

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 468**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2009 E 09705071 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 2256185**

54 Título: **Protección heteróloga contra pasteurella multocida proporcionada por células de P. multocida fur y sus extractos proteicos de membrana externa**

30 Prioridad:

30.01.2008 ES 200800239

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

09.12.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
(100.0%)**

**Edifici A - Campus Universitari s/n
08193 Bellaterra, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**BARBÉ GARCIA, JORGE;
BADIOLA, SÁIZ;
LLAGOSTERA CASAS, MONTSERRAT;
GARRIDO OCAÑA, MA ELENA;
BOSCH GALLEGO, MONTSERRAT y
PEREZ DE ROZAS RUIZ DE GAUNA, ANA MA**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 524 468 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).

PROTECCIÓN HETERÓLOGA CONTRA *PASTEURELLA MULTOCIDA* PROPORCIONADA POR CÉLULAS
DE *P. MULTOCIDA FUR* Y SUS EXTRACTOS PROTEICOS DE MEMBRANA EXTERNA
DESCRIPCIÓN

- 5 Campo de la invención
La invención se refiere a mutantes de *Pasteurella multocida* capaces de conferir protección heteróloga frente a la infección producida por *P. multocida* virulenta. Estos mutantes son defectivos en los genes: *fur ompH* y *fur ompH galE*. La presente invención se refiere a composiciones de vacuna contra bacterias del género *Pasteurella*, concretamente *Pasteurella multocida* que comprenden dobles mutantes *fur ompH* y mutantes triples *fur ompH galE*, obtenidos a partir de *P. multocida* o un extracto de proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMPs) obtenidas a partir de dichos mutantes y un vehículo y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
- Estado de la técnica anterior
10 Las infecciones bacterianas son una causa importante de enfermedades en el mundo, tanto en animales como en el hombre, especialmente en niños. Entre las bacterias causantes de enfermedades se encuentra el género *Pasteurella* en el que se incluyen en la actualidad 20 especies entre las que se encuentra *Pasteurella multocida* que es una bacteria patógena que causa diversas enfermedades infecciosas, tales como el cólera aviar, la neumonía bovina, septicemia hemorrágica y rinitis atrófica del cerdo, en animales utilizados para la producción de alimentos, por lo que el control de la enfermedad es de gran importancia para los ganaderos dedicados a la crianza de este ganado. Por lo tanto es importante desarrollar una vacuna que evite que el ganado se infecte. El objetivo del desarrollo de cualquier vacuna es proporcionar la debida protección durante el mayor tiempo posible. Tradicionalmente se han desarrollado fundamentalmente tres tipos de vacunas: a) "vacunas vivas atenuadas" en las que se utiliza el patógeno vivo al que se ha reducido o eliminado su virulencia incapacitado para su crecimiento, b) vacunas en las que se utilizan componentes purificados del patógeno, y c) las "vacunas muertas" en las que el patógeno muerto se utiliza directamente. Cada uno de estos tipos de vacunas tiene sus ventajas e inconvenientes; las vacunas vivas atenuadas son las que producen una protección en condiciones similares a la de la enfermedad natural. Sin embargo, las vacunas del tipo (b) y (c) son más atractivas desde el punto de vista de la seguridad.
15 En medicina veterinaria, la vacunación contra *P. multocida* se basa principalmente en la utilización de células de *P. multocida* inactivadas, conocidas como "bacterinas", o en bacterias vivas atenuadas. Las bacterinas sólo confieren protección homóloga; las vacunas vivas proporcionan protección homóloga y heteróloga, sin embargo contienen marcadores de atenuación desconocidos y, en algunos casos, han sido asociadas incluso con brotes de epidemias. En los documentos de patente US 3,855,408, US 4,169,886 y US 4,626,430 se describen "vacunas vivas" contra *P. multocida*.
20 La solicitud de patente WO 98/56901 A2 cuyo título es "Live attenuated vaccines" describe bacterias atenuadas en las cuales el gen *fur* o un gen homólogo al mismo, es modificado de manera que la expresión del producto del gen *fur*, o de su homólogo, es regulada independientemente de la concentración de hierro presente en el medio en que se encuentra la bacteria. Dichas bacterias pueden ser utilizadas como "vacunas vivas". El documento se refiere en general a cualquier bacteria gramnegativa aunque se centra en particular en *Neisseria meningitidis*. La atenuación de la bacteria se lleva a cabo por mutación de un gen esencial para la producción de un metabolito o catabolito no producido por humanos o animales. Preferiblemente, las mutaciones para atenuar a la bacteria son en el gen *aro* o en un gen de la ruta de las purinas o pirimidinas. En otro aspecto de la invención, la bacteria comprende una mutación *recA*.
25 La invención también proporciona vacunas así como el método para producir una bacteria según la invención y que comprende la modificación del gen *fur* nativo o de un homólogo, de una bacteria atenuada, de manera que la expresión del gen *fur* o de su homólogo es regulada independientemente de la concentración de hierro presente en el entorno de la bacteria. El documento señala que, en el pasado, en intentos de producción de vacunas vivas atenuadas, los organismos no producían ciertas proteínas importantes para la protección cruzada durante el cultivo en masa. Estas proteínas incluían las proteínas reguladas por hierro, cuya producción está regulada por el gen *fur*. Adicionalmente, una vez estas bacterias se administraban al huésped, las cepas de la vacuna no tenían tiempo o recursos metabólicos durante su limitada colonización para expresar estas proteínas.
30 La producción de cepas de bacterias atenuadas en las cuales la expresión de *fur* ha sido modificada, es una técnica aplicable de manera general. Así, una bacteria patogénica cuyo genoma comprenda el gen *fur* o un homólogo al mismo, siendo la bacteria atenuada por supresión o modificación de un gen esencial para el crecimiento en el huésped en el que la bacteria es patogénica, puede ser modificada según se ha descrito de manera que la bacteria produce el producto del gen *fur* o de su homólogo de manera independiente a la concentración de hierro presente en el entorno de la bacteria. Los homólogos de *fur* pueden ser identificados por comparación con secuencias conocidas de otros genes *fur* como por ejemplo *E. coli* y *N. meningitidis*. Preferentemente, estos homólogos son substancialmente homólogos a otros genes *fur* conocidos, con una identidad de entre 60-70% en una longitud de al menos 100 aminoácidos. Por lo

35

tanto, genes identificados en otras bacterias que codifican factores de la transcripción y que además presentan la propiedad de responder a la presencia de hierro, también pueden ser usados.

La invención propone también mutaciones en los genes *recA* y *comA* para proporcionar estabilidad a la bacteria que se emplea en la vacuna. Estas mutaciones deben ser introducidas como modificaciones genéticas finales, a continuación

5 del resto de modificaciones descritas.

En la solicitud de patente ES 2059 503 T3 cuyo título es "Vacuna contra la pasteurelisis" se describen vacunas contra bacterias del género *Pasteurella*, y en concreto, en ciertos casos contra *Pasteurella multocida*.

El documento describe que cuando los organismos de *Pasteurella* se cultivan bajo condiciones de restricción de hierro, la extracción de la membrana externa o el lisado de la célula entera originan un perfil proteico diferente del obtenido en condiciones normales *in vitro*, más inmunogénico que el producido por el mismo organismo cultivado bajo condiciones normales de crecimiento. Las células enteras inactivadas de *Pasteurella* cultivadas bajo condiciones de restricción de hierro que incluye la "bacterina", con el propósito de preparar una vacuna, se incluyen dentro de la invención.

10 La invención propone formular la vacuna para uso de serotipo homólogo, pero también incluye una vacuna polivalente que contiene proteínas reguladas por hierro de todos los serotipos de *Pasteurella* patológicamente importantes. Así, este documento de solicitud de patente se centra en proteínas reguladas por hierro, anticuerpos monoclonales o policlonales para dichas proteínas y formulaciones de vacunas en las que el material proteico puede estar combinado con cualquiera de los coadyuvantes habituales en vacunas veterinarias. El documento precisa que debe controlarse cuidadosamente las proporciones de agente quelante a utilizar ya que una concentración demasiado grande impediría el cultivo de las bacterias.

En el documento de patente US 6,790,950 B2 cuyo título es "Anti-bacterial vaccine compositions" se identifican genes virulentos de bacterias gramnegativas (centrándose en *Pasteurella multocida* como un caso particular) que permite la identificación de nuevos agentes antibacterianos dirigidos contra esos genes virulentos y sus productos.

15 En esta patente se hace referencia a los intentos para producir composiciones de vacunas, que tradicionalmente utilizan células enteras de bacterias muertas (inactivadas) proporcionando únicamente protección específica de un serotipo, lo cual supone un problema para la vacunación dada la existencia de diferentes serotipos. Los inventores hacen alusión a un estudio en el que una vacuna de bacteria atenuada, que produce una forma inactiva de la toxina ApxII, ha mostrado protección cruzada.

Teniendo en cuenta los problemas asociados con las formulaciones de vacunas que comprenden cepas bacterianas con mutaciones indefinidas, espontáneas, los autores de dicho documento se centran en la construcción de bacterias atenuadas para su uso como vacunas que sean seguras y proporcionen protección homóloga y heteróloga contra serotipos de *Pasteurella*, así como en la identificación de bacterias atenuadas y genes necesarios para la virulencia bacteriana, que faciliten el desarrollo de métodos de identificación de agentes antibacterianos. Así, este documento proporciona organismos bacterianos gramnegativos (*Pasteurella multocida* entre ellos), que contienen mutaciones funcionales en la secuencia de ciertos genes. Esta mutación inhibe o impide la expresión o la actividad biológica del producto codificado por el gen, siendo el efecto de esta mutación la atenuación de la virulencia de la cepa bacteriana.

20 Se describen composiciones que comprenden organismos bacterianos gramnegativos mutados y atenuados y, opcionalmente un adyuvante y/o un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable con vistas a la construcción de una vacuna que prevenga la infección bacteriana o los síntomas asociados a ella.

Para que la cepa modificada de la invención sea efectiva en una formulación farmacéutica, los inventores señalan que la atenuación debe ser lo suficientemente significativa para evitar síntomas clínicos de infección, pero permitiendo replicación y crecimiento limitado de la bacteria en el huésped.

25 La invención proporciona cepas atenuadas de *P. multocida*, vacunas (aplicables a humanos y animales), polinucleótidos que codifican productos génicos necesarios para la virulencia de las bacterias gramnegativas, células huésped transformadas con los polinucleótidos de la infección, métodos de producción de los polipéptidos de la invención, métodos de tratamiento de sujetos infectados por bacterias gramnegativas mediante la administración de los agentes antibacterianos definidos en la invención etc.

Sin embargo, en este documento sólo se reivindican los polinucleótidos codificados por las secuencias que se proporcionan así como los vectores que los incluyen y las células huésped transformadas con ellos. Las bacterias mutadas *Pasteurella* descritas por esta invención, son utilizadas de manera atenuada.

30 Es de resaltar que la mutación *fur* objeto de la presente solicitud de invención no conlleva la disminución de la virulencia de la bacteria por lo que no estaría englobada dentro de este grupo de mutaciones. En el mencionado documento US 6,790,950 B2 refieren la dificultad de conferir protección heteróloga vía vacunación con células completas muertas, que es lo que la invención de la presente solicitud consigue.

La solicitud de patente WO 99/29724 A2 cuyo título es "DNA encoding *Pasteurella multocida* outer membrane protein" reivindica una molécula de ácido nucleico aislada y purificada que comprende una secuencia de ácido nucleico preseleccionada que codifica una proteína de membrana o polipéptido OmpH de *Pasteurella multocida* aviar y una subunidad o una variante biológicamente activa. Para ello, secuencian y clonan OmpHs de 16 serotipos (que presentan una identidad del 73%) de *P. multocida*.

35 En esta solicitud de patente se muestran estudios de protección homóloga de pollos a través de polipéptidos X-73 de membrana externa aislados y purificados. Asimismo, indican que las composiciones inmunogénicas de la invención pueden ser usadas en combinación con bacterinas. Estas composiciones inmunogénicas comprenden una cantidad

efectiva de polipéptido de membrana externa de *P. multocida* aislado y purificado en combinación, subunidad, péptido, variante o combinación de ellos, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable que, tras su administración a vertebrados, induce la producción de anticuerpos específicos para porinas de membrana externa de *P. multocida*. La invención también proporciona un método para detectar o determinar la presencia de anticuerpos que son específicos para *P. multocida* aviar.

5 En el artículo cuyo título es "Use of a reporter gene to follow high-pressure signal transduction in the Deep-Sea Bacterium *Photobacterium* sp. Strain SS9" [Ellen Chi y Douglas H. Bartlett, (American Society for Microbiology, p. 7533-7540 (1993)) se desarrolla el primer sistema genético de una bacteria barofílica, la *Photobacterium* sp. SS9. Se describe el uso de este sistema en la caracterización inicial de los mecanismos regulatorios que controlan la expresión del gen *ompH* en respuesta a cambios en la presión hidrostática.

10 Para estudiar dicha relación entre el gen *ompH* y la presión, obtienen una cepa de *Photobacterium* sp. *ompHLac*. También obtienen cepas mutantes de *ompH* seleccionadas en condiciones de presión de 1 atm. De esta manera, consiguen cuatro mutantes, tres de los cuales no se ven afectados en su expresión por la presión del medio. Sin embargo, el cuarto mutante (EC1002) demuestra ser sensible de forma extrema a la presión. Así, la futura caracterización de mutantes sensibles a la presión, como EC1002, ofrecerá la oportunidad de identificar funciones necesarias para la adaptación a altas presiones.

Se observa que aunque en el trabajo descrito en este artículo se construyen mutantes *ompH* de una bacteria gramnegativa, estos mutantes no están dirigidos a estudios de inmunidad frente a dicha bacteria, es más, en este caso concreto, los mutantes *ompH* defectivos están dirigidos a la identificación de funciones importantes para el crecimiento a altas presiones.

15 Por último, los autores de la presente solicitud, en el artículo cuyo título es "Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the Fur protein" [Montserrat Bosch, Raul Tarragó, M^a Elena Garrido, Susana Campoy, Antonio R. Fernández de Henestrosa, Ana M. Pérez de Rozas, Ignacio Badiola y Jordi Barbé; FEMS Microbiology Letters 203, 35-40 (2001)] profundizan en los mecanismos y regulación de toma de hierro en *P. multocida*. Mediante la construcción de un mutante *fur* de *P. multocida*, se demuestra que el gen *ompH*, que codifica la principal proteína estructural de membrana (que presenta alta antigenicidad), está negativamente regulado por la proteína Fur, hierro y glucosa. Así mismo, también se demuestra que células *P. multocida* de tipo salvaje y *fur* defectivas presentan el mismo nivel de virulencia.

El documento explica el papel del gen *fur* en el sistema de toma de hierro de las bacterias a través de su producto, una proteína de 17KDa que presenta actividad de unión a DNA dependiente de Fe²⁺. La proteína *fur* puede actuar como regulador positivo o negativo.

20 Teniendo en cuenta que es conocido que cultivos en condiciones defectivas en hierro inducen protección heteróloga contra la infección producida por cepas virulentas de *P. multocida*, los autores proponen obtener, aislar y caracterizar un mutante *fur* defectivo de este organismo. La secuencia de nucleótidos de este gen está registrada en GenBank con el Número de Acceso AF027154.

El artículo describe la clonación y construcción de un mutante *fur* de *P. multocida*. Para ello, inactivan el gen *fur* de *P. multocida* por recombinación simple de un plásmido suicida que porta una región interna del gen *fur*. Mediante amplificación por PCR y usando los cebadores Fur1 y Fur2 obtienen un fragmento de 394 pares de bases que comprende los nucleótidos 18-412 del gen *fur*. Este fragmento es clonado en el plásmido suicida pUA826 dando lugar al plásmido pUA891 que es introducido en *P. multocida* por "conjugación triparental". Los transconjugados resistentes a estreptomycin son seleccionados.

25 Tanto el modo de inactivación del gen *fur* como la región amplificada y los cebadores y plásmidos empleados, se utilizan como punto de partida para la obtención posterior de los mutantes doble y triple, objeto de la presente solicitud de patente.

Posteriormente, el estudio llevado a cabo en este artículo continúa analizando la expresión del gen *ompH* (que codifica la porina de 36 KDa que hemos indicado anteriormente) de *P. multocida* salvaje y en mutantes *fur*. Se observa que la expresión de *ompH* es mayor en el mutante *fur* que en las cepas salvajes lo que lleva a confirmar que la expresión de *ompH* está negativamente regulada por *fur*. El trabajo también realiza estudios de virulencia del mutante *fur*, llegando a la conclusión de que tanto las bacterias salvajes de *P. multocida* como los mutantes *fur* presentan el mismo nivel de virulencia.

30 El artículo concluye que, teniendo en cuenta que está demostrado el papel de la proteína OmpH como antígeno protector contra la infección por *P. multocida*, para obtener "bacterinas", la cepa a utilizar debería ser crecida en ausencia de glucosa debido a su efecto inhibitorio sobre la expresión del gen *ompH*.

Compendio de la invención

Un objeto de la presente invención proporciona materiales y métodos para la producción de vacunas que comprenden mutantes dobles *fur ompH* y mutantes triples *fur ompH galE* de *Pasteurella multocida*, ya que un extracto de proteínas de la membrana externa preparado a partir de mutantes de *Pasteurella multocida fur ompH* confieren protección total heteróloga contra *Pasteurella multocida* virulenta.

35 La invención también menciona que el uso de mutantes *fur ompH* y triples mutantes *fur ompH galE* de *P. multocida* inactivados térmicamente proporciona protección cruzada de un 60% contra *P. multocida* virulenta. Así mismo, la

invención señala que cuando las células son inactivadas por sonicación se obtiene un mayor nivel de protección que cuando se tratan únicamente de forma térmica.

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar composiciones que contengan dichos mutantes dobles y triples para ser utilizados como agentes inmunogénicos para la protección contra *P. multocida* virulenta.

- 5 Asimismo, también es un objeto de la invención proporcionar vacunas para prevenir la infección causada por *P. multocida* tales como neumonías en ganado porcino, ganado vacuno y en mamíferos pequeños, así como el cólera aviar.

Además, en el presente documento se describe un kit para administrar dicha vacuna a animales en peligro de enfermar por *P. multocida*, que comprende un extracto de proteínas de membrana externa obtenidas a partir de *P. multocida* defectiva en los genes *fur*, *fur ompH* (doble mutante) y/o *fur ompH galE* (triple mutante) y un vehículo farmacéuticamente aceptable opcionalmente con adyuvantes adecuados para su posterior administración.

Breve descripción de las figuras

- 10 La figura 1 muestra un análisis mediante PCR de los mutantes *fur* de *Pasteurella multocida*. La figura 1A muestra la construcción del mutante *fur* de *P. multocida*. Fur3 y Aad3 indican las posiciones de los cebadores utilizados para confirmar la presencia de la mutación *fur*.

La figura 1B muestra DNA cromosómico de la cepa salvaje (PM1011) (carril 2), mutantes *fur* (PM1095) (carril 3) y *fur ompH* (PM1094) (carril 4) que fueron sujetos al análisis por PCR con los cebadores Aad3 y Fur3 (Tabla 2). El control de la PCR sin DNA se muestra en la carril 5. DNA del fago ΦX174 digerido con *HinfI* se utilizó como marcador de pesos moleculares (carriles 1 y 6).

La figura 2 muestra un esquema de la estructura de los genes *ompH1* y *ompH2* de *P. multocida*. RTompH1up, RTompH1rp, RTompH2up y RTompH2rp indican las posiciones de los cebadores utilizados para el análisis transcripcional.

- 15 La figura 2A muestra los resultados del análisis mediante RT-PCR de los transcritos de los genes *ompH1*.

La figura 2B muestra los resultados del análisis mediante RT-PCR de los transcritos de los genes *ompH2*.

La figura 2C muestra los resultados del análisis mediante RT-PCR de los transcritos de los genes del posible operón *ompH1-ompH2*

La figura 2D muestra los resultados del análisis mediante RT-PCR de los transcritos de los genes tanto en la cepa salvaje (PM1011) (carril 2) como en la mutante *fur ompH* (PM1094) (carril 3). Se utilizó RNA total de cada una de las cepas y las parejas de cebadores RTompH1up y RTompH1rp, RTompH2up y RTompH2rp y RTompH1up y RTompH2rp, respectivamente. Se muestran también las PCRs con DNA de la cepa salvaje (carril 4) y de un control negativo sin RNA ni DNA (carril 5). DNA de los fagos ΦX174 digerido con *HinfI* (B y C) y del fago λ, digerido con *BstEII* (D) se utilizaron como marcadores de pesos moleculares (carriles 1 y 6).

- 20 La figura 3 muestra el análisis mediante PCR de la construcción del mutante *galE* de *P. multocida*.

La figura 3A muestra la construcción del mutante *galE* de *P. multocida*. GalEint2up y pKO3-R indican las posiciones de los cebadores utilizados para confirmar la presencia de la mutación *galE*.

La figura 3B muestra el DNA cromosómico de la cepa salvaje (PM1011) (carril 2), mutantes *fur ompH* (PM1094) (carril 3) y *fur ompH galE* (PM1096) (carril 4) que fueron sujetos a análisis mediante PCR utilizando los cebadores GalEint2up y pKO3-R (Tabla 2). El control de PCR sin DNA se muestra en la carril 5. DNA del fago λ digerido con *BstEII* se utilizó como marcador de pesos moleculares (carriles 1 y 6).

- 25 Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a mutantes derivados de *Pasteurella multocida* capaces de promover protección heteróloga frente a la infección producida por *P. multocida* y su utilización en vacunas. Estos mutantes son defectivos en el gen *fur* y *ompH*. Este mutante ya ha sido descrito previamente por los mismos autores de la presente solicitud, no habiendo sido descrita su utilización en vacunas. Se obtienen mutantes dobles como el mutante *fur ompH* y mutantes triples como el mutante *fur ompH galE*, y también se utilizan para conferir protección heteróloga frente a la infección producida por *P. multocida* por medio de su incorporación en vacunas.

El hierro es un elemento necesario para casi todas las células vivas. Muchas bacterias patógenas gramnegativas, tales como *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, presentan en su membrana externa proteínas que se unen a moléculas de unión a hierro, como son transferrina, lactoferrina, hemoglobina, hemo y ferritina, presentes en la mucosa de los organismos huésped (Ratledge, C. y L. G. Dover. Annu. Rev. Microbiol. 54: 881-941. 2000). La expresión de casi todas estas proteínas de membrana externa está bajo el control de la proteína Fur ("ferric uptake regulator" o regulador de la captación del hierro) (Stojiljkovic, I., et al A.J. Baumler y K. Hantke. J. Mol. Biol. 236: 531-545. J. Mol. Biol. 240: 271. 1994), la cual se une al hierro presente en el citoplasma de las bacterias. En esta reacción, la proteína Fur forma un complejo con Fe(II), el cual se une posteriormente a una secuencia específica de DNA, conocida como "*fur box*" (caja fur) (2,12,14), en la región promotora de los genes regulados por hierro, bloqueando así su transcripción. Muchas proteínas de la membrana externa reguladas por hierro (IROMP o "iron-regulated outer membrane proteins") son poderosos antígenos y factores esenciales para la virulencia durante el proceso de infección de algunos patógenos (Ratledge, C., y L. G. Dover. Annu. Rev. Microbiol. 54: 881-941. 2000). Por esta razón, dichas proteínas de la membrana externa reguladas por hierro se han propuesto como posibles candidatas para vacunas basadas en un

35

receptor purificado (Chibber, S., y S.B. Bhardwaj J. Med. Microbiol. 53: 705-706. 2004), o utilizando antisuero anti-IROMP (Sood, S., P. Rishi, V. Dahwan, S. Sharma, y N.K. Ganguly. Mol. Cell. Biochem. 273:69-78. 2005).

Pasteurella multocida es una bacteria patógena que causa diversas enfermedades infecciosas, tales como cólera aviar, neumonía bovina y septicemia hemorrágica, y rinitis atrófica del cerdo, en animales utilizados para la producción de alimentos. En medicina veterinaria, la vacunación contra *P. multocida* se basa principalmente en la utilización de células de *P. multocida* inactivadas, conocidas como "bacterinas", o en bacterias vivas atenuadas. Sin embargo, las bacterinas solo confieren protección homóloga; por otro lado, aunque las vacunas vivas proporcionan protección homóloga y heteróloga, contienen marcadores de atenuación desconocidos y, en algunos casos, han sido incluso asociadas con brotes de epidemias. La protección homóloga se ha obtenido utilizando proteínas de membrana externa de *P. multocida* crecidas sin privación del hierro (Basagoudanavar, S.H., D.K. Singh y B.C. Varshney. J. Vet. Med. 53: 524-530. 2006). Además, se han descrito recientemente varias cepas vivas atenuadas bien definidas que son candidatas prometedoras para vacunas (10,17).

Se conoce protección cruzada a partir de bacterinas (Glisson, J.R., M.D. Contreras, I.H. Cheng, y C. Wang. Avian. Dis. 37:1074-1079. 1993) así como a partir de extractos de proteínas de membrana externa (Adler B. et al J. Biotechnol., Vol. 44, pp. 139-144. 1996; Ruffolo, C.G., et al B.H. José, y B. Adler. Vet. Microbiol. 59:123-137. 1998) obtenidas de *P. multocida* crecidas en medio deficiente en hierro. Esta protección heteróloga parece basarse en la sobreexpresión de las proteínas de membrana externa reguladas por hierro de *P. multocida*, inducida por la ausencia de hierro en el medio, y como consecuencia, en el interior de las células. Este enfoque está limitado por el hecho de que las bacterias crecen muy pobremente en presencia de agentes quelantes de cationes divalentes, tales como el 2,2'-dipiridilo (DPD), lo que constituye una limitación importante para obtener vacunas en grandes cantidades.

Inicialmente se caracterizaron dos receptores de unión a hemoglobina en *P. multocida* (Bosch, M., et al M.E. Garrido, M. Llagostera, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, y J. Barbé. Infect. Immun. 70: 5955-5964. 2002; Cox, A. J., M.L. Hunt., J.D. Boyce, y B. Adler. Microb. Pathog. 34: 287-296. 2003), y posteriormente se demostró que esta bacteria posee un mínimo de seis proteínas de unión a hemo- y/o hemoglobina, todas ellas inmunogénicas (Bosch, et al M., M.E. Garrido, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, J. Barbé, y M. Llagostera. Vet. Microbiol. 99: 103-112. 2004); sin embargo, cuando son inoculadas individualmente, ninguna de ellas confiere protección contra un ataque heterólogo (Bosch, M., M.E. Garrido, M. Llagostera, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, y J. Barbé. Infect. Immun. 70: 5955-5964. 2002; Bosch, M., M.E. Garrido, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, J. Barbé, y M. Llagostera. Vet. Microbiol. 99: 103-112. 2004; B. Adler, comunicación personal).

El aislamiento reciente del gen *fur* de *P. multocida* ha permitido a los autores de la presente solicitud la construcción de mutantes *fur* de esta especie de bacteria (Bosch, M., R. Tarragó, M.E. Garrido, S. Campoy, A.R. Fernández de Henestrosa, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, y J. Barbé. FEMS Microbiol. Lett. 203:35-40. 2001). Dado que *Fur* regula muchas proteínas captadoras de hierro bacterianas, los autores de la presente solicitud han estudiado la protección heteróloga conferida por células de *P. multocida fur*.

La estrategia de usar mutantes *fur* soluciona problemas asociados con el pobre crecimiento que se observa en el cultivo de bacterias en presencia de agentes quelantes de hierro, ya que la sobreexpresión por el mutante de *P. multocida fur* de proteínas de la membrana externa reguladas por hierro se asemeja al crecimiento de células de *P. multocida* de tipo salvaje crecidas en un medio deficiente en hierro evitando el pobre crecimiento que muestran las células en esas condiciones.

Entre sus usos se destaca el desarrollo de vacunas basadas en proteínas de la membrana externa reguladas por hierro, particularmente contra patógenos que presenten varios y distintos receptores de hierro, como es el caso de *P. multocida*.

Se describen como resultado de la invención, mutantes de *P. multocida*, todos ellos defectivos en el gen *fur* y en el gen *ompH*. El gen *fur* regula la expresión de muchas proteínas reguladas por hierro en bacterias. Así, la sobreexpresión de proteínas de membrana externa reguladas por hierro en mutantes *fur* de *P. multocida* se asemeja a la sobreexpresión a la que da lugar el crecimiento de células de *P. multocida* de tipo silvestre en medio deficiente en hierro.

También se describen mutantes dobles *fur ompH*, que no expresan la proteína *OmpH* (altamente inmunogénica), y los mutantes triples *fur ompH galE* que, además de defectivos en *fur* y *ompH*, también son defectivos en *galE*.

Junto con los mutantes de la invención, también se describen los oligos empleados para dar lugar a la mutación correspondiente, los plásmidos que los incorporan, así como las vacunas a las que los mutantes dan lugar. Las vacunas pueden estar basadas en bacterias mutantes (que contengan las mutaciones anteriormente descritas) inactivadas térmicamente o por sonicación, o basadas en dichas proteínas de membrana externa reguladas por hierro a las que los mutantes de *P. multocida* dan lugar.

Por lo tanto en la presente solicitud se describe:

a) Gen mutado *fur* de *P. multocida*. Esta mutación consiste en la disrupción del gen por introducción en la bacteria de un plásmido que contiene un fragmento de 394 pares de pares de bases de la región interna de este gen comprendido entre los nucleótidos 18 y 412.

b) Los cebadores *Fur* 1, *Fur* 2 y *Fur*3. Los cebadores *Fur* 1 y *Fur* 2 permiten la clonación por PCR de un fragmento interno de 394 pares de bases del gen *fur* de *P. multocida* para su posterior inserción en un plásmido. El cebador *Fur* 3 permite la comprobación de que el gen de tipo silvestre ha sido interrumpido por integración en *P. multocida* del plásmido que integra el fragmento de 394 pares de bases de *P. multocida* clonado.

La secuencia de los oligos Fur1, Fur2 y Fur3 se puede observar en la Tabla 2.

c) Plásmido pUA891, que incorpora el gen de resistencia a la estreptomina, que es obtenido a través del plásmido suicida pUA826, y que permite la clonación del fragmento de 394 pares de bases del gen *fur* de *P. multocida*. Este plásmido es introducido en *P. multocida* por unión triparental, permitiendo posteriormente el aislamiento de los mutantes putativos *fur* por selección.

5 d) Mutaciones sin sentido en los genes *ompH1* y *ompH2*. Teniendo en cuenta que en *P. multocida* existen dos copias del gen *ompH* separadas por 154 pares de bases, que se transcriben independientemente, se describen dos mutaciones.

La mutación en *ompH1* es una mutación sin sentido en posición 76 que da lugar a un codón stop en lugar de un codón glutamina, haciendo que se exprese una proteína truncada de 24 aminoácidos. La mutación en *ompH2* implica varios cambios nucleotídicos, incluida una mutación sin sentido en posición 670, que da lugar a una proteína truncada de 223 aminoácidos en lugar de los 350 que presenta la proteína nativa. El efecto producido por las mutaciones sin sentido en *ompH1* y *ompH2* es la ausencia de expresión de la proteína OMP de 36 KDa.

10 e) Cebadores OmpH1sequp, OmpH2seqdw, Omp21000, Omp22000, ompH1-2up, RTompH1up, RTompH1rp, RTompH2up y RTompH2dw.

Los cebadores OmpH1sequp y OmpH2seqdw, amplifican las bandas que contienen los genes *ompH1* y *ompH2* (Número de acceso del gen *ompH1*: EF102481 y del gen *ompH2*: EF102482, GenBank) de *P. multocida* para su posterior clonación en vectores. Los Omp21000 y Omp22000, se usan para analizar la secuencia de los genes *ompH1* y *ompH2* de *P. multocida*. El ompH1-2up se utiliza para analizar la secuencia de *ompH1* de *P. multocida*. Y los RTompH1up, RTompH1rp, RTompH2up, RTompH2dw, se usan para analizar la transcripción del gen *ompH* (OmpH1 y OmpH2) en *P. multocida*. La secuencia de los oligos indicados se puede observar en la Tabla 2.

15 f) Vectores que incorporan el fragmento de *P. multocida* clonado usando los cebadores y que, por inserción en *P. multocida* dan lugar al mutante *P. multocida fur ompH*.

g) Cebadores GalEintup, GalEintp, GalEint2up, y pKO3-R. Los cebadores GalEintup y GalEintp son los empleados para obtener el fragmento interno de 495pb del gen *galE* de *P. multocida*. GalEint2up es un cebador directo utilizado para confirmar la disrupción del gen *galE* de *P. multocida*. pKO3-R es un cebador para confirmar la disrupción del gen *galE* de *P. multocida* por la inserción del plásmido pUA891 (plásmido en el que se ha clonado el fragmento de 495 pb.) en *P. multocida fur ompH*. Las secuencias de estos cebadores se pueden observar en la Tabla 2.

20 h) Bacterias *P. multocida* mutantes. Estas bacterias son defectivas en determinados genes. Los mutantes *P. multocida fur* son defectivos en el gen *fur*, impiden la formación del complejo fur-Fe(II), no produciéndose el bloqueo de la transcripción de los genes regulados por el hierro. Estos mutantes o las proteínas de membrana externa reguladas por hierro a las que dan lugar, pueden ser empleados en la fabricación de vacunas contra *P. multocida*, capaces de proporcionar protección heteróloga contra *P. multocida* virulenta. Al no ser necesario el crecimiento en medio deficiente en Fe, se consigue un mayor rendimiento en el cultivo de las bacterias (cuyo crecimiento es muy pobre en presencia de agentes quelantes). Las bacterias *P. multocida fur* son obtenidas tras el aislamiento de los mutantes obtenidos por la inserción del plásmido que incorpora el fragmento de 394 pares de bases del gen *fur* de *P. multocida*. Dichos mutantes ya han sido descritos (Bosch, M., R. Tarragó, M.E. Garrido, S. Campoy, A.R. Fernández de Henestrosa, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, y J. Barbé. FEMS Microbiol. Lett. 203:35-40. 2001).

Otro objeto de invención lo constituyen los mutantes *P. multocida fur ompH*. Dichas bacterias son defectivas en los genes *fur* y *ompH*. Así, en ellas no se produce expresión de *ompH1* y *ompH2*. Este hecho hace que dichos mutantes, al ser empleados en vacunas, confieran mayor protección que los mutantes *fur* (consecuencia no esperable ya que *ompH* codifica la proteína OmpH de 36KDa, altamente inmunogénica).

25 Finalmente, también se han obtenido los triples mutantes *P. multocida fur ompH galE*. El objetivo de la mutación *galE* es optimizar la superficie de exposición de las proteínas de membrana externa reguladas por hierro del mutante *P. multocida fur ompH* con el fin de incrementar la protección frente a *P. multocida*. Para ello, se proporciona la secuencia de los cebadores usados para amplificar un fragmento de 495 pares de bases de *galE*, que posteriormente es clonado en el plásmido pUA1089. Este plásmido es introducido por conjugación triparental en mutantes *P. multocida fur ompH* PM1094, realizándose posteriormente la selección de los mutantes triples. No obstante, los experimentos de efectividad de estas vacunas realizados *in vivo* en ratones muestran un nivel de protección igual al conferido por los mutantes *fur ompH*.

30 i) Utilización de las bacterias mutantes inactivadas *P. multocida fur*, *P. multocida fur ompH*, *P. multocida fur ompH galE* y/o sus proteínas de membrana externa reguladas por hierro, fundamentalmente en forma de extracto, en la elaboración de una vacuna destinada a conferir protección heteróloga a animales susceptibles de ser infectados por *P. multocida* virulenta, siendo dicha inactivación térmica o por sonicación.

j) Vacunas que comprenden las bacterias mutantes *P. multocida fur*, *fur ompH* o *fur ompH GalE*, inactivadas térmicamente o por sonicación y/o extractos de proteínas de membrana externa reguladas por hierro de estos mutantes, que comprendan uno o más adyuvantes y/o uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Con esta aplicación de la invención, la obtención de vacunas, se cumple el requisito de aplicación industrial de la invención.

35 Los estudios de protección frente a *P. multocida*, utilizando los mutantes dobles y triples de la presente solicitud se han llevado a cabo con ratones. Sin embargo, la vacuna se puede aplicar en la lucha contra cualquiera de las enfermedades

causadas por *P. multocida*, tales como neumonías en ganado porcino y vacuno; cólera aviar y neumonías en mamíferos pequeños tales como conejos y hamsters, etc.

Para formular la vacuna, los mutantes *P. multocida fur ompH* o *fur ompH galE* pueden combinarse con cualquiera de los coadyuvantes habituales en este tipo de vacunas veterinarias, tales como lipopolisacáridos, el adyuvante completo o incompleto de Freund, monofosfolípidos como el monofosfolípido A, sulfatos, fosfatos como el fosfato de aluminio, e hidróxidos como el hidroxifosfato de aluminio hidratado y el hidróxido de aluminio.

La dosis de la vacuna variará dependiendo de la concentración del material antigénico; por ejemplo para una vacuna basada en células inactivadas la dosis será de 0,1 ml utilizando una concentración de 10^9 cfu/ml del mutante *fur* o *fur ompH* o *fur ompH galE* en una solución de 1 ml de suero fisiológico utilizado como vehículo, aunque en general la concentración de activo será de 7×10^8 a 1×10^9 cfu/ml en una disolución de 1 ml de vehículo y opcionalmente un adyuvante como por ejemplo el hidróxido de aluminio al 0,7%. Para una vacuna basada en extractos proteicos de membrana externa un ejemplo sería una dosis de 0,1 ml utilizando una concentración de 400 µg de extracto en una solución de 1 ml de suero fisiológico, aunque en general la concentración de activo será de 100 a 400 µg en una disolución de 1 ml de vehículo y opcionalmente un adyuvante como por ejemplo el hidróxido de aluminio al 0,7%.

TABLA 1

Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en la presente invención

Organismo y plásmido	Características relevantes	Fuente de referencia
<i>E. coli</i> DH5α		Clontech
15 MC1061 (λpir)	F'/supE4 ΔlacU169 (Ø80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 hsdR mcrB araD139 Δ(araABC-leu)7679 ΔlacX74 gal1 galK rpsL thi lisógena del bacteriófago λpir	Este laboratorio
<i>P. multocida</i>		
20 PM25	Salvaje, serogrupo D	Aislada de secreción nasal de conejo
PM108	Salvaje, serogrupo A	Aislada de brote de neumonía ovina
PM1002	PM25 Rif ^R Spc ^R	Este laboratorio
PM1011	PM108 Rif ^R Spc ^R	Este laboratorio
PM1094	PM1011 <i>fur ompH</i>	La presente invención
PM1095	PM1011 <i>fur</i>	La presente invención
PM1096	PM1094 <i>galE</i>	La presente invención
Plásmidos		
25 pGEM-T	Vector de clonación de PCR Ap ^R	Promega

25

30

35

5	pRK2013	<i>rep</i> (colE1) Mob ⁺ Tra ⁺ Km ^R	
	pKO3	M13ori <i>repA</i> (ts) <i>sacB</i> Cm ^R	
			(13 – Ditta, G., et al T. Schmidhauser, E. Yakobson, P. Lu, X. W. Liang, D.R. Finlay, D. Guiney, D.R. Helinsky. Plasmid. 13: 149-153. 1985) (18 – Link, A.J., et al D. Phillips, y G.M. Church. J. Bacteriol. 179-6228-6237. 1997)
15	pUA826	Mob ⁺ R6K replicon Ap ^R Str ^R Spc ^R	Este laboratorio
	pUA1089	pKO3 que contiene el lugar <i>mob</i> de pUA826	La presente invención
			(4 – Bosch, M., et al R. Tarragó, M.E. Garrido, S. Campoy, A.R. Fernández de Henestrosa, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, y J. Barbé. FEMS Microbiol. Lett. 203: 35-40. 2001)
	pUA891	pUA826 que contiene un fragmento interno de 394-pb del gen <i>fur</i> de <i>P. multocida</i>	
20	pUA1090	pUA1089 que contiene un fragmento interno de 495-pb del gen <i>galE</i> de <i>P. multocida</i>	La presente invención

TABLA 2
Características de los cebadores utilizados en la presente invención

Cebador	Secuencia	Posición	Aplicación
25	Fur1 5'-AAACTTTTGAAAAA AGCGC-3'	-18 ^a	Cebador directo para obtener un fragmento interno de 394-pb del gen <i>fur</i> de <i>P. multocida</i>
	Fur2 5'-CTTGACATTACTAC ATTTGAA-3'	+412 ^a	Cebador reverso para obtener un fragmento interno de 394-pb el gen <i>fur</i> de <i>P. multocida</i>
	Fur3 5'-CTTAATAGCAAAT AATTAAGGGGC-3'	-30 ^a	Cebador directo utilizado para confirmar la disrupción del gen <i>fur</i> de <i>P. multocida</i>
30	GalEintup 5'-GTGTTGCTCAAAT CACCGGC-3'	+128 ^b	Cebador directo para obtener un fragmento interno de 495-pb del gen <i>galE</i> de <i>P. multocida</i>
	GalEintrp 5'-CCACTTGGCTAAT ATAAGGC-3'	+622 ^b	Cebador reverso para obtener un fragmento interno de 495-bp del gen <i>galE</i> de <i>P. multocida</i>
	GalEint2up 5'-AAGCCCTGCCTTC TATGTGG-3'	-98 ^b	Cebador directo utilizado para confirmar la disrupción del gen <i>galE</i> de <i>P. multocida</i>
35	Aad3 5'-GCCCGAGGCATAG ACTGTACCCC-3'	+123 ^c	Cebador para confirmar la disrupción del gen <i>fur</i> de <i>P. multocida</i> por la inserción del plásmido pUA891

	pKO3-R	5'- TTAATGCGCCGCT ACAGGGCG-3'	90 ^d	Cebador para confirmar la disrupción del gen <i>galE</i> de <i>P.</i> <i>multocida</i> por la inserción del plásmido pUA1090
5	OmpH1sequ p	5'- CAAACCTATTTTGT TTTGAC-3'	-161 ^e	Cebador directo para amplificar la banda que contiene los genes <i>ompH1</i> y <i>ompH2</i> de <i>P. multocida</i> PM1011 y PM1094 y analizar la secuencia del gen <i>ompH1</i> de <i>P.</i> <i>multocida</i> PM1011 and PM1094
10	OmpH2seqd w	5'- CAAAAACGGTGGT GTCGGTG-3'	+1228 [†]	Cebador reverso para amplificar la banda que contiene los genes <i>ompH1</i> y <i>ompH2</i> de <i>P. multocida</i> PM1011 y PM1094 y analizar la secuencia del gen <i>ompH2</i> de <i>P.</i> <i>multocida</i> PM1011 y PM1094
	Om21000	CATTTGGGCAAAA GAAGG	+860 ^e	Cebador para analizar la secuencia del gen <i>ompH2</i> de <i>P. multocida</i> PM1011 y PM1094
	Om22000	CTGCCACTGCAAAA ATCTTGG	+695 ^f	Cebador para analizar la secuencia del gen <i>ompH2</i> de <i>P. multocida</i> PM1011 y PM1094
15	RTompH1up	CGTTTTAGTAAAG ATGTG	+235 ^e	Cebador directo para analizar la transcripción de <i>ompH1</i> en <i>P.</i> <i>multocida</i> PM1011 y PM1094
	RTompH1rp	GTCACCTTAGATT GTGC	+779 ^e	Cebador reverso para analizar la transcripción de <i>ompH1</i> en <i>P.</i> <i>multocida</i> PM1011 y PM1094
	RTompH2up	AAAGAATATTAATA ACAACG	+513 ^f	Cebador directo para analizar la transcripción de <i>ompH2</i> en <i>P.</i> <i>multocida</i> PM1011 y PM1094
20	RTompH2d w	AATCGTACTAACG TCACC	+735 ^f	Cebador reverso para analizar la transcripción de <i>ompH2</i> en <i>P.</i> <i>multocida</i> PM1011 y PM1094 y analizar la secuencia del gen <i>ompH2</i> en ambas cepas
	OmpH1-2up	AATGAGCTGATCG CTAATGC	+33 ^f	Cebador para analizar la secuencia del gen <i>ompH1</i> de <i>P. multocida</i> PM1011 y PM1094
25		^a Posición del extremo 5' del oligonucleótido con respecto al punto inicial de transcripción del gen <i>fur</i> de <i>P. multocida</i> .		
		^b Posición del extremo 5' del oligonucleótido con respecto al punto inicial de transcripción del gen <i>galE</i> de <i>P. multocida</i> .		
		^c Posición del extremo 5' del oligonucleótido con respecto al punto inicial de transcripción del gen <i>aad</i> de pUA826.		
		^d Posición del extremo 5' del oligonucleótido con respecto al lugar de inserción <i>SmaI</i> en el pKO3.		
		^e Posición del extremo 5' del oligonucleótido con respecto al punto inicial de transcripción del gen <i>ompH1</i> de <i>P. multocida</i> .		
30		^f Posición del extremo 5' del oligonucleótido con respecto al punto inicial de transcripción del gen <i>ompH2</i> de <i>P. multocida</i> .		

TABLA 3

rotección conferida en ratones en el enfrentamiento heterólogo con *P. multocida* PM1002 por inmunización con proteínas de la membrana externa

Cepa fuente de OMP	Características relevantes	Dosis ^b (µg/animal)	Supervivencia
PM1011	Salvaje	10	0/5
		40	0/5

35

	PM1011	Salvaje crecida en presencia de DPD ^a	10	0/5
5			40	1/5
	PM1095	<i>fur</i>	10	0/5
			40	1/5
	PM1094	<i>fur ompH</i>	10	4/5
			40	5/5
10	Control Suero Fisiológico			0/5

^aQuelante de cationes divalentes 2,2'-dipiridilo.

^bCantidad de extracto de proteína de la membrana externa inoculado en cada inmunización animal.

15

TABLE 4
Protección conferida en ratones en el enfrentamiento heterólogo con la cepa PM1002 de *P. multocida* mediante inmunización con cepas inactivadas de *P. multocida*

Cepa	Procedimiento inactivación ^a	de	Dosis de enfrentamiento (x LD ₅₀)	Supervivencia
Salvaje	H		500	0/5
	H		100	0/5
<i>fur oomph</i>	H		500	0/5
	H		100	3/5
<i>fur oomph galE</i>	H		500	0/5
	H		100	3/5
Salvaje	S		500	0/5
<i>fur oomph galE</i>	S		500	3/5
Control Suero fisiológico			100	0/5

30

^a Una suspensión de células a 7×10^8 cfu/ml se inactivó por calor mediante incubación a 45°C durante 12 h (H) o por sonicación (S) y se inocularon 0,1 ml por animal.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

El listado de las cepas bacterianas utilizadas se muestra en la Tabla 1. Todas las cepas de *P. multocida* fueron crecidas en medio líquido, en agua de peptona tamponada (BPW) o BHI, en placas de agar SBA. Cuando fue necesario se añadieron antibióticos en las concentraciones descritas (Cárdenas, M. et al A.R. Fernández de Henestrosa, S. Campoy,

35

A.M Pérez de Rozas, J. Barbé, I. Badiola, y M. Llagostera. Vet. Microbiol. 80:53-61. 2001). En el crecimiento de la cepa salvaje, la concentración de agente quelante de cationes divalentes, 2-2'-dipiridilo DPD (Sigma) utilizado fue de 150 μ M (Tabla 3).

5 Métodos genéticos

El mutante *P. multocida fur* se obtuvo a partir del plásmido pUA891 (Figura 1A). Este plásmido se obtiene como resultado de la inserción de un fragmento interno del gen pUA826 (Bosch, M., R. Tarragó, M.E. Garrido, S. Campoy, A.R. Fernández de Henestrosa, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, y J. Barbé. FEMS Microbiol. Lett. 203: 35-40. 2001) con un fragmento interno del gen *fur* de *Pasteurella multocida* de 394 pb. El pUA826 deriva del pGY2 (26-) al que se ha extraído el gen *cat* mediante restricción con *SalI*. El plásmido pGY2 tiene un origen de replicación R6K (dependiente de la proteína *lpir* para replicarse, por tanto es suicida en *Pasteurella multocida*, contiene la región de movilización *mob* del RP4 y los genes que le confieren resistencia a ampicilina (*bla*), estreptomycinina y espectinomycinina (*aadA*) y cloramfenicol (*cat*). Este último gen, como ya se ha comentado, no está en los plásmidos pUA826 y pUA891.

10 Para construir el mutante *fur ompH galE* se utilizó el plásmido pUA1090 (Figura 3A). Este plásmido es el resultado de la clonación en el plásmido pUA1089 (pKO3 con el sitio *mob* del pUA826) de un fragmento interno de 495 pb del gen *galE* de *Pasteurella multocida*. El plásmido pUA1090 fue introducido por conjugación triparental en la cepa mutante *fur ompH*, seleccionándose los transconjugantes en placas selectivas.

Para determinar la estabilidad de la mutación *fur*, los mutantes *fur* se subcultivaron 20 veces consecutivas sobre placas de SBA sin añadir antibióticos. La concentración de bacterias viables se determinó a los 5, 15 y 20 pases utilizando diluciones adecuadas de una suspensión de células (10^9 cfu/ml) sobre placas SBA con y sin estreptomycinina, ya que pUA891 codifica el gen de resistencia a este antibiótico. El porcentaje de estabilidad se calculó como el número de colonias obtenidas en placas suplementadas con antibiótico frente a aquellas que no contenían antibiótico.

15 Así, se observó que la mutación *fur* se mantenía con una estabilidad del 100% en células después de 20 pases en ausencia de presión selectiva.

Métodos bioquímicos, técnicas de DNA y RNA

20 La metodología y análisis de secuencias por ordenador fueron llevadas a cabo según se ha descrito (8- Cárdenas, M., A.R. Fernández de Henestrosa, S. Campoy, A.M. Pérez de Rozas, J. Barbé, I. Badiola, y M. Llagostera. Vet. Microbiol. 80: 53-61. 2001). Los cebadores utilizados se describen en la Tabla 2. Las secuencias de nucleótidos se determinaron por el método dideoxi en un secuenciador ALF Sequencer (Farmacia Biotech). Los análisis de extracción de RNA y de RT-PCR se llevaron a cabo según se ha descrito (Bosch, M., E. Garrido, M. Llagostera, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, y J. Barbé. FEMS Microbiol Lett. 210: 201-208. 2002). Los extractos de proteína de membrana externa de *P. multocida* se obtuvieron y analizaron según se ha descrito (Bosch, M., E. Garrido, M. Llagostera, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, y J. Barbé. FEMS Microbiol Lett. 210: 201-208. 2002). Las concentraciones de proteína se midieron según se ha descrito (Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, y R.J. Randall. J. Biol. Chem. 193: 265-275. 1951).

Estudios de protección contra *P. multocida*

25 Grupos de cinco ratones hembra Swiss de tres semanas (Harlan Ibérica; Barcelona, España) fueron inyectados intraperitonealmente con 10 ó 40 μ g/animal de extracto de proteína de membrana externa (OMP). Los extractos se prepararon a partir de distintas cepas de *P. multocida* crecidas en diferentes condiciones de cultivo. En todos los casos el volumen de extracto inoculado fue de 100 μ l que se administró en dos dosis con dos semanas de diferencia. Los ratones control fueron inoculados con 100 μ l de suero fisiológico. El desafío heterólogo se llevó a cabo tres semanas después por inoculación intraperitoneal de 0,1 ml de una cepa virulenta de *P. multocida* (PM1002) que contenía 100 ó 500 veces su LD₅₀.

30 La misma metodología fue usada para estudiar la protección conferida por las cepas PM1094 (deficiente en *fur* y *ompH*) y PM1096 (deficiente en *fur*, *ompH* y *galE*) de *P. multocida* inactivadas térmicamente o por sonicación. La inactivación térmica se consiguió por incubación a 45°C durante toda la noche de un cultivo crecido previamente en BHI a 30°C hasta una densidad de 7×10^8 cfu/ml. Las células inactivadas por sonicación se prepararon sonicando 7×10^8 cfu/ml, resuspendidas en BPW, cinco veces durante cinco minutos en un baño de hielo a -40°C, con un rendimiento del 80%. La ausencia de células viables se probó sobre placas SBA. En todos los casos, el volumen de extracto de células inactivadas inoculado fue de 100 μ l y se administró en dos dosis con un intervalo de dos semanas. El control negativo y el desafío heterólogo se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente.

Resultados

Construcción de un mutante *P. multocida*

El fragmento interno de 394-pb del gen *fur* de *P. multocida* fue obtenido por amplificación por PCR utilizando los cebadores Fur1 y Fur2 (Tabla 2). El fragmento obtenido fue clonado en el plásmido suicida pUA826, dando como resultado el plásmido pUA891 (Fig.1A).

35 Tras la introducción del plásmido pUA891 en *P. multocida* por conjugación triparental, se aislaron varios mutantes putativos *fur* tras sembrado de bacterias en placas selectivas adecuadas. El análisis del DNA cromosómico por la

técnica PCR confirmó que el gen *fur* del tipo salvaje había sido interrumpido por integración del plásmido pUA891 (Fig. 1B).

En la Fig.1B puede observarse el DNA cromosómico de la cepa salvaje (PM1011) (carril 2), mutantes *fur* (PM1095) (carril 3) y *fur ompH* (PM1094) (carril 4) que fueron sujetos al análisis por PCR con los cebadores Aad3 y Fur3 (Tabla 2).

5 El control de PCR sin DNA se muestra en el carril 5. DNA del fago ΦX174 digerido con *HinfI* se utilizó como marcador de pesos moleculares (carriles 1 y 6).

Igualmente, los perfiles electroforéticos de las fracciones de membrana externa de varios mutantes *fur* fueron analizados para corroborar que la presencia de la mutación *fur* daba lugar a la inducción de proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMPs) de elevado peso molecular, tal y como se ha descrito previamente (4). Se obtuvieron dos perfiles distintos de mutantes *fur*. Sorprendentemente, el primer mutante expresó la principal proteína de membrana externa (OMP) de 36-kDa, OmpH, de *P. multocida*, mientras que el segundo no lo hizo.

10 En la secuencia completa del genoma de *P. multocida* Pm70 (21), se identificaron dos copias del gen *ompH* (separadas por 154 pb), que codifican las proteínas OmpH1 y OmpH2. Con objeto de determinar la mutación responsable del fenotipo observado en el mutante *fur ompH* (cepa PM1094), se llevaron a cabo análisis de RT-PCR para determinar si los genes *ompH* se habían transcrito. Los resultados demostraron que *ompH1* y *ompH2* del mutante *fur ompH* habían sido transcritos independientemente. Sin embargo, la secuenciación del DNA de estos genes (número de acceso GenBank EF102481 y EF102482, respectivamente) reveló diferencias significativas en comparación con las secuencias correspondientes de las cepas PM1011 y Pm70. En el gen *ompH1* del mutante *fur ompH*, se encontró una mutación sin sentido en posición 76, dando lugar a un codón stop en lugar de uno que codifica glutamina; esto da lugar a una proteína truncada muy corta de 24 aminoácidos. Igualmente, la secuencia de *ompH2* de este mutante presentaba muchos cambios nucleotídicos, incluyendo una mutación sin sentido en posición 670 que da lugar a una proteína truncada de 223 aminoácidos en lugar de 350 aminoácidos. Estos resultados indicaron claramente que la ausencia de la principal proteína de membrana externa (OMP) de 36-kDa en el mutante *P. multocida fur ompH* es debida a mutaciones sin sentido en *ompH1* y *ompH2*. La Figura 2 muestra el esquema de la estructura de los genes *ompH1* y *ompH2* de *P. multocida*. RTompH1up, RTompH1rp, RTompH2up y RTompH2rp indican las posiciones de los cebadores utilizados para el análisis transcripcional (A). Los apartados (B), (C) y (D) muestran el análisis mediante RT-PCR de los transcritos de los genes *ompH1*, *ompH2* y del posible operón *ompH1-ompH1* tanto en la cepa salvaje (PM1011) (carril 2) como en la mutante *fur ompH* (PM1094) (carril 3). Se utilizó RNA total de cada una de las cepas y las parejas de cebadores RTompH1up y RTompH1rp, RTompH2up y RTompH2rp y RTompH1up y RTompH2rp, respectivamente. Se muestran también las PCRs con DNA de la cepa salvaje (carril 4) y de un control negativo sin RNA ni DNA (carril 5). DNA de los fagos ΦX174 digerido con *HinfI* (B y C) y del fago λ digerido con *BstEII* (D) se utilizaron como marcadores de pesos moleculares (carril 1).

Estudios de protección con mutantes *P. multocida fur*

25 Para analizar el efecto protector putativo del mutante *P. multocida fur* se inmunizaron grupos de cinco ratones con 10 y 40 µg/animal de extracto de proteínas de membrana externa (OMP) preparados a partir de cepa PM1011 de tipo salvaje de *P. multocida*, crecida en ausencia o presencia de DPD, y a partir de los mutantes *fur* y *fur ompH*. A continuación los ratones fueron desafiados heterológamente con la cepa virulenta PM1002 (LD₅₀ = 3 cfu/animal) con una dosis de 500XLD₅₀. Todos los ratones inmunizados con extracto de proteína de membrana externa (OMP) obtenido de células de tipo salvaje crecidas en ausencia de DPD murieron dos días después del desafío (Tabla 3). Sin embargo, los ratones inmunizados con 40 µg de extracto de proteína de membrana externa (OMP) tanto de la cepa del tipo salvaje crecida en medio deficiente en hierro como los inmunizados con el mutante *fur* presentaron un 20% de protección (Tabla 3). Notablemente, la ausencia de la principal proteína de membrana externa (OMP) de *P. multocida* en el extracto dio lugar a protección total (Tabla 3).

30 Ya que el nivel de protección más alto se obtuvo con el extracto de proteína de membrana externa (OMP) preparado a partir del doble mutante *fur ompH*, los siguientes experimentos se enfocaron hacia el análisis de la protección proporcionada por células de esta cepa inactivadas térmicamente. Ratones a los que se administró una dosis de 7×10^7 cfu/ml de células *fur ompH* inactivadas térmicamente fueron posteriormente sometidos a desafío heterólogo con una dosis de 100XLD₅₀ de la cepa PM1002; estos ratones fueron protegidos en un 60% (Tabla 4). Estos resultados indican que la simple inactivación térmica de las células de *P. multocida fur ompH* puede ser usada para producir una vacuna que confiera protección heteróloga.

Efecto de la mutación *galE* en la capacidad protectora de la cepa *P. multocida*

35 Con objeto de determinar si la optimización de la superficie de exposición de las proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMPs) aumentaba la protección obtenida con células *fur ompH* inactivadas, se procedió a introducir una mutación en el lipopolisacárido (LPS) del mutante *fur ompH*, dando lugar a una cepa derivada. El producto del gen *galE* cataliza la epimerización de UDP-galactosa a UDP-glucosa y es necesario para la correcta síntesis del centro del lipopolisacárido. Con este fin se construyó un mutante *galE* capaz de crecer en presencia de glucosa pero incapaz de sintetizar el LPS de superficie de las células de tipo salvaje. Mediante amplificación por PCR con oligonucleótidos GalEintup y GalEintrp se obtuvo un fragmento interno del gen *galE* de 495-pb. Este fragmento se clonó

en pUA1089 y el plásmido resultante fue introducido en la cepa *fur ompH* (PM1094) por conjugación triparental. Tras cultivo en placas selectivas adecuadas, se obtuvieron varios mutantes *galE* putativos.

5 En la Figura 3 se describe el análisis mediante PCR de la construcción del mutante *galE* de *P. multocida*. El apartado (A) muestra la construcción del mutante *galE* de *P. multocida*. GalEint2up y pKO3-R indican las posiciones de los cebadores utilizados para confirmar la presencia de la mutación *galE* y el apartado (B) muestra el DNA cromosómico de la cepa salvaje (PM1011) (carril 2), mutantes *fur ompH* (PM1094) (carril 3) y *fur ompH galE* (PM1096) (carril 4) que fueron sujetos a análisis mediante PCR utilizando los cebadores GalEint2up y pKO3-R (Tabla 2). El control de PCR sin DNA se muestra en el carril 5. DNA del fago λ digerido con *BstEII* se utilizó como marcador de pesos moleculares (carriles 1 y 6).

El análisis por PCR del DNA cromosómico de cuatro de los transconjugados confirmó que la inserción de pUA1090 interrumpía el gen *galE* de tipo salvaje. A continuación, se eligió uno de estos clones, el PM1096 (Fig.3), para estudios posteriores, y el análisis de su perfil de proteínas de membrana exterior corroboró que presentaba el mismo perfil que el de la cepa progenitora.

10 Grupos de cinco ratones fueron inoculados con 7×10^7 cfu/ animal de células *fur ompH galE* inactivadas térmicamente (45°C durante 12 horas) y posteriormente fueron enfrentados al desafío heterólogo de PM1002 con dosis de 100 y 500xLD₅₀. Como se observa en la Tabla 4, los animales inmunizados con la cepa inactivada térmicamente fueron protegidos en un 60% con la dosis más baja. Así, aunque las células bacterianas expresaron LPS de superficie celular más cortos, esto no resultó en un aumento de la protección mediada por proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMPs), ya que los mutantes *fur ompH* y *fur ompH galE* indujeron el mismo nivel de protección en ratones inmunizados con cualquiera de las cepas de estos mutantes inactivadas térmicamente.

15 Además, se probó una estrategia de inactivación diferente basada en la disrupción de las células por sonicación. Los ratones inmunizados con células *fur ompH galE* inactivadas por sonicación fueron protegidos en un 60% frente a la dosis más alta (500xLD₅₀) de bacteria virulenta, (Tabla 4), sugiriendo estos resultados que la inactivación de las células por este método proporciona una respuesta inmune más fuerte que el tratamiento térmico y que por lo tanto este método de inactivación puede ser más adecuado para el desarrollo de vacunas contra la infección de *P. multocida*.

En conclusión, los resultados presentados muestran por primera vez que las proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMPs) de mutantes *P. multocida fur ompH* son inmunogénicas y confieren protección heteróloga. Por lo tanto, dichos resultados sugieren que los mutantes dobles *fur ompH* pueden ser utilizados para el desarrollo de vacunas basadas en proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMPs), particularmente contra patógenos que presenten varios y distintos receptores de hierro, como es el caso de *P. multocida*. Además, la estrategia de utilizar mutantes dobles *fur ompH* soluciona los problemas asociados con otros métodos tales como el pobre crecimiento que experimentan las células bacterianas en presencia de agentes quelantes de cationes divalentes.

20

25

30

35

Referencias

1. Adler B., R. Chancellor, P. Homchampa, M. Hunt, C. Ruffolo, R. Strugnell, and D. Wapling. 1996. Immunity and vaccine development in *Pasteurella multocida* infections. *J. Biotechnol.* 44:139-144.
2. Baichoo, N., and J.D. Helmann. 2002. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* 184:5826-5832.
3. Basagoudanavar, S.H., D.K. Singh and B.C. Varshney. 2006. Immunization with outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* (6:B) provides protection in mice. *J. Vet. Med.* 53:524-530.
4. Bosch, M., R. Tarragó, M.E. Garrido, S. Campoy, A.R. Fernández de Henestrosa, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, and J. Barbé. 2001. Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 203:35-40.
5. Bosch, M., E. Garrido, M. Llagostera, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, and J. Barbé. 2002. *Pasteurella multocida exxB, exxD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiol Lett.* 210:201-208.
6. Bosch, M., M.E. Garrido, M. Llagostera, A.M. Pérez De Rozas, I. Badiola, and J. Barbé. 2002. Characterization of the *Pasteurella multocida hgbA* gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infect. Immun.* 70:5955-5964.
7. Bosch, M., M.E. Garrido, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola, J. Barbé, and M. Llagostera. 2004. *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. *Vet. Microbiol.* 99:103-112.
8. Cárdenas, M., A.R. Fernández de Henestrosa, S. Campoy, A.M. Pérez de Rozas, J. Barbé, I. Badiola, and M. Llagostera. 2001. Virulence of *Pasteurella multocida recA* mutants. *Vet. Microbiol.* 80:53-61.
9. Chibber, S., and S.B. Bhardwaj. 2004. Protection in a mouse peritonitis model mediated by iron-regulated outer-membrane protein of *Salmonella typhi* coupled to its Vi antigen. *J. Med. Microbiol.* 53:705-709.
10. Chung, J.Y., I. Wilkie, J.D. Boyce, and B. Adler. 2005. Vaccination against fowl cholera with acapsular *Pasteurella multocida* A:1. *Vaccine.* 23:2751-2755.
11. Cox, A.J., M.L. Hunt., J.D. Boyce, and B. Adler. 2003. Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. *Microb. Pathog.* 34:287-296.
12. de Lorenzo, V., M. Herrero, F. Giovannini, and J.B. Neilands. 1988. Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 173:537-546.
13. Ditta, G., T. Schmidhauser, E. Yakobson, P. Lu, X.W. Liang, D. R. Finlay, D. Guiney, D.R. Helinski. 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13:149-153.
14. Escolar, L., J. Pérez-Martín, and V. de Lorenzo. 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181:6223-6229.
15. Garrido, M.E., M. Bosch, R. Medina, A. Bigas, M. Llagostera, A. M. Pérez de Rozas, I. Badiola, and J. Barbé. 2003. *fur*-independent regulation of the *Pasteurella multocida hbpA* gene encoding a haemin-binding protein. *Microbiology* 149:2273-2281.
16. Glisson, J.R., M.D. Contreras, I.H. Cheng, and C. Wang. 1993. Cross-protection studies with *Pasteurella multocida* bacterins prepared from bacteria propagated in iron-depleted medium. *Avian. Dis.* 37:1074-1079.
17. Hodgson, J.C., A. Finucane, M.P. Dagleish, S. Ataei, R. Parton, and J. G. Coote. 2005. Efficacy of vaccination of calves against hemorrhagic septicemia with a live *aroA* derivative of *Pasteurella multocida* B:2 by two different routes of administration. *Infect. Immun.* 73:1475-1481.
18. Link, A.J., D. Phillips, and G.M. Church. 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* 179:6228-6237.
19. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
20. Luo, Y., J.R. Glisson, M. W. Jackwood, R.E. Hancock, M. Bains, I.H. Cheng, and C. Wang. 1997. Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (*ompH*) of *Pasteurella multocida* X-73. *J. Bacteriol.* 179:7856-7864.
21. May, B.J., Q. Zhang, L.L. Li, M.L. Paustian, T.S. Whittam, and V. Kapur. 2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:3460-3465.
22. Ratledge, C., and L.G. Dover. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:881-941.
23. Ruffolo, C.G., B.H. Jost, and B. Adler. 1998. Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. *Vet. Microbiol.* 59:123-137.
24. Sood, S., P. Rishi, V. Dahwan, S. Sharma, and N.K. Ganguly. 2005. Protection mediated by antibodies to iron-regulated outer-membrane proteins of *S. typhi* in a mouse peritonitis model. *Mol. Cell. Biochem.* 273:69-78.

25. Stojiljkovic, I., A.J. Baumler, and K. Hantke. 1994. Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. J. Mol. Biol. 236:531-545. Erratum in: 1994. J. Mol. Biol. 240:271.

5 26. Young, G.M., Amid, D. and Miller, V.L. 1996. A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. J. Bacteriol. 178, 6457-6495.

10

15

20

25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Bacteria *Pasteurella multocida* mutada caracterizada porque es defectiva en los genes *fur* y *ompH* de forma tal que no se produce la expresión de *fur* ni de *ompH1* y *ompH2*.
2. Bacteria *Pasteurella multocida* de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque además de ser defectiva en los genes *fur* y *ompH* también lo es en el gen *galE* de forma tal que se optimiza la superficie de exposición de las proteínas de membrana externa reguladas por hierro de las células de *P. multocida fur ompH*.
3. Bacteria *Pasteurella multocida* mutada de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, caracterizada por ser defectiva en *fur* por interrupción del gen salvaje depositado en GenBank con en número de acceso AF027154 versión 1, por integración en el mismo del fragmento interno de 394 pb del gen *fur* comprendido entre los nucleótidos 18 y 412, amplificado con el cebador Fur1 de secuencia 5'-AACTTTTGAAAAAAGCGC-3' y el cebador Fur2 de secuencia 5'-CTTGACATTACTACATTTGAA-3'.
4. Bacteria *Pasteurella multocida* mutada, de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, caracterizada por ser defectiva en *OmpH*, presentando una mutación sin sentido en *ompH1* en posición 76, y varios cambios nucleotídicos así como una mutación sin sentido en posición 670 en *ompH2*.
5. Bacteria *Pasteurella multocida* mutada, de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, caracterizada porque la mutación en *ompH1* da lugar a un codón stop en lugar de glutamina resultando en una proteína truncada de 24 aminoácidos, y porque la mutación en *ompH2* da lugar a una proteína truncada de 223 aminoácidos en lugar de 350 aminoácidos.
6. Bacteria *Pasteurella multocida* mutada, de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, caracterizada por la ausencia de la principal proteína de membrana externa de 36-KDa debido a las mutaciones sin sentido según reivindicaciones 4 y 5.
7. Bacteria *Pasteurella multocida* mutada, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada por ser defectiva en *galE* por interrupción del gen salvaje por integración en el mismo del fragmento interno de *galE* de 495 pb. obtenido por amplificación con el cebador GalEintup de secuencia 5'-GTGTTGCTCAAATCACCGGC-3' y el cebador GalEintrp de secuencia 5'-CCACTTGGCTAATATAAGGC-3'.
8. Bacteria *Pasteurella multocida* mutada, de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, caracterizada por haber sido inactivada.
9. Bacteria *Pasteurella multocida* mutada, de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada porque ha sido inactivada térmicamente.
10. Bacteria *Pasteurella multocida* mutada de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada por haber sido inactivada por sonicación.
11. Utilización del mutante doble *Pasteurella multocida fur ompH* o mutante triple *Pasteurella multocida fur ompH galE* de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, para obtener una preparación de proteínas de membrana externa.
12. Método para la preparación de una vacuna para la protección heteróloga de animales frente a la infección por *P. multocida* que se caracteriza porque comprende:
 - a. la obtención de mutantes de *P. multocida* defectivos en los genes *fur* y *ompH*, o en los genes *fur*, *ompH* y *galE*, de acuerdo con las reivindicaciones 1-10 y/o una preparación de proteínas de membrana externa a la que dichas células de *P. multocida* mutadas dan lugar, de acuerdo con la reivindicación 11; y
 - b. la preparación adecuada al método de administración elegido de la vacuna, que comprenda un extracto de células obtenidas en (a) conteniendo una cantidad efectiva del mutante *fur ompH* o *fur ompH galE* y/o de proteínas de su membrana externa y un vehículo y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
13. Método para la preparación de una vacuna para la protección heteróloga de animales frente a la infección por *P. multocida*, de acuerdo con la reivindicación 12, que se caracteriza porque las células del mutante doble *fur ompH* o del mutante triple *fur ompH galE* han sido inactivadas térmicamente.
14. Método para la preparación de una vacuna para la protección heteróloga de animales frente a infección por *P. multocida*, de acuerdo con la reivindicación 12, que se caracteriza porque las células del mutante *fur*, del mutante doble *fur ompH* o del mutante triple *fur ompH galE* han sido inactivadas por sonicación.
15. Composición de vacuna para la protección heteróloga de animales contra la infección por *Pasteurella multocida* caracterizada porque comprende una cantidad inmunogénica del mutante doble *fur ompH* o del mutante triple *fur ompH gal E* de acuerdo con las reivindicaciones 12-14, un vehículo y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
16. Composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 15, para proteger de forma heteróloga a animales de enfermedades causadas por infección por *P. multocida*, tales como neumonías en ganado porcino y vacuno, cólera aviar y neumonías en mamíferos pequeños como conejos y hamsters.
17. Utilización del mutante doble *Pasteurella multocida fur ompH* o del mutante triple *Pasteurella multocida fur ompH galE* para la preparación de una vacuna para la protección heteróloga de animales contra la infección por *Pasteurella multocida* de acuerdo con las reivindicaciones 12-16.

18. Utilización del mutante doble *Pasteurella multocida fur ompH* para la preparación de una vacuna para la protección heteróloga de animales contra la infección por *Pasteurella multocida* de acuerdo con las reivindicaciones 12-16.

5 19. Utilización del mutante triple *Pasteurella multocida fur ompH galE* para la preparación de una vacuna para la protección heteróloga de animales contra la infección por *Pasteurella multocida* de acuerdo con las reivindicaciones 12-16.

10

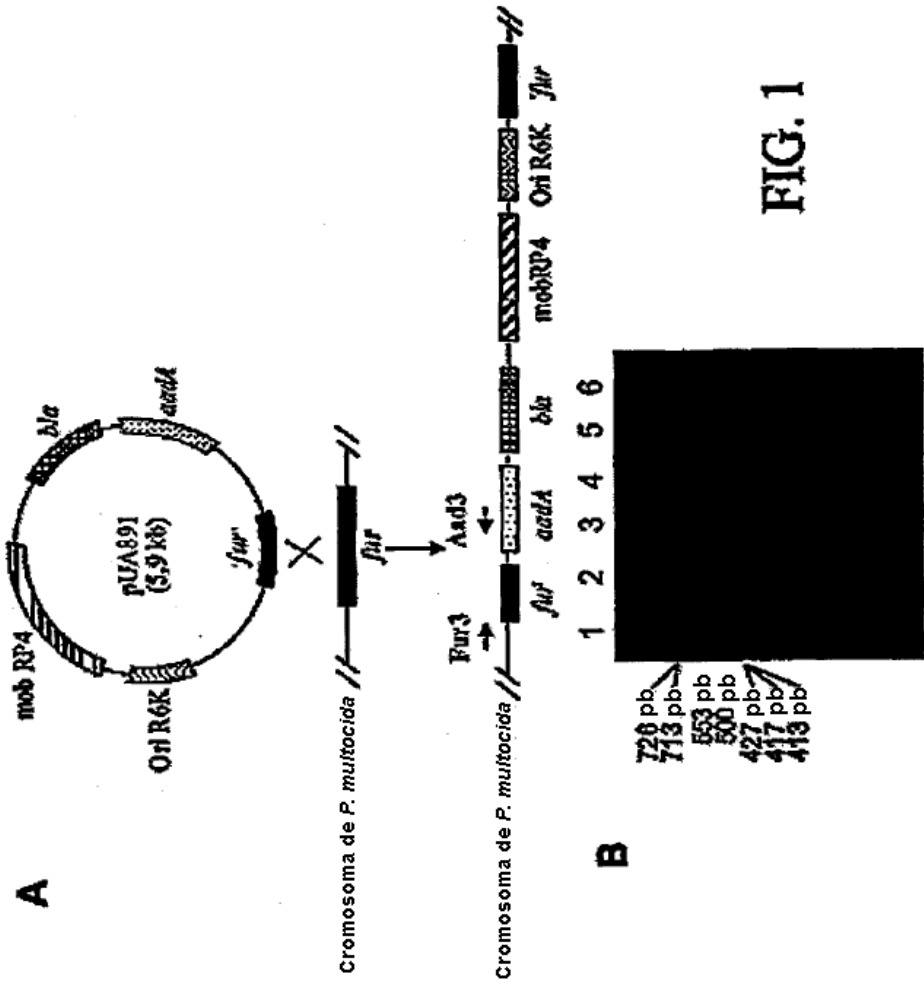
15

20

25

30

35



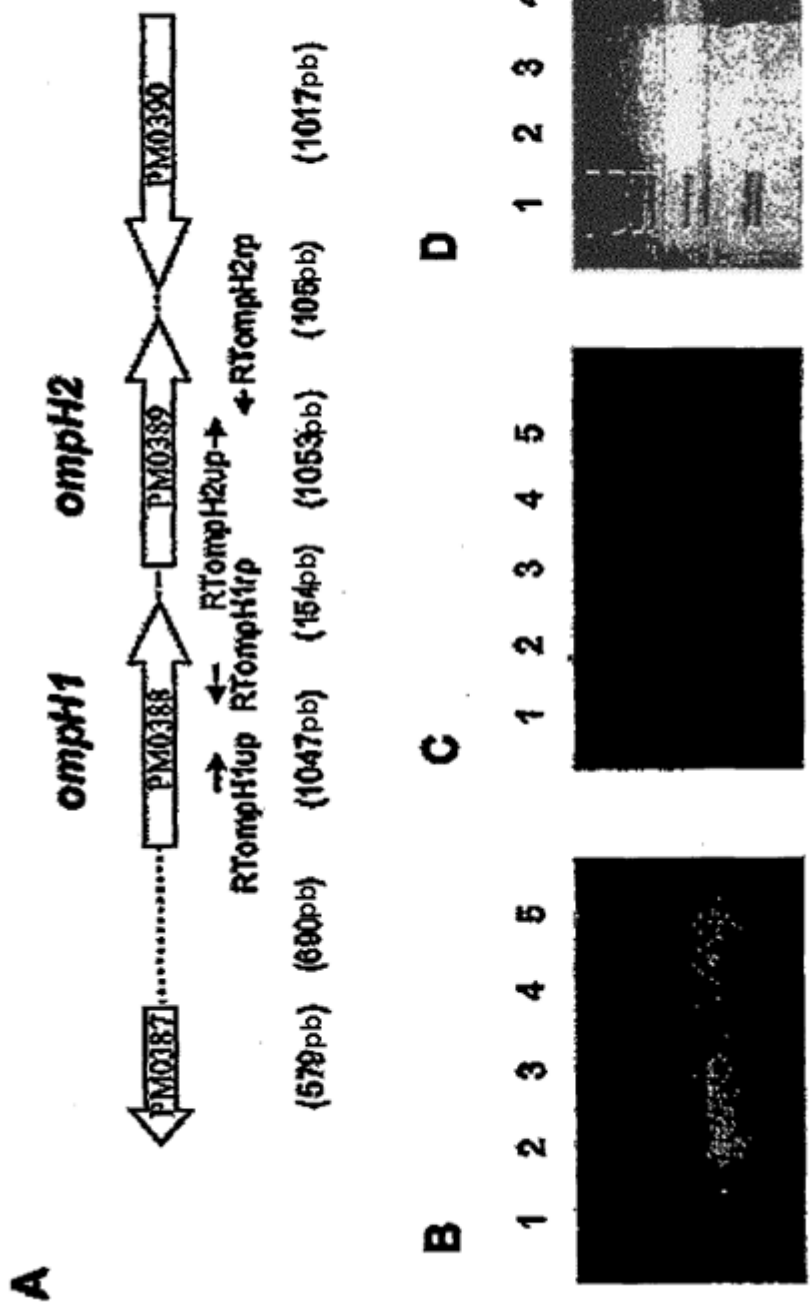


FIG. 2

