplo 9: Construcción de mutantes por delección definidos mediante electroporación

30 [0294] Inicialmente, el gen diana más las secuencias de ADN flanqueantes se amplifican mediante PCR utilizando una polimerasa de alta fidelidad y se clonan en un vector de clonación adecuado. Los cebadores de PCR se diseñan de manera que eliminan el gen cuando se utiliza en PCR inversa para generar una construcción inicial. Los cebadores de PCR contienen un sitio *Xba*I para introducir un nuevo sitio de restricción y de este modo proporcionan un marcador para la eliminación del gen. Las construcciones por delección se transfieren a continuación en un vector  
35 suicida pCVD442 para la transferencia al cromosoma de *Pasteurella*. Esta construcción se introduce en la cepa 16084 (CDM) de *P. multocida* mediante electroporación. Para extraer la cápsula extracelular sustancial de 16084, las células de la fase estacionaria se tratan con hialuronidasa testicular ovina (tipo V, esterilizada por filtración antes de su uso, concentración final de 25 µg/ml) durante 1 hora antes de recoger y lavar las células. El pCVD442 (1,5 µg) se mezcla con una suspensión celular en glicerol al 10% (0,05 ml, 10<sup>10</sup> células/ml) justo antes de pipetear la mezcla en las cubetas de electroporación de 1 mm enfriadas en hielo (Biorad, Hercules, CA, USA). Se utiliza el GenePulser (Biorad) para pulsar las células (12,5 kV/cm, 250 ohms, 40 µF). Inmediatamente después del pulso, las células se diluyen con 1 ml de BHI y partes del cultivo (5-50 µl) se extienden rápidamente (en 1-5 min) en placas agar con BHI que contiene ampicilina 1 µg/ml. Se seleccionan los recombinantes que contienen el plásmido integrado en el  
40 cromosoma en el sitio homólogo (merodiploides) utilizando el marcador de resistencia a antibiótico presente en el plásmido (gen de resistencia a ampicilina)  
45

[0295] El plásmido pCVD442 no se replica en la cepa de *P. Multocida* receptora; las colonias resistentes a antibiótico sólo se obtienen por tanto si el plásmido se integra en el cromosoma. Este vector suicida también contiene el gen *sacB* que codifica la enzima levan sacarasa, que es tóxica para la mayoría de bacterias gram negativas en presencia de sacarosa. La selección de sacarosa se puede utilizar por tanto como una contraselección para aislar colonias en las que haya tenido lugar una segunda recombinación, dando lugar a una pérdida del plásmido del cromosoma. Esta segunda recombinación puede dar lugar a dos resultados, la regeneración del alelo de tipo natural o la generación de un mutante por delección.  
50

[0296] Las colonias aparecen después de una incubación a 37°C durante 2-4 días. El rayado de las colonias sobre placas similares aísla transformantes individuales. Las colonias que contienen la mutación por delección se identifican mediante PCR de las colonias.

5

**Ejemplo 10:** Vacuna y test de eficacia

[0297] Los mutantes por delección atenuados obtenidos del ejemplo 8 ó 9 se cultivan en medio de cultivo CDM (Hu et. al., Infection and Immunity 1986, 804-810) bajo condiciones de agitación durante 24 a 48 horas.

10

[0298] El cultivo se recoge cuando se detiene el crecimiento, que es seguido mediante la medición de la densidad óptica (DO) o el pH.

15

[0299] La concentración bacteriana se determina mediante la densidad óptica y, cuando es necesario, se ajusta la concentración hasta una concentración final de  $10^9$  CFU por ml de medio de cultivo nuevo.

[0300] La eficacia de la vacuna se prueba en pavos de 3 semanas de vida mediante vacunación y estimulación.

20

[0301] Los pavos se comprueban antes de la vacunación para observar la ausencia de anticuerpos de *Pasteurella* mediante ELISA de las muestras de sangre.

[0302] Un primer grupo de pavos se vacuna mediante inyección de  $10^8$  CFU en 0,1 ml por vía ocular.

25

[0303] Un segundo grupo permaneció sin vacunar (grupo de control).

[0304] Todos los animales se estimularon en D21 o D23 con la cepa P-1059 de *P. multocida* por vía ocular ( $10^8$  CFU en 0,1 ml por animal).

30

[0305] La mortalidad se observa cada día hasta D35.

[0306] Se observa una mortalidad inferior en los animales vacunados en comparación con los controles.

[0307] La descripción se describe adicionalmente mediante los siguientes párrafos:

35

1- Un mutante de una bacteria gram negativa, en el que dicha bacteria presenta una mutación en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad que es igual o superior al 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de nucleótidos identificadas como SEC 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, dando lugar dicha mutación a una virulencia atenuada de la bacteria.

40

2- El mutante del párrafo 1, en el que la bacteria es una *Pasteurellaceae*.

45

3- El mutante del párrafo 2, en el que la bacteria se selecciona del grupo de: *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

4- El mutante del párrafo 3, en el que la bacteria es *Pasteurella multocida*.

50

5- El mutante de cualquiera de los párrafos 1 a 4, en el que la mutación es una delección en la secuencia de nucleótidos, o una inserción en la misma o una sustitución de ácidos nucleicos.

6- El mutante del párrafo 5, en el que la mutación es la delección de toda la secuencia de nucleótidos.

55

7- El mutante del párrafo 5, en el que la inserción se realiza entre: los nucleótidos 180-181 ó 182-183 ó 190-191 en la SEC ID No: 2, 77-78 ó 1026-1027 ó 1027-1028 en la SEC ID No: 6, 416-417 en la SEC ID No: 9, 389-390 en la SEC ID No: 12, 381-382 en la SEC ID No: 16, 219-220 en la SEC ID No: 19, 1353-1354 en la SEC ID No: 22, 136-137 en la SEC ID No: 25, 384-385 en la SEC ID No: 28, 222-223 ó 225-226 en la SEC ID No: 31, 217-218 en la SEC ID No: 34, 1411-1412 en la SEC ID No: 37, 943-944 en la SEC ID No: 40, 855-856 en la SEC ID No: 43, 369-370 en la SEC ID No: 46, 111-112 en la SEC ID No: 49, 443-444 en la SEC ID No: 52, 4-5 en la SEC ID No: 55, inmediatamente en dirección 5' con respecto al nucleótido 1 en la SEC ID No: 58, 573-574 en la SEC ID No: 61, 875-876 en la SEC ID No: 64, inmediatamente en dirección 5' con respecto al nucleótido 1 en la SEC ID No: 67, 218-219

60

en la SEC ID No: 70, 1072-1087 en la SEC ID No: 75, 64-65 en la SEC ID No: 78, 282-283 en la SEC ID No: 81, 1431-1432 en la SEC ID No: 84, 974-975 en la SEC ID No: 87, 802-803 en la SEC ID No: 90, 850-851 en la SEC ID No: 92.

5 8- El mutante según cualquiera de los párrafos 1 a 7, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un inmunógeno de un agente patológico viral, parasítico o bacteriano, para una proteína terapéutica, para un alérgeno, para un factor de crecimiento o para una citoquina.

10 9- Una composición inmunogénica que comprende un mutante atenuado según 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 además un adyuvante.

15 11- Una vacuna que comprende un mutante atenuado según cualquiera de los párrafos 1 a 8, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

12- La vacuna del párrafo 11 que comprende además un adyuvante.

20 13- Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido que tiene una identidad que es igual o superior al 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos identificadas como SEC 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 y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante.

25 14- Una preparación de anticuerpos que comprende un anticuerpo específico para un polipéptido que tiene una identidad que es igual o superior al 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos identificadas como SEC 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.

30 15- Método de diagnóstico para detectar una infección por una bacteria gram negativa, que utiliza un polipéptido que tiene una identidad que es igual o superior al 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos identificada como SEC 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, o un anticuerpo específico para dicho polipéptido.

35 16- Utilización de una preparación de anticuerpos según el párrafo 14 para la producción de una composición de inmunización pasiva o una composición terapéutica contra bacterias gram negativas.

40 17- Utilización de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos identificadas como SEC 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, o un fragmento de por lo menos 20 nucleótidos, como cebadores para la PCR para la detección de bacterias gram negativas en un medio.

45 LISTADO DE SECUENCIAS

**[0308]**

<110> Merial Limited  
 <120> Bacterias gram negativas atenuadas  
 50 <130> 454313-3171.1Wo  
 <150> 60/370,282  
 <151> 2002-04-05  
 <160> 118  
 <170> PatentIn version 3.1  
 55 <210> 1  
 <211> 775  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <220>  
 60 <221> misc\_feature  
 <222> (579)..(579)

<223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (580)..(580)  
 5 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (598)..(598)  
 <223> A o C o G o T  
 10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (599)..(599)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (616)..(616)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (617)..(617)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (636)..(636)  
 25 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (637)..(637)  
 <223> A o C o G o T  
 30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (667)..(667)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> (668)..(668)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> (697)..(697)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>,  
 <221> misc\_feature  
 <222> (698)..(698)  
 45 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (702)..(702)  
 <223> A o C o G o T  
 50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (703)..(703)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 55 <221> misc\_feature  
 <222> (707)..(707)  
 <223> A o C ar G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (706)..(706)  
 <223> A o C o G o T

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (714)..(715)  
 <223> A o C o G o T  
 5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (715)..(716)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (717)..(718)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (718)..(719)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (721)..(721)  
 20 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (722)..(722)  
 <223> A o C o G o T  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (742)..(744)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (743)..(745)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (746)..(749)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (747)..(750)  
 40 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (755)..(756)  
 <223> A o C o G o T  
 45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (756)..(757)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 50 <221> misc\_feature  
 <222> (767)..(768)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (766)..(767)  
 <223> A o C o G o T  
 <400> 1  
 60

ES 2 371 498 T3

gtgctttata tccccattct aaaatacatg ttctctcctt tttccatgtg acaaatggag 60  
 5 agaacatttt caagcgttgg gtaaaaaagc cgcttaaata aggaattttt aacatccctt 120  
 tagaaaaaat aagaaactct tgatacatat ttaatctaata atagtcatat aaagttgaca 180  
 10 tatcatatat taaacatgac tagttaatca ttaaataatta aacaacctca acttaataaaa 240  
 acaataataa aacaaacaag gtaaaaaaca aactaatact gagcaataaa aaaacggatt 300  
 15 aatataataa cgatatatca acctctaaaa cagaccaaaa ataaatcaca cgagacaaaa 360  
 gaacaattat aatccaaata ttaattaata aataaacacc tagcgcaacg aataatcaaa 420  
 caaatcaca tttagattta tttaaattaa aaatatagat tatattttta atataatgct 480  
 20 agaattcggc accaaaattt ttctccagct gtaaattaga gataaagata tgaaaaaggt 540  
 tattatcatg ggacataaac agtctaacta tcaagatgtn gaaaaggttt ttcaatgtna 600  
 25 tgggatgaat ccccgntcc atcaaaacgt gaaaaangtc cccatcgaac ttttgetgag 660  
 tgaggatnag atagggcaaa tctgcaaatt catccacngc cgncgngac tcatnnanng 720  
 30 cnaatcgcca tagtagttat acnnncnnnn gtttanngtt gaccgcnnag gcgag 775

35 <210> 2  
 <211> 2091  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 2

40 atgtcaattt tatatgacta tattagatta aatatgtatc aagagtttct tattttttct 60  
 aaagggatgt taaaaattcc ttatttaagc ggttttttta cccaacgctt gaaaatgttc 120  
 45 tctccatttg tcacatggaa aaaggagaga acatgtattt tagaatgggg atataaagca 180  
 tcatcaaaga aagcgaggca ttttgcaaa caacatgatt taccttatgc gacgatagaa 240  
 gatggttttt tacgttctat tggactgggt gtggatgggt atccaccttt ctcattagtg 300  
 50

ES 2 371 498 T3

tacgatgata ttggtattta ttatgatatc aatcagcctt ctcgtttaga aaacttaatt 360  
 5 ctttctcaag atgtattact tcaggaaaaa gtcgatcaag ttgaatatgc aattgaatta 420  
 atttgtacac ataacctttc caaatataac cacgctattg atacaccttt acagaatacg 480  
 aagaggccga ttgtcttagt cgttgatcaa acatatggcg atatggcagt tactttcggg 540  
 10 aatgccgagc agagtgattt tctacatatg ttagaacgtg cgattattga aaatccaaca 600  
 gcagaaatct ggttaaaaac ccatcctgat gtaatgtgtg gtaaaaaaca aggctattta 660  
 15 acggaatatac agcaatttcc aagagtaaaa gtattatcag aagattttta ttctatctca 720  
 ctactaaagc atgttgataa agtttattgc gtgacatctc aactggggtt tgaggccctt 780  
 ttgttaggaa aaactgtcgt gacttttggg gctgcctggg tttctggttg gggattgacg 840  
 20 gatgatcggc atgcgtatat tcgtcagcta aaacagagta agagaagagc gaagcgttca 900  
 ttgttcagc tattctatgc tgcttatttc caatattgtc gttatattaa tcctaatacg 960  
 25 ggtaaatcag gcacattggt tgatgtcatt gattatctga ttcaagcaa aaaagtaacc 1020  
 aatcagttag ctggtgatat ttattgtgtg ggtatgcgt tttggaaaacg taaagtgggt 1080  
 caaccctttt ttcaatttcc acgctgtcgt ttacattttg tgctgaatgt gcatgagcta 1140  
 30 aagcgatgta ttcacgagaa atctcaggct aaaatagtgg tgtggggaca ttcacacatt 1200  
 gaagtgggtg aatatgcca gcaacagcaa cttctcttt tgagaatgga agatggtttt 1260  
 ttacgttcag ttgggttagg gtctaattta acgccaccga tatcattagt tttagatgac 1320  
 gttggcattt attttgacgc ccaatctcgt tcccgattag aggatattct acagcatcaa 1380  
 tcctttactc taaaggattt acagcgcgca gaaacgttaa agaaaacact gattgagcaa 1440  
 catattggta agtataatgt gggacataca cacttatgcc taacacacat cagacaaaat 1500  
 aaacttttag ttgtgggaca agtggaaaat gatgcttcaa ttcaatatgg ttcaccgcat 1560  
 attcgtacga atgcagagtt attatgtacg gtcagaaaaa ataatcccca agcctatatt 1620  
 atttataaac ctcatcctga tgtggttgca ggcaatcgta aaaacacaga tcgtctagat 1680  
 gattatcgac agtatgctga tttcgtgggt gagaaagcca atatattgga ttgcattaac 1740  
 caagtggatg aagtgcatac gatgacctct ttagcggggg ttgaagcgtt actgcgcgag 1800  
 aaaaaagtac attgttatgg cttgcctttt tattctaact gggggctaac agtggatcat 1860  
 ctttctctaa accgaagaag tcggaagtta agtcttttag aattaattgc tggcgtgctg 1920  
 atttattacc cacaatatac tgacccaaaa acaaaaacaa tgatcgatgt gcagcgagcg 1980  
 gttgatattc tgatcgagca acgtcgaaaa ataaaaata ataaattaca tacaattat 2040  
 tttatgaaca tttttatgaa attaaaaaat gtttattctg ttttgaggta g 2091

<210> 3  
<211> 696  
<212> PRT  
<213> Pasteurella multocida  
5 <400> 3



ES 2 371 498 T3

Met Ser Ile Leu Tyr Asp Tyr Ile Arg Leu Asn Met Tyr Gln Glu Phe  
1 5 10 15

Leu Ile Phe Ser Lys Gly Met Leu Lys Ile Pro Tyr Leu Ser Gly Phe  
20 25 30

Phe Thr Gln Arg Leu Lys Met Phe Ser Pro Phe Val Thr Trp Lys Lys  
35 40 45

Glu Arg Thr Cys Ile Leu Glu Trp Gly Tyr Lys Ala Ser Ser Lys Lys  
50 55 60

Ala Arg His Phe Ala Gln Gln His Asp Leu Pro Tyr Ala Thr Ile Glu  
65 70 75 80

Asp Gly Phe Leu Arg Ser Ile Gly Leu Gly Val Asp Gly Tyr Pro Pro  
85 90 95

Phe Ser Leu Val Tyr Asp Asp Ile Gly Ile Tyr Tyr Asp Ile Asn Gln  
100 105 110

Pro Ser Arg Leu Glu Asn Leu Ile Leu Ser Gln Asp Val Leu Leu Gln  
115 120 125

Glu Lys Val Asp Gln Val Glu Tyr Ala Ile Glu Leu Ile Cys Thr His  
130 135 140

Asn Leu Ser Lys Tyr Asn His Ala Ile Asp Thr Pro Leu Gln Asn Thr  
145 150 155 160

Lys Arg Pro Ile Val Leu Val Val Asp Gln Thr Tyr Gly Asp Met Ala  
165 170 175

Val Thr Phe Gly Asn Ala Glu Gln Ser Asp Phe Leu His Met Leu Glu  
180 185 190

Arg Ala Ile Ile Glu Asn Pro Thr Ala Glu Ile Trp Leu Lys Thr His  
195 200 205

Pro Asp Val Met Cys Gly Lys Lys Gln Gly Tyr Leu Thr Glu Tyr Gln  
210 215 220

ES 2 371 498 T3

Gln Phe Pro Arg Val Lys Val Leu Ser Glu Asp Phe Asn Ser Ile Ser  
 225 230 235 240

Leu Leu Lys His Val Asp Lys Val Tyr Cys Val Thr Ser His Thr Gly  
 245 250 255

Phe Glu Ala Leu Leu Leu Gly Lys Thr Val Val Thr Phe Gly Ala Ala  
 260 265 270

Trp Phe Ser Gly Trp Gly Leu Thr Asp Asp Arg His Ala Tyr Ile Arg  
 275 280 285

Gln Leu Lys Gln Ser Lys Arg Arg Ala Lys Arg Ser Leu Leu Gln Leu  
 290 295 300

Phe Tyr Ala Ala Tyr Phe Gln Tyr Cys Arg Tyr Ile Asn Pro Asn Thr  
 305 310 315 320

Gly Lys Ser Gly Thr Leu Phe Asp Val Ile Asp Tyr Leu Ile Gln Ala  
 325 330 335

Lys Lys Val Thr Asn Gln Leu Ala Gly Asp Ile Tyr Cys Val Gly Met  
 340 345 350

Arg Phe Trp Lys Arg Lys Val Val Gln Pro Phe Phe Gln Phe Pro Arg  
 355 360 365

Cys Arg Leu His Phe Val Leu Asn Val His Glu Leu Lys Arg Cys Ile  
 370 375 380

His Glu Lys Ser Gln Ala Lys Ile Val Val Trp Gly His Ser His Ile  
 385 390 395 400

Glu Val Val Glu Tyr Ala Lys Gln Gln Gln Leu Pro Leu Leu Arg Met  
 405 410 415

Glu Asp Gly Phe Leu Arg Ser Val Gly Leu Gly Ser Asn Leu Thr Pro  
 420 425 430

Pro Ile Ser Leu Val Leu Asp Asp Val Gly Ile Tyr Phe Asp Ala Gln  
 435 440 445

Ser Arg Ser Arg Leu Glu Asp Ile Leu Gln His Gln Ser Phe Thr Leu  
 450 455 460

ES 2 371 498 T3

Lys Asp Leu Gln Arg Ala Glu Thr Leu Lys Lys Thr Leu Ile Glu Gln  
 465 470 475 480  
 His Ile Gly Lys Tyr Asn Val Gly His Thr His Leu Cys Leu Thr His  
 485 490 495  
 Ile Arg Gln Asn Lys Leu Leu Val Val Gly Gln Val Glu Asn Asp Ala  
 500 505 510  
 Ser Ile Gln Tyr Gly Ser Pro His Ile Arg Thr Asn Ala Glu Leu Leu  
 515 520 525  
 Cys Thr Val Arg Lys Asn Asn Pro Gln Ala Tyr Ile Ile Tyr Lys Pro  
 530 535 540  
 His Pro Asp Val Val Ala Gly Asn Arg Lys Asn Thr Asp Arg Leu Asp  
 545 550 555 560  
 Asp Tyr Arg Gln Tyr Ala Asp Phe Val Val Glu Lys Ala Asn Ile Leu  
 565 570 575  
 Asp Cys Ile Asn Gln Val Asp Glu Val His Thr Met Thr Ser Leu Ala  
 580 585 590  
 Gly Phe Glu Ala Leu Leu Arg Glu Lys Lys Val His Cys Tyr Gly Leu  
 595 600 605  
 Pro Phe Tyr Ser Asn Trp Gly Leu Thr Val Asp His Leu Ser Leu Asn  
 610 615 620  
 Arg Arg Ser Arg Lys Leu Ser Leu Leu Glu Leu Ile Ala Gly Val Leu  
 625 630 635 640  
 Ile Tyr Tyr Pro Gln Tyr Ile Asp Pro Lys Thr Lys Thr Met Ile Asp  
 645 650 655  
 Val Gln Arg Ala Val Asp Ile Leu Ile Glu Gln Arg Arg Lys Ile Lys  
 660 665 670  
 Asn Asn Lys Leu His Thr Asn Tyr Phe Met Asn Ile Phe Met Lys Leu  
 675 680 685  
 Lys Asn Val Tyr Ser Val Leu Arg  
 690 695

ES 2 371 498 T3

<210> 4  
 <211> 226  
 <212> ADN  
 5 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 4

10 agcaaaagtt cgattactac cagagacagt aagaagtgcg gttaaatac ctaacaagaa 60  
 gagaaataac acaatattaa tgttatttga attaagtgcg ttatcactgt atgccaatga 120  
 15 aataatatta tttttgagat acattagcgt atgcgaaata ttaaactctg caagcattaa 180  
 agcacctaca ataataccea cactcaatga taaaataaca cggcgc 226

20

25

<210> 5  
 <211> 87  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 30 <400> 5

35 cgacactatg cattottatt gatcgtcaag tgagtttggc ggaatacggg aaatcctgga 60  
 ttttaggcgt gaagtcaatg ctcggtg 87

40 <210> 6  
 <211> 1524  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 45 <400> 6

ES 2 371 498 T3

atggaactta ttgattattc gaegtctatt tggctctgctg tacccectat tttagcatta	60
ttattagcca ttgggacacg ccgtgttatt ttatcattga gtgttggtat tattgtaggc	120
gctttaatgc ttgcagattt taatatttcg catacgetaa tgtatctcaa aaataatatt	180
atltcattgg catacagtga taacacactt aattcaaata acattaatat tgtgttattt	240
ctcttcttgt taggtatttt aacegcactt cttactgtct caggcagtaa tcgagccttt	300
gcagaatggg cacaaaaacg aattaaagat agaaaagggg ctaaattatt agccgcatcg	360
ctcgtgtttg tgactttcat tgaecgattat tttcatagct tagcgggtggg agcgattgcc	420
agcccagtta cagataaatt taaagtttca cgcctaaac ttgcctatat tcttgattca	480
accgctgcgc caatgtgtgt gttgatgcct gtatcaagtt ggggcgccta tattattaca	540
cttattgcag gacttcttgc gacttattcg atcaccgagt attcccctat cgggtgcattt	600
atgacaatga gtgcaatgaa cttttatgct attttttcta ttttaatggg gttctttgta	660
tcttattatt cgtttgatat tggttcaatg gcgcgtcacg aaagaatggc cctagcgcgt	720
gtaacagaag aagaaaaact ggaaagtagt aataaagggc atgttctcta ttttaattta	780
ccgattactg tcctgatatt agcaaccggt ggtatgatga tgtacacggg ctatgaagca	840
ttagcggcgg atggaaaacc ttttgatgtg ttaggcgcgt ttgagaatac tacagtaggg	900
atltcattgg ttgtggggggg attaagtgcg gtcttgattt cgacactatg cattcttatt	960
gatcgtcaag tgagtttggc tgaatacggg aaatcctgga ttttaggcgt gaagtcaatg	1020
ctcgggtcgg tattgatttt attgtttgct tggactatta ataccatcgt tggagatgtc	1080
aaaacagggg tttattttatc ttcattagta tcggatagtt taccgattgc tttgttgcct	1140
gcgttattat ttattttaac tggaatcatg gcattctcga caggaacaag ctggggaact	1200
tttgggatta tgttaccgat cgcggcagcg attgcagcga atactgcacc agaattgatg	1260
ttaccttggt tatccgcagt catggctggt gcagtttgtg gtgatcattg ctccaccgatt	1320
tcggatacca cgattttatc ttctaccggg gcaaaatgta atcatatcga ccatgtaaca	1380
acacagttac cttatgcgat gtttaattgcg acagcgtcta ttgctggcta tttagtacta	1440
gggttcagcc agtcaggcat actgggtttt gtgacaacgg gtgtggtttt atcagtactt	1500
gtttttatat ttagaataaa ataa	1524

ES 2 371 498 T3

<210> 7  
 <211> 507  
 <212> PRT  
 5 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 7

10

Met Glu Leu Ile Asp Tyr Ser Thr Ser Ile Trp Ser Val Val Pro Pro  
 1 5 10 15

15

Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ile Gly Thr Arg Arg Val Ile Leu Ser  
 20 25 30

20

Leu Ser Val Gly Ile Ile Val Gly Ala Leu Met Leu Ala Asp Phe Asn  
 35 40 45

25

Ile Ser His Thr Leu Met Tyr Leu Lys Asn Asn Ile Ile Ser Leu Ala  
 50 55 60

30

Tyr Ser Asp Asn Thr Leu Asn Ser Asn Asn Ile Asn Ile Val Leu Phe  
 65 70 75 80

35

Leu Phe Leu Leu Gly Ile Leu Thr Ala Leu Leu Thr Val Ser Gly Ser  
 85 90 95

40

Asn Arg Ala Phe Ala Glu Trp Ala Gln Lys Arg Ile Lys Asp Arg Lys  
 100 105 110

45

Gly Ala Lys Leu Leu Ala Ala Ser Leu Val Phe Val Thr Phe Ile Asp  
 115 120 125

50

55

60

ES 2 371 498 T3

5 Asp Tyr Phe His Ser Leu Ala Val Gly Ala Ile Ala Ser Pro Val Thr  
130 135 140

10 Asp Lys Phe Lys Val Ser Arg Pro Lys Leu Ala Tyr Ile Leu Asp Ser  
145 150 155 160

15 Thr Ala Ala Pro Met Cys Val Leu Met Pro Val Ser Ser Trp Gly Ala  
165 170 175

20 Tyr Ile Ile Thr Leu Ile Ala Gly Leu Leu Ala Thr Tyr Ser Ile Thr  
180 185 190

25 Glu Tyr Ser Pro Ile Gly Ala Phe Met Thr Met Ser Ala Met Asn Phe  
195 200 205

30 Tyr Ala Ile Phe Ser Ile Leu Met Val Phe Phe Val Ser Tyr Tyr Ser  
210 215 220

35 Phe Asp Ile Gly Ser Met Ala Arg His Glu Arg Met Ala Leu Ala Arg  
225 230 235 240

40 Val Thr Glu Glu Glu Lys Leu Glu Ser Ser Asn Lys Gly His Val Leu  
245 250 255

45 Tyr Leu Ile Leu Pro Ile Thr Val Leu Ile Leu Ala Thr Val Gly Met  
260 265 270

50 Met Met Tyr Thr Gly Tyr Glu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Lys Pro Phe  
275 280 285

55 Asp Val Leu Gly Ala Phe Glu Asn Thr Thr Val Gly Ile Ser Leu Val  
290 295 300

60 Val Gly Gly Leu Ser Ala Val Leu Ile Ser Thr Leu Cys Ile Leu Ile  
305 310 315 320

65 Asp Arg Gln Val Ser Leu Ala Glu Tyr Gly Lys Ser Trp Ile Leu Gly  
325 330 335

70 Val Lys Ser Met Leu Gly Ala Val Leu Ile Leu Leu Phe Ala Trp Thr  
340 345 350

75 Ile Asn Thr Ile Val Gly Asp Val Lys Thr Gly Ile Tyr Leu Ser Ser  
355 360 365

ES 2 371 498 T3

5 Leu Val Ser Asp Ser Leu Pro Ile Ala Leu Leu Pro Ala Leu Leu Phe  
 370 375 380  
 10 Ile Leu Thr Gly Ile Met Ala Phe Ser Thr Gly Thr Ser Trp Gly Thr  
 385 390 395 400  
 15 Phe Gly Ile Met Leu Pro Ile Ala Ala Ala Ile Ala Ala Asn Thr Ala  
 405 410 415  
 20 Pro Glu Leu Met Leu Pro Cys Leu Ser Ala Val Met Ala Gly Ala Val  
 420 425 430  
 25 Cys Gly Asp His Cys Ser Pro Ile Ser Asp Thr Thr Ile Leu Ser Ser  
 435 440 445  
 30 Thr Gly Ala Lys Cys Asn His Ile Asp His Val Thr Thr Gln Leu Pro  
 450 455 460  
 35 Tyr Ala Met Leu Ile Ala Thr Ala Ser Ile Ala Gly Tyr Leu Val Leu  
 465 470 475 480  
 40 Gly Phe Ser Gln Ser Gly Ile Leu Gly Phe Val Thr Thr Gly Val Val  
 485 490 495  
 45 Leu Ser Val Leu Val Phe Ile Phe Arg Lys Lys  
 500 505

45 <210> 8  
 <211> 78  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 8

50 gggaaaagca gcaaataatca aaaataactgt tttagtgaaa acaggaaaac cgattacagc 60  
 agaaggcgta caccacc 78

55 <210> 9  
 <211> 555  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 9

60



ES 2 371 498 T3

atgaaaaaag caatTTTTTT agatcgagat ggcacattaa atattgatca tggctatgtt 60  
 catgaaattg atcagtttca atttattgac ggtagcattg aagcgttaca acaactgaaa 120  
 5 gcgatgggct atttattggt acttgtaaca aatcagtcag gtattgcgcg tggatatttt 180  
 agcgaagatc aatTTTTTaca gctgacagaa tggatggatt ggtctcttgc agatcgtgga 240  
 10  
 gtggatttag atggcatcta ttattgceca caccacacag aaggaaaagg tgagtattgc 300  
 15 caagactgcg attgccgtaa gccaaaacct ggtatgttac tgcaggcaat taaggaactt 360  
 aatatagatc ccaatacctc ttttatgggtg ggtgataaag tggaagatat gttagcaggt 420  
 20 aaaggtgccca aaattaaaaa tactgtttta gtgaaaacag gcaagcctat tacggaggat 480  
 ggcaaaaaac aggcaaaacta tgtattagag tccattgcgg atctaccaa actgataaaa 540  
 25 ggattaaaaa gttaa 555

30 <210> 10  
 <211> 184  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 10

35

ES 2 371 498 T3

Met Lys Lys Ala Ile Phe Leu Asp Arg Asp Gly Thr Leu Asn Ile Asp  
 1 5 10 15

His Gly Tyr Val His Glu Ile Asp Gln Phe Gln Phe Ile Asp Gly Ser  
 20 25 30

Ile Glu Ala Leu Gln Gln Leu Lys Ala Met Gly Tyr Leu Leu Val Leu  
 35 40 45

Val Thr Asn Gln Ser Gly Ile Ala Arg Gly Tyr Phe Ser Glu Asp Gln  
 50 55 60

Phe Leu Gln Leu Thr Glu Trp Met Asp Trp Ser Leu Ala Asp Arg Gly  
 65 70 75 80

Val Asp Leu Asp Gly Ile Tyr Tyr Cys Pro His His Thr Glu Gly Lys  
 85 90 95

Gly Glu Tyr Cys Gln Asp Cys Asp Cys Arg Lys Pro Lys Pro Gly Met  
 100 105 110

Leu Leu Gln Ala Ile Lys Glu Leu Asn Ile Asp Pro Asn Thr Ser Phe  
 115 120 125

Met Val Gly Asp Lys Val Glu Asp Met Leu Ala Gly Lys Gly Ala Lys  
 130 135 140

Ile Lys Asn Thr Val Leu Val Lys Thr Gly Lys Pro Ile Thr Glu Asp  
 145 150 155 160

Gly Lys Lys Gln Ala Asn Tyr Val Leu Glu Ser Ile Ala Asp Leu Pro  
 165 170 175

Lys Leu Ile Lys Gly Leu Lys Ser  
 180

ES 2 371 498 T3

<210> 11  
 <211> 467  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 11

5

gagctctgca ttagttaa gtggtgattt cttatttgac ttcaataaag attcattaac 60  
 agcaaaagggt aaagaagttg ttgacagcgt tgcaacacaa taaaagcct ctgatgcaaa 120  
 agaagtgaaa gtcgcaggct ttactgaccg ttaggttca gaagcgtata acttaaaact 180  
 ttctcaacgt cgtgcagatc gtgttaaagc gcgtttaatt gagcaagggtg ttgccgcaaa 240  
 tattcatgct gtaggctatg gtaaagcaca acaagtgaaa gcttgtgatg atgtacaagg 300  
 tgcagcatta agagactggt tacgtcctaa ccgtcgtggt gaaattaccg cttctgggtac 360  
 tgtgttaaaa caaggttcac aaggatgga agcagggaca acaggaccag caccacttta 420  
 tagaaaataa tttttctcaa tgaaatagaa gggcgcttta atagcgc 467

25

<210> 12  
 <211> 819  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 12

30

atgaaattat ctccggtttt attaacagtt gttgctgcga cgacattggc tgcctgcggt 60  
 aatttaagta aagttactcc agaaggtaca tctgacaatt tagtgtggcc aaaaattgat 120  
 gaatcagtct ttaatcatga tggtagccaa tttggttcct ggccaaactg ggataacgta 180  
 cgcattggtg agcgtggtat gaataaagac caactttata atttgttagg tegtccacac 240  
 ttctctgaag gcttatacgg tgtgcgtgaa tgggactatg tgtttaacta tegtgagaat 300  
 ggtgtacata aagtatgtca atataaagtc ttatttgaca aaaatatgaa tgcacaaagt 360  
 ttcttctgggt atccaaatgg ctgtaacggg agctctgcat ttagtttaag tgggtgatttc 420  
 ttatttgact tcaataaaga ttcattaaca gcaaaaggta aagaagttgt tgacagcgtt 480  
 gcaacacaat taaaagcctc tgatgcaaaa gaagtgaaag tgcaggcctt tactgaccgt 540  
 ttaggttcag aagcgtataa cttaaaactt tctcaacgtc gtgcagatcg tgttaaagcg 600  
 cgtttaattg agcaagggtg tgccgcaaat atccatgctg taggctatgg taaagcacia 660  
 caagtgaaag cttgtgatga tgtacaaggt gcagcattaa gagattgttt acgtcctaac 720  
 cgctcgtggtg aaattaccgc ttctgggtact gtgttaaaac aaggttcaca aggtatggaa 780  
 gcagggacaa caggaccagc accactttat agaaaataa 819

60

<210> 13  
 <211> 272  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 13

5

Met Lys Leu Ser Arg Val Leu Leu Thr Val Val Ala Ala Thr Thr Leu  
 1 5 10 15

Ala Ala Cys Gly Asn Leu Ser Lys Val Thr Pro Glu Gly Thr Ser Asp  
 20 25 30

Asn Leu Val Trp Pro Lys Ile Asp Glu Ser Val Phe Asn His Asp Gly  
 35 40 45

Ser Gln Phe Gly Ser Trp Pro Asn Trp Asp Asn Val Arg Met Val Glu  
 50 55 60

Arg Gly Met Asn Lys Asp Gln Leu Tyr Asn Leu Leu Gly Arg Pro His  
 65 70 75 80

Phe Ser Glu Gly Leu Tyr Gly Val Arg Glu Trp Asp Tyr Val Phe Asn  
 85 90 95

Tyr Arg Glu Asn Gly Val His Lys Val Cys Gln Tyr Lys Val Leu Phe  
 100 105 110

Asp Lys Asn Met Asn Ala Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Pro Asn Gly Cys  
 115 120 125

Asn Gly Ser Ser Ala Phe Ser Leu Ser Gly Asp Phe Leu Phe Asp Phe  
 130 135 140

Asn Lys Asp Ser Leu Thr Ala Lys Gly Lys Glu Val Val Asp Ser Val  
 145 150 155 160

Ala Thr Gln Leu Lys Ala Ser Asp Ala Lys Glu Val Lys Val Ala Gly  
 165 170 175

Phe Thr Asp Arg Leu Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Leu Lys Leu Ser Gln  
 180 185 190

Arg Arg Ala Asp Arg Val Lys Ala Arg Leu Ile Glu Gln Gly Val Ala

ES 2 371 498 T3

	195		200		205	
5	Ala Asn Ile His Ala Val Gly Tyr Gly Lys Ala Gln Gln Val Lys Ala	210	215	220		
10	Cys Asp Asp Val Gln Gly Ala Ala Leu Arg Asp Cys Leu Arg Pro Asn	225	230	235	240	
15	Arg Arg Val Glu Ile Thr Ala Ser Gly Thr Val Leu Lys Gln Gly Ser	245	250	255		
20	Gln Gly Met Glu Ala Gly Thr Thr Gly Pro Ala Pro Leu Tyr Arg Lys	260	265	270		

25

30 <210> 14  
 <211> 204  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 14

35	tgccaattat agactttgtg tgaatgtacg agtaatcaca tcacgttggt gttcaggtgt	60
	taatgagttg aaacgtacag cgtaacctga aacacggatt gttaattgtg ggtatttttc	120
40	tgggttattg accgcatctt ctaaggtttc gcggcgtaat acgttaacgt ttaagtgttg	180
	accacottct actttgactg ttgg	204

45 <210> 15  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 50 <400> 15  
 aggtgtttt ttaagagga aatggatgcc aatta 35  
 <210> 16  
 <211> 384  
 <212> ADN  
 55 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 16

60

ES 2 371 498 T3

atgattaaag gtattcaaat tacccaagcg gctaatagaca atttattaaa ctcattttgg 60  
 ttattagata gcgaaaaagg tgaagcgcgt tgtttatgtg ctaaagggtga cttcgttgaa 120  
 5 gatcaaatcg ttgcagtaag tgaattaggt caaatcgaat atcgcggaatt accagttgat 180  
 atcgcccaaa cagtcaaagt agaaggtggt caacacttaa acgttaacgt attacgccgc 240  
 10 gaaaccttag aagatgcggt caataacca gaaaaatacc cacaattaac aatccgtggt 300  
 tcaggttacg ctgtacgttt caactcatta acacctgaac aacaacgtga tgtgattact 360  
 15  
 cgtaacattca cacaaagtct ataa 384

20  
 <210> 17  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 25 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 17

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

ES 2 371 498 T3

<210> 18  
 <211> 75  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 18

5  
 acattcttga tgcaataagt cataacgttt tttgagaaac tggagottat taaagaaaa 60  
 10 gcgtacatgc cctgt 75

<210> 19  
 <211> 390  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 19

20 atgacacgga ttaatctcat cgcccccgct gaactttgtg atcaacatct gttagcagaa 60

25 cacagagaac tgacacgtat tcccaatgct gtggcaaaag ggaatttag cctcctcggt 120  
 cagccagaag attataaatt aggtacaggg catgtacgct ttttcttaa taagctccag 180  
 30 tttctcaaaa aacgttatga cttattgcat caagaatgct gagctcgagg ttttaatgtg 240  
 caatatattt ggcccgacaa gttgccggag gacgataacc tctggttaga ctacatccct 300  
 35 actgagcatg ccttagccgc caatagagcg cgtatttttag aaagaatgcc tgtcaaagcc 360  
 cgctttacac caagtaaagc tacaacttaa 390

<210> 20  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 20

50

55

60

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

45 <210> 21  
 <211> 229  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 50 <400> 21

55

60



ES 2 371 498 T3

cgatttcaat cccttttttg cggagttggt catcatcata aatatgttta tcgccgtaga 60  
gggcattgat tgtttcatgg ataccaatat agcctaataa aatagaggca cgcccatttt 120  
5 taaagatttg tgccacattg tcatcagcct ttaagegtac accacaggca ccctccatat 180  
aaagaattgg ggcaacgcga gctttggtat gttctaaacg tgcaatgcg 229

10

<210> 22

<211> 2142

<212> ADN

15 <213> Pasteurella multocida

<400> 22

ES 2 371 498 T3

atggcaactt tctttgtaat taaacgagat gggtcacgaa cggggtttga aatccaacgt 60  
 atcattaatg caattaataaa agcggcacia gcggtgaata ttgaagatga acgttattgt 120  
 catacaatgg gacagcaggt atgtaatgac atctttactc gttaccaaca agaaattgat 180  
 atcagccaca ttcaaaaaat cgtagaaaat accttaatgg cgggaaaata ccctgaaata 240  
 gcgagagctt atatogaata ccgccatgat cgggatctcg cgcgagaaaa acgcagtcaa 300  
 ctcacaaaag aaatogaagg attaattcag caaagtaatg ttgaactcct caatgaaaat 360  
 gccaataaag atgcgaaagt tatcccaact caacgcgacg tcttagcggg tattgtggca 420  
 aacattacg ctaaacgtta tattctgcca cgcgatgtcg tagacgcaca tgaaaaaggg 480  
 gaaattcatt atcacgattt agactatgcc ccatttttcc caatgtttaa ctgcatgctt 540  
 gtcgatctca aagggatgct aagcaatggg ttcaaatgg gtaatgccga aattgaacca 600  
 ccgaaatcga tcacaacagc aaccgcagtc agtgcacaaa ttatcgaca agtcgcgagc 660  
 catatttacg gtggtaccac gattaaccgt atagatgaaa tccttgcccc ttatgtgcaa 720  
 ttaagttatg aaaaacattt aaaaaatgca gcggaatgga aagttcccga accagaagcc 780  
 tacgcgaaag cactcattga aaaagaatgt ttcgacgctt ttcaatcctt agaatatgaa 840  
 gtcaatacgc tgcatacttc aaatgggcaa accccttttg tcacttttgg ctttggettta 900  
 ggaacgacgt ggcaatcgag acttatccag cgctcaattc tgaaaaatcg tattcgtggg 960  
 ttaggcaaaa atcacaaaac ccctgtcttc ccaaaactgg tgttcactat taaaaaaggc 1020  
 attaaccata gcccgagtga tcctaactac gacattaaac aactggcttt agaattgtgcc 1080  
 tccaaacgga tgtatcctga tattctcaat tatgatcagg tgggtgaaagt cacgggttct 1140  
 tttaaagcac caatgggatg ccgtagtttc ttaggtgctt atcaggagca aggacaggaa 1200  
 atccatgatg gacgtaataa cttaggcgta gtgagtttga attaccgcg tatagcaatt 1260  
 gaagccaacg ccacgaattc agcccaaagt gcggtcgagt ttataaaat tttagatcaa 1320  
 cgtcttgoga ttgcaaaaaa agccttaatg acacgcattg cacgtttaga acataccaaa 1380

ES 2 371 498 T3

5 gctcgcgttg cccaattct ttatatggag ggtgcctgtg gtgtacgctt aaaggctgat 1440  
 gacaatgtgg cacaaatctt taaaaatggg cgtgcctcta tttcgttagg ctatattggt 1500  
 atccatgaaa caatcaatgc cctctacggc gataaacata tttatgatga tgaacaactc 1560  
 10 cgccaaaaag ggattgaaat cgtcgaatat ttacacgaga ccgtgcaacg ttggaaacaa 1620  
 gaaacagggtt atgctttcag cctatatctc acaccaagtg aaaacctttg tgaccgtttc 1680  
 tgtcgccttg atactaagca atttgggctt atcgaagggtg tcacagataa aggctactat 1740  
 15 actaatagct accacttaga cgtagagaaa aaagtcaatc cttatgacaa gatagatttt 1800  
 gaattgcctt atccaccgtt cgcaagcggc gggtttattt gctatgggtga atacccaaat 1860  
 20 gttcagcata accttaaagc attagaggac gtttgggatt atagctatga cagagtgcct 1920  
 tactatggga ccaatacacc gattgatgaa tgctatgaat gtggtttcag tgggtgaattt 1980  
 gaatgtacca gtaaaggggtt tacttgctcg aaatgtggta accatgacag tgagaaagtc 2040  
 25 tccgtgacce gacgtgtctg tggctatctt ggcagtcag atgccagacc atttaatgcc 2100  
 ggtaaacaag aagaagtcaa gcgcagagta aaacatctct aa 2142

30

<210> 23

<211> 713

<212> PRT

35 <213> Pasteurella multocida

<400> 23

40

45

50

55

60

ES 2 371 498 T3

Met Ala Thr Phe Phe Val Ile Lys Arg Asp Gly Ser Arg Thr Gly Phe  
 1 5 10 15

Glu Ile Gln Arg Ile Ile Asn Ala Ile Lys Lys Ala Ala Gln Ala Val  
 20 25 30

Asn Ile Glu Asp Glu Arg Tyr Cys His Thr Met Gly Gln Gln Val Cys  
 35 40 45

Asn Asp Ile Phe Thr Arg Tyr Gln Gln Glu Ile Asp Ile Ser His Ile  
 50 55 60

Gln Lys Ile Val Glu Asn Thr Leu Met Ala Gly Lys Tyr Pro Glu Ile  
 65 70 75 80

Ala Arg Ala Tyr Ile Glu Tyr Arg His Asp Arg Asp Leu Ala Arg Glu  
 85 90 95

Lys Arg Ser Gln Leu Thr Lys Glu Ile Glu Gly Leu Ile Gln Gln Ser  
 100 105 110

ES 2 371 498 T3

Asn Val Glu Leu Leu Asn Glu Asn Ala Asn Lys Asp Ala Lys Val Ile  
 115 120 125  
 Pro Thr Gln Arg Asp Leu Leu Ala Gly Ile Val Ala Lys His Tyr Ala  
 130 135 140  
 Lys Arg Tyr Ile Leu Pro Arg Asp Val Val Asp Ala His Glu Lys Gly  
 145 150 155 160  
 Glu Ile His Tyr His Asp Leu Asp Tyr Ala Pro Phe Phe Pro Met Phe  
 165 170 175  
 Asn Cys Met Leu Val Asp Leu Lys Gly Met Leu Ser Asn Gly Phe Lys  
 180 185 190  
 Met Gly Asn Ala Glu Ile Glu Pro Pro Lys Ser Ile Thr Thr Ala Thr  
 195 200 205  
 Ala Val Ser Ala Gln Ile Ile Ala Gln Val Ala Ser His Ile Tyr Gly  
 210 215 220  
 Gly Thr Thr Ile Asn Arg Ile Asp Glu Ile Leu Ala Pro Tyr Val Gln  
 225 230 235 240  
 Leu Ser Tyr Glu Lys His Leu Lys Asn Ala Ala Glu Trp Lys Val Pro  
 245 250 255  
 Glu Pro Glu Ala Tyr Ala Lys Ala Leu Ile Glu Lys Glu Cys Phe Asp  
 260 265 270  
 Ala Phe Gln Ser Leu Glu Tyr Glu Val Asn Thr Leu His Thr Ser Asn  
 275 280 285  
 Gly Gln Thr Pro Phe Val Thr Phe Gly Phe Gly Leu Gly Thr Thr Trp  
 290 295 300  
 Gln Ser Arg Leu Ile Gln Arg Ser Ile Leu Lys Asn Arg Ile Arg Gly  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Lys Asn His Lys Thr Pro Val Phe Pro Lys Leu Val Phe Thr  
 325 330 335  
 Ile Lys Lys Gly Ile Asn His Ser Pro Ser Asp Pro Asn Tyr Asp Ile  
 340 345 350

ES 2 371 498 T3

Lys Gln Leu Ala Leu Glu Cys Ala Ser Lys Arg Met Tyr Pro Asp Ile  
 355 360 365

Leu Asn Tyr Asp Gln Val Val Lys Val Thr Gly Ser Phe Lys Ala Pro  
 370 375 380

Met Gly Cys Arg Ser Phe Leu Gly Ala Tyr Gln Glu Gln Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

Ile His Asp Gly Arg Asn Asn Leu Gly Val Val Ser Leu Asn Leu Pro  
 405 410 415

Arg Ile Ala Ile Glu Ala Asn Ala Thr Asn Ser Ala Gln Ser Ala Val  
 420 425 430

Glu Phe Tyr Lys Ile Leu Asp Gln Arg Leu Ala Ile Ala Lys Lys Ala  
 435 440 445

Leu Met Thr Arg Ile Ala Arg Leu Glu His Thr Lys Ala Arg Val Ala  
 450 455 460

Pro Ile Leu Tyr Met Glu Gly Ala Cys Gly Val Arg Leu Lys Ala Asp  
 465 470 475 480

Asp Asn Val Ala Gln Ile Phe Lys Asn Gly Arg Ala Ser Ile Ser Leu  
 485 490 495

Gly Tyr Ile Gly Ile His Glu Thr Ile Asn Ala Leu Tyr Gly Asp Lys  
 500 505 510

His Ile Tyr Asp Asp Glu Gln Leu Arg Gln Lys Gly Ile Glu Ile Val  
 515 520 525

Glu Tyr Leu His Glu Thr Val Gln Arg Trp Lys Gln Glu Thr Gly Tyr  
 530 535 540

Ala Phe Ser Leu Tyr Ser Thr Pro Ser Glu Asn Leu Cys Asp Arg Phe  
 545 550 555 560

Cys Arg Leu Asp Thr Lys Gln Phe Gly Leu Ile Glu Gly Val Thr Asp  
 565 570 575

Lys Gly Tyr Tyr Thr Asn Ser Tyr His Leu Asp Val Glu Lys Lys Val  
 580 585 590

ES 2 371 498 T3

Asn Pro Tyr Asp Lys Ile Asp Phe Glu Leu Pro Tyr Pro Pro Phe Ala  
 595 600 605

5 Ser Gly Gly Phe Ile Cys Tyr Gly Glu Tyr Pro Asn Val Gln His Asn  
 610 615 620

10 Leu Lys Ala Leu Glu Asp Val Trp Asp Tyr Ser Tyr Asp Arg Val Pro  
 625 630 635 640

15 Tyr Tyr Gly Thr Asn Thr Pro Ile Asp Glu Cys Tyr Glu Cys Gly Phe  
 645 650 655

20 Ser Gly Glu Phe Glu Cys Thr Ser Lys Gly Phe Thr Cys Pro Lys Cys  
 660 665 670

25 Gly Asn His Asp Ser Glu Lys Val Ser Val Thr Arg Arg Val Cys Gly  
 675 680 685

30 Tyr Leu Gly Ser Pro Asp Ala Arg Pro Phe Asn Ala Gly Lys Gln Glu  
 690 695 700

35 Glu Val Lys Arg Arg Val Lys His Leu  
 705 710

40 <210> 24  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 24  
 attgtgatta cgggattatc gggatcaggt aaatctctt tagccttga tacctgt 58  
 <210> 25  
 <211> 2832  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 25

50  
  
55  
  
60

ES 2 371 498 T3

atggataaga ttgaggtacg tggggcgaga acccataatt taaaaaatat taatttaact 60  
attcctcgtg ataaattaat tgtgattacg ggattatcgg gatcaggtaa atcttcttta 120  
gcctttgata ccctgtatgc tgagggacaa cgccggtatg tagaatcctt gtcggcatat 180  
gcacgtcaat tcttatccct aatggaaaag ccggatgtgg atcatattga aggattatcg 240  
ccggcgattt ctattgaaca aaaatctacc tcacataatc cgcggtcaac ggtgggtacg 300  
gtcaccgaaa ttcattgatta cttacgtctt ctttttgcctc gagtagggga accgcggtgt 360  
ccgaatcatg atgtgccttt agcggcacia accattagcc agatggtgga taaagtattg 420



ES 2 371 498 T3

agtttgctg aagaaagcaa aatgatggtg ctggcgccag tggtgaaaga acgtaagggg 480  
 gaacatgta aattattaga gcaaattgcc gccaaggtt atattcgagc cagaattgac 540  
 ggtgaaattt gtgatttata tgatgcacct aaattagaat tacataaaaa acatactatt 600  
 gaagtgggtg tggaccggtt taagggtcgg tctgatttag ccacaagatt agcagaatcc 660  
 tttgaaacag cattggaatt atctgggtgg accgctgtag ttgcttccat ggatgagcct 720  
 gaaacggaag aattgggtctt ttccgctaata tttgcttgct cacattgtgg gtattctgtc 780  
 ccagaattag aacctcggtt attttctttt aataatcccg cggggcgctg tccgacttgc 840  
 gatggcttag gtgtacaaca atattttgat gaaaaacgct tggtgcaaaa cccgagtatt 900  
 tcgtagcca gtggcgcagt aaaaggctgg gatcgtcgtc acttctatta ctaccaaag 960  
 ctcacctcct tagcgaagca ttatgaattt gatattgaat caccttttga ggcactgccg 1020  
 aaaaaaatcc agcagattat tttaaatggt tcaggtaagg aagaaattga gtttcaatac 1080  
 atgaatgatc gcggcgatgt agtcgtcgt catcatgcat ttgaaggcat tctaaataat 1140  
 atggcgcgcc gttataaaga aacggaatcg ctgtctgtgc gtgaagaatt agcgaanaat 1200  
 atcagtacct gtccttgcca tgattgtggg ggttcacgtt tacgtcaaga ggcacgtcat 1260  
 gtgtatattg gcaccaaccac tttacctgat gtggcagaaa agagtattgg cgaaaccttg 1320  
 catttcttta gtgaattgca ttttaagcggg caaagagctc aaattgccga gaaaatctta 1380  
 aaagaaatta aagagcgtt acaattttta gtcaatgtag ggttgatta tctttccctt 1440  
 tctcgttcag cagaaacctt gtctgggtgg gaggcacagc gaattcgttt agccagtcaa 1500  
 attggtcggg gtttagtggg ggtgatgtat gtgctagatg agcctctat tggtttgcatt 1560  
 caacgtgata atgagcgatt actgaatata ttgcttcaact tacgtaactt agggaacacc 1620  
 gtgattgtgg tagaacatga tgaagatgcc attatggcgg cagatcataat tattgatatt 1680  
 ggtcccgggg caggagtcca tgggtggcaa attgtggcag aaggttcggc aaaggcgatt 1740  
 atggctaata cacactcaat tacggggaaa tttttatctg gggtcgagaa aatcgaatt 1800  
 cccgcaaac ggaccgact tgataagaaa aaaatgttga aattagaagg ggcaacgggg 1860  
 aataatctga aatcagtga tttagccatt ccagtaggat tgtttacctg tgtgacaggt 1920  
 gtttcggggg cagggaaatc gaccttgatt aatgatacgt tgttccatt agcacaanaat 1980  
 gccttgaatc gtgcggaaaa tacgcaattt gcgccttata aatccatttc gggtttgaa 2040  
 ttttttgata aagtaattga tattgaccaa agtccaattg gtcgtacacc gcgttcgaat 2100  
 cctgccactt atactggctt atttacgccc attcagagaat tatttgccgg cgtgcctgag 2160  
 tcgagagccc ggggttataa tcccggacgt tttagtttta atgtacgcgg tggacgctgt 2220  
 gaggcctgtc aaggcgatgg tgtgattaaa gtagagatgc actttttgcc cgatgtgtat 2280

ES 2 371 498 T3

gtgccttgtg agcaatgtaa gggaaaacgt tataatcgag agaccttaga gatccgttac 2340  
 aaaggtaaaa cgattcatca agtgtttagaa atgacggtag aagaagcgcg cgagtttttt 2400  
 5 gatgcgattc cgcagatcgc ccgtaaatta caaactttta tggatgttgg tttatcctat 2460  
 attcgtttag gacaatcttc gaccacgtta tcgggtgggg aagcgcaacg agtgaaatta 2520  
 10 gcaacgggagc tttcaaaacg tgatacaggg aaaactttgt atgtattaga tgaaccgacg 2580  
 acaggtttac attttgctga tattaacag ctattaacag tcttgcatcg tttacgtgat 2640  
 15 caaggcaata cgat'agtggg gattgagcac aatttagatg tgatcaaaac agccgattgg 2700  
 attattgatt taggtcctga aggggggaat ggcgggggac aaattattgc cacaggcaca 2760  
 ccagaacagg tcgctgaagt gaaaggttca cataccgcac gcttcttaaa aacgctttta 2820  
 20 caaaagcgct aa 2832

<210> 26  
 <211> 943  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 26

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

ES 2 371 498 T3

Ala Gln Thr Ile Ser Gln Met Val Asp Lys Val Leu Ser Leu Pro Glu  
130 135 140

Glu Ser Lys Met Met Leu Leu Ala Pro Val Val Lys Glu Arg Lys Gly  
145 150 155 160

Glu His Val Lys Leu Leu Glu Gln Ile Ala Ala Gln Gly Tyr Ile Arg  
165 170 175

Ala Arg Ile Asp Gly Glu Ile Cys Asp Leu Ser Asp Ala Pro Lys Leu  
180 185 190

Glu Leu His Lys Lys His Thr Ile Glu Val Val Val Asp Arg Phe Lys  
195 200 205

Val Arg Ser Asp Leu Ala Thr Arg Leu Ala Glu Ser Phe Glu Thr Ala  
210 215 220

Leu Glu Leu Ser Gly Gly Thr Ala Val Val Ala Ser Met Asp Glu Pro  
225 230 235 240

Glu Thr Glu Glu Leu Val Phe Ser Ala Asn Phe Ala Cys Pro His Cys  
245 250 255

Gly Tyr Ser Val Pro Glu Leu Glu Pro Arg Leu Phe Ser Phe Asn Asn  
260 265 270

Pro Ala Gly Ala Cys Pro Thr Cys Asp Gly Leu Gly Val Gln Gln Tyr  
275 280 285

Phe Asp Glu Lys Arg Val Val Gln Asn Pro Ser Ile Ser Leu Ala Ser  
290 295 300

Gly Ala Val Lys Gly Trp Asp Arg Arg Asn Phe Tyr Tyr Tyr Gln Met  
305 310 315 320

Leu Thr Ser Leu Ala Lys His Tyr Glu Phe Asp Ile Glu Ser Pro Phe  
325 330 335

Glu Ala Leu Pro Lys Lys Ile Gln Gln Ile Ile Leu Asn Gly Ser Gly  
340 345 350

Lys Glu Glu Ile Glu Phe Gln Tyr Met Asn Asp Arg Gly Asp Val Val  
355 360 365

Val Arg His His Ala Phe Glu Gly Ile Leu Asn Asn Met Ala Arg Arg

ES 2 371 498 T3

370						375										380
Tyr 385	Lys	Glu	Thr	Glu	Ser 390	Leu	Ser	Val	Arg	Glu 395	Glu	Leu	Ala	Lys	Asn 400	
Ile	Ser	Thr	Cys	Pro 405	Cys	His	Asp	Cys	Gly 410	Gly	Ser	Arg	Leu	Arg 415	Gln	
Glu	Ala	Arg	His 420	Val	Tyr	Ile	Gly	Thr 425	Thr	Thr	Leu	Pro	Asp 430	Val	Ala	
Glu	Lys	Ser	Ile	Gly	Glu	Thr	Leu	His 440	Phe	Phe	Ser	Glu 445	Leu	His	Leu	
Ser 450	Gly	Gln	Arg	Ala	Gln	Ile 455	Ala	Glu	Lys	Ile	Leu 460	Lys	Glu	Ile	Lys	
Glu 465	Arg	Leu	Gln	Phe	Leu 470	Val	Asn	Val	Gly	Leu 475	Asp	Tyr	Leu	Ser	Leu 480	
Ser	Arg	Ser	Ala	Glu 485	Thr	Leu	Ser	Gly	Gly 490	Glu	Ala	Gln	Arg	Ile 495	Arg	
Leu	Ala	Ser	Gln 500	Ile	Gly	Ala	Gly	Leu 505	Val	Gly	Val	Met	Tyr 510	Val	Leu	
Asp	Glu	Pro 515	Ser	Ile	Gly	Leu	His 520	Gln	Arg	Asp	Asn 525	Glu	Arg	Leu	Leu	
Asn 530	Thr	Leu	Leu	His	Leu	Arg 535	Asn	Leu	Gly	Asn 540	Thr	Val	Ile	Val	Val	
Glu 545	His	Asp	Glu	Asp	Ala 550	Ile	Met	Ala	Ala	Asp 555	His	Ile	Ile	Asp	Ile 560	
Gly	Pro	Gly	Ala	Gly 565	Val	His	Gly	Gly	Gln 570	Ile	Val	Ala	Glu	Gly 575	Ser	
Ala	Lys	Ala	Ile 580	Met	Ala	Asn	Pro	His 585	Ser	Ile	Thr	Gly	Lys 590	Phe	Leu	
Ser	Gly	Val 595	Glu	Lys	Ile	Glu	Ile 600	Pro	Ala	Lys	Arg 605	Thr	Ala	Leu	Asp	
Lys 610	Lys	Lys	Met	Leu	Lys	Leu 615	Glu	Gly	Ala	Thr	Gly 620	Asn	Asn	Leu	Lys	

ES 2 371 498 T3

Ser Val Asn Leu Ala Ile Pro Val Gly Leu Phe Thr Cys Val Thr Gly  
625 630 635 640

Val Ser Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Ile Asn Asp Thr Leu Phe Pro  
645 650 655

Leu Ala Gln Asn Ala Leu Asn Arg Ala Glu Asn Thr Gln Phe Ala Pro  
660 665 670

Tyr Gln Ser Ile Ser Gly Leu Glu Phe Phe Asp Lys Val Ile Asp Ile  
675 680 685

Asp Gln Ser Pro Ile Gly Arg Thr Pro Arg Ser Asn Pro Ala Thr Tyr  
690 695 700

Thr Gly Leu Phe Thr Pro Ile Arg Glu Leu Phe Ala Gly Val Pro Glu  
705 710 715 720

Ser Arg Ala Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Arg Phe Ser Phe Asn Val Arg  
725 730 735

Gly Gly Arg Cys Glu Ala Cys Gln Gly Asp Gly Val Ile Lys Val Glu  
740 745 750

Met His Phe Leu Pro Asp Val Tyr Val Pro Cys Glu Gln Cys Lys Gly  
755 760 765

Lys Arg Tyr Asn Arg Glu Thr Leu Glu Ile Arg Tyr Lys Gly Lys Thr  
770 775 780

Ile His Gln Val Leu Glu Met Thr Val Glu Glu Ala Arg Glu Phe Phe  
785 790 795 800

Asp Ala Ile Pro Gln Ile Ala Arg Lys Leu Gln Thr Leu Met Asp Val  
805 810 815

Gly Leu Ser Tyr Ile Arg Leu Gly Gln Ser Ser Thr Thr Leu Ser Gly  
820 825 830

Gly Glu Ala Gln Arg Val Lys Leu Ala Thr Glu Leu Ser Lys Arg Asp  
835 840 845

Thr Gly Lys Thr Leu Tyr Val Leu Asp Glu Pro Thr Thr Gly Leu His  
850 855 860

ES 2 371 498 T3

Phe Ala Asp Ile Lys Gln Leu Leu Thr Val Leu His Arg Leu Arg Asp  
 865 870 875 880

5

Gln Gly Asn Thr Ile Val Val Ile Glu His Asn Leu Asp Val Ile Lys  
 885 890 895

10

Thr Ala Asp Trp Ile Ile Asp Leu Gly Pro Glu Gly Gly Asn Gly Gly  
 900 905 910

15

Gly Gln Ile Ile Ala Thr Gly Thr Pro Glu Gln Val Ala Glu Val Lys  
 915 920 925

20

Gly Ser His Thr Ala Arg Phe Leu Lys Thr Leu Leu Gln Lys Arg  
 930 935 940

25

<210> 27  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida

30

<400> 27  
 caggacttag tgggtaacaa cacaccagtc ttcttatcc gtgatccatt gaaa 54

<210> 28  
 <211> 1455  
 <212> ADN

35

<213> Pasteurella multocida  
 <400> 28

ES 2 371 498 T3

atgtctaaat gccatttga ccatggttca aaaaccttaa cgaatgcagc tgggtgcacct	60
attggtgaaa acgacaacac catgtctgcg ggtcctaaag gtccattact ttacaagat	120
gtttggttcc aagagaaatt agcacacttt gcacgtgagc gtattcctga gcgtgttggt	180
catgcaaaaag gttcagcagc gtacggtaca ttcactgtga cacacgatat cagcaaatac	240
accaaagcgg atttattcaa tggtatcggg aaacaaacac aagtcttatt acgtttctca	300
acagtagcgg gtgagcgcgg tgcggcagac gctgagcgtg atgtgcgtgg tttcgcatta	360
aaattctaca ctgaacaagg taactgggac ttagtgggta acaacacacc cgtattcttt	420
atccgtgatc cattgaaatt cccagatttc attcactctc aaaaacgtaa tccacaaact	480
aacttgctg atgcaaacgc ggcattgggat ttctggtcac gtcattcctga atcattacac	540
caaatcatga ttcttttcag tgatcgtggt attccaactg acttacgtca tatgaacggt	600
tacggtagcc atacatatag ctttattaac gcacaaaatg agcgtttctg ggtgaaattc	660
cacttcaaaa cacaacaagg tcacaaatc tataactaatg aagaagcggc taaagtgggtg	720
ggtgaaaacc gtgagtcaag ccaacaagat ttatacgaag cgattgagcg tggcgaattc	780
.	
ccacgttggg atgttcaagt gcaaatcatg ccagaagcag atgcacacaa acataactat	840
gcgtttgact taactaaagt atggccacac aaagattatc cgatgatcga agtgggtgta	900
ttagagttaa accaaaacc aattaactac ttcgcagaag tgaacaagc tgcgtttgca	960
ccttctaaca tcgtaccggg aattggtttc tcaccagacc gtatgttaca aggtcgtctt	1020
ttctcatacc aagacgcgca acgttatcgt ttaggggtta accatcacca aatcccagtg	1080
aacgcaccaa aatgccata ccacaccact caccgtgatg gcgcaatgcg tgtagataac	1140
aatggtggta cacaccctaa ctatgcaccg aaccgttttg atacttatgt gccgactcac	1200
caacaagagc ctgcattaga gttagagcgt tcagcagcac actttaaact ccgtagtat	1260
gatgaagact actacacaca acctgccgca ctttacaact tattegatgt ggatcaaaaa	1320
gcacgtgtgg cagccaactt cgcagcgggc ttagcaggtg ttacagaacc tgcgattggt	1380
gaaagacaat tagcccactt cgacaaagta agcaaagaat tagctgatgc aattcgtgcg	1440
aacttagcga aataa	1455



ES 2 371 498 T3

<210> 29  
 <211> 484  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 29

5

10 Met Ser Lys Cys Pro Phe Asp His Gly Ser Lys Thr Leu Thr Asn Ala  
 1 5 10 15

15 Ala Gly Ala Pro Ile Val Glu Asn Asp Asn Thr Met Ser Ala Gly Pro  
 20 25 30

20 Lys Gly Pro Leu Leu Leu Gln Asp Val Trp Phe Gln Glu Lys Leu Ala  
 35 40 45

25 His Phe Ala Arg Glu Arg Ile Pro Glu Arg Val Val His Ala Lys Gly  
 50 55 60

30 Ser Ala Ala Tyr Gly Thr Phe Thr Val Thr His Asp Ile Ser Lys Tyr  
 65 70 75 80

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

40 Leu Arg Phe Ser Thr Val Ala Gly Glu Arg Gly Ala Ala Asp Ala Glu  
 100 105 110



ES 2 371 498 T3

Arg Asp Val Arg Gly Phe Ala Leu Lys Phe Tyr Thr Glu Gln Gly Asn  
 115 120 125

Trp Asp Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Val Phe Phe Ile Arg Asp Pro  
 130 135 140

Leu Lys Phe Pro Asp Phe Ile His Thr Gln Lys Arg Asn Pro Gln Thr  
 145 150 155 160

Asn Leu Arg Asp Ala Asn Ala Ala Trp Asp Phe Trp Ser Arg His Pro  
 165 170 175

Glu Ser Leu His Gln Ile Met Ile Leu Phe Ser Asp Arg Gly Ile Pro  
 180 185 190

Thr Asp Leu Arg His Met Asn Gly Tyr Gly Ser His Thr Tyr Ser Phe  
 195 200 205

Ile Asn Ala Gln Asn Glu Arg Phe Trp Val Lys Phe His Phe Lys Thr  
 210 215 220

Gln Gln Gly His Lys Phe Tyr Thr Asn Glu Glu Ala Ala Lys Val Val  
 225 230 235 240

Gly Glu Asn Arg Glu Ser Ser Gln Gln Asp Leu Tyr Glu Ala Ile Glu  
 245 250 255

Arg Gly Glu Phe Pro Arg Trp Asn Val Gln Val Gln Ile Met Pro Glu  
 260 265 270

Ala Asp Ala His Lys His Asn Tyr Ala Phe Asp Leu Thr Lys Val Trp  
 275 280 285

Pro His Lys Asp Tyr Pro Met Ile Glu Val Gly Val Leu Glu Leu Asn  
 290 295 300

Gln Asn Pro Ile Asn Tyr Phe Ala Glu Val Glu Gln Ala Ala Phe Ala  
 305 310 315 320

Pro Ser Asn Ile Val Pro Gly Ile Gly Phe Ser Pro Asp Arg Met Leu  
 325 330 335

Gln Gly Arg Leu Phe Ser Tyr Gln Asp Ala Gln Arg Tyr Arg Leu Gly  
 340 345 350

Val Asn His His Gln Ile Pro Val Asn Ala Pro Lys Cys Pro Tyr His

ES 2 371 498 T3

	355		360		365	
5	Thr Thr His Arg Asp Gly Ala Met Arg Val Asp Asn Asn Gly Gly Thr					
	370		375		380	
10	His Pro Asn Tyr Ala Pro Asn Arg Phe Asp Thr Tyr Val Pro Thr His					
	385		390		395	400
15	Gln Gln Glu Pro Ala Leu Glu Leu Glu Arg Ser Ala Ala His Phe Asn					
		405		410		415
20	Phe Arg Glu Tyr Asp Glu Asp Tyr Tyr Thr Gln Pro Ala Ala Leu Tyr					
		420		425		430
25	Asn Leu Phe Asp Val Asp Gln Lys Ala Arg Val Ala Ala Asn Phe Ala					
		435		440		445
30	Ala Gly Leu Ala Gly Val Thr Glu Pro Ala Ile Val Glu Arg Gln Leu					
	450		455		460	
35	Ala His Phe Asp Lys Val Ser Lys Glu Leu Ala Asp Ala Ile Arg Ala					
	465	470		475		480
40	Asn Leu Ala Lys					

<210> 30  
 <211> 172  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 30

50	atttctcagc cattttttcgt gtaaaaccaa cgggaatcgt tgattttata ataatcgttg	60
	cttgtggatt gattgagagg gtttgttcaa tgacagcttc aacagtggat gtattaaaat	120
55	aacctgtttc ggtattatag tctgttggcg ttgcgatgat gacaaagtcc tg	172

<210> 31  
 <211> 1173  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 31

ES 2 371 498 T3

atgaagaaaa ttacaattgc tggggctggc tatggttggtt tatccaatgc agtattatta	60
gctcaacacc acaatgtgat cttattagat attgatcaaaa ataaagttga ttttaattaat	120
aataaaaaat cgcccatcac agataaagaa atcgaagatt tcttcaaaaa taaatcactg	180
acaatgatgg caacaacaga taaagaagtg gcattaaaaa acgcagactt tgtcatcatc	240
gcaacgccaa cagactataa taccgaaaca ggttatttta atacatccac tgttgaagct	300
gtcattgaac aaacccttc aatcaatcca caagcaacga ttattataaa atcaacaatt	360
cccgttggtt ttaccgaaaa catgcgtgaa aaatttaata ccccaaactc tatcttttca	420
cctgaatttc taagagaggg aaaagccctt tacgataatt tgtatccaag cagaattatt	480
gttggcagta cttcttatca agcaaaagta tttgccgata tgttgacaca gtgtgccaga	540
aaaaaagatg taactgtttt atttacacac aatactgagg ccgaagctgt taaattattt	600
gcaaatacgt atctcgcaat gcgagttgcc ttttttaatg aattagatac ttatgcgagt	660
cttcaccatt taaatacaaaa agacattatc aatggtattt ctactgatcc tcgcattggt	720
acacactaca ataaccgaag tttcggtat ggccggttatt gttaccxaa agacactaaa	780
cagttactgg ctaactatgc tgacgtgcct caaatctca ttgaagccat tgtcaaactc	840
aatgaaacca gaaaacgttt cattactcat gatgtattaa ataagaaacc taaaactggt	900
ggtatttate gtttaatcat gaagtcaggt tctgataact tcagagcttc tgctattctc	960
gatattatgc cgcactctca agaaaacggt gttgagattg tgatttatga gccaacotta	1020
aatcaacagg catttgagga ctaccccggt attaatcaac tctctgaatt tattaatcgc	1080
tctgatgtca ttctcgetaa tcggtctgag ccagatttaa atcaatgttc ccataaaatc	1140
tatacaagag atatttttgg cggatgatgct taa	1173

ES 2 371 498 T3

<210> 32  
 <211> 390  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 32

5

10 Met Lys Lys Ile Thr Ile Ala Gly Ala Gly Tyr Val Gly Leu Ser Asn  
 1 5 10 15

15 Ala Val Leu Leu Ala Gln His His Asn Val Ile Leu Leu Asp Ile Asp  
 20 25 30

20 Gln Asn Lys Val Asp Leu Ile Asn Asn Lys Lys Ser Pro Ile Thr Asp  
 35 40 45

25 Lys Glu Ile Glu Asp Phe Leu Gln Asn Lys Ser Leu Thr Met Met Ala  
 50 55 60

30 Thr Thr Asp Lys Glu Val Ala Leu Lys Asn Ala Asp Phe Val Ile Ile  
 65 70 75 80

35

ES 2 371 498 T3

Ala Thr Pro Thr Asp Tyr Asn Thr Glu Thr Gly Tyr Phe Asn Thr Ser  
85 90 95

Thr Val Glu Ala Val Ile Glu Gln Thr Leu Ser Ile Asn Pro Gln Ala  
100 105 110

Thr Ile Ile Ile Lys Ser Thr Ile Pro Val Gly Phe Thr Glu Asn Met  
115 120 125

Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Asn Leu Ile Phe Ser Pro Glu Phe Leu  
130 135 140

Arg Glu Gly Lys Ala Leu Tyr Asp Asn Leu Tyr Pro Ser Arg Ile Ile  
145 150 155 160

Val Gly Ser Thr Ser Tyr Gln Ala Lys Val Phe Ala Asp Met Leu Thr  
165 170 175

Gln Cys Ala Arg Lys Lys Asp Val Thr Val Leu Phe Thr His Asn Thr  
180 185 190

Glu Ala Glu Ala Val Lys Leu Phe Ala Asn Thr Tyr Leu Ala Met Arg  
195 200 205

Val Ala Phe Phe Asn Glu Leu Asp Thr Tyr Ala Ser Leu His His Leu  
210 215 220

Asn Thr Lys Asp Ile Ile Asn Gly Ile Ser Thr Asp Pro Arg Ile Gly  
225 230 235 240

Thr His Tyr Asn Asn Pro Ser Phe Gly Tyr Gly Gly Tyr Cys Leu Pro  
245 250 255

Lys Asp Thr Lys Gln Leu Leu Ala Asn Tyr Ala Asp Val Pro Gln Asn  
260 265 270

Leu Ile Glu Ala Ile Val Lys Ser Asn Glu Thr Arg Lys Arg Phe Ile  
275 280 285

Thr His Asp Val Leu Asn Lys Lys Pro Lys Thr Val Gly Ile Tyr Arg  
290 295 300

Leu Ile Met Lys Ser Gly Ser Asp Asn Phe Arg Ala Ser Ala Ile Leu  
305 310 315 320

Asp Ile Met Pro His Leu Lys Glu Asn Gly Val Glu Ile Val Ile Tyr



ES 2 371 498 T3

atgaataatg atcaacctct tttaaaagca cagagtcocgg ctggtttagc ggaagaatat 60  
 attgtcagaa gtatctggaa taatcatttc ccaccagget ccgatttgcc ggctgaacgt 120  
 5 gagttggcag agaaaattgg ggtgacgct accacgttac gtgaagtgc acaacgcctg 180  
 gcgcgtgacg gttggttgaa tattcaacat gggaaaccaa ccaaagtgaa taatatttgg 240  
 10 gaaacttcgg gcttgaatat tttagaggta ttagtacggt tagatagcac caagttacct 300  
 agtttcattt ctaacatcct gtccgcgcga accaatattt cggcaatcta tattcaaaaa 360  
 15 gccttcaaag tagaaccaca gaaatcactc gaagcgttta aggatcttga tactctagca 420  
 gatacagcag aagcttatac taattttgat tatgatcttt tccgtaaatt agcatttgca 480  
 tctgataatc ctgtgtatgg tttgatttta aatagtttga aagggttata tacacgtgta 540  
 20 gggttgtttt attttgcaa tccatcggcg cgtgagttag cgaaacgctt ttatcttctg 600  
 ctaaagacgt tgtgtcaaac acagcaagtg aacgatgtca aagagtgtat cegtcaatat 660

25  
 ggtaaagaca gtgggggtgat ttgggcaaat atgcaggcat atttaccggc taattttaat 720  
 30 gaatag 726

35 <210> 35  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 35

40

45

50

55

60

ES 2 371 498 T3

Met Asn Asn Asp Gln Pro Leu Leu Lys Ala Gln Ser Pro Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Ala Glu Glu Tyr Ile Val Arg Ser Ile Trp Asn Asn His Phe Pro Pro  
 20 25 30

Gly Ser Asp Leu Pro Ala Glu Arg Glu Leu Ala Glu Lys Ile Gly Val  
 35 40 45

Thr Arg Thr Thr Leu Arg Glu Val Leu Gln Arg Leu Ala Arg Asp Gly  
 50 55 60

Trp Leu Asn Ile Gln His Gly Lys Pro Thr Lys Val Asn Asn Ile Trp  
 65 70 75 80

Glu Thr Ser Gly Leu Asn Ile Leu Glu Val Leu Val Arg Leu Asp Ser  
 85 90 95

Thr Lys Leu Pro Ser Phe Ile Ser Asn Ile Leu Ser Ala Arg Thr Asn  
 100 105 110

Ile Ser Ala Ile Tyr Ile Gln Lys Ala Phe Lys Val Glu Pro Gln Lys  
 115 120 125

Ser Leu Glu Ala Phe Lys Asp Leu Asp Thr Leu Ala Asp Thr Ala Glu  
 130 135 140

Ala Tyr Thr Asn Phe Asp Tyr Asp Leu Phe Arg Lys Leu Ala Phe Ala  
 145 150 155 160

Ser Asp Asn Pro Val Tyr Gly Leu Ile Leu Asn Ser Leu Lys Gly Leu  
 165 170 175

Tyr Thr Arg Val Gly Leu Phe Tyr Phe Ala Asn Pro Ser Ala Arg Glu  
 180 185 190



5 Leu Ala Lys Arg Phe Tyr Leu Ser Leu Lys Thr Leu Cys Gln Thr Gln  
 195 200 205

10 Gln Val Asn Asp Val Lys Glu Cys Ile Arg Gln Tyr Gly Lys Asp Ser  
 210 215 220

15 Gly Val Ile Trp Ala Asn Met Gln Ala Tyr Leu Pro Ala Asn Phe Asn  
 225 230 235 240

**Glu**

20

<210> 36  
 <211> 214  
 <212> ADN  
 25 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 36

30 acaaccgctg gcgtatccgt taaacgggtgg gttaagcgca cttctttcac gcgctcacca 60  
 agcaagggtt tcacacgttc cacaaaagaa gcatattgct catcttgtgc tttttgactg 120  
 tcttcctett tatccgctaa atcacctaga totaaatccg ctttactgat ggtttgcagt 180  
 35 ggcttaccgt caaattccgt taagtaactt aaca 214

40 <210> 37  
 <211> 1896  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 37

45

50

55

60

ES 2 371 498 T3

	atgtcgacga atcaagaaac gcgtggtttt caatcagaag tcaaacaact tcttcaacta	60
5	atgatccatt ctctctattc caataaagaa attttcttac gtgaattaat ttccaatgcc	120
	tctgatgcgg cagataaatt gcgttttaaa gccttgtctg tgccagagct ttatgaaggt	180
	gatggggatt taaaagtgcg tattcgtttt gatgaagaga aaggtagcctt aaccattagt	240
10	gataatggca ttgggatgac gcgtgatgaa gtaatcgatc atttaggtac cattgcctaaa	300
	tccgggtacca aagaattttt aagtgcatta ggacaagatc aagccaaaga tagccaatta	360
15	attggtcagt ttggggtcgg tttttattcc gcctttattg tggcagataa agtcactgtg	420
	aaaacgcgtg cagcaggcgt aagtgcagat aaagcgggtgc tttgggaatc ggcaggcgaa	480
20	ggtgagtatt ctgtggcgga tattgacaaa aaagaacgcg gtaccgaaat tacccttcac	540
	ttacgtgaag atgaaaaagc ctttttaaat gattggcgct tacgtgaaat tatcggcaaa	600
	tattcggatc atattggttt gccagtagaa attctagcca aagaatatga cgatgaaggc	660
25	aaagaaaccg gcattaaatg ggaaaaaatc aataaagcgc aagccttgtg gacacgtgca	720
30		

ES 2 371 498 T3

aaaaatgaga	tttcggagga	agaatatcaa	gagttctata	agcatttaag	tcatgatttt	780
accgatccgt	tactttgggc	acacaataaa	gtagaaggaa	atcaagaata	taccagttta	840
ctttatgtgc	cagcaaaagc	cccttgggat	ttatttaatc	gcgaacataa	acacggctta	900
aagctgtatg	tgcaacgtgt	ctttattatg	gatgatgcgc	aagtctttat	gccaattat	960
ctgcgtttta	tgcgtggttt	attagattcc	aatgatttgc	cactgaatgt	atcgcgcgaa	1020
attttacaag	ataacaaagt	cacgagtgc	ttacgtaaag	ccctaacgaa	acgtgcattg	1080
caaatgctcg	aaaaattagc	caaagacgat	gcagagaaat	accaacgctt	ttggcaagag	1140
tttggtttgg	tgttaaaaga	aggccagca	gaagattttg	caaataaaga	aacgattgca	1200
aaattattac	gttttgcttc	aacacacaat	gacagcagcc	aacaaagcgt	gtcgttagaa	1260
gactatgtgg	cacgtatgaa	agaaggacaa	aaggcgattt	attatattac	ggcagatact	1320
tatgtcgccg	cgaaaaactc	accgcactta	gaattgttca	ataagaaagg	cattgaagta	1380
ttattgttgt	ccgatcgtat	tgatgaatgg	atgttaagct	acttaacgga	attgatggt	1440
aagccactgc	aaaccatcag	taaagcggat	ttagatctag	gtgatttagc	ggataaagag	1500
gaagacagtc	aaaaagcaca	agatgagcaa	tatgcttctt	ttgtggaacg	tgtgaaaacc	1560
ttgcttggcg	agcgcgtgaa	agaagtgcgc	ttaactcacc	gtttaacgga	tacgccagcg	1620
gttgtttcga	cgggtgatga	ccagatgacc	acccaaatgg	cgaaattggt	cgctgcggcg	1680
ggccaagcga	tgccagaggt	taaatacacc	ttcgaattaa	atccagaaca	tggtttagta	1740
caaaaagtag	cagaaattgc	cgatgagcag	caatttgccg	attggattga	attgctactt	1800
gaacaagcaa	tgttggctga	gcgtggtagc	cttgaaaatc	cagttgcctt	tattaaacgc	1860
atgaacacct	tgtttaagtaa	actcacaagt	cattaa			1896

ES 2 371 498 T3

<210> 38  
<211> 631  
<212> PRT  
5 <213> Pasteurella multocida  
<400> 38

10 Met Ser Thr Asn Gln Glu Thr Arg Gly Phe Gln Ser Glu Val Lys Gln  
1 5 10 15

15 Leu Leu Gln Leu Met Ile His Ser Leu Tyr Ser Asn Lys Glu Ile Phe  
20 25 30

20 Leu Arg Glu Leu Ile Ser Asn Ala Ser Asp Ala Ala Asp Lys Leu Arg  
35 40 45

25 Phe Lys Ala Leu Ser Val Pro Glu Leu Tyr Glu Gly Asp Gly Asp Leu

30

35

ES 2 371 498 T3

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

ES 2 371 498 T3

Gln Arg Val Phe Ile Met Asp Asp Ala Gln Val Phe Met Pro Asn Tyr  
 305 310 315 320

Leu Arg Phe Met Arg Gly Leu Leu Asp Ser Asn Asp Leu Pro Leu Asn  
 325 330 335

Val Ser Arg Glu Ile Leu Gln Asp Asn Lys Val Thr Ser Ala Leu Arg  
 340 345 350

Lys Ala Leu Thr Lys Arg Ala Leu Gln Met Leu Glu Lys Leu Ala Lys  
 355 360 365

Asp Asp Ala Glu Lys Tyr Gln Arg Phe Trp Gln Glu Phe Gly Leu Val  
 370 375 380

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

Lys Leu Leu Arg Phe Ala Ser Thr His Asn Asp Ser Ser Gln Gln Ser  
 405 410 415

Val Ser Leu Glu Asp Tyr Val Ala Arg Met Lys Glu Gly Gln Lys Ala  
 420 425 430

Ile Tyr Tyr Ile Thr Ala Asp Thr Tyr Val Ala Ala Lys Asn Ser Pro  
 435 440 445

His Leu Glu Leu Phe Asn Lys Lys Gly Ile Glu Val Leu Leu Leu Ser  
 450 455 460

Asp Arg Ile Asp Glu Trp Met Leu Ser Tyr Leu Thr Glu Phe Asp Gly  
 465 470 475 480

Lys Pro Leu Gln Thr Ile Ser Lys Ala Asp Leu Asp Leu Gly Asp Leu  
 485 490 495

Ala Asp Lys Glu Glu Asp Ser Gln Lys Ala Gln Asp Glu Gln Tyr Ala  
 500 505 510

Ser Phe Val Glu Arg Val Lys Thr Leu Leu Gly Glu Arg Val Lys Glu  
 515 520 525

Val Arg Leu Thr His Arg Leu Thr Asp Thr Pro Ala Val Val Ser Thr  
 530 535 540

ES 2 371 498 T3

5 Gly Asp Asp Gln Met Thr Thr Gln Met Ala Lys Leu Phe Ala Ala Ala  
 545 550 555 560

10 Gly Gln Ala Met Pro Glu Val Lys Tyr Thr Phe Glu Leu Asn Pro Glu  
 565 570 575

15 His Gly Leu Val Gln Lys Val Ala Glu Ile Ala Asp Glu Gln Gln Phe  
 580 585 590

20 Ala Asp Trp Ile Glu Leu Leu Leu Glu Gln Ala Met Leu Ala Glu Arg  
 595 600 605

25 Gly Ser Leu Glu Asn Pro Val Ala Phe Ile Lys Arg Met Asn Thr Leu  
 610 615 620

30 Leu Ser Lys Leu Thr Ser His  
 625 630

35 <210> 39  
 <211> 252  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 39

40 gagttgggtc agaatatatt gctcagtatg gcaatgtgag tcttactata caaatggta 60

aaattcatgg tgagatttat aggcataacc gagggtagca tgatctattt aagctctctg 120

gagaaggccg gaatttaata ttaacgccac ataaaaataa ccctcatgat ctttccocaa 180

45 caggacccga caacatgaca atggagctga attttatcaa cgcagaaaag actgataaaa 240

aatacgttgt tc 252

50 <210> 40  
 <211> 1008  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 40

55

ES 2 371 498 T3

atgaaacaaa tcgttttaaa aacaagctta ttgatgacce tctcttcatt attagttgca 60  
 5 tgtagcggcg gtggcggtag cgctggaaat cgtgctgacc gtgtagagga aaaagcacia 120  
 ccggttcaat caaatagtga gccttcttcc gctccaatca aaaatcctac taataccgct 180  
 acgaatgatt ctcttcatga caaactttca atgtcttctc atgacacatc caaagaaaat 240  
 10 agtcaacaat cctcctttta agccctctca gaacaagaaa aaaaccaacc tgcacaagaa 300  
 aatctcactt ggacagggtta tcatgtttca gaagtgggaa atgcgagtaa taatgtagat 360  
 15 aaagataacg ttacgggtatt cactttcgtta aaatataatt ctcaatacaa tgatgatcca 420  
  
 20 gtttttgata aaacaaaaac acaaagtaaa acaatatcat tagttgacgg aaaaaatgag 480  
 aataaagagg attattataa ctttacgtta aaagacgctt tattttatta tggaagtat 540  
 25 ggacaacctt cagcagatta caaaaaagta gaaaaaaatt atatttatgc aattaaacca 600  
 gatgcaataa ataatgagaa cctcaatgca ctaactgcaa cttattatca agaagatggt 660  
 tttatatatt ccgtattaag tgatgtaaat cgagttggtt cagaatatat tctcagtat 720  
 30 ggcaatgtga ctcttacttt ccgaaatggc aagatttatg gtgaaatcta cagatataat 780  
 agaggacgtg atgatttggt tcagctctca ggagaaggac aaaacttaac tataacacca 840  
 35 cacaaggaca atccccataa actatccctt acaggacccg acaacatggc aatggagctg 900  
 aattttatca acgcagaaaa aactgataaa aaatacgttg ttggtgtagg aaaagctgaa 960  
 40 aaatattatg ggttattatt tgctgaaaa agtcaccaag cacaataa 1008  
  
 45 <210> 41  
 <211> 335  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 50 <400> 41



ES 2 371 498 T3

Met Lys Gln Ile Val Leu Lys Thr Ser Leu Leu Met Thr Leu Ser Ser  
 1 5 10 15

Leu Leu Val Ala Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly Asn Arg Ala  
 20 25 30

Asp Arg Val Glu Glu Lys Ala Gln Pro Val Gln Ser Asn Ser Glu Pro  
 35 40 45

Ser Ser Ala Pro Ile Lys Asn Pro Thr Asn Thr Ala Thr Asn Asp Ser  
 50 55 60

Leu His Asp Lys Leu Ser Met Ser Ser His Asp Thr Ser Lys Glu Asn  
 65 70 75 80

Ser Gln Gln Ser Ser Phe Lys Ala Pro Leu Glu Gln Glu Lys Asn Gln  
 85 90 95

Pro Ala Gln Glu Asn Leu Thr Trp Thr Gly Tyr His Val Ser Glu Val  
 100 105 110

Gly Asn Ala Ser Asn Asn Val Asp Lys Asp Asn Val Thr Val Phe Thr  
 115 120 125

Phe Val Lys Tyr Asn Ser Gln Tyr Asn Asp Asp Pro Val Phe Asp Lys  
 130 135 140

Thr Lys Thr Gln Ser Lys Thr Ile Ser Leu Val Asp Gly Lys Asn Glu  
 145 150 155 160

Asn Lys Glu Asp Tyr Tyr Asn Phe Thr Leu Lys Asp Ala Leu Phe Tyr  
 165 170 175

Tyr Gly Ser Tyr Gly Gln Pro Ser Ala Asp Tyr Lys Lys Val Glu Lys  
 180 185 190

Asn Tyr Ile Tyr Ala Ile Lys Pro Asp Ala Ile Asn Asn Glu Asn Leu  
 195 200 205

Asn Ala Leu Thr Ala Thr Tyr Tyr Gln Glu Asp Gly Phe Ile Tyr Ser  
 210 215 220

Val Leu Ser Asp Val Asn Arg Val Gly Ser Glu Tyr Ile Pro Gln Tyr  
 225 230 235 240

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

Tyr Arg Tyr Asn Arg Gly Arg Asp Asp Leu Phe Gln Leu Ser Gly Glu  
 260 265 270

Gly Gln Asn Leu Thr Ile Thr Pro His Lys Asp Asn Pro His Lys Leu  
 275 280 285

Ser Pro Thr Gly Pro Asp Asn Met Ala Met Glu Leu Asn Phe Ile Asn  
 290 295 300

Ala Glu Lys Thr Asp Lys Lys Tyr Val Val Gly Val Gly Lys Ala Glu  
 305 310 315 320

Lys Tyr Tyr Gly Leu Leu Phe Ala Glu Lys Ser His Gln Ala Gln  
 325 330 335

ES 2 371 498 T3

<210> 42  
 <211> 546  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (42B)..(428)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (470).. (470)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (497).. (497)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (499)..(499)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (504)..(504)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (507)..(507)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> (512)..(512)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (519).. (519)  
 <223> A o C o G o T  
 <400> 42

40 gcttgggtatt tacaggggaat ccaacctaataat cccggttttta gacagggttt taatgcaatt 60  
 actgatccca aagaacaatt aattgcttta gaagggtttt ttaatttgat tctgatggat 120  
 45 aaagaaaaaa atgttagaac aacaacgtaa tcctgctgat gcactaactg tatcagtggt 180  
 aaattcacia tctcaagtca caataaacc attgctgat tctgtgaaac aagcattgag 240  
 50 aaattatttg tgcagtttag atggccaaga tgtcaatgag ctttatgaat tagtattagc 300  
 agaagttgag catcctatgt tagatatggt tatgcaatat acacgtggaa atcaaactcg 360  
 55 tgcagcgaca atgttagga ttaaccgtgg cactttacgt aagaaattaa aaaagtacgg 420  
 tatgggtnaa cggaccattg tagtatttaa actagttttg gttatagaan ggcggactta 480

60

ES 2 371 498 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45

```

ggtcgcgctt tttaatntnc attncnnttt cntttttcna aacaatgatt tttacgcct 540
caaatg 546

atgacagtgc ggataggttc ttatcagctt aaaaatcgca tttttcttgc tcctatggct 60
ggcatcactg accaaccatt tcggcgaatc tgcactcatt atggggcagg ttttaactttt 120
tctgaaatga tgtcaacgaa tccgcaagtc tggcataccg aaaaatcgaa actgcgcttg 180
gctcatcadc aagaagcagg aattaatgct gtgcaaatac ctgggtgtga tcccgatgag 240
atggcgaaag ctgctcaaata caatgtagaa tatggggcag aaattattga tatcaatatg 300
ggctgcccag ccaaaaaagt gaatcgtaaa atggcgggct ctgcgctggt acaatatcct 360
gatttgggtca aacaaattct taataaagtt gtgaaatctg ttactgtacc agtgacatta 420
aagataagaa caggctggga taaagacaac cgaaattggt tagaaatcgc taaaattgca 480
gagcaatgtg gtattcaagc actgaccatc cacggacgaa caaggagttg tatgtttgag 540
ggggaggctg aatatgacaa tatcaaggcg gtcaaagagc aactttctat tccgattatt 600
gccaatggcg atattacttc cgctgaaaaa gcaaagtatg ttcttgatta taccaacgca 660
gatgcaataa tgatcggacg tggttcatta ggcaatccgt ggcttttccg agttatggaa 720
agcttaattg aaaaagactc gattgtttta gagccaagtt taaacgagaa atgtaatgtg 780
attttacagc atatccaaga actgcatcaa ttttatggtg tggagaaagg atgtcgtatt 840
gcacgtaaac acgttgcttg gtatttacag ggaatccaac ctaatcccg ttttagacag 900
gcttttaatg caattactga tcccaaagaa caattaattg ctttagaagg tttttttaat 960
ttgattctga tggataaaga aaaaaatggt agaacaacaa cgtaa 1005
  
```

50  
 55

```

<210> 44
<211> 334
<212> PRT
<213> Pasteurella multocida
<400> 44
  
```

```

Met Thr Val Arg Ile Gly Ser Tyr Gln Leu Lys Asn Arg Ile Phe Leu
1           5           10           15

Ala Pro Met Ala Gly Ile Thr Asp Gln Pro Phe Arg Arg Ile Cys Thr
           20           25           30
  
```

60

ES 2 371 498 T3

His Tyr Gly Ala Gly Leu Thr Phe Ser Glu Met Met Ser Thr Asn Pro  
35 40 45

Gln Val Trp His Thr Glu Lys Ser Lys Leu Arg Leu Ala His His Gln  
50 55 60

Glu Ala Gly Ile Asn Ala Val Gln Ile Ala Gly Cys Asp Pro Asp Glu  
65 70 75 80

Met Ala Lys Ala Ala Gln Ile Asn Val Glu Tyr Gly Ala Glu Ile Ile  
85 90 95

Asp Ile Asn Met Gly Cys Pro Ala Lys Lys Val Asn Arg Lys Met Ala  
100 105 110

Gly Ser Ala Leu Leu Gln Tyr Pro Asp Leu Val Lys Gln Ile Leu Asn  
115 120 125

Lys Val Val Lys Ser Val Thr Val Pro Val Thr Leu Lys Ile Arg Thr  
130 135 140

Gly Trp Asp Lys Asp Asn Arg Asn Cys Leu Glu Ile Ala Lys Ile Ala  
145 150 155 160

Glu Gln Cys Gly Ile Gln Ala Leu Thr Ile His Gly Arg Thr Arg Ser  
165 170 175

Cys Met Phe Glu Gly Glu Ala Glu Tyr Asp Asn Ile Lys Ala Val Lys  
180 185 190

Glu Gln Leu Ser Ile Pro Ile Ile Ala Asn Gly Asp Ile Thr Ser Ala  
195 200 205

Glu Lys Ala Lys Tyr Val Leu Asp Tyr Thr Asn Ala Asp Ala Ile Met  
210 215 220

Ile Gly Arg Gly Ser Leu Gly Asn Pro Trp Leu Phe Arg Val Met Glu  
225 230 235 240

Ser Leu Ile Glu Lys Asp Ser Ile Val Leu Glu Pro Ser Leu Asn Glu  
245 250 255

Lys Cys Asn Val Ile Leu Gln His Ile Gln Glu Leu His Gln Phe Tyr  
260 265 270

Gly Val Glu Lys Gly Cys Arg Ile Ala Arg Lys His Val Ala Trp Tyr

ES 2 371 498 T3

	275		280		285														
5	Leu	Gln	Gly	Ile	Gln	Pro	Asn	Pro	Val	Phe	Arg	Gln	Ala	Phe	Asn	Ala			
	290						295					300							
10	Ile	Thr	Asp	Pro	Lys	Glu	Gln	Leu	Ile	Ala	Leu	Glu	Gly	Phe	Phe	Asn			
	305					310					315					320			
15	Leu	Ile	Leu	Met	Asp	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Arg	Thr	Thr	Thr					
					325					330									
20	<210> 45																		
	<211> 43																		
	<212> ADN																		
	<213> Pasteurella multocida																		
25	<400> 45																		
	gcaaaaatttt tggggatggt ctgacctaata tgcaattcaa ata 43																		
	<210> 46																		
	<211> 1869																		
	<212> ADN																		
30	<213> Pasteurella multocida																		
	<400> 46																		

ES 2 371 498 T3

atgaaaaagg	ttattatcat	tggacataaa	cagtctaact	atcaagatgt	tgaaaagggt	60
tttcaatggt	atgggatgaa	tccccgctt	ccatcaaaac	gtgaaaaaat	gtcccccatc	120
gaaattggcc	atgtacttaa	taaagtatta	ccaagtcttg	agcacacacc	taaaaatgta	180
tctttacttt	ctaataagaa	aagcaaaata	aaaaaaggga	attcagccaa	aaataaatct	240
cataagcacg	ctaaaacgaa	cacaatacaa	acgacttcga	gcatctggga	taacttatct	300
ctcgatttga	tgctcgcgaa	tatcgagcaa	aatthttggg	gatggtctga	tcctaattgca	360
attcaaatat	tagattattg	ggctaacctt	gacccaaaca	ttcatttctg	ctttgthtat	420
gataagccag	aaaatttatt	ccaatatcat	agcttagaag	aggctctcaa	attagataaa	480
cacaccgtac	aagaaaaatt	tgaagagtgg	caaacctaca	atgaaaaaat	cctaacttac	540
tttaataaat	ataaagatcg	tagtgtatta	ctgaatacac	aacaactcca	aaatacgaaa	600
aaaacatcac	tgtctgaaat	ttataaacat	atthctgcac	ctgatgcatt	agtcaaaaaa	660
ctgaatgaac	cttctctaaa	taaagagatg	gaaattattg	aagtaaacca	agatttatct	720
caccaagaag	aatgtccact	gtctaacttt	attgtagacc	aaattataaa	aaattctcct	780
actgttacgc	aggtatatga	agaattacag	tcgcatgctg	atctgcctta	tatttcagaa	840
caaaaattag	taaagatgac	cgattttgct	ctccttgcat	ggaaagatat	gattcaaaaa	900
aaagtcgatg	taaatacaata	tcaacatgaa	aaagaattag	aacttagcac	aataaaagaa	960

ES 2 371 498 T3

5 cgtcaattag aggtcacaga gagatatcaa ttgacggaac aaaaactgtc agaaacacaa 1020  
 aaagaaatcg aacaaattaa agatgaaaat agaaaagtaa aatctgaaaa agcaaaactc 1080  
 actgcatctg ttcaatcaac gagcaaaata ctttctgaga aagaaaaaga gatttcttgc 1140  
 ataaaaagtg aaaatacaaa gattaaagaa gaaaaaatta aaattgatga agcataccac 1200  
 10 ttaaccaaga aaaccttgtc ggataaagaa aaagccctca aaacgcatca agatgaaatt 1260  
 gaagcgtca agataatfff taatgaaaat atttccgtac aagaagatat gcaagaaaaa 1320  
 15 tttcaggaag ccaataaaag aaaacaagaa cttgaacaag agctaaaagc catatcggat 1380  
 aagaaagcat tattagaaac agaaaacagc caaaaaaccc aagtatctga gtcttttagaa 1440  
 aatgaaaata aagtgttatt agctcaactc caactcatte aagaagaatt agaaaaactt 1500  
 20 tatattgaca atcaagtatt aaaagctaaa ccacgccttt acggtgcagc tgatcgcata 1560  
 aaaaaccaat taacttatcg actaggttac aaaatacaaa gacatggaag aagtctatff 1620  
 25 ggtctcattt ttcttccttt catcttattt ttcacctate tgggctttaa aagagagatg 1680  
 aaaaagtaag agtgggaatac gctcccacca attcatgaat atgaagatgc gcatgaagcc 1740  
 30 aatcgcatta aaagccattt atcttataaa ttgggcgtcc tctttttgca agaaatcaac 1800  
 aatccgttta agtggcttac tctcccttat aaactgatta aagaaggtaa acgattcaag 1860  
 35 caagggtaa 1869

<210> 47  
 <211> 622  
 <212> PRT  
 40 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 47

45 Met Lys Lys Val Ile Ile Ile Gly His Lys Gln Ser Asn Tyr Gln Asp  
 1 5 10 15  
 Val Glu Lys Val Phe Gln Cys Tyr Gly Met Asn Pro Pro Leu Pro Ser  
 20 25 30  
 50 Lys Arg Glu Lys Met Ser Pro Ile Glu Ile Gly His Val Leu Asn Lys  
 35 40 45  
 55 Val Leu Pro Ser Leu Glu His Thr Pro Lys Asn Val Ser Leu Leu Ser  
 50 55 60  
 60 Asn Lys Lys Ser Lys Ile Lys Lys Gly Asn Ser Ala Lys Asn Lys Ser  
 65 70 75 80



ES 2 371 498 T3

His Lys His Ala Lys Thr Asn Thr Ile Gln Thr Thr Ser Ser Ile Trp  
85 90 95

Asp Asn Leu Ser Leu Asp Leu Met Leu Ala Asn Ile Glu Gln Asn Phe  
100 105 110

Trp Gly Trp Ser Asp Pro Asn Ala Ile Gln Ile Leu Asp Tyr Trp Ala  
115 120 125

Asn Leu Asp Pro Asn Ile His Phe Val Phe Val Tyr Asp Lys Pro Glu  
130 135 140

Asn Leu Phe Gln Tyr His Ser Leu Glu Glu Ala Leu Lys Leu Asp Lys  
145 150 155 160

His Thr Val Gln Glu Lys Phe Glu Glu Trp Gln Thr Tyr Asn Glu Lys  
165 170 175

Ile Leu Thr Tyr Phe Asn Lys Tyr Lys Asp Arg Ser Val Leu Leu Asn  
180 185 190

Thr Gln Gln Leu Gln Asn Thr Lys Lys Thr Ser Leu Ser Glu Ile Tyr  
195 200 205

Lys His Ile Ser Ala Pro Asp Ala Leu Val Lys Lys Leu Asn Glu Pro  
210 215 220

Ser Leu Asn Lys Glu Met Glu Ile Ile Glu Val Asn Gln Asp Leu Ser  
225 230 235 240

His Gln Glu Glu Cys Pro Leu Ser Asn Phe Ile Val Ser Gln Ile Ile  
245 250 255

Lys Asn Ser Pro Thr Val Thr Gln Val Tyr Glu Glu Leu Gln Ser His  
260 265 270

Ala Asp Leu Pro Tyr Ile Ser Glu Gln Lys Leu Val Asn Asp Ala Asp  
275 280 285

Phe Ala Leu Leu Ala Trp Lys Asp Met Ile Gln Lys Lys Val Asp Val  
290 295 300

Asn Gln Tyr Gln His Glu Lys Glu Leu Glu Leu Ser Thr Ile Lys Glu  
305 310 315 320

Arg Gln Leu Glu Val Thr Glu Arg Tyr Gln Leu Thr Glu Gln Lys Leu

ES 2 371 498 T3

				325						330					335
Ser	Glu	Thr	Gln	Lys	Glu	Ile	Glu	Gln	Ile	Lys	Asp	Glu	Asn	Arg	Lys
			340					345					350		
Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Ser	Val	Gln	Ser	Thr	Ser
		355					360					365			
Lys	Ile	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Ile	Ser	Cys	Ile	Lys	Ser	Glu
	370					375					380				
Asn	Thr	Lys	Ile	Lys	Glu	Glu	Lys	Ile	Lys	Ile	Asp	Glu	Ala	Tyr	His
385					390					395					400
Leu	Thr	Lys	Lys	Thr	Leu	Ser	Asp	Lys	Glu	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr	His
				405					410					415	
Gln	Asp	Glu	Ile	Glu	Ala	Leu	Lys	Ile	Ile	Phe	Asn	Glu	Asn	Ile	Ser
			420					425					430		
Val	Gln	Glu	Asp	Met	Gln	Glu	Lys	Phe	Gln	Glu	Ala	Asn	Lys	Arg	Lys
		435					440					445			
Gln	Glu	Leu	Glu	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Lys	Lys	Ala	Leu
	450					455					460				
Leu	Glu	Thr	Glu	Asn	Ser	Gln	Lys	Thr	Gln	Val	Ser	Glu	Ser	Leu	Glu
465				470						475					480
Asn	Glu	Asn	Lys	Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Leu	Gln	Leu	Ile	Gln	Glu	Glu
				485					490					495	
Leu	Glu	Lys	Leu	Tyr	Ile	Asp	Asn	Gln	Val	Leu	Lys	Ala	Lys	Pro	Arg
			500					505					510		
Leu	Tyr	Gly	Ala	Ala	Asp	Arg	Ile	Lys	Asn	Gln	Leu	Thr	Tyr	Arg	Leu
		515					520					525			
Gly	Tyr	Lys	Ile	Gln	Arg	His	Gly	Arg	Ser	Leu	Phe	Gly	Leu	Ile	Phe
	530					535					540				
Leu	Pro	Phe	Ile	Leu	Phe	Phe	Thr	Tyr	Leu	Gly	Phe	Lys	Arg	Glu	Met
545					550					555					560
Lys	Lys	Tyr	Glu	Trp	Asn	Thr	Leu	Pro	Pro	Ile	His	Glu	Tyr	Glu	Asp
				565					570					575	

ES 2 371 498 T3

Ala His Glu Ala Asn Arg Ile Lys Ser His Leu Ser Tyr Lys Leu Gly  
 580 585 590

5

Val Leu Phe Leu Gln Glu Ile Asn Asn Pro Phe Lys Trp Leu Thr Leu  
 595 600 605

10

Pro Tyr Lys Leu Ile Lys Glu Gly Lys Arg Phe Lys Gln Gly  
 610 615 620

15

<210> 48  
 <211> 279  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 48

20

accgcttcct gagctacgcc aaattctcac tgccttacca gtatccgcag aacaagcaga 60  
 25 aatgatgat tacttaacc attttaatcg cagccaagaa ttacttaatt ggcaacattt 120  
 ttttattgcc cagcaacttg ctttcgttaa cgcattggaa aatcaagaat gaaaaaatgg 180  
 30 ttgaaacatt tagatttgag cactggotta caactgtctt ttctgatcag tgggctactt 240  
 tgtctgtttg tcggtggcgt cgggctttat acttggcac 279

35

<210> 49  
 <211> 1983  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 49

40

ES 2 371 498 T3

atgaaaaaat ggttgaaca tttagatttg agcactggct tacaactgtc ttttctgac	60
agtgggctac tttgtctggt tgtcggtggc gtcgggcttt atacttggca gcaacaacgc	120
acggaaatca atttcgcact cgataaagat tttcctaaag tgcaagctgc gtttcaaca	180
gaagaacaaa ttaatatoct ccatcatgcc tttatccatt tggccaatgt caaaaacacc	240
aatgagaaag tcgaacgtta caaccatgca aagcaacagc tttcgacggt aaaagaactg	300
atcattgaat tagacgaaaa tttagatgag gatttgatgg cattattaca acaacaagcc	360
tcacttttag aacaaatata acaaaatata acaggtacgc ttacgttaaa cgatgaactg	420
aataaaacca tttctcaaat caactgggta cataatgatt ttcacaatga attcaccgca	480
cttttgcaag aaatgagctg gcaacaatct actctggcta acaatattgt tcaacagcca	540
cacaacaaac aaaaaatcga acaattaaaa aaactacaac aagaattatt gttagtttac	600
gatttcacta cttatgaaga gcaaattata acggaattac gcaccagat aacagagcca	660
actgaaagca atgtcattcg actacacaat tatttgagct atttatcgtt attaattact	720

ES 2 371 498 T3

aaccgaattc agttgcttgg tcttcattcc tccacgtcaa ccattaaaca aatthtagat	780
gaactgatta actttggctt aaaccacaaa gcaactcccc ccctatttgc aatccgtacc	840
gaactgaacc aacaacgaga acagctgatt caacaaagtg ataagatatt cgaggcattt	900
cgcgagcaaa tcagtactca aattggtaac agtaaacaac aattacattt actgcataat	960
attgtcgaaa aaagtactac attcaacggc gcattaattt tattggtgat gctatttgcg	1020
ggaatthttg tcatcggtat taacttcttt tatattcggt tacgtctctt aaaacgthtt	1080
caacaactta accacgccgt agttcaatta accaatggcg agcccaacgt caaatcgcc	1140
atthtaggca atgatgaatt agggcggatt gctaaattat tgcgcttatt tctgttcgaa	1200
atgaatcaca aaacagaaga gttaaaatcg cgtaatcaag ttctcttaga ggaaatcgaa	1260
caccgtattg aagtacaaac cgcattagaa aatgccccaa atgaactaac ccaagccgca	1320
aaactggctg ctgtcggtaa aaccttgact tcgattagcc atgaaattac acaaccactt	1380
aatgccatga acgcttattt gthtagtgcg aaaaaagccg tgagtaaaca aaacagtgag	1440
gcagcacttg aatacttaaa taaaatcaat catttagttg aacgcacggc gctgattgtc	1500
aaacgcttac ggcaattctc acgccaaagg agcggcaaaa tacaagctgt caatthaatg	1560
gattgtattc aaagcgcgtg ggaattattg gaatcacaac ataaaccgcg tcaaagtcag	1620
ctcatcacgc ccacagattt accactcgta ttaggtgaag atgtccttat cgaacaagtg	1680
thtgtcaatc tcttctcaa tgctthtagaa gccattgaac acacaccgcc ccaaattcat	1740
attgacgttg acagcgataa tgcggaagac ctctgthtat ggatcacoga caatggthcaa	1800
ggttggccct taactgacaa gthattgcaa cthththtga gcagthaaatc gatcaatthta	1860
ggtthtaggac tgtccattag tcaatccatc atggagcaat gtcaaggatc attgaccatt	1920
gcctctactc tcaccataa tgcattagtg atathaaat ttaaggtggc tcaacatgth	1980
taa	1983

ES 2 371 498 T3

<210> 50  
<211> 660  
<212> PRT  
<213> Pasteurella multocida  
<400> 50

5

10 Met Lys Lys Trp Leu Lys His Leu Asp Leu Ser Thr Gly Leu Gln Leu  
1 5 10 15

15 Ser Phe Leu Ile Ser Gly Leu Leu Cys Leu Phe Val Gly Gly Val Gly  
20 25 30

20 Leu Tyr Thr Trp Gln Gln Gln Arg Thr Glu Ile Asn Phe Ala Leu Asp

ES 2 371 498 T3

	35		40		45													
Lys	Asp	Phe	Pro	Lys	Val	Gln	Ala	Ala	Phe	Gln	Thr	Glu	Glu	Gln	Ile			
	50					55					60							
Asn	Ile	Leu	His	His	Ala	Phe	Ile	His	Leu	Val	Asn	Val	Lys	Asn	Thr			
	65				70					75					80			
Asn	Glu	Lys	Val	Glu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala	Lys	Gln	Gln	Leu	Ser	Thr			
				85					90					95				
Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Leu	Asp	Glu	Asn	Leu	Asp	Glu	Asp	Leu			
			100					105					110					
Met	Ala	Leu	Leu	Gln	Gln	Gln	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Ser	Gln			
		115					120						125					
Asn	Ile	Thr	Gly	Thr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	Glu	Leu	Asn	Lys	Thr	Ile			
	130					135						140						
Ser	Gln	Ile	Asn	Trp	Leu	His	Asn	Asp	Phe	His	Asn	Glu	Phe	Thr	Ala			
	145				150					155					160			
Leu	Leu	Gln	Glu	Met	Ser	Trp	Gln	Gln	Ser	Thr	Leu	Ala	Asn	Asn	Ile			
				165					170					175				
Val	Gln	Gln	Pro	His	Asn	Lys	Gln	Lys	Ile	Glu	Gln	Leu	Lys	Lys	Leu			
			180					185						190				
Gln	Gln	Glu	Leu	Leu	Leu	Val	Tyr	Asp	Phe	Thr	Thr	Tyr	Glu	Glu	Gln			
		195					200						205					
Ile	Ile	Thr	Glu	Leu	Arg	Thr	Gln	Ile	Thr	Glu	Pro	Thr	Glu	Ser	Asn			
	210					215						220						
Val	Ile	Arg	Leu	His	Asn	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Leu	Ile	Thr			
	225				230					235					240			
Asn	Arg	Ile	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	His	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Ile	Lys			
				245					250					255				
Gln	Ile	Leu	Asp	Glu	Leu	Ile	Asn	Phe	Gly	Leu	Asn	Pro	Gln	Ala	Leu			
			260					265					270					
Pro	Ala	Leu	Phe	Ala	Ile	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	Gln	Gln	Arg	Glu	Gln			
		275					280						285					

Leu Ile Gln Gln Ser Asp Lys Ile Phe Glu Ala Phe Arg Glu Gln Ile  
 290 295 300

Ser Thr Gln Ile Gly Asn Ser Lys Gln Gln Leu His Leu Leu His Asn  
 305 310 315 320

Ile Val Glu Lys Ser Thr Thr Phe Asn Gly Ala Leu Ile Leu Leu Val  
 325 330 335

Met Leu Phe Ala Gly Ile Phe Val Ile Gly Ile Asn Phe Phe Tyr Ile  
 340 345 350

Arg Leu Arg Leu Leu Lys Arg Phe Gln Gln Leu Asn His Ala Val Val  
 355 360 365

Gln Leu Thr Asn Gly Glu Pro Asn Val Lys Ile Ala Ile Tyr Gly Asn  
 370 375 380

Asp Glu Leu Gly Arg Ile Ala Lys Leu Leu Arg Leu Phe Leu Phe Glu  
 385 390 395 400

Met Asn His Lys Thr Glu Glu Leu Lys Ser Arg Asn Gln Val Leu Leu  
 405 410 415

Glu Glu Ile Glu His Arg Ile Glu Val Gln Thr Ala Leu Glu Asn Ala  
 420 425 430

Gln Asn Glu Leu Thr Gln Ala Ala Lys Leu Ala Ala Val Gly Lys Thr  
 435 440 445

Leu Thr Ser Ile Ser His Glu Ile Thr Gln Pro Leu Asn Ala Met Asn  
 450 455 460

Ala Tyr Leu Phe Ser Ala Lys Lys Ala Val Ser Lys Gln Asn Ser Glu  
 465 470 475 480

Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Asn His Leu Val Glu Arg Thr  
 485 490 495

Ala Leu Ile Val Lys Arg Leu Arg Gln Phe Ser Arg Gln Gly Ser Gly  
 500 505 510

Lys Ile Gln Ala Val Asn Leu Met Asp Cys Ile Gln Ser Ala Trp Glu  
 515 520 525



Leu Leu Glu Ser Gln His Lys Pro Arg Gln Ser Gln Leu Ile Thr Pro  
 530 535 540  
 5 Thr Asp Leu Pro Leu Val Leu Gly Glu Asp Val Leu Ile Glu Gln Val  
 545 550 555 560  
 10 Phe Val Asn Leu Phe Leu Asn Ala Leu Glu Ala Ile Glu His Thr Pro  
 565 570 575  
 15 Pro Gln Ile His Ile Asp Val Asp Ser Asp Asn Ala Glu Asp Leu Cys  
 580 585 590  
 20 Leu Trp Ile Thr Asp Asn Gly Gln Gly Trp Pro Leu Thr Asp Lys Leu  
 595 600 605  
 25 Leu Gln Pro Phe Ser Ser Ser Lys Ser Ile Asn Leu Gly Leu Gly Leu  
 610 615 620  
 30 Ser Ile Ser Gln Ser Ile Met Glu Gln Cys Gln Gly Ser Leu Thr Ile  
 625 630 635 640  
 35 Ala Ser Thr Leu Thr His Asn Ala Leu Val Ile Leu Lys Phe Lys Val  
 645 650 655  
 40 Ala Gln His Val  
 660

<210> 51  
 <211> 93  
 <212> ADN  
 45 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 51

50 atagaaatgg tttatttcca aatttcctca aatttcacct tggcttttaa gaattttggc 60  
 gttgccacta aattacagta gctgttttgt gct 93

55 <210> 52  
 <211> 525  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 52  
 60

ES 2 371 498 T3

atgacacaac aagcgatcct tgccggcggc tgtttttggg gcggtgaggc agtatattaat 60  
 caaattaaag gcgttgaaaa agcgacttca gggtatatta acgggacgac tgaaaatcca 120  
 5 acttaciaaag aagtatgtac cggtgaaacg ggcatgcggg aagcggtaaa agtggaaatc 180  
 gatgacgacag tgattagtta tgaaaaatta ttagacatct tcttttctat ccataatcca 240  
 10  
 acccaattaa atcaccaggg cgaagatgtg ggaacgcaat atcgcacagg gatttactat 300  
 15 ttaaatgatg aacaagaaca gctggcaaat aagaaaattg cagaattaca accgcacttt 360  
 gccgaaaaaa ttgtcactga agtgctgcca gcacaaactt tttatcccgc agaagattat 420  
 20 caccaaggct atttattgca gaaccacaaa aacagctact gtaatttagt ggcaacgcca 480  
 aaattcttaa aagccaaggc gaaatttgag gaaatttgga agtaa 525  
 25  
 <210> 53  
 <211> 174  
 <212> PRT  
 30 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 53

ES 2 371 498 T3

Met Thr Gln Gln Ala Ile Phe Ala Gly Gly Cys Phe Trp Cys Val Glu  
 1 5 10 15

Ala Val Phe Asn Gln Ile Lys Gly Val Glu Lys Ala Thr Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Ile Asn Gly Thr Thr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Glu Val Cys Thr Gly  
 35 40 45

Glu Thr Gly His Ala Glu Ala Val Lys Val Glu Phe Asp Ala Thr Val  
 50 55 60

Ile Ser Tyr Glu Lys Leu Leu Asp Ile Phe Phe Ser Ile His Asn Pro  
 65 70 75 80

Thr Gln Leu Asn His Gln Gly Glu Asp Val Gly Thr Gln Tyr Arg Thr  
 85 90 95

Gly Ile Tyr Tyr Leu Asn Asp Glu Gln Glu Gln Leu Ala Asn Lys Lys  
 100 105 110

Ile Ala Glu Leu Gln Pro His Phe Ala Glu Lys Ile Val Thr Glu Val  
 115 120 125

Leu Pro Ala Gln Thr Phe Tyr Pro Ala Glu Asp Tyr His Gln Gly Tyr  
 130 135 140

Leu Leu Gln Asn Pro Gln Asn Ser Tyr Cys Asn Leu Val Ala Thr Pro  
 145 150 155 160

Lys Phe Leu Lys Ala Lys Val Lys Phe Glu Glu Ile Trp Lys  
 165 170

<210> 54  
 <211> 772  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (537)..(537)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (540)..(540)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (545)..(545)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (581)..(581)  
 20 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (613)..(614)  
 <223> A o C o G o T  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (665)..(665)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (668)..(668)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (685)..(686)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (700)..(704)  
 40 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (721)..(723)  
 <223> A o C o G o T  
 45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (732)..(732)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 50 <221> misc\_feature  
 <222> (734)..(734)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (737)..(738)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (748)..(748)  
 60 <223> A o C o G o T  
 <220>

ES 2 371 498 T3

```

<221> misc_feature
<222> (752)..(752)
<223> A o C o G o T
<220>
5 <221> misc_feature
   <222> (755)..(755)
   <223> A o C o G o T
   <220>
10 <221> misc_feature
    <222> (770)..(772)
    <223> A o C o G o T
    <400> 54
      gcataggtat cctttgcttg acataaaatg actacaggct aaagcacagg atattaaaag      60
15      ggcaaaagaa taagttactt ttgcgacacg catcgcaaaa gtaaaataaa tttagtcaat      120
      caatttagct tgttttaaga aataactcaat gccatgtttt ttgatcggta aggtgacatg      180
20      atcggctact gtttttagct gatgatgtgc attccccatt gcaacaccca ctctgcccgt      240
      gcttaacatt tcaatatcat tcaagccatc accaaatgcc atcacatfff ccattgcaaa      300
25      gccaaaatgt tgaattgcac aagcgatacc cgtagctfff gagatfffft catcaaataa      360

30      atcaaccgag tatttatgcc agegtaccga ttgtaatcct ttcagtacac cagaatcttg      420
      gacaaattga tcttgcgtag catcataaaa agccagtatc tgaaaaacat catgactggt      480
35      taaaatagtc tttatctaca tgataatgcc cttttagcgg atccaatgca tcacganctn      540
      gatcngttat cgctgaaact gcggtatctg tcggtgacac ntgcgcataa caatctgatg      600
40      ttgatcacia aannacgaac tctggatfff gcttagataa ggatctccga tggctatcta      660
      tactnatntg acatcatgta cacanncatg tcgtgccatn nnnacttag cgaagtgcag      720
45      nnnccgtcat cngncannca gacatcanc cnaentgcta ttaggataan nn              772

<210> 55
<211> 687
<212> ADN
<213> Pasteurella multocida
50 <400> 55

```

ES 2 371 498 T3

atgcgggggat ttggtttttg ttgtgttcac tgccagcaac cgttagccat tgcacatcat 60  
 ggattatgta gtcgctgtaa tcagcaaate agacgttttg cttattgtgg ccattgtggg 120  
 5 aaggaattaa cacgagatgc actacgttgt gggcattggt tacaacataa agccagttgg 180  
 gatcgcacatgg tgatcgttgg tcactatgtc gatcccttat cttgtttaat tcaccgtttt 240  
 10 aaattccaac atgccttctt tttagaocgt actttagcac gcctgctatt attagcgcctc 300  
 tatcatgcaa gacgtactca tggacttatt tggccagaag tacttttgcc ggtgccttta 360  
 15 catcgtttac gtcattggca acgtggttac aatcaatctg cgttgattgc aaactatctt 420  
 gcgcattggc taaagatacc ctgcatcat gattttctac agcgtattaa acatactcat 480  
 acgcaacgtg gtttaagtgc aacggaacga agaaaaaatt tacgccacgc atttegtctt 540  
 20 catccaaaaa gtcaaacgca tcgctatcaa tctgttgcat taattgatga tgtaattaca 600  
 acaggtgcaa cgttgaatga gttggcactc ttattaaaaa aagcaggtgt tgagcatatt 660  
 25 caagtttggg gattagcaaa aacgtaa 687

<210> 56  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 56

35 Met Arg Gly Phe Gly Phe Cys Cys Val His Cys Gln Gln Pro Leu Ala  
 1 5 10 15

40 Ile Ala His His Gly Leu Cys Ser Arg Cys Asn Gln Gln Ile Arg Arg  
 20 25 30

45

50

55

Phe Ala Tyr Cys Gly His Cys Gly Lys Glu Leu Thr Arg Asp Ala Leu  
 35 40 45

Arg Cys Gly His Cys Leu Gln His Lys Ala Ser Trp Asp Arg Met Val  
 50 55 60

Ile Val Gly His Tyr Val Asp Pro Leu Ser Cys Leu Ile His Arg Phe  
 65 70 75 80

Lys Phe Gln His Ala Phe Phe Leu Asp Arg Thr Leu Ala Arg Leu Leu  
 85 90 95

Leu Leu Ala Leu Tyr His Ala Arg Arg Thr His Gly Leu Ile Trp Pro  
 100 105 110

Glu Val Leu Leu Pro Val Pro Leu His Arg Leu Arg His Trp Gln Arg  
 115 120 125

Gly Tyr Asn Gln Ser Ala Leu Ile Ala Asn Tyr Leu Ala His Trp Leu  
 130 135 140

Lys Ile Pro Cys Asp His Asp Phe Leu Gln Arg Ile Lys His Thr His  
 145 150 155 160

Thr Gln Arg Gly Leu Ser Ala Thr Glu Arg Arg Lys Asn Leu Arg His  
 165 170 175

Ala Phe Arg Leu His Pro Lys Ser Gln Thr His Arg Tyr Gln Ser Val  
 180 185 190

Ala Leu Ile Asp Asp Val Ile Thr Thr Gly Ala Thr Leu Asn Glu Leu  
 195 200 205

Ala Leu Leu Leu Lys Lys Ala Gly Val Glu His Ile Gln Val Trp Gly  
 210 215 220

Leu Ala Lys Thr  
 225

<210> 57  
 <211> 700  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (498)..(498)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (540)..(540)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (562)..(562)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (565)..(565)  
 20 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (572)..(573)  
 <223> A o C o G o T  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (577)..(577)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (584)..(584)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (587)..(588)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (591)..(592)  
 40 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (594)..(595)  
 <223> A o C o G o T  
 45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (599)..(599)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 50 <221> misc\_feature  
 <222> (604)..(604)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (619)..(619)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (623)..(623)  
 60 <223> A o C o G o T  
 <220>



<221> misc\_feature  
 <222> (625)..(625)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> (627)..(627)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (633)..(633)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (638)..(638)  
 15 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (644)..(645)  
 <223> A o C o G o T  
 20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (653)..(653)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (657) .. (657)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (661)..(661)  
 30 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (664)..(664)  
 35 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (666)..(666)  
 <223> A o C o G o T  
 40 <220>  
 <221> misc feature  
 <222> (671)..(671)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 45 <221> misc\_feature  
 <222> (673)..(674)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (678)..(678)  
 50 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (682)..(682)  
 55 <223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (686)..(687)  
 <223> A o C o G o T  
 60 <220>  
 <221> misc\_feature

ES 2 371 498 T3

```

<222> (694)..(694)
<223> A o C o G o T
<220>
<221> misc_feature
5 <222> (696)..(697)
<223> A o C o G o T
<220>
<221> misc_feature
<222> (699)..(700)
10 <223> A o C o G o T
<400> 57

    tgccgaccac tccaaaggac aaaaaatgag cctatttgcg attttctatc tgttctctggc      60
15    gtatttatta ggatctgttt ctagtgcaat tttattgtgt cgtttagcgg ggttgctga      120
    tcctagagaa agtggttctc ataatcccgg tgcaaccaat gtattgcgta ttgggtgggcg      180
20    ttgggtggca ttgagtgtac tcctgtttga tatgetcaaa ggtatgttac ctgtttggtt      240
    aggctattat cttggtttga ctcatthtga gttagggatg gtggcattag gtgcttggtt      300
25    agggcacatt ttcccaatct tctttaaatt taaaggcgga aaaggggtag caacggcatt      360
    tggtgctatt gcgccgattt catgggggtgt cgcaggcagt atgctgggca cttggttatt      420
30    gattttcttc gtgagtggtt attcttcgct cagtgcagtg atgaccgcgc ttctgggtacc      480
    tttctatgtg tgggtggtnta agcccagatt tactttccct gtcgcttagt gtggttgcttn      540
    tcgattatcg ccatcatgac anatncagcg tnngtgnngtg ggcnagnnga nnanngtgna      600
35    atanactgaa aacaaaaang atnantnagc tanttacnaa aaanngacag acngtcnttt      660
    natncngtt nanntatnga cntatnngat ggcntnncnn      700
40

<210> 58
<211> 606
<212> ADN
45 <213> Pasteurella multocida
<400> 58

50

55

60

```

ES 2 371 498 T3

	atgagcctat ttgcgatttt ctatctgttc ctggcgtatt tattaggatc tgtttctagt	60
	gcaatthttat tgtgtcgttt agcggggttg cctgatccaa gagaaagtgg ttctcataat	120
5	cccggtgcaa ocaatgtcct gcgtattggt gggcgttggg tggcattgag tgtactcctg	180
	tttgatatgc ttaaaggtat gttacctgtt tggttaggct attatcttgg tttgactcat	240
10	tttgaattag ggatggtggc attagggtgct tgtttagggc acatthttcc aatcttcttt	300
	aaatthaaag gcggaaaagg ggtggcaacg gcatttggtg ctattgcgcc gatctcatgg	360
15	ggtgtcgtctg gcagtatgct aggcacttgg ttattgattt tcttcgtgag tggttattct	420
	tcgctcagtg cggatgatgac cgcgcttctg gtacctttct atgtgtggtg gtttaagccc	480
20	gagtttactt tcctctgctc tttagtgtgt tgcttgttga tttatcgcca tcatgacaat	540
	attcagcgtt tgtggcgtgg gcaagaagac aaagtgtgga ataaactgaa aaacaaaaaa	600
25	gattaa	606
	<210> 59	
	<211> 201	
	<212> PRT	
30	<213> Pasteurella multocida	
	<400> 59	

Met Ser Leu Phe Ala Ile Phe Tyr Leu Phe Leu Ala Tyr Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

Ser Val Ser Ser Ala Ile Leu Leu Cys Arg Leu Ala Gly Leu Pro Asp  
 20 25 30

Pro Arg Glu Ser Gly Ser His Asn Pro Gly Ala Thr Asn Val Leu Arg  
 35 40 45

Ile Gly Gly Arg Trp Val Ala Leu Ser Val Leu Leu Phe Asp Met Leu  
 50 55 60

Lys Gly Met Leu Pro Val Trp Leu Gly Tyr Tyr Leu Gly Leu Thr His  
 65 70 75 80

Phe Glu Leu Gly Met Val Ala Leu Gly Ala Cys Leu Gly His Ile Phe  
 85 90 95

Pro Ile Phe Phe Lys Phe Lys Gly Gly Lys Gly Val Ala Thr Ala Phe  
 100 105 110

Gly Ala Ile Ala Pro Ile Ser Trp Gly Val Ala Gly Ser Met Leu Gly  
 115 120 125

Thr Trp Leu Leu Ile Phe Phe Val Ser Gly Tyr Ser Ser Leu Ser Ala  
 130 135 140

Val Met Thr Ala Leu Leu Val Pro Phe Tyr Val Trp Trp Phe Lys Pro  
 145 150 155 160

Glu Phe Thr Phe Pro Val Ala Leu Val Cys Cys Leu Leu Ile Tyr Arg  
 165 170 175

His His Asp Asn Ile Gln Arg Leu Trp Arg Gly Gln Glu Asp Lys Val  
 180 185 190

Trp Asn Lys Leu Lys Asn Lys Lys Asp  
 195 200

ES 2 371 498 T3

<210> 60  
<211> 188  
<212> ADN  
<213> Pasteurella multocida  
<400> 60

5  
atcccaccga taaaaccaa tggattacgc gcagtttcca aataaacagg ggtagcacca 60  
10 gcttgaatta atgcaccatg atggatagat ttgtgattgt tacgatcaaa gagcacaaga 120  
tcacccgggtg tgagtaacgc attggtgacg actttatttg cagaagatgt cccatttaag 180  
15 acgaagta 188

<210> 61  
<211> 2163  
<212> ADN  
<213> Pasteurella multocida  
<400> 61

20

atgctaaatt taaaaattgc atatagccca ttaattcgac cttatthttca taaaaataga 60  
 gaactcgtht ctgttcaaga aacagatttc accgacattg gtgcaattat cctgagttct 120  
 gaagatattg aagattatat tgatagtata caagcaactg aatttaatat tccggtcttt 180  
 gttgctgtca ttgaagggtca atthtttagat cctcaattct ttgacaaaagt ctatcacggt 240  
 caagatctca acaactacga catcaaccta tacagtcgcc aaattgaaac tgcggcgcggt 300  
 thttacgaag aaaaaatcct cccaccttht thtaaaatgc taagtgaata tgtggaaatg 360  
 gggaaattctg cthttgattg tccgggacac caaggtggac aatatttccg taaacatcct 420  
 gcaggacggt atctctatga thttctacggt gaaaatattt tccgctcaga tatctgtaat 480  
 gccgatgtaa aattaggcga thttgctaac catgaaggag ccgcttgtga tgetcaaaaa 540  
 cacgctgctc aagtctthaa tgctgataaa acctacttgc thttaaatgg gacatcttct 600  
 gcaaaaaag tcgtcaccaa tgcgthtactc acaccgggtg atcttgtgct cthttgatcgt 660  
 aacaatcaca aatctatcca tcacggtgca ttaattcaag ctggtgctac cctgthttat 720  
 ttggaaactg cgcgtaatcc atthggthtt atcgggtggga tcgatagcca thgtthttgat 780  
 gaagattatt tgaaatctth aattaaagat gttgcgcctg aaaaactaac acaagcacgt 840  
 cthttccggt tagccgtht tccagctcggc acttatgacg gaaccatcta taatgcgcgc 900  
 caagtcgtag ataaaattgg tcatttatgt gactacatct tgthttgatc tgcgtgggta 960  
 ggttatgaac aattcattcc aatgatgaaa gattgctcac cgtcttctgct tgaattaaat 1020  
 gaaaatgatc ccggcatcat cgtgacacaa tcagtacaca aacaacaagc cggcttctca 1080  
 caagcctcac aaattcacia aaaagacaag cacattaaag gtcaacagcg ctactgtaat 1140  
 cataaacgct thtaaatgc atctatgtta cacgcctcca ccagccatt ctaccctctt 1200  
 thttgccacac thgatgtcaa tgcaaaaatt caaggtacce ctgcgggtat tegtthtatgg 1260  
 catgactgtg tcaaaatcgg gatagaagca cgtaaaatgg tgctgaatag thttgatctg 1320

ES 2 371 498 T3

atcaaaccgt ttattccgcc ttatgtcaat ggcaaaaaat ggcaagacta cgatacagaa 1380  
 5 gaaatggcaa atgatttaac attcttcaaa ttccatgctg atgataaatg gcatcaattt 1440  
 gaaggctatg tagataacca atatthttggt gatccatgta aattcatgct aacgacgccg 1500  
 ggtattgata ttgaaacagg tgaatacгаа gacttcgggtg tccctgctac gattcttgct 1560  
 10 aattatttac gtgaaaacgg cattattccg gaaaaatgtg acttaaactc aattctcttc 1620  
 ttattaacgc cagcagaaac cctcaccaa atgcaaagt ttggtgcaca aattgcggca 1680  
 15 tttgaacaac acatcaaaaa agattcotta ctaaaagaag tcttaccaag tgthtatcac 1740  
 aacaatgaaa aacgctatga aggttatacc atccgtcgtc tttgccaaga aatgcatgat 1800  
 20 ttgtatgtca gccgtaacgt gaaaacttta caacgcaact tattcagaaa agcgcacctg 1860  
 cctgaatatg tgatgaatcc acatcaagct aatcttgaat ttgttcgtaa tcgtgtagaa 1920  
 ctggttccac taaccgaaat cgttaatcgc attgcggcag aaggagcact tccttatcca 1980  
 25 ccgggtgtgc tttgtgtcgt accgggtgaa aatggagtc agactgcaca ggaatatttc 2040  
 ttagcactcg aagaaggcat taatttatta ccaggthtcg caccagaaat tcaaggggta 2100  
 30 tatctacaac aagatgcaga tggacgtatt cgtgcttatg gctacgtatt aactgaaaac 2160  
 taa 2163

35 <210> 62  
 <211> 720  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 62

40

45

50

55

60

ES 2 371 498 T3

Met Leu Asn Leu Lys Ile Ala Tyr Ser Pro Leu Ile Arg Pro Tyr Phe  
 1 5 10 15

His Thr Asn Arg Glu Leu Val Ser Val Gln Glu Thr Asp Phe Thr Asp  
 20 25 30

Ile Gly Ala Ile Ile Leu Ser Ser Glu Asp Ile Glu Asp Tyr Ile Asp  
 35 40 45

Ser Ile Gln Ala Thr Glu Phe Asn Ile Pro Val Phe Val Ala Val Ile  
 50 55 60

Glu Gly Gln Phe Leu Asp Pro Gln Phe Phe Asp Lys Val Tyr His Val  
 65 70 75 80

Gln Asp Leu Asn Asn Tyr Asp Ile Asn Leu Tyr Ser Arg Gln Ile Glu  
 85 90 95



ES 2 371 498 T3

Thr Ala Ala Arg Phe Tyr Glu Glu Lys Ile Leu Pro Pro Phe Phe Lys  
 100 105 110

Met Leu Ser Glu Tyr Val Glu Met Gly Asn Ser Ala Phe Asp Cys Pro  
 115 120 125

Gly His Gln Gly Gly Gln Tyr Phe Arg Lys His Pro Ala Gly Arg Tyr  
 130 135 140

Leu Tyr Asp Phe Tyr Gly Glu Asn Ile Phe Arg Ser Asp Ile Cys Asn  
 145 150 155 160

Ala Asp Val Lys Leu Gly Asp Leu Leu Ile His Glu Gly Ala Ala Cys  
 165 170 175

Asp Ala Gln Lys His Ala Ala Gln Val Phe Asn Ala Asp Lys Thr Tyr  
 180 185 190

Phe Val Leu Asn Gly Thr Ser Ser Ala Asn Lys Val Val Thr Asn Ala  
 195 200 205

Leu Leu Thr Pro Gly Asp Leu Val Leu Phe Asp Arg Asn Asn His Lys  
 210 215 220

Ser Ile His His Gly Ala Leu Ile Gln Ala Gly Ala Thr Pro Val Tyr  
 225 230 235 240

Leu Glu Thr Ala Arg Asn Pro Phe Gly Phe Ile Gly Gly Ile Asp Ser  
 245 250 255

His Cys Phe Asp Glu Asp Tyr Leu Lys Ser Leu Ile Lys Asp Val Ala  
 260 265 270

Pro Glu Lys Leu Thr Gln Ala Arg Pro Phe Arg Leu Ala Val Ile Gln  
 275 280 285

Leu Gly Thr Tyr Asp Gly Thr Ile Tyr Asn Ala Arg Gln Val Val Asp  
 290 295 300

Lys Ile Gly His Leu Cys Asp Tyr Ile Leu Phe Asp Ser Ala Trp Val  
 305 310 315 320

Gly Tyr Glu Gln Phe Ile Pro Met Met Lys Asp Cys Ser Pro Leu Leu  
 325 330 335

ES 2 371 498 T3

Leu Glu Leu Asn Glu Asn Asp Pro Gly Ile Ile Val Thr Gln Ser Val  
 340 345 350

His Lys Gln Gln Ala Gly Phe Ser Gln Ala Ser Gln Ile His Lys Lys  
 355 360 365

Asp Lys His Ile Lys Gly Gln Gln Arg Tyr Cys Asn His Lys Arg Phe  
 370 375 380

Asn Asn Ala Phe Met Leu His Ala Ser Thr Ser Pro Phe Tyr Pro Leu  
 385 390 395 400

Phe Ala Thr Leu Asp Val Asn Ala Lys Ile Gln Gly Thr Pro Ala Gly  
 405 410 415

Ile Arg Leu Trp His Asp Cys Val Lys Ile Gly Ile Glu Ala Arg Lys  
 420 425 430

Met Val Leu Asn Ser Cys Asp Leu Ile Lys Pro Phe Ile Pro Pro Tyr  
 435 440 445

Val Asn Gly Lys Lys Trp Gln Asp Tyr Asp Thr Glu Glu Met Ala Asn  
 450 455 460

Asp Leu Thr Phe Phe Lys Phe His Ala Asp Asp Lys Trp His Gln Phe  
 465 470 475 480

Glu Gly Tyr Val Asp Asn Gln Tyr Phe Val Asp Pro Cys Lys Phe Met  
 485 490 495

Leu Thr Thr Pro Gly Ile Asp Ile Glu Thr Gly Glu Tyr Glu Asp Phe  
 500 505 510

Gly Val Pro Ala Thr Ile Leu Ala Asn Tyr Leu Arg Glu Asn Gly Ile  
 515 520 525

Ile Pro Glu Lys Cys Asp Leu Asn Ser Ile Leu Phe Leu Leu Thr Pro  
 530 535 540

Ala Glu Thr Leu Thr Lys Met Gln Ser Leu Val Ala Gln Ile Ala Ala  
 545 550 555 560

Phe Glu Gln His Ile Lys Lys Asp Ser Leu Leu Lys Glu Val Leu Pro  
 565 570 575

Ser Val Tyr His Asn Asn Glu Lys Arg Tyr Glu Gly Tyr Thr Ile Arg  
 580 585 590  
 5  
 Arg Leu Cys Gln Glu Met His Asp Leu Tyr Val Ser Arg Asn Val Lys  
 595 600 605  
 10  
 Thr Leu Gln Arg Asn Leu Phe Arg Lys Ala Thr Leu Pro Glu Tyr Val  
 610 615 620  
 15  
 Met Asn Pro His Gln Ala Asn Leu Glu Phe Val Arg Asn Arg Val Glu  
 625 630 635 640  
 20  
 Leu Val Pro Leu Thr Glu Ile Val Asn Arg Ile Ala Ala Glu Gly Ala  
 645 650 655  
 25  
 Leu Pro Tyr Pro Pro Gly Val Leu Cys Val Val Pro Gly Glu Lys Trp  
 660 665 670  
 30  
 Ser Gln Thr Ala Gln Glu Tyr Phe Leu Ala Leu Glu Glu Gly Ile Asn  
 675 680 685  
 35  
 Leu Leu Pro Gly Phe Ala Pro Glu Ile Gln Gly Val Tyr Leu Gln Gln  
 690 695 700  
 40  
 Asp Ala Asp Gly Arg Ile Arg Ala Tyr Gly Tyr Val Leu Thr Glu Asn  
 705 710 715 720

<210> 63  
 <211> 101  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 63

50 gaaaaattag agaaacaaat agaatcactc aatctacaag aagattgttt tcttttagga 60  
 aataaagata atccgtatcc attaataaaa aatgctaagc t 101

55 <210> 64  
 <211> 1179  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 60 <400> 64

ES 2 371 498 T3

	atgaatattc tatttgtaca taaaagcctt gtcgctcggag gcgctgaaag aattctaatt	60
5	aactatntaa atattctatc tggatttaat gaattcaaag ttacattact tttactagaa	120
	aataaagggtg aagataacaa aaacatcaat caaatcaata aaaatattaa tatagatttt	180
10	attctagaca atagtgagtc aagaaaatat actgaatttg aaaataaaat aaatcagcgc	240
	agcatcttca gaaaaatata taaatataaa ctatcaaaaa ttaataagat agaagaaaat	300
15	agaataaaaa aatacattaa aaacaaggaa tttgatttaa ttgntaattt taactcacac	360
	cttgatttct tcttatcaaa caatcaaatt aacatcccga taattcgttg gatacacggt	420
20	caagctcatt tagatgactg gtgcaacaga agagaatggt accaaaacat tcttctaaa	480
	cacacttatt tctttgcaat taaaaagaa atgcaaaaa atgctcaaaa aatcttacta	540
25	tcttacggga tccaagaaga agaatacat atcttataca atcctattga tattaatttt	600
	gtccaggaac aatcaatcaa aaatactcat gacattcatc ataaacaata cttaatnac	660
30	gtttctcgtt tagatataga taagaatcat gaacaaatga ttaatattta ttatcaatta	720
	aaaaaacgag gtatccaaga aaaattatat attgttgggg atggtgagtg tcgagaaaaa	780
35	ttagagaaac aatagaatc actcaatcta caagaagatt gctttctttt aggaaataaa	840
	gataatccgt atccattaat aaaaaatgct aagctattct tacacacctc tttgaaagag	900
40	gggttaccga cagttatcct agaaagcatg gcctgcggta cacctgtaat atccatggac	960
	tgcctaccg gtccgaaaga aattctccga ggaggagaat ttggaggatt agtaaattta	1020
45	ggtgacgaga atgcttttat acaaaaaaca ctctctttcc ttcaaaatca agatgaatac	1080
	aaccattatt gtaataaatt agaacaagct atttctcctt ttcgctttga agaaatcagc	1140
	actatactct tatctcattt acaaaaattc aatagttaa	1179

50 <210> 65  
 <211> 392  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 65  
 55

60

ES 2 371 498 T3

1 Met Asn Ile Leu Phe Val His Lys Ser Leu Val Val Gly Gly Ala Glu  
 5                   5                   10                   15  
 20 Arg Ile Leu Ile Asn Tyr Leu Asn Ile Leu Ser Gly Phe Asn Glu Phe  
 25                   20                   25                   30  
 40 Lys Val Thr Leu Leu Leu Leu Glu Asn Lys Gly Glu Asp Asn Lys Asn  
 45                   35                   40                   45  
 60 Ile Asn Gln Ile Asn Lys Asn Ile Asn Ile Asp Phe Ile Leu Asp Asn  
 65                   50                   55                   60  
 80 Ser Glu Ser Arg Lys Tyr Thr Glu Phe Glu Asn Lys Ile Asn Gln Arg  
 85                   65                   70                   75                   80  
 90 Ser Ile Phe Arg Lys Ile Tyr Lys Tyr Lys Leu Ser Lys Ile Asn Lys

ES 2 371 498 T3

				85						90				95			
Ile	Glu	Glu	Asn	Arg	Ile	Lys	Lys	Tyr	Ile	Lys	Asn	Lys	Glu	Phe	Asp		
			100					105					110				
Leu	Ile	Val	Asn	Phe	Asn	Ser	His	Leu	Asp	Phe	Phe	Leu	Ser	Asn	Asn		
		115					120					125					
Gln	Ile	Asn	Ile	Pro	Ile	Ile	Arg	Trp	Ile	His	Gly	Gln	Ala	His	Leu		
	130					135					140						
Asp	Asp	Trp	Cys	Asn	Arg	Arg	Glu	Trp	Tyr	Gln	Asn	Ile	Leu	Pro	Lys		
145					150					155					160		
His	Thr	Tyr	Phe	Phe	Ala	Ile	Thr	Lys	Glu	Met	Gln	Lys	Asn	Ala	Gln		
			165						170					175			
Lys	Ile	Leu	Leu	Ser	Tyr	Gly	Ile	Gln	Glu	Glu	Arg	Ile	His	Ile	Leu		
			180					185					190				
Tyr	Asn	Pro	Ile	Asp	Ile	Asn	Phe	Val	Gln	Glu	Gln	Ser	Ile	Lys	Asn		
		195					200					205					
Thr	His	Asp	Ile	His	His	Lys	Gln	Tyr	Leu	Ile	Asn	Val	Ser	Arg	Leu		
	210					215					220						
Asp	Ile	Asp	Lys	Asn	His	Glu	Gln	Met	Ile	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Gln	Leu		
225					230					235					240		
Lys	Lys	Arg	Gly	Ile	Gln	Glu	Lys	Leu	Tyr	Ile	Val	Gly	Asp	Gly	Glu		
				245					250					255			
Cys	Arg	Glu	Lys	Leu	Glu	Lys	Gln	Ile	Glu	Ser	Leu	Asn	Leu	Gln	Glu		
			260					265						270			
Asp	Cys	Phe	Leu	Leu	Gly	Asn	Lys	Asp	Asn	Pro	Tyr	Pro	Leu	Ile	Lys		
		275					280					285					
Asn	Ala	Lys	Leu	Phe	Leu	His	Thr	Ser	Leu	Lys	Glu	Gly	Leu	Pro	Thr		
	290					295					300						
Val	Ile	Leu	Glu	Ser	Met	Ala	Cys	Gly	Thr	Pro	Val	Ile	Ser	Met	Asp		
305					310					315					320		
Cys	Pro	Thr	Gly	Pro	Lys	Glu	Ile	Leu	Arg	Gly	Gly	Glu	Phe	Gly	Gly		
				325					330					335			

ES 2 371 498 T3

Leu Val Asn Leu Gly Asp Glu Asn Ala Phe Ile Gln Lys Thr Leu Ser  
 340 345 350

5

Phe Leu Gln Asn Gln Asp Glu Tyr Asn His Tyr Cys Asn Lys Leu Glu  
 355 360 365

10

Gln Ala Ile Ser Pro Phe Arg Phe Glu Glu Ile Ser Thr Ile Leu Leu  
 370 375 380

15

Ser His Leu Gln Lys Phe Asn Ser  
 385 390

20

<210> 66  
 <211> 222  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 66

25

agcagagtaa gttctttttg cttgttaagt aacaaagctt attgtgacga cacgcggggtc 60  
 taaattgtgt tttccccagc gagtagcgta aagtaatctt gtccagcaag gatagcgatc 120  
 ccgacagaca tcgcttatgt aatggactga gcgtaatcta attgccgcat gccatgtttc 180  
 aatttctttg aactcttgta tcgtccatga aaattcaggg cg 222

30

35

40

<210> 67  
 <211> 831  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 67

45

50

55

60

ES 2 371 498 T3

atgtctgaca aaatttcacc caataagata tctgcgcttt cttctacttt attaactact 60  
 5 ctttgggcaa aagcagttga atatgataaa gccaatccat tactgaaaga tcgcgaagca 120  
 gcaagaatga aaaaacagat tgactatgac tttcaaaagt ttgaatctgc tcatttatca 180  
 10 caagtgggat gttgtggacg cgcaaaatta tttgatcaag aaagcttaa atttctttca 240  
 cagcaccaag acgcggttgt tgtgcagctt ggtgcgggct tagatgcacg ctttgaacgc 300  
 ttaggcaaac cacaagtcag tgcgtggtat gatttagact tacctgaagt catcaatata 360  
 15 cgtcgccaac ttttaccaga aacgagtaat cattatttgg ctgactcact tttcaatata 420  
 gattggatga aaacagttag tcaacataac aaaccgttt tattaattct tgaaggcgta 480  
 20 ttgatgtttt ttcctaaaga acaagtcaaa cagtttattg cctctgtggc tgaaaactta 540  
 cctaacagca caatgatttt cgatattgtg cccccaatgg cagtcggctg tagtaaatac 600  
 25 cacgatgcac tcaaaaaaat agacagtcaa gaacgccttg aattttcatg gacaatacaa 660  
  
 30 gagatcaaag aaattgaaac atggcatgcg gcaattaaat tacgctcagt ccattacata 720  
 agcgatgtct gtcgggatcg ctatccttgc tggacaagat tactttacgc tactcgctgg 780  
 35 ggaaaacaca atttagacco gcgtgctgtc acaataagct ttgttactta a 831  
  
 <210> 68  
 <211> 276  
 40 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 68  
  
 45



Met Ser Asp Lys Ile Ser Pro Asn Lys Ile Ser Ala Leu Ser Ser Thr  
1 5 10 15

Leu Leu Ile Thr Leu Trp Ala Lys Ala Val Glu Tyr Asp Lys Ala Asn  
20 25 30

Pro Leu Leu Lys Asp Arg Glu Ala Ala Arg Met Lys Lys Gln Ile Asp  
35 40 45

Tyr Asp Phe Gln Lys Phe Glu Ser Ala His Leu Ser Gln Val Gly Cys  
50 55 60

Cys Gly Arg Ala Lys Leu Phe Asp Gln Glu Ser Leu Lys Phe Leu Ser  
65 70 75 80

Gln His Gln Asp Ala Val Val Val Gln Leu Gly Ala Gly Leu Asp Ala  
85 90 95

Arg Phe Glu Arg Leu Gly Lys Pro Gln Val Ser Ala Trp Tyr Asp Leu  
100 105 110

Asp Leu Pro Glu Val Ile Asn Ile Arg Arg Gln Leu Leu Pro Glu Thr  
115 120 125

Ser Asn His Tyr Leu Ala Asp Ser Leu Phe Asn Thr Asp Trp Met Lys  
130 135 140

Thr Val Ser Gln His Asn Lys Pro Val Leu Leu Ile Leu Glu Gly Val  
145 150 155 160

Leu Met Phe Phe Pro Lys Glu Gln Val Lys Gln Phe Ile Ala Ser Val  
165 170 175

Ala Glu Asn Leu Pro Asn Ser Thr Met Ile Phe Asp Ile Val Pro Pro  
180 185 190

5 Met Ala Val Gly Arg Ser Lys Tyr His Asp Ala Leu Lys Lys Ile Asp  
195 200 205

10 Ser Gln Glu Arg Pro Glu Phe Ser Trp Thr Ile Gln Glu Ile Lys Glu  
210 215 220

15 Ile Glu Thr Trp His Ala Ala Ile Lys Leu Arg Ser Val His Tyr Ile  
225 230 235 240

20 Ser Asp Val Cys Arg Asp Arg Tyr Pro Cys Trp Thr Arg Leu Leu Tyr  
245 250 255

25 Ala Thr Arg Trp Gly Lys His Asn Leu Asp Pro Arg Val Val Thr Ile  
260 265 270

30 Ser Phe Val Thr  
275

35 <210> 69  
<211> 55  
<212> ADN  
<213> Pasteurella multocida

40 <400> 69  
tcgatgaaaa acgccattat ggcatggaa tcagctgcaa aattctcact ccaca 55  
<210> 70  
<211> 1314  
<212> ADN  
<213> Pasteurella multocida  
<400> 70

ES 2 371 498 T3

atggtattac	actatacccc	tcatcaatcc	gccccacgca	acacaacatt	cgttgcggaa	60
attcttgatc	ttgattatca	aggacgtggg	gtagccaaag	tacaaggcaa	aacgtgggtc	120
attgaaaatg	cactgccaca	agaaaaagtg	gaagtgcgca	ttgtcgatga	aaaacgccat	180
tatggtcacg	ggatcagctg	caaaattctc	actccacatc	cagatcgcca	gtcagcaaaa	240
tgtgcttact	atgcccagtg	cggtggttgc	caaagtcaac	atattccaat	tgacatgcaa	300
cgtcaggcta	aacaacaagc	cttattccaa	cgcttacaac	aattacaacc	tcaagcgacc	360
ttcatgccca	tgatcgtcgc	agcgccttgg	cattatcgcc	gtcgtgtgcg	tttaagcgtg	420
cggtttcatc	ccaaaagcaa	acaacttgcg	atgggtttgc	gtcagagaaa	tactcaacaa	480
atcgtgaate	tgacgacattg	tgatgtgctt	gaaatcccct	taagtcaact	cttacctaaa	540
ctacatttgt	tgttttcaac	atggtccttg	cctaaaaacc	tagggcatgt	ggagttagtg	600
catgcggata	atggaattgc	gatgttatta	cgccatacag	gaaatttagc	gcaaactgac	660
cgcactttat	taaccaatth	tgcgcaacaa	gaaaacttaa	tgttgthtgt	acaagatgat	720
caacagatca	cccaactaca	tggcgaggca	ccttactaca	tactacgcga	tggcaccaaa	780
ttacagtttg	atatccgtga	ctttatccaa	gtgaatgctg	ttgtaaataca	gaaaatgatt	840
gatactgctc	ttgagtgggt	ggaactcaca	tcgaacgata	acgtattaga	tttgthttht	900
ggtatgggaa	acttcaccct	ccaatcagt	cgtcagggtca	atcaggthtgt	gggcattgaa	960
ggcgtaggag	aatgggtgga	gaaagcaaaa	cgaaatgcgg	aacaaaatca	atgtgataat	1020
gtccaattct	atcaggcgaa	tttagatcaa	cctthtgtgc	aacaacattg	ggcgagccaa	1080
cattthtaata	aaatthtact	ggaccaccca	cgtaacggcg	cggcattthgc	cttacatgcc	1140
ttatgtgaat	tgggocgcaga	aaaaatctta	tatgthtctc	gcaatcctgc	tacattagta	1200
cgtgatacag	cgatthtatt	acaatthaac	taccgactta	agaaagtcgc	aatgatcgat	1260
atgthcccca	atacaggaca	thtagaatcc	atcagthtth	thgaaaaaga	atag	1314

<210> 71  
 <211> 437  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 71

5

10

Met Val Leu His Tyr Thr Pro His Gln Ser Ala Pro Arg Asn Thr Thr  
 1 5 10 15

15

Phe Val Ala Glu Ile Leu Asp Leu Asp Tyr Gln Gly Arg Gly Val Ala  
 20 25 30

20

Lys Val Gln Gly Lys Thr Trp Phe Ile Glu Asn Ala Leu Pro Gln Glu  
 35 40 45

25

Lys Val Glu Val Arg Ile Val Asp Glu Lys Arg His Tyr Gly His Gly  
 50 55 60

30

Ile Ser Cys Lys Ile Leu Thr Pro His Pro Asp Arg Gln Ser Ala Lys  
 65 70 75 80

35

Cys Ala Tyr Tyr Ala Gln Cys Gly Gly Cys Gln Ser Gln His Ile Pro  
 85 90 95

40

Ile Asp Met Gln Arg Gln Ala Lys Gln Gln Ala Leu Phe Gln Arg Leu  
 100 105 110

45

Gln Gln Leu Gln Pro Gln Ala Thr Phe Met Pro Met Ile Val Ala Ala  
 115 120 125

50

ES 2 371 498 T3

Pro Trp His Tyr Arg Arg Arg Val Arg Leu Ser Val Arg Phe His Pro  
 130 135 140

Lys Ser Lys Gln Leu Ala Met Gly Leu Arg Gln Arg Asn Thr Gln Gln  
 145 150 155 160

Ile Val Asn Leu Gln His Cys Asp Val Leu Glu Ile Pro Leu Ser Gln  
 165 170 175

Leu Leu Pro Lys Leu His Leu Leu Phe Ser Thr Trp Ser Leu Pro Lys  
 180 185 190

Asn Leu Gly His Val Glu Leu Val His Ala Asp Asn Gly Ile Ala Met  
 195 200 205

Leu Leu Arg His Thr Gly Asn Leu Ala Gln Thr Asp Arg Thr Leu Leu  
 210 215 220

Thr Asn Phe Ala Gln Gln Glu Asn Leu Met Leu Phe Val Gln Asp Asp  
 225 230 235 240

Gln Gln Ile Thr Gln Leu His Gly Glu Ala Pro Tyr Tyr Ile Leu Arg  
 245 250 255

Asp Gly Thr Lys Leu Gln Phe Asp Ile Arg Asp Phe Ile Gln Val Asn  
 260 265 270

Ala Val Val Asn Gln Lys Met Ile Asp Thr Ala Leu Glu Trp Leu Glu  
 275 280 285

Leu Thr Ser Asn Asp Asn Val Leu Asp Leu Phe Cys Gly Met Gly Asn  
 290 295 300

Phe Thr Leu Pro Ile Ser Arg Gln Val Asn Gln Val Val Gly Ile Glu  
 305 310 315 320

Gly Val Gly Glu Met Val Glu Lys Ala Lys Arg Asn Ala Glu Gln Asn  
 325 330 335

Gln Cys Asp Asn Val Gln Phe Tyr Gln Ala Asn Leu Asp Gln Pro Phe  
 340 345 350

Val Gln Gln His Trp Ala Ser Gln His Phe Asn Lys Ile Leu Leu Asp  
 355 360 365

5 Pro Pro Arg Thr Gly Ala Ala Phe Ala Leu His Ala Leu Cys Glu Leu  
 370 375 380

10 Gly Ala Glu Lys Ile Leu Tyr Val Ser Cys Asn Pro Ala Thr Leu Val  
 385 390 395 400

15 Arg Asp Thr Ala Ile Leu Leu Gln Phe Asn Tyr Arg Leu Lys Lys Val  
 405 410 415

20 Ala Met Ile Asp Met Phe Pro Asn Thr Gly His Leu Glu Ser Ile Ser  
 420 425 430

25 Leu Phe Glu Lys Glu  
 435

30 <210> 72  
 <211> 598  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (412)..(412)  
 <223> A o C o G o T

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (451)..(451)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>

40 <221> misc\_feature  
 <222> (471)..(471)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>

45 <221> misc\_feature  
 <222> (503)..(503)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>

50 <221> misc\_feature  
 <222> (546)..(546)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>

55 <221> misc\_feature  
 <222> (562)..(564)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>

60 <221> misc\_feature  
 <222> (576)..(576)  
 <223> A o C o G o T  
 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> (588)..(590)

ES 2 371 498 T3

<223> A o C o G o T  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (595)..(595)  
 <223> A o C o G o T  
 <400> 72

10    **tcagtacttt gcttgcttaa gcaagtaaaa agtgcggtca ttttagcaa aaataaaggg    60**  
       **cttctgtttg gaagcccttt gtgtattgca agttagtctt ttttatgagt gtattcttta    120**  
 15    **tacatcgctt caatttgtgc tttatagcgt tccaaaatca ctttacgacg gagtttcaat    180**  
       **gtcggagtaa tttcttccat ttttgtggta aatgcctgag gtaataaagt gaatttttta    240**  
       **at ttgctcaa agctaggcaa ttctttttgt aatcattaa tacgctgttc aacatttga    300**  
 20    **agaatatcag aatgtttaat gagttctaaa cgatcgtgat attttatatt taattgtttg    360**  
       **gcgtattctt caagactatt aaagcaaggc acaataagcg ctgagacata tnttttgga    420**  
 25    **tccgcaatga ctgcaatttg ttcaataaat ntatctttac ccactttggt ntcaatatat    480**  
       **tgtggagcaa tatattttcc atnggagggt ttcattaact ctttgatagc atctgtaata    540**  
 30    **tataantacc ttgtggatca amncccagc atcacnagtt tttaaaannn gtctnctg    598**

<210> 73  
 <211> 561  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (560)..(561)  
 <223> A o C o G o T  
 <400> 73

45    **gagcaaagta gctgtccgcc gtatattgta agaagttggc ataagaatta acgctaact    60**  
       **tgaccgcac gcccatcgga tctaaacgac ctacatgtac gccggtacct ttacttaaac    120**  
 50    **tttcaattac ttttgggtgtg aattgtggct ccgcaaataa gcaattcact ttatgttctt    180**  
       **taatttcccg cttaattttc gctaacgtct tagctcccgg cgccaccaac ggattaattg    240**

55

60

ES 2 371 498 T3

	tgaaataacc ggtttgtttt aagccataag cattattgaa ataactatac gcatcatgga	300
5	aaacataaaa ccctttttct ttaactggtg cgagttgctg ttttaattttc tcgctttgtt	360
	cagctaaagt gogggttaa atctgccaat tttgcgcaat tttctctttt ctctctggat	420
	aagcttccgt taaacgtgtt gctaagcgtg tcgcgacaat tttgctaate tctggcgaat	480
10	accacacatg ccagttagta ctgtgatcat gctcgtgttc atgtgcgtgg tcatgtttat	540
	gctcatggtc gtgtttgtgn n	561
15	<210> 74	
	<211> 575	
	<212> ADN	
	<213> Pasteurella multocida	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (574)..(575)	
	<223> A o C o G o T	
	<400> 74	
25	ttacttgctt aagcaagcaa agtagctgtc cgccgtatat tgtaagaagt tggcataaga	60
	attaacgcct aacttgaccg catcgcccat cggatctaaa cgacctacat gtacgcccgt	120
30	acctttactt aaactttcaa ttacttttgg tgtgaattgt ggctccgcaa ataagcaatt	180
	cactttatgt tctttaattt cccgcttaat tttcgctaac gtcttagctc ccggcgccac	240
35	caacggatta attgtgaaat aaccggtttg ttttaagcca taagcattat tgaaataact	300
	atacgcatca tggaaaacat aaaacccttt ttctttaact ggtgcgagtt gctgtttaat	360
40	tttctcgctt tgttcageta aagtgcgggt aaattctgcc aaattttgcy caattttctc	420
	ttttctctct ggataagctt ccgttaaacy tgttgctaag cgtgtecgya caattttgct	480
45	aatctctggc gaataccaca catgccagtt agtactgtga tcatgctcgt gttcatgtgc	540
	gtggcatgtt ttatgctcat ggtcgtgttt gtggn	575
50	<210> 75	
	<211> 1101	
	<212> ADN	
	<213> Pasteurella multocida	
	<400> 75	
55		



ES 2 371 498 T3

atggcaogtt tcattaagac attgaaaaaa accgcattag cggcaagtat tgcttcttta 60  
 5 gcaactgtgg caaatgcgac gattgtgact tcgattaaac cattagggtt tattgettca 120  
 tcgattgctg atggggtaac agacactgaa gtattagtcc ctgcgggtgc ttcaccacat 180  
 gattacagct taaaaccctc agatatacaa aaattacagg gggcggaatt aatcctgtgg 240  
 10 gtcggggaag acattgatgc tttccttgat aaaacattac gtccaatgcc ttttaaaaag 300  
  
 15 gtgtaagta ttgctgattt tgcggaatt ggtggtttgc ttgaaggatga agcacatgat 360  
 cataaacatg agcatgatca tactcacaaa cagcaccagc atcacaaca cgaccacgat 420  
 20 cacaacacg accacgatca caaacatgag cagatcata aacacgacca cgatcacaaa 480  
 catgaccagc atcacaaca cgaccatgct cacaagcatg agcacgatca caaacacgac 540  
 25 catgagcata aacatgacca cgcacatgga cagagcatg atcacagtac taactggcat 600  
 gtgtggtatt cgccagagat tagcaaaatt gtcgcgacac gcttagcaac acgtttaacg 660  
 gaagcttatc cagagaaaaa agagaaaatt gcgcaaaatt tggcagaatt taaccgtact 720  
 30 ttagctgaac aaagcgagaa aattaaacag caactcgac cagttaaaga aaaagggtt 780  
 tatgttttcc atgatgcgta tagctatttc aataatgctt atggcttaaa acaaaccggt 840  
 35 tatttcacaa ttaatccgtt ggtggcgccg ggagctaaga cgtagcgaa aattaagcag 900  
 gaaattaaag aacataaagt gaattgctta tttgcgagc cacaattcac accaaaagta 960  
 40 attgaaagtt taagtaaagg taccggtgta catgtaggtc gtttagatcc gatggcgat 1020  
 gcggtcaagt taggcgttaa ttcttatgcc aacttcttac aatatacggc ggacagctac 1080  
 45 tttgcttgct taagcaagta a 1101

<210> 76  
 <211> 366  
 50 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 76

55

60

Met Ala Arg Phe Ile Lys Thr Leu Lys Lys Thr Ala Leu Ala Ala Ser  
 1 5 10 15  
 5  
 Ile Ala Ser Leu Ala Thr Val Ala Asn Ala Thr Ile Val Thr Ser Ile  
 20 25 30  
 10  
 Lys Pro Leu Gly Phe Ile Ala Ser Ser Ile Ala Asp Gly Val Thr Asp  
 35 40 45  
 15  
 Thr Glu Val Leu Val Pro Ala Gly Ala Ser Pro His Asp Tyr Ser Leu  
 50 55 60  
 20  
 Lys Pro Ser Asp Ile Gln Lys Leu Gln Gly Ala Glu Leu Ile Leu Trp  
 65 70 75 80  
 25  
 Val Gly Glu Asp Ile Asp Ala Phe Leu Asp Lys Thr Leu Arg Pro Met  
 85 90 95  
 30

Pro Phe Lys Lys Val Leu Ser Ile Ala Asp Phe Ala Glu Ile Gly Gly  
 100 105 110

Leu Leu Glu Gly Glu Ala His Asp His Lys His Glu His Asp His Thr  
 115 120 125

His Lys His Asp His Asp His Lys His Asp His Asp His Lys His Asp  
 130 135 140

His Asp His Lys His Glu His Asp His Lys His Asp His Asp His Lys  
 145 150 155 160

His Asp His Asp His Lys His Asp His Ala His Lys His Glu His Asp  
 165 170 175

His Lys His Asp His Glu His Lys His Asp His Ala His Gly His Glu  
 180 185 190

His Asp His Ser Thr Asn Trp His Val Trp Tyr Ser Pro Glu Ile Ser  
 195 200 205

Lys Ile Val Ala Thr Arg Leu Ala Thr Arg Leu Thr Glu Ala Tyr Pro  
 210 215 220

Glu Lys Lys Glu Lys Ile Ala Gln Asn Leu Ala Glu Phe Asn Arg Thr  
 225 230 235 240

Leu Ala Glu Gln Ser Glu Lys Ile Lys Gln Gln Leu Ala Pro Val Lys  
 245 250 255

Glu Lys Gly Phe Tyr Val Phe His Asp Ala Tyr Ser Tyr Phe Asn Asn  
 260 265 270

Ala Tyr Gly Leu Lys Gln Thr Gly Tyr Phe Thr Ile Asn Pro Leu Val  
 275 280 285

Ala Pro Gly Ala Lys Thr Leu Ala Lys Ile Lys Gln Glu Ile Lys Glu  
 290 295 300

His Lys Val Asn Cys Leu Phe Ala Glu Pro Gln Phe Thr Pro Lys Val  
 305 310 315 320

Ile Glu Ser Leu Ser Lys Gly Thr Gly Val His Val Gly Arg Leu Asp  
 325 330 335

Pro Met Gly Asp Ala Val Lys Leu Gly Val Asn Ser Tyr Ala Asn Phe

ES 2 371 498 T3

340

345

350

5

Leu Gln Tyr Thr Ala Asp Ser Tyr Phe Ala Cys Leu Ser Lys  
 355 360 365

10

<210> 77

<211> 70

<212> ADN

15 <213> Pasteurella multocida

<400> 77

20

gctttgcatt tgagtcataa aatagtacag tacggtaatt ttctggatga ataccttttt 60

tcatattggc 70

25

<210> 78

<211> 267

<212> ADN

30 <213> Pasteurella multocida

<400> 78

atgaaaaaag gtattcatcc agaaaattac cgtactgtac tattttatga ctcaaatgca 60

35

aagcaagggt ttttaatccg ctcttgcgcc agaaccacaa cgaccatgaa atgggaagat 120

ggtcatgaat atcctgtctt tatgtgtgat acctcctcag catcacaccc gtactataca 180

40

ggtaaaacac gtcaaattgc gaatgaaggc cgtgcaagcg actttgtcaa tcgctacggc 240

aaatttgga cattaataatc aaaataa 267

45

<210> 79

<211> 88

<212> PRT

50 <213> Pasteurella multocida

<400> 79

55

60

5 Met Lys Lys Gly Ile His Pro Glu Asn Tyr Arg Thr Val Leu Phe Tyr  
 1 5 10 15  
 10 Asp Ser Asn Ala Lys Gln Gly Phe Leu Ile Arg Ser Cys Ala Arg Thr  
 20 25 30  
 15 Thr Thr Thr Met Lys Trp Glu Asp Gly His Glu Tyr Pro Val Phe Met  
 35 40 45  
 20 Cys Asp Thr Ser Ser Ala Ser His Pro Tyr Tyr Thr Gly Lys Thr Arg  
 50 55 60  
 25 Gln Ile Ala Asn Glu Gly Arg Ala Ser Asp Phe Val Asn Arg Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 30  
 35 Lys Phe Gly Thr Leu Lys Ser Lys  
 85  
 40 <210> 80  
 <211> 506  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 80  
 45  
 50  
 55  
 60

ES 2 371 498 T3

5      tgctccaact ctactttcaa cctatcctct gtccatgttc ttggaaacat cgtggataca      60  
       cctttatttc cctttttctc caaaacttcg gggcagtagg agatcaacac cctcgtttca      120  
 10     tagaccccat ttgggtattc cttaatcacc ttatctacaa tcacattgcc taagatgggtg      180  
       tgtcttaacg ctcccatgta aaaaaatggt caattttctca aaacaaaact ttttcaaaat      240  
 15     tgaccgcact ttttcttcta actgttcctt ttcagaaaat caacaccttc acttaagaaa      300  
       accctacgc atattttctc atcagggcaa tgatagcttg agagctagga cgatgggact      360  
 20     catatTTTTT tatcccctca agtaattcat gttgtccatt aaaataatgt acgtttccac      420  
       ctttatccag catcaattta agcagatcta gcgctttcag ggacataacc tgtcattgcc      480  
       aatggaatca ottggtctcg atttgg    506

25     <210> 81  
       <211> 348  
       <212> ADN  
       <213> Pasteurella multocida  
       <400> 81

30     atgagagcgt taagacacac caccttaggc aatgtgattg tggataaggt gattaaggaa      60  
       taccCAAATg gggtttatga agcgaggggtg ttgatcccta acccgaaagc ccaaaccgat      120  
 35     cctaccgccc cgaagtTTTT ggagaaaagg ggaataaag gtgtatccac gatgtttcca      180  
       agaacatgga cagaggatag gttgaaagtg gagttggagc atgcgtttaa aaatgggata      240  
 40     cacgataaag ggcaagtatg gactgggata actaaatcag gtgttaaagt acaatgggat      300  
       agaagtgaaa aaggtgagat aaccagtgtt catccaatct tagaataa                      348

45     <210> 82  
       <211> 115  
       <212> PRT  
       <213> Pasteurella multocida  
       <400> 82

50

55

60

5 Met Arg Ala Leu Arg His Thr Thr Leu Gly Asn Val Ile Val Asp Lys  
 1 5 10 15

10 Val Ile Lys Glu Tyr Pro Asn Gly Val Tyr Glu Ala Arg Val Leu Ile

15 Pro Asn Pro Lys Ala Gln Thr Asp Pro Thr Ala Pro Lys Phe Leu Glu  
 20 35 40 45

20 Lys Arg Gly Asn Lys Gly Val Ser Thr Met Phe Pro Arg Thr Trp Thr  
 50 55 60

25 Glu Asp Arg Leu Lys Val Glu Leu Glu His Ala Phe Lys Asn Gly Ile  
 65 70 75 80

30 His Asp Lys Gly Gln Val Trp Thr Gly Ile Thr Lys Ser Gly Val Lys  
 85 90 95

35 Val Gln Trp Tyr Arg Ser Glu Lys Gly Glu Ile Thr Ser Val His Pro  
 100 105 110

40 Ile Leu Glu  
 115

<210> 83  
 <211> 243  
 <212> ADN  
 45 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 83

gccgatatgg tacgtgtcga cattatgatc aatgggtgagc gtgtcgatgc gttagcgtta 60

50 atcgtgcata aagataatgc accttatcgt ggtcgtgaat tagtggaaaa aatgcgtgag 120

ctcattccac gtcaacaatt tgatattgcg attcaagcgg cgattggtaa ccacattatt 180

55 gcccgttcta ccgtcaaaca attacgtaaa aacgtattag caaaatgta tggtgggtgac 240

gtg 243

60

ES 2 371 498 T3

<210> 84  
<211> 1797  
<212> ADN  
<213> Pasteurella multocida  
<400> 84

5  
10  
15  
20

atgaagaata tacgtaactt ttctattatt gcacacattg accacggtaa atcgacactc 60  
tctgaccgcc ttattcaaac ttgcggtggc ttatctgacg gtgaaatgga agcccaagtg 120  
ttggattcca tggatcttga acgtgaacgt gggattacga tcaaagcaca aagtgtgacc 180  
ttaaattaca aagcgaaaga tggcgaaacc tatcaattaa atttcatcga tacgccaggt 240  
cacgttgact tctcttatga agtatcgcgt tctttagcgg cttgtgaagg cgcattatta 300  
gtggtggatg cgggacaagg tgtcaggcca caaactttgg ctaactgcta taccgcaatt 360



gaaatgaatt tagaagtggg gccgatttta aacaaaatcg acttgcccgc ggcagatcct 420  
 gaacgcggtg cagaagaaat tgaagacatt gtcggtattg acgcgatgga agcgggtgcgc 480  
 tgttcagcaa aaaccggtgt gggatttgaa gatgtggtgg aagaaattgt gcataaaatc 540  
 cctgcacccg aaggggatcc gaatgcacca ttacaagcct tgattatcga ctcggtggttt 600  
 gataactact taggcgtagt atcttttagtg cgcattaaaa acggcacatt acgcaaaggc 660  
 gataaaatca aagtgatgtc tacagggcaa tcttacaatg tggatcgtct tggatatttc 720  
 accccaaaaa aagtcgatac caccatttta aattgtgggtg aagtgggttg ggtgggtgtc 780  
 gccattaaag atattttagg ggcacccgtg ggtgatacgc ttacttcgca caacaatcca 840  
 gcttcttctg tcctgccggg ttttaagaaa gttaagccac aggtgatgac cggtttattc 900  
 ccaattagct ctgatgatta tgaagcattc cgtgatgccc tcggtaaact tagtctaaac 960  
 gatgcgcatc tattctatga accagaaaac tccaccgcac ttggtttcgg tttccggtgt 1020  
 ggtttcttag gacttctcca catggagatt attcaagagc gtttagagcg cgaatacgat 1080  
 cttgatctga ttaccacagc accgacagta gtgtatgaag tggaaaaaac cgacggtgaa 1140  
 gtgatttatg tggatagccc atcaaaatta ccgccaactca acaacattac ggagattcgt 1200  
 gaaccgattg cagaatgtaa catgctgtta ccacaaacct acttaggtaa cgtcattacg 1260  
 ctctgtgtag aaaaacgcgg tgtacaaacc aatatggttt accatggtaa ccaagtggca 1320  
 ttgacctatg aatcccaat gggcgaagtg gtactggatt tcttcgaccg cttaaaatca 1380  
 acttctcgtg gttatgcttc cttagattat ggtttcaaac gttccaagc cgccgatatg 1440  
 gtacgtgtcg acattatgat caatggtgag cgtgtcgtatg cgttagcgtt aatcgtgcat 1500  
 aaagataatg caccttatcg tggtcgtgaa ttagtggaaa aaatgcgtga gctcattcca 1560  
 cgtcaacaat ttgatattgc gattcaagcg gcgattggta accacattat tgcccgttct 1620  
 actgtcaaac aattacgtaa aaacgtatta gcaaaatggt atggtgggtga cgttagccgt 1680  
 aagaaaaaac tcttacagaa acaaaaagaa ggtaaaaaac gcatgaagtc tttgggtaac 1740  
 gtcgaagtac cacaagaagc cttcttagcg attttacatg tcggaaaaga caataa 1797

ES 2 371 498 T3

<210> 85  
<211> 598  
<212> PRT  
<213> Pasteurella multocida  
<400> 85

5

Met Lys Asn Ile Arg Asn Phe Ser Ile Ile Ala His Ile Asp His Gly  
1 5 10 15

10

15

ES 2 371 498 T3

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

ES 2 371 498 T3

	260				265				270						
Thr	Leu	Thr	Ser	His	Asn	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Val	Leu	Pro	Gly	Phe
		275					280					285			
Lys	Lys	Val	Lys	Pro	Gln	Val	Tyr	Ala	Gly	Leu	Phe	Pro	Ile	Ser	Ser
	290					295					300				
Asp	Asp	Tyr	Glu	Ala	Phe	Arg	Asp	Ala	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Leu	Asn
305					310					315					320
Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Tyr	Glu	Pro	Glu	Asn	Ser	Thr	Ala	Leu	Gly	Phe
				325					330					335	
Gly	Phe	Arg	Cys	Gly	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	His	Met	Glu	Ile	Ile	Gln
			340					345					350		
Glu	Arg	Leu	Glu	Arg	Glu	Tyr	Asp	Leu	Asp	Leu	Ile	Thr	Thr	Ala	Pro
		355					360					365			
Thr	Val	Val	Tyr	Glu	Val	Glu	Lys	Thr	Asp	Gly	Glu	Val	Ile	Tyr	Val
	370					375					380				
Asp	Ser	Pro	Ser	Lys	Leu	Pro	Pro	Leu	Asn	Asn	Ile	Thr	Glu	Ile	Arg
385					390					395					400
Glu	Pro	Ile	Ala	Glu	Cys	Asn	Met	Leu	Leu	Pro	Gln	Thr	Tyr	Leu	Gly
				405					410					415	
Asn	Val	Ile	Thr	Leu	Cys	Val	Glu	Lys	Arg	Gly	Val	Gln	Thr	Asn	Met
			420					425					430		
Val	Tyr	His	Gly	Asn	Gln	Val	Ala	Leu	Thr	Tyr	Glu	Ile	Pro	Met	Gly
		435					440					445			
Glu	Val	Val	Leu	Asp	Phe	Phe	Asp	Arg	Leu	Lys	Ser	Thr	Ser	Arg	Gly
	450					455					460				
Tyr	Ala	Ser	Leu	Asp	Tyr	Gly	Phe	Lys	Arg	Phe	Gln	Ala	Ala	Asp	Met
465					470					475					480
Val	Arg	Val	Asp	Ile	Met	Ile	Asn	Gly	Glu	Arg	Val	Asp	Ala	Leu	Ala
				485					490					495	
Leu	Ile	Val	His	Lys	Asp	Asn	Ala	Pro	Tyr	Arg	Gly	Arg	Glu	Leu	Val
			500					505					510		

5  
 Glu Lys Met Arg Glu Leu Ile Pro Arg Gln Gln Phe Asp Ile Ala Ile  
 515 520 525

10  
 Gln Ala Ala Ile Gly Asn His Ile Ile Ala Arg Ser Thr Val Lys Gln  
 530 535 540

15  
 Leu Arg Lys Asn Val Leu Ala Lys Cys Tyr Gly Gly Asp Val Ser Arg  
 545 550 555 560

20  
 Lys Lys Lys Leu Leu Gln Lys Gln Lys Glu Gly Lys Lys Arg Met Lys  
 565 570 575

25  
 Ser Leu Gly Asn Val Glu Val Pro Gln Glu Ala Phe Leu Ala Ile Leu  
 580 585 590

30  
 His Val Gly Lys Asp Lys  
 595

30  
 <210> 86  
 <211> 147  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 35  
 <400> 86

40  
 aaaagttcga cttccgtaat cggtttttta gttaattggt caatattgcg taataaacga 60  
 cgttctcttg gttcaacaaa taacaatgca cgccctgtac gtccggcacg ccctgtacga 120  
 ccaatacggg ggacataaga ctcagca 147

45  
 <210> 87  
 <211> 1833  
 <212> ADN  
 50  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 87

55

60

ES 2 371 498 T3

atgactgaaa caacaatgac tttcaatgat ttaggcttgc ctgaatttct tcttaacgcc 60  
gtctctgact taggcttga aacccttct ccaattcaac aaagttgtat cccaaacctg 120  
ttaaattgggc atgatgtgct aggtatggca caaactggaa gtggtaaaac cgccgccttt 180  
tcactccctt tattagcaca aattgattta gataaaaaat atccacaaat gttagtgatg 240  
gcaccgacac gtgagttagc catccaagta gcagatgect gtgagcactt ttgcaaatat 300  
gcgaaaaata ccaatattgt taccctttat ggtggccaac gctatgacat tcaattgcgt 360  
gctttacgcc aaggtgctca ggttgtagtg gggacacctg gtcgtatfff agatcacatt 420  
cgtcgtggca ctttagattt gtctaattta cgttttatgg tgttagatga agcggacgaa 480

ES 2 371 498 T3

atgttacgta tgggctttat tgatgatggt gaaacgggtga tggcagaatt accagaacaa 540  
 catcagactg cactttttctc agccaccatg ccagatccaa ttcgtcgtat tactaagcgt 600  
 tttatgaaag atccgaaaga gattaaaatt aaatcgacgc aaacgacgaa tccagatatt 660  
 acacagagtt gttggtatgt gcatggtttc cgtaaaaatg atgccttatt acgtttctta 720  
 gaagtagaaa aatttgatgc cgcgattatc tttactcgta ctaaaacggg gacattagat 780  
 gtaacggaat tgttggaana acatggtttc cgtgccgcag cattaatgg cgatatgaca 840  
 caacaattac gtgaacaaac gcttgatcgt ttaagaaatg gtagtttaga tatccttggtg 900  
 gcaaccgatg tggcggcgcg tggtttagat gtggagcgcg ttagcctcgt agtgaactat 960  
 gatattccat tagatgctga gtcttatggt caccgtattg gtcgtacagg gcgtgcagga 1020  
 cgtacagggc gtgcattggt atttggtgaa ccaagagaac gtcgtttatt acgtaatatt 1080  
 gaacaattaa ctaaaaaacc gattacggaa gtcgaagtgc caaatcatga ggtactacaa 1140  
 gcttgtcgcc gtgagaaatt taaagccaaa attacagtcc aattagagca tcatgattta 1200  
 ggactttatc gtagcttact agaagatatg ttcaccgcgg atcaagatca ggaagatatt 1260  
 gcggcggcga tgttgatggt gttgcaaggt aaacaaaagc ttattttacc agccgatcca 1320  
 attattgatc gtaaaaacttc acgtgggtgat cgtggcgagc gtcgtgaacg tgggtggacgt 1380  
 gaaaatccac gttcagcaga gcgtcgtggt tacggtacac cgcaggcgat ggatttatat 1440  
 cgtattgaag taggacgttt agatggcgcg gaagtccgtc atattggttg ggcgattgcc 1500  
 aatgaaggtg atatcaatag tcgttatatt ggtcatatta aattatatga tgattacacc 1560  
 acgattgaat taccacaagg tatgccgaaa gaattattag gtgtatttgc gaaaacacgc 1620  
 gtgatgaaca aacaaatgca gatgtcattt gtgggagcgt ctaatgcagg ttcaagccgt 1680  
 gatcgcgatg atttcgctga ccgccgtggt ggaaaacgta aaggacgcgg cgatgaacca 1740  
 cgttttgggc gtgaagatcg taaatttaaa gaaaaaagtc agcgcacttt taatgatcgc 1800  
 ccacgcagag aaagacgtga acgccaaaag taa 1833

ES 2 371 498 T3

<210> 88  
<211> 610  
<212> PRT  
<213> Pasteurella multocida  
<400> 88

5

10 Met Thr Glu Thr Thr Met Thr Phe Asn Asp Leu Gly Leu Pro Glu Phe  
1 5 10 15

15 Leu Leu Asn Ala Val Ser Asp Leu Gly Phe Glu Thr Pro Ser Pro Ile  
20 25 30

20



ES 2 371 498 T3

Gln Gln Ser Cys Ile Pro Asn Leu Leu Asn Gly His Asp Val Leu Gly  
 35 40 45

Met Ala Gln Thr Gly Ser Gly Lys Thr Ala Ala Phe Ser Leu Pro Leu  
 50 55 60

Leu Ala Gln Ile Asp Leu Asp Lys Lys Tyr Pro Gln Met Leu Val Met  
 65 70 75 80

Ala Pro Thr Arg Glu Leu Ala Ile Gln Val Ala Asp Ala Cys Glu His  
 85 90 95

Phe Cys Lys Tyr Ala Lys Asn Thr Asn Ile Val Thr Leu Tyr Gly Gly  
 100 105 110

Gln Arg Tyr Asp Ile Gln Leu Arg Ala Leu Arg Gln Gly Ala Gln Val  
 115 120 125

Val Val Gly Thr Pro Gly Arg Ile Leu Asp His Ile Arg Arg Gly Thr  
 130 135 140

Leu Asp Leu Ser Asn Leu Arg Phe Met Val Leu Asp Glu Ala Asp Glu  
 145 150 155 160

Met Leu Arg Met Gly Phe Ile Asp Asp Val Glu Thr Val Met Ala Glu  
 165 170 175

Leu Pro Glu Gln His Gln Thr Ala Leu Phe Ser Ala Thr Met Pro Asp  
 180 185 190

Pro Ile Arg Arg Ile Thr Lys Arg Phe Met Lys Asp Pro Lys Glu Ile  
 195 200 205

Lys Ile Lys Ser Thr Gln Thr Thr Asn Pro Asp Ile Thr Gln Ser Cys  
 210 215 220

Trp Tyr Val His Gly Phe Arg Lys Asn Asp Ala Leu Leu Arg Phe Leu  
 225 230 235 240

Glu Val Glu Lys Phe Asp Ala Ala Ile Ile Phe Thr Arg Thr Lys Thr  
 245 250 255

Gly Thr Leu Asp Val Thr Glu Leu Leu Glu Lys His Gly Phe Arg Ala  
 260 265 270

ES 2 371 498 T3

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

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

Ala Ala Arg Gly Leu Asp Val Glu Arg Ile Ser Leu Val Val Asn Tyr  
 305 310 315 320

Asp Ile Pro Leu Asp Ala Glu Ser Tyr Val His Arg Ile Gly Arg Thr  
 325 330 335

Gly Arg Ala Gly Arg Thr Gly Arg Ala Leu Leu Phe Val Glu Pro Arg  
 340 345 350

Glu Arg Arg Leu Leu Arg Asn Ile Glu Gln Leu Thr Lys Lys Pro Ile  
 355 360 365

Thr Glu Val Glu Val Pro Asn His Glu Val Leu Gln Ala Cys Arg Arg  
 370 375 380

Glu Lys Phe Lys Ala Lys Ile Thr Val Gln Leu Glu His His Asp Leu  
 385 390 395 400

Gly Leu Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Met Phe Thr Ala Asp Gln Asp  
 405 410 415

Gln Glu Asp Ile Ala Ala Ala Met Leu Met Leu Leu Gln Gly Lys Gln  
 420 425 430

Lys Leu Ile Leu Pro Ala Asp Pro Ile Ile Asp Arg Lys Thr Ser Arg  
 435 440 445

Gly Asp Arg Gly Glu Arg Arg Glu Arg Gly Gly Arg Glu Asn Pro Arg  
 450 455 460

Ser Ala Glu Arg Arg Gly Tyr Gly Thr Pro Gln Ala Met Asp Leu Tyr  
 465 470 475 480

Arg Ile Glu Val Gly Arg Leu Asp Gly Ala Glu Val Arg His Ile Val  
 485 490 495

Gly Ala Ile Ala Asn Glu Gly Asp Ile Asn Ser Arg Tyr Ile Gly His  
 500 505 510

Ile Lys Leu Tyr Asp Asp Tyr Thr Thr Ile Glu Leu Pro Gln Gly Met

ES 2 371 498 T3

	515		520		525														
5	Pro	Lys	Glu	Leu	Leu	Gly	Val	Phe	Ala	Lys	Thr	Arg	Val	Met	Asn	Lys			
		530					535					540							
10	Gln	Met	Gln	Met	Ser	Phe	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Ala	Gly	Ser	Ser	Arg			
	545					550					555					560			
15	Asp	Arg	Asp	Asp	Phe	Ala	Asp	Arg	Arg	Gly	Gly	Lys	Arg	Lys	Gly	Arg			
					565					570					575				
20	Gly	Asp	Glu	Pro	Arg	Phe	Gly	Arg	Glu	Asp	Arg	Lys	Phe	Lys	Glu	Lys			
				580					585					590					
25	Ser	Gln	Arg	Thr	Phe	Asn	Asp	Arg	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Arg	Glu	Arg			
			595					600					605						
30	Gln	Lys																	
		610																	

35 <210> 89  
 <211> 187  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 89

40	tctacg	ttaa	cgccacc	cggt	tgtatta	taata	acattgg	caa	agccaga	aagc	agcgat	catc		60
	acaaa	accaa	tcatcg	ccat	taaacg	taag	ccttg	tggga	aaatgt	catt	acttt	tctttt		120
45	aatttg	aaaa	taccaca	aac	agcaaaa	aata	atcagac	ccgg	ctaata	ccacc	aataat	agtt		180
	gaact	ct												187

50 <210> 90  
 <211> 1359  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 55 <400> 90

atgttattaa ctaaccctgt cgtgatttcc attgtggttc tacttgcgct cagtttattg 60  
 cgtattaatg ttgtcatcgc actcgttatt tccgcattag tggcaggttt aactggcaat 120  
 ttgggcgtca gtgaaacaat aaaaacgttt acgaatggac taggcggagg tgcagaggtc 180  
 gccatgaatt atgcgatttt aggcgcgttt gcggttgcca tttcaaaatc aggcattact 240  
 gatttacttg cctataaagt cattaacgt ttgggcaata caccaagcag tcgctcaatg 300  
 gcgggtttta aatattttat cttaacaatc ctcacgctgt ttgcogtttc atcgcaaac 360  
 ttattacctg tccatatcgc gtttattcct attgtgattc ccccgcttct tgcgattttc 420  
  
 aataaactaa aattggatcg tcgtgocggt gcttgtgttt taacttttgg ttaaccgcc 480  
 acttatatgt tattaccagt agggtttggg aaaattttta ttgaaagtat cctcgttaag 540  
 aatatcaatc aagccggcgc gactttaggc ttacagacat ctgtggctga agtgtcatta 600  
 gctatggcag tcccagtgat tggcatgatt cttggtttac tgacagcgat ctttattage 660  
 tatcgtaaac cgagagaata tgccatgatg cgcagcgaaa tcagcacgca agatattgaa 720  
 tcacatgttg ctcaaatcaa gccgttccat gtcggcgcaa gtttagtggc aatcattgtt 780  
 acttttgccc ttcagctctt taccagttca accattattg gtggattage cggctctgatt 840  
 atttttgctg tttgtggtat tttcaaatta aaagaaagta atgacatttt ccaacaaggc 900  
 ttacgtttaa tggcgatgat tggttttgtg atgatcgctg cttctggctt tgccaatgtt 960  
 attaatacaa cgggtggtgt aacggcgtta gttgaaacct tcagtcaagg ttttggcgca 1020  
 gaaaataaag ggattgcagc ctttttaatg ctgttagttg gcttatttat tactatgggg 1080  
 attggetcat cattctcaac ggtacctatt attgcctota tttatgtacc actttgtctt 1140  
 tctcttggtt tctcaccttt agcaacgggt tcgcttattg gggtatccgc tgcgcttgg 1200  
 gatgcgggtt cgctgcctc tgactcaaca ttaggaccaa cctcgggttt aatgcagat 1260  
 ggtaaacatg atcatatttg ggattctgtc gtcccaacat ttatccatta taatatccca 1320  
 ctcaattctt tcggttgggt agccgccatg tatctgtaa 1359

ES 2 371 498 T3

<210> 91  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 5 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 91

10	Met	Leu	Leu	Thr	Asn	Pro	Val	Val	Ile	Ser	Ile	Val	Val	Leu	Leu	Ala
	1				5					10					15	
15	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Ile	Asn	Val	Val	Ile	Ala	Leu	Val	Ile	Ser	Ala
				20					25					30		
20	Leu	Val	Ala	Gly	Leu	Thr	Gly	Asn	Leu	Gly	Val	Ser	Glu	Thr	Ile	Lys
			35					40					45			
25	Thr	Phe	Thr	Asn	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Glu	Val	Ala	Met	Asn	Tyr
		50					55					60				
30	Ala	Ile	Leu	Gly	Ala	Phe	Ala	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Ser	Gly	Ile	Thr
	65					70					75				80	

ES 2 371 498 T3

Asp Leu Leu Ala Tyr Lys Val Ile Lys Arg Leu Gly Asn Thr Pro Ser  
 85 90 95

Ser Arg Ser Met Ala Gly Phe Lys Tyr Phe Ile Leu Thr Ile Leu Thr  
 100 105 110

Leu Phe Ala Val Ser Ser Gln Asn Leu Leu Pro Val His Ile Ala Phe  
 115 120 125

Ile Pro Ile Val Ile Pro Pro Leu Leu Ala Ile Phe Asn Lys Leu Lys  
 130 135 140

Leu Asp Arg Arg Ala Val Ala Cys Val Leu Thr Phe Gly Leu Thr Ala  
 145 150 155 160

Thr Tyr Met Leu Leu Pro Val Gly Phe Gly Lys Ile Phe Ile Glu Ser  
 165 170 175

Ile Leu Val Lys Asn Ile Asn Gln Ala Gly Ala Thr Leu Gly Leu Gln  
 180 185 190

Thr Ser Val Ala Glu Val Ser Leu Ala Met Ala Val Pro Val Ile Gly  
 195 200 205

Met Ile Leu Gly Leu Leu Thr Ala Ile Phe Ile Ser Tyr Arg Lys Pro  
 210 215 220

Arg Glu Tyr Ala Met Met Arg Ser Glu Ile Ser Thr Gln Asp Ile Glu  
 225 230 235 240

Ser His Val Ala Gln Ile Lys Pro Phe His Val Gly Ala Ser Leu Val  
 245 250 255

Ala Ile Ile Val Thr Phe Ala Leu Gln Leu Phe Thr Ser Ser Thr Ile  
 260 265 270

Ile Gly Gly Leu Ala Gly Leu Ile Ile Phe Ala Val Cys Gly Ile Phe  
 275 280 285

Lys Leu Lys Glu Ser Asn Asp Ile Phe Gln Gln Gly Leu Arg Leu Met  
 290 295 300

Ala Met Ile Gly Phe Val Met Ile Ala Ala Ser Gly Phe Ala Asn Val  
 305 310 315 320

Ile Asn Thr Thr Gly Gly Val Thr Ala Leu Val Glu Thr Phe Ser Gln

5  
 325 330 335  
 Gly Phe Gly Ala Glu Asn Lys Gly Ile Ala Ala Phe Leu Met Leu Leu  
 340 345 350  
 10  
 Val Gly Leu Phe Ile Thr Met Gly Ile Gly Ser Ser Phe Ser Thr Val  
 355 360 365  
 15  
 Pro Ile Ile Ala Ser Ile Tyr Val Pro Leu Cys Leu Ser Leu Gly Phe  
 370 375 380  
 20  
 Ser Pro Leu Ala Thr Val Ser Leu Ile Gly Val Ser Ala Ala Leu Gly  
 385 390 395 400  
 25  
 Asp Ala Gly Ser Pro Ala Ser Asp Ser Thr Leu Gly Pro Thr Ser Gly  
 405 410 415  
 30  
 Leu Asn Ala Asp Gly Lys His Asp His Ile Trp Asp Ser Val Val Pro  
 420 425 430  
 35  
 Thr Phe Ile His Tyr Asn Ile Pro Leu Ile Leu Phe Gly Trp Leu Ala  
 435 440 445  
 40  
 Ala Met Tyr Leu  
 450

45  
 <210> 92  
 <211> 1391  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 50  
 <400> 92

ES 2 371 498 T3

ctctagatag aggagcttat atatttactt aagaataagt tgctggtaaa tattcgttgt	60
gtttctcttt taagtactca tcaacactat tatgatcaac gttataagac aattgttctt	120
tgtaaaaatc taatcttget cttgcattat taataatttc agcccaagtc atcacaataa	180
cttctacatt gtactctaga tegtctgata ccacaccttt acgctttcct cgttgattgg	240
attctcgttt tgcgaattgg tcaagctcat ttgaaactgc tataaatgtc cactttgttt	300
tactatgatc gaatcgttca tcagatgaca ctgcgtaagc atagttttta atttgagtaa	360
ttacttcaga attaattttc tgacttggac gctttaattc tacaactaaa tattctttat	420
aaccttggct aggctttctt gctttatgaa aaaataaatc aactcttcct tgttttccat	480
cagaaagaaa tactggttta tctgcatcaa aactatcttt atcataataa tctaaatgtg	540
ttgcatgaat ctttaaaaca tcatttagtg tattttcact tctgaaaaa ttaaatctt	600
ccataaaaac ccaagtttca ttttctaaga ttttatgtaa ctgatctctt tccaaaagag	660
cttttttatt ctctttatca aaaagaagat tttctaatec tttcaaaaaa ttaagtctat	720
ctgcaactat ctttgaagaa cggattatag atgtagaga tgtattctct aataatttag	780
aaaacatttc cttctegtta tcattcaatt ttaatacttc ttcagaatt ctttgcattg	840
atgctggatt ctcttttate gcattagata gcaattggaa agttaatctc tttgattcaa	900
tagaactaga gctaaatcta ggtaggttat cctcaacctt aacagctacg atatcaaaaa	960
gatttttttc tattttttca acggatgtat attcgtttgc tacatcggga taaatatcca	1020
aatctatcca agattttatt ctttttgcac tttctctctc tctttgttgt ctaagatatt	1080
catttaattt tgttattget tctgtaataa gttttctctc attttcatcc atatcaacta	1140
tgctcaaatt atcactttca tttaagctgt taatagtctc tccacataaa tagacagtat	1200
agttatatcc ttgctttcta attctatfff tagtgtcata atcacaaatg aaggaataat	1260
tctctttgca tagataaaaa tctgaaacat ctttcttctc ccaagaata attttcattt	1320
tcccatgaat atcagactct tcaoctaaaa taatttcagt ttcagtggtta attaattctc	1380
gagggtctag a	1391



<210> 93  
<211> 1290  
<212> ADN  
5 <213> *Pasteurella multocida*  
<400> 93

ES 2 371 498 T3

ttaagaataa gttgctggta aatattcggtt gtgtttctct ttttaagtact catcaacact 60  
 attatgatca acgttataag acaattgttc tttgtaaaaa tctaactcttg ctcttgcatt 120  
 5 attaataatt tcagcccaag tcatcacaat aacttctaca ttgtactcta gatcgtctga 180  
 taccacacct ttacgctttc ctgcttgatt ggattctcgt tttgccaatt ggtcaagctc 240  
 10 atttgaaact gctataaatg tccactttgt tttactatga tcgaatcgtt catcagatga 300  
 cactgegtta gcatagtttt taatttgagt aattacttca gaattaattt tctgacttgg 360  
 acgctttaat tctacaacta aatattcttt ataaccttgg ctaggctttc ttgctttatg 420  
 15 aaaaaataaa tcaactcttc cttgttttcc atcagaaaga aatactgggtt tatctgcac 480  
 aaaactatct ttatcataat aatctaaatg tgttgcacga atctttaaaa catcatttag 540  
 20 tgtattttca cttcctgaaa aattaaatc ttccataaaa acccaagttt cattttctaa 600  
 gattttatgt aactgatctc tttccaaaag agctttttta ttctctttat caaaaagaag 660  
 attttcta at cttttcaaaa aattaagtct atctgcaact atctttgaag aacggattat 720  
 25 agatgttaga gatgtattct ctaataattt agaaaacatt tcttctcgt tatcattcaa 780  
 30  
 ttttaatacc tcttccagaa ttctttgcat tgatgctgga ttctctttta tcgcattaga 840  
 tagcaattgg aaagttaatc tctttgatc aatagaacta gagctaaatc taggtagggtt 900  
 35 atcctcaacc ttaacagcta cgatatcaaa aagatttttt tctatttttt caacggatgt 960  
 atattcgttt gctacatagc gataaatatc caaatctatc caagatttta ttctttttgc 1020  
 40 attttcttct tctctttggt gtctaagata ttcattta at tttgttattg cttctgtaat 1080  
 aagttttctc gcattttcat ccatatcaac tatgctcaaa ttatcacttt catttaagct 1140  
 gttaatagtc tctccacata aatagacagt atagttatat ccttgccttc taattctatt 1200  
 45 tttagtgtca taatcacaaa tgaaggaata attctctttg catagataaa aatctgaaac 1260  
 atctttctta tcccaaagaa taattttcat 1290

50 <210> 94  
 <211> 429  
 <212> PRT  
 <213> Pasteurella multocida  
 55 <400> 94

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

ES 2 371 498 T3

Leu Thr Phe Gln Leu Leu Ser Asn Ala Ile Lys Glu Asn Pro Ala Ser  
 145 150 155 160

Met Gln Arg Ile Leu Glu Glu Val Leu Lys Leu Asn Asp Asn Glu Lys  
 165 170 175

Glu Met Phe Ser Lys Leu Leu Glu Asn Thr Ser Leu Thr Ser Ile Ile  
 180 185 190

Arg Ser Ser Lys Ile Val Ala Asp Arg Leu Asn Phe Leu Lys Gly Leu  
 195 200 205

Glu Asn Leu Leu Phe Asp Lys Glu Asn Lys Lys Ala Leu Leu Glu Arg  
 210 215 220

Asp Gln Leu His Lys Ile Leu Glu Asn Glu Thr Trp Val Phe Met Glu  
 225 230 235 240

Asp Phe Asn Phe Ser Gly Ser Glu Asn Thr Leu Asn Asp Val Leu Lys  
 245 250 255

Ile His Ala Thr His Leu Asp Tyr Tyr Asp Lys Asp Ser Phe Asp Ala  
 260 265 270

Asp Lys Pro Val Phe Leu Ser Asp Gly Lys Gln Gly Arg Val Asp Leu  
 275 280 285

Phe Phe His Lys Ala Arg Lys Pro Ser Gln Gly Tyr Lys Glu Tyr Leu  
 290 295 300

Val Val Glu Leu Lys Arg Pro Ser Gln Lys Ile Asn Ser Glu Val Ile  
 305 310 315 320

Thr Gln Ile Lys Asn Tyr Ala Tyr Ala Val Ser Ser Asp Glu Arg Phe  
 325 330 335

Asp His Ser Lys Thr Lys Trp Thr Phe Ile Ala Val Ser Asn Glu Leu  
 340 345 350

Asp Gln Phe Ala Lys Arg Glu Ser Asn Gln Arg Gly Lys Arg Lys Gly  
 355 360 365

Val Val Ser Asp Asp Leu Glu Tyr Asn Val Glu Val Ile Val Met Thr  
 370 375 380

Trp Ala Glu Ile Ile Asn Asn Ala Arg Ala Arg Leu Asp Phe Tyr Lys  
 385 390 395 400

5

Glu Gln Leu Ser Tyr Asn Val Asp His Asn Ser Val Asp Glu Tyr Leu  
 405 410 415

10

Lys Glu Lys His Asn Glu Tyr Leu Pro Ala Thr Tyr Ser  
 420 425

15

20 <210> 95  
 <211> 101  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 95

25

cttattttaag cggttttttt acccaacgct tgaaaatggt ctctccattt gtcacatgga 60

aaaaggagag aacatgtatt ttagaatggg gatataaagc a 101

30

<210> 96  
 <211> 220  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 96

35

ctttttcctg aagtaataca tcttgagaaa gaattaagtt ttctaaacga gaaggctgat 60

40

tgatatcata ataaatacca atatcatcgt acactaatga gaaaggtgga taccatcca 120

caccagtc c aatagaacgt aaaaaacat cttctatcgt cgcataaggt aatcatggt 180

45

gttgtgcaaa atgcctcgt ttctttgatg atgctttata 220

50 <210> 97  
 <211> 546  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <220>

55 <221> misc\_feature  
 <222> (529)..(529)  
 <223> n e s a, g, c, o t  
 <220>

60 <221> misc\_feature  
 <222> (532)..(532)  
 <223> n e s a, g, c, o t

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (535)..(535)
<223> n es a, g, c, o t
5 <220>
<221> misc_feature
<222> (538)..(538)
<223> n es a, g, c, o t
10 <220>
<221> misc_feature
<222> (543)..(543)
<223> n es a, g, c, o t
<400> 97

15 gactttgtca tcategcaac gccaacagac tataataccg aaacaggtta ttttaataca 60
tccactgttg aagctgtcat tgaacaaacc ctttcaatca atccacaagc aacgattatt 120
20 ataaaatcaa cgattcccgt tggttttacc gaaaaaatgc gtgagaaatt tcataccaag 180
aacattattht tttctcctga gtttttaaga gaaggaaaag cacttcatga caatttgtht 240
25 ccaagcagaa ttattgthtg cagtacttct tatcaagcaa aagtatttgc cgatathgtg 300
acacagthtg ccagaaaaaa agatgthact gttttattta cacacaatac tgaggctgaa 360
gctgthtaat tatttgcaaa tacgtatctc gcaatgagag ttgcctthtc taatgaatta 420
30 gatacttatg cgagthctca ccattthaat acaaaagaca ttatcaatgg tatttctact 480
gatcctcgca ttggtacaca ctacaataac ccaagthtgc gctatggcng tnatngnta 540
35 ccnaag 546

40 <210> 98
<211> 20
<212> ADN
<213> Transposón Tn10
<400> 98
atctgatcct tcaactcagc 20
45 <210> 99
<211> 19
<212> ADN
<213> Transposón Tn10
<400> 99
50 cgcaggcctt tattgattc 19
<210> 100
<211> 27
<212> ADN
<213> Transposón Tn10
55 <400> 100
gcggaattcg atgaatgthc cgthgagc 27
<210> 101
<211> 20
<212> ADN
60 <213> Transposón Tn10
<400> 101

```

tttaccaaaa tcattagggg 20  
 <210> 102  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 5 <213> Transposón Tn10  
 <400> 102  
 gatcatatga caagatgtg 19  
 <210> 103  
 <211> 35  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> polinucleótido como cebador de PCR  
 <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (21) .. (30)  
 <223> n es a, g, c, o t  
 <400> 103  
 ggccacgctg cgactagtagc nnnnnnnnnn gatat 35  
 20 <210> 104  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> polinucleótido como cebador de PCR  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (21) .. (30)  
 <223> n es a, g, c, o t  
 30 <400> 104  
 ggccacgctg cgactagtagc nnnnnnnnim cagcc 35  
 <210> 105  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Transposón Tn10  
 <400> 105  
 ggccacgctg cgactagtagc 20  
 <210> 106  
 <211> 20  
 40 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 106  
 tacgttaacg ccacccgttg 20  
 <210> 107  
 <211> 20  
 45 <213> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 107  
 gcttcatac cttgtgaacc 20  
 50 <210> 108  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 108  
 55 ggggtgacgc cttctgctg 19  
 <210> 109  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 60 <400> 109  
 attgcagtagc ttgcggatgc 20

<210> 110  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 5 <400> 110  
 cgatatgga cgtgtcgac 19  
 <210> 111  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 111  
 aaaaggcgga cctaagtcg 20  
 <210> 112  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 112  
 ccgacaacat gacaatggag 20  
 <210> 113  
 20 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 113  
 tttgcagtgg cttaccgac 19  
 25 <210> 114  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 114  
 30 cctgacgacc aatacggag 19  
 <210> 115  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 35 <400> 115  
 ggatgtctg atcctaagc 20  
 <210> 116  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 40 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 116  
 cgttcacag atgacactgc 20  
 <210> 117  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 117  
 gtgattacgg gattatcggg 20  
 <210> 118  
 50 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Pasteurella multocida  
 <400> 118  
 tgaagtggta acgaggcttg 20  
 55



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Mutante de una bacteria gram negativa, en el que dicha bacteria presenta una mutación en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad que es igual o superior al 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% con una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID No: 75, dando lugar dicha mutación a una virulencia atenuada de la bacteria, en el que la mutación es una inserción entre los nucleótidos 1072-1087 en la SEC ID No: 75.
- 10 2. Mutante según la reivindicación 1, en el que dicho mutante tiene un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID No: 75.
3. Mutante según la reivindicación 1 ó 2, en el que la bacteria es una *Pasteurellaceae*.
- 15 4. Mutante según la reivindicación 3, en el que la bacteria se selecciona del grupo de: *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatipestifer* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
5. Mutante según la reivindicación 4, en el que la bacteria es *Pasteurella multocida*.
- 20 6. Mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un inmunógeno de un agente patológico viral, parasítico o bacteriano, para una proteína terapéutica, para un alérgeno, para un factor de crecimiento o para una citoquina.
- 25 7. Mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que presenta una mutación en la secuencia de nucleótidos SEC ID No: 75.
8. Mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es un mutante 9C8 disponible bajo el número de acceso CNCM 1-3001.
- 30 9. Mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho mutante tiene dos o más mutaciones.
10. Mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene dos o más de las siguientes secuencias mutadas: SEC 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.
- 35 11. Mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene dos o más de las siguientes secuencias mutadas: SEC ID No: 37, 40, 75, 90, 93.
- 40 12. Mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene dos o más de las siguientes secuencias mutadas: SEC ID No: 37 y 75; SEC ID No: 40 y 75; SEC ID No: 75 y 90; o SEC ID No: 75 y 93.
13. Vacuna que comprende un mutante atenuado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 14. Vacuna según la reivindicación 13, que comprende además un adyuvante.
15. Composición inmunogénica que comprende un mutante atenuado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y un diluyente, portador, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 50 16. Composición inmunogénica según la reivindicación 15, que comprende además un adyuvante.
17. Molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia SEC ID No: 75 con una inserción entre los nucleótidos 1072-1087.
- 55 18. Utilización de un mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la producción de una composición inmunogénica atenuada viva o la preparación de una composición de vacuna atenuada viva.
19. Mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, vacuna según la reivindicaciones 13 ó 14, o una composición inmunogénica según la reivindicación 15 ó 16, para utilizar en la inmunización contra o la prevención de una infección bacteriana en un animal.
- 60 20. Utilización de un mutante de una bacteria gram negativa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, una

vacuna según la reivindicación 13 ó 14, o una composición inmunogénica según la reivindicación 15 ó 16, en la preparación de un medicamento para la inmunización contra o la prevención de una infección bacteriana en un animal.