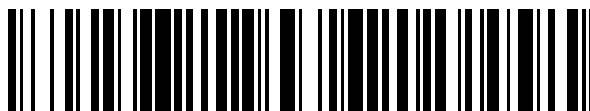


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 682**

51 Int. Cl.:

C07K 14/235 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08723920 .8**

96 Fecha de presentación: **25.03.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2134743**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2009**

54 Título: **Vacunas mejoradas contra Bordetella pertussis basadas en mutantes de glicosiltransferasa LPS**

30 Prioridad:

26.03.2007 EP 07104885

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

27.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

27.12.2012

73 Titular/es:

**DE STAAT DER NEDERLANDEN, VERT. DOOR
DE MINISTER VAN VWS (100.0%)
P.O. BOX 20350
2500 EJ THE HAGUE, NL**

72 Inventor/es:

**GEURTSSEN, JEROEN JOHANNES GERARDUS;
TOMMASSEN, JOHANNES PETRUS MARIA y
VAN DER LEY, PETER ANDRÉ**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 393 682 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

Vacunas mejoradas contra *Bordetella pertussis* basadas en mutantes de glicosiltransferasa LPS

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a una vacuna mejorada contra la tos ferina comprendiendo mutantes de *Bordetella pertussis* con una molécula LPS modificada y/o las moléculas LPS obtenibles de estos mutantes. Estos mutantes y / o las moléculas LPS obtenibles pueden usarse además como adyuvante.

10

Antecedentes de la invención

[0002] LPS es una molécula anfifílica localizada en la cara externa de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. LPS posee ambas actividad endotóxica y actividad adyuvante. Ambas propiedades se basan en su reconocimiento por el complejo receptor TLR4/MD-2 huésped (revisado en Pålsson-McDermott and O'Neill, 2004; O'Neill, 2006). LPS consiste en tres dominios estructurales diferentes: lípido A, el núcleo y el antígeno O. Lípido A funciona como un anclaje de membrana hidrofóbica y forma el componente bioactivo de la molécula (Takada and Kotani, 1989). La región de núcleo consiste en un oligosacárido complejo, que, en comparación con el antígeno O, muestra solo variabilidad estructural. En algunas bacterias, por ejemplo, *Enterobacteriaceae*, el oligosacárido del núcleo (OS del núcleo) se puede dividir en un núcleo interno y un núcleo externo. El núcleo externo principalmente consiste en hexosas piranosídicas, por ejemplo, D-glucosa, D-galactosa y D-glucosamina, mientras que el núcleo interno principalmente consiste en ácidos octulosónicos y heptopiranosas. En la gran mayoría de bacterias gram-negativas, el dominio del núcleo se conecta al dominio del lípido A por un carbohidrato específico, ácido 2-ceto-3-deoxioctulosónico (Kdo) (Raetz and Whitfield, 2002). El antígeno O comprende la parte más variable del LPS y confiere especificidad de serotipo de bacterias. Se compone de repetición de subunidades de azúcar de uno a ocho azúcares. Cada cadena O puede contener hasta 50 de estas subunidades. El antígeno O ha sido implicado en el escape inmunológico bacteriano, especialmente el escape de lisis mediado por complemento de suero (Raetz and Whitfield, 2002).

[0003] A diferencia del LPS de *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella parapertussis*, el LPS de *Bordetella pertussis* nunca contiene un dominio de antígeno O (Peppler, 1984; Di Fabio *et al.*, 1992). Por lo tanto, LPS de *B. pertussis* se refiere frecuentemente como lipooligosacárido. *B. pertussis* produce dos formas de LPS dominantes, LPS de banda A y banda B (Peppler, 1984). Banda B LPS se compone de lípido A y un oligosacárido de núcleo que consiste en 9 carbohidratos (Caroff *et al.*, 2000). Adición de un trisacárido terminal, que consiste en N-acetil glucosamina, ácido 2,3-diacetamido-2,3-didesoxi-manurónico y 2-acetamido-4-N-metil-2,4-didesoxi-fucosa, a banda B LPS forma el LPS referido como banda A.

[0004] En *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, el clúster de gen de biosíntesis de OS del núcleo consiste en tres operones, designados los operones *gmhD*, *waaQ* y *WaaA*. El operón *gmhD* consiste en cuatro genes, *gmhD* y *waaFCL*, que están implicados en la síntesis del núcleo interno (Schnaitman y Klena, 1993). Los genes *gmhD*, *waaF* y *waaC* codifican proteínas implicadas en la biosíntesis y transferencia de Heptosas I y II a Kdo2-lípido A (Schnaitman and Klena, 1993), mientras que el producto genético *waaL* es una ligasa que está implicada en la fijación del antígeno de O (MacLachlan *et al.*, 1991). El operón *waaQ* es el más grande de los tres operones y codifica proteínas que están implicadas en la biosíntesis del núcleo externo y en la modificación/decoración del núcleo OS. El número y tipos de genes presentes dentro de en el operón *waaQ* difiere por cepa, que explica las diferencias específicas de tensión en la composición de núcleo (Heinrichs *et al.*, 1998). El operón *WaaA* codifica frecuentemente solo una proteína, KdtA. Solo en *E. coli* K-12, un marco de lectura abierto no relacionado con LPS adicional (ORF) está presente (Raetz and Whitfield, 2002). El gen *KdtA* de *Enterobacteriaceae* codifica la transferasa Kdo bifuncional que añade los dos residuos Kdo en la biosíntesis Kdo2-lípido A (Clementz and Raetz, 1991).

[0005] Aunque OS del núcleo de *Bordetella* y de *E. coli* muestran alguna similitud, la composición exacta y configuración de residuos muestran diferencias marcadas. Por ejemplo, el OS del núcleo de *Bordetella* contiene solo un residuo Kdo, en vez de los dos o tres residuos que se encuentran en la mayoría de otras bacterias gram-negativas, incluyendo *E. coli*. Recientemente, esto mostró ser debido al funcionamiento de *Bordetella* KdtA como un monofuncional, más que como una bifuncional, transferasa Kdo (Isobe *et al.*, 1999). Las enzimas responsables de la síntesis de la parte restante del OS del núcleo de *Bordetella* se desconocen actualmente y se esperan identificación adicional.

[0006] Aunque su parte de lípido A se ve generalmente como el principal determinante para la actividad biológica de LPS a través de la activación del complejo receptor TLR4/MD-2, la región de oligosacárido puede también jugar un papel importante en su interacción con células que presentan antígeno (APCs). Receptores implicados en este tipo de reconocimiento LPS incluyen el receptor de complemento CR3 y el receptor de depurador SR-A (van Amersfoort *et al.*, 2003; Plüddemann *et al.*, 2006).

[0007] Diferentes vacunas de *Bordetella pertussis* se han usado ya. Introducción de vacunas de tos ferina de células enteras (wP) en los años cuarenta y cincuenta y más tarde vacunas de tos ferina acelular (aP) en los ochenta y noventa, llevaron a un descenso gradual en la incidencia de tos ferina y morbilidad y mortalidad de la enfermedad reducida a niveles bajos. A pesar de cobertura de vacunación alta, la enfermedad de la tos ferina se ha mantenido endémica y

sigue mostrando un modelo cíclico con picos en incidencia cada 2 a 5 años. Durante las últimas dos décadas, diferentes países, incluyendo los Países Bajos, han experimentado aumentos en los números de casos de tos ferina reportados. De manera interesante, en algunas áreas, un desvío en la distribución de edad se ha observado también. Mientras que en la prevacunación y en la era de la vacunación temprana los casos de tos ferina se informaron predominantemente en niños jóvenes, adultos y adolescentes han representado una proporción en aumento de los casos en los últimos años. Diferentes cuestiones para la re-emergencia de la tos ferina informados se han propuesto, incluyendo: (1) cambios genéticos en las cepas de *B. pertussis* circulantes que reducen eficacia de la vacuna, (2) potencia reducida de vacunas de tos ferina, (3) disminución de la inmunidad, (4) información aumentada de casos de tos ferina, y (5) el diagnóstico mejorado de la enfermedad de la tos ferina.

[0008] Por lo tanto, todavía hay una necesidad de vacunas nuevas contra la *Bordetella pertussis* que no muestran todos los inconvenientes de las vacunas existentes.

Descripción de la invención

[0009] La presente invención se basa en la hipótesis de que mutantes de *B. pertussis* con una cadena de oligosacárido alterada se puede afectar en su interacción con células dendríticas (DCs). La focalización específica hacia células que presentan antígenos (APCs), tales como DCs, podría afectar posiblemente a los resultados de la respuesta inmunitaria contra una vacuna de tos ferina de células enteras. Como un primer paso hacia la mejora de vacunas de células enteras por esta vía, se ha identificado ahora un clúster de genes implicado en la biosíntesis de oligosacárido LPS en *B. pertussis*. Especialmente dos genes dentro de este clúster cuando son inactivados o sobreexpresados dan mutantes con una potencialidad mejorada para interactuar con y activar DC.

Polipéptidos

[0010] En un primer aspecto, las descripciones proporcionan unos polipéptidos. El polipéptido es una glicosiltransferasa y tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2.

[0011] La actividad del polipéptido de glicosiltransferasa se evalúa preferiblemente por inactivación del gen respectivo codificado en una cepa de *Bordetella pertussis* como más tarde se define aquí y análisis del LPS obtenible. Cuando el LPS producido por la cepa *Bordetella pertussis* transformada comprende al menos cantidades detectables del LPS de la invención como más tarde se define aquí, los polipéptidos de glicosiltransferasa debería decirse que están activos y son funcionales. Cantidades detectables de LPS se detectan preferiblemente como se describe en los ejemplos: después de aislamiento con extracción de fenol/agua caliente (Westphal and Jann, 1965), O-desacilación por hidrólisis moderada (Holst 2000) y análisis por ESI-MS (espectrometría de masas de ionización por electropulverización) en el modo de iones negativos.

[0012] El polipéptido tiene al menos, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2. Preferiblemente la glicosiltransferasa tiene la SEC ID nº 2. Esta glicosiltransferasa se origina de *Bordetella pertussis*. La codificación de secuencia de ácidos nucleicos para la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 se da en la SEC ID nº 4. El porcentaje de identidad se calcula como el número de residuos de aminoácidos idénticos entre secuencias alineadas dividido por la longitud las secuencias alineadas menos la longitud de todos los espacios. Alineamiento de secuencia múltiple se realizó usando programa de alineamiento óptimo DNAMAN 4.0 usando los ajustes por defecto. El alineamiento se realiza normalmente entre secuencias identificadas por sus SEC ID nº o partes de éstas. Preferiblemente, el alineamiento se realiza usando secuencias identificadas por sus SEC ID nº. El experto en la materia entenderá que los polipéptidos de la presente divulgación podrían obtenerse de otros organismos de *Bordetella pertussis* mientras estos tengan la actividad y la identidad requeridas. Cada polipéptido como se identifica arriba se obtiene de unas especies de *Bordetella* tales como *pertussis*, *bronchiseptica*, *parapertussis*. De forma más preferida, cada polipéptido como se identifica arriba se obtiene de *Bordetella pertussis*. Una única cepa de *Bordetella pertussis* o varias cepas *Bordetella pertussis* diferentes pueden tener diferentes polipéptidos homólogos según la presente divulgación. El polipéptido de la descripción puede ser una variante de cualquiera de las secuencias polipéptidas tal y como se define anteriormente. Una variante de polipéptido puede ser una forma de origen no natural del polipéptido. Una variante polipeptídica puede diferir en alguna vía creada genéticamente del polipéptido aislado de su fuente nativa. Una variante puede hacerse por mutagénesis dirigida empezando a partir de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 o de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2, que es la SEC ID nº 4. Preferiblemente, la variante polipeptídica contiene mutaciones que no alteran la función biológica del polipéptido codificado. Función biológica o actividad del polisacárido desacetilasa o la glicosiltransferasa ya se ha definido en este documento.

[0013] En otro aspecto de la descripción, se proporciona una glicosiltransferasa como anteriormente se define siendo ambos para uso para preparar un medicamento. Preferiblemente dicho medicamento es una vacuna o un adyuvante como más adelante se define en este documento.

Secuencias de ácidos nucleicos

[0014] En un segundo aspecto de la descripción se proporciona unas secuencias de ácidos nucleicos.

Los códigos de secuencia de ácidos nucleicos para una glicosiltransferasa con una secuencia de aminoácidos con al menos 50% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2, preferiblemente con la secuencia de aminoácidos con la SEC ID nº 2, y/o originados de unas especies de *Bordetella*, preferiblemente *Bordetella pertussis*.

La secuencia de ácidos nucleicos es preferiblemente una secuencia de ácidos nucleicos con al menos 98% e incluso más preferiblemente al menos 99%. De forma más preferida, la secuencia de ácidos nucleicos tiene la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID nº 4. La SEC ID nº 4 corresponde a NP_8809669.

[0015] El porcentaje de identidad se determinó calculando la proporción del número de nucleótidos idénticos en la secuencia dividida por la longitud de los nucleótidos totales menos las longitudes de cualquier espacio. Alineamiento de secuencia múltiple de ADN se realizó usando DNAMAN versión 4.0 que usa el programa Optimal Alignment (alineamiento completo). La longitud mínima de una secuencia de ADN pertinente que muestra 98% o nivel de identidad mayor debería ser 40 nucleótidos o más largo. El alineamiento es normalmente realizado entre secuencias identificadas por sus SEC ID nº o partes de estas. Preferiblemente, el alineamiento se realiza usando secuencias identificadas por sus SEC ID nº.

[0016] La secuencia de ácidos nucleicos de la descripción puede ser una variante de cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos tal como se ha definido anteriormente. Variantes de secuencias de ácidos nucleicos se pueden utilizar para preparar variantes polipeptídicas tal y como se define anteriormente. Una variante de ácido nucleico puede ser un fragmento de cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos tal como se ha definido anteriormente. Una variante de ácido nucleico puede también ser una secuencia de ácidos nucleicos que difiere de la SEC ID nº 4 en virtud de la degeneración del código genético. Una variante de ácido nucleico puede también ser una variante alélica de la SEC ID nº 4. Una variante alélica denota cualquiera de dos o formas más alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. Una variante de ácido nucleico preferida es una secuencia de ácidos nucleicos, que contiene mutación(s) silenciosa. Alternativamente o en combinación, una variante de ácido nucleico puede obtenerse también por introducción de sustituciones de nucleótido, que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificada por la secuencia de ácidos nucleicos, pero que corresponde al uso del codón del organismo huésped destinado para la producción del polipéptido de la descripción. La variante de ácido nucleico codifica un polipéptido todavía muestra su función biológica como anteriormente se define en este documento. Más preferiblemente, la variante de secuencia de ácidos nucleicos codifica un polipéptido que muestra actividad de polisacárido desacetilasa o de glicosiltransferasa respectivamente. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican este polipéptido se pueden aislar de cualquier microorganismo.

Todas estas variantes pueden obtenerse usando técnicas conocidas por el experto en la materia, tal como selección de biblioteca por hibridación (procedimientos de transferencia de Southern) bajo condiciones de hibridación de bajas a medias a altas para la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 4 o un variante de esta que se puede usar para diseño de una sonda. Condiciones de astringencia de bajas a medias a altas significan prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, 0,3% SDS, 200pg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizada y cortada, y bien 25% 35% o 50% de formamida para condiciones de astringencia de bajas a medias a altas respectivamente. Posteriormente, la reacción de hibridación se lava tres veces durante 30 minutos cada vez usando 2XSSC, 0,2% SDS y bien 55 °C, 65 °C, o 75 °C para astringencias de bajas a medias a altas.

[0017] La información de secuencia como se proporciona aquí debería no ser interpretado estrictamente en cuanto a requerir inclusión de bases erróneamente identificadas. El experto en la materia es capaz de identificar tales bases erróneamente identificadas y saber cómo corregir este tipo de errores.

[0018] En otro aspecto de la descripción, se proporciona una codificación de ácidos nucleicos a una glicosiltransferasa como anteriormente se define ambos ácidos nucleicos que son para uso para preparar un medicamento. Preferiblemente dicho medicamento es una vacuna o un adyuvante como más adelante se define aquí.

Construcción de ácidos nucleicos

[0019] En otro aspecto, las descripciones se refieren a una construcción de ácidos nucleicos que comprende cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos definida en la sección anterior, dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifica polipéptido muestra:

- actividad de glicosiltransferasa y con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2.

Opcionalmente, la secuencia de ácidos nucleicos presente en la construcción de ácidos nucleicos se une operativamente a una o más secuencias de control, que dirige la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuada.

Unido operativamente se define aquí como una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición en relación a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de la descripción de manera que la secuencia de control dirige la producción del polipéptido de la descripción.

Expresión se entenderá que incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

Construcción de ácidos nucleicos se define como una molécula de ácidos nucleicos, que se aísla de un gen de origen natural o que ha sido modificado para contener segmentos de ácidos nucleicos que se combinan o superponen en cierto modo que de otra manera no existe en la naturaleza.

- 5 [0020] Secuencia de control se define aquí para incluir todos componentes, que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido. A un mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcionales y traduccionales.

Vector de inactivación

10

[0021] La descripción además se refiere a un vector de inactivación comprendiendo una construcción de ácidos nucleicos comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que muestra actividad de glicosiltransferasa y con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 en un huésped dado.

15

Un vector de inactivación se diseña para reducir o inactivar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 en un huésped. El vector de inactivación se puede ver como un vector de expresión recombinante. El vector de inactivación puede ser cualquier vector (p. ej., plásmico, virus), que puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la inactivación de la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos tal como se ha definido anteriormente. Dependiendo de la identidad del huésped donde este vector de inactivación se introducirá y en el origen de la secuencia de ácidos nucleicos de la descripción, el experto en la materia sabrá elegir el vector de inactivación más adecuado. Las células huésped más preferidas se presentan en la sección titulada células huésped.

20

En el contexto de la descripción, un vector de inactivación cuando se introduce en una célula huésped conducirá a una célula con nivel de expresión disminuido (o reducido) de la secuencia de ácidos nucleicos presente en el vector de expresión, y/o un nivel de expresión disminuido del polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos presente en el vector de expresión y/o un nivel de actividad disminuido del polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos presente en el vector de expresión. En este contexto, la reducción se evalúa preferiblemente por comparación con la célula huésped que no comprende dicho vector de inactivación. La reducción del nivel de expresión del polipéptido que muestra actividad de glicosiltransferasa y con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 y/o la disminución de su nivel de actividad puede haberse conseguido por métodos convencionales conocidos en la técnica, tal como inactivación o disminución de la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos endógena que codifica dicha glicosiltransferasa en el huésped. Esta inactivación o reducción puede haberse conseguido por eliminación de uno o más nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido. En otra forma de realización, la invención se refiere a un huésped, preferiblemente una *Bordetella* que tiene una mutación en su secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicha glicosiltransferasa. Preferiblemente, para construir un huésped con una secuencia de ácidos nucleicos inactivada que codifica una glicosiltransferasa, una sustitución o vector de inactivación se prepara y se introduce posteriormente en el huésped por transformación. El experto en la materia sabrá construir tal vector.

35

40

[0022] Alternativamente o en combinación con la inactivación de la secuencia de ácidos nucleicos endógenos que codifica la glicosiltransferasa, la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la glicosiltransferasa se puede bajar fusionándola a un promotor débil adecuado para expresión de proteína de nivel bajo en el organismo seleccionado.

45

Alternativamente o en combinación con la inactivación de la secuencia de ácidos nucleicos endógena que codifica la glicosiltransferasa, la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la glicosiltransferasa endógena puede restituirse induciendo fusionándola a un promotor inducible adecuado para expresión de proteína de nivel inducible en el organismo seleccionado.

Alternativamente o en combinación con la forma de realización preferida definida anteriormente, la inactivación de la secuencia de ácidos nucleicos endógenos que codifica la glicosiltransferasa se consigue preferiblemente usando un vector suicida. Más preferiblemente, el vector suicida es pSS1129 (Stibitz *et al*, 1994).

50

[0023] Se proporciona un vector de inactivación como se define anteriormente para uso para preparación de un medicamento. Preferiblemente dicho medicamento es una vacuna o un adyuvante como más adelante se define en este documento.

55

Célula huésped

[0024] En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped comprendiendo el vector de inactivación de la invención tal y como se define en secciones anteriores. La elección de la célula huésped en gran parte depende de la fuente de la secuencia de ácidos nucleicos de la invención. Dependiendo de la identidad de la célula huésped, el experto en la materia sabría transformarlo con la construcción o vector de la invención.

60

La célula huésped puede ser cualquier célula microbiana, procariota, o eucariota, que es adecuada para la expresión del LPS de la invención. En una forma de realización preferida, la célula huésped es una especie de *Bordetella* como se menciona aquí anteriormente. De forma más preferida, la *Bordetella* es una *Bordetella pertussis*.

65

[0025] Procedimientos adecuados para transformación de *Bordetella* pueden implicar un proceso comprendiendo en cierto modo de conjugación conocido por el experto en la materia. Procedimientos de transformación adecuados para *Bordetella* se describen en Stibitz *et al*, 1994.

5 [0026] Alternativamente o en combinación con la primera forma de realización preferida, la invención proporciona una segunda forma de realización preferida, donde la célula huésped tiene un nivel de expresión disminuido de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido con al menos 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2, y/o tiene un nivel de expresión disminuido de dicho polipéptido y/o tiene un nivel de actividad aumentado de dicho polipéptido, preferiblemente mediante el uso del vector de inactivación de la invención como se define
10 anteriormente en este documento. En esta forma de realización, la secuencia de ácidos nucleicos presente en los vectores de inactivación codifica un polipéptido con al menos 98% de identidad con la SEC ID nº 2. En este contexto, la reducción se evalúa por comparación con la célula huésped que no comprende dicho vector de inactivación cuando ambos se cultivan y/o prueban bajo las mismas condiciones.

15 "Nivel de expresión disminuido del polipéptido" se define aquí preferiblemente como que produce menos del polipéptido como se define anteriormente que lo que la célula huésped parental de la que la célula huésped transformada deriva se producirá cuando ambos tipos de células (células parentales y transformadas) se cultiven bajo las mismas condiciones. Preferiblemente, la célula huésped de la invención produce al menos 3%, 6%, 10% o 15% menos del polipéptido de la invención teniendo al menos 98% de identidad con la SEC ID nº 2 que la célula huésped parental de la que la célula huésped transformada deriva se producirá cuando ambos tipos de células (células parentales y transformadas) se
20 cultiven bajo las mismas condiciones. También huéspedes que producen al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o 150% menos de dicho polipéptido que la célula parental se prefieren. Según otra forma de realización preferida, el nivel de producción de este polipéptido de la célula huésped de la invención se compara con el nivel de producción de la cepa B213 tal y como se define antes, que se toma como control. Según una forma de realización aún más preferida, cuando la célula huésped de la invención es una cepa de *Bordetella pertussis*, el nivel de
25 producción del polipéptido de la célula huésped de la invención se compara con el nivel de producción de la cepa B213 tal y como se define antes, que se toma como control.

[0027] La evaluación del nivel de producción del polipéptido se puede realizar al nivel de ARNm realizando una transferencia Northern o un análisis de array y/o al nivel de polipéptido realizando una transferencia Western. Todos
30 estos métodos se conocen por el experto en la materia.

"Disminución en la actividad del polipéptido" se define aquí como que muestra una actividad de glicosiltransferasa inferior a la una de la célula huésped parental de la que la célula huésped transformada deriva usando un ensayo específico para dicha actividad. Preferiblemente, el ensayo es uno que ha sido ya descrito aquí bajo la sección polipéptidos. Preferiblemente, la célula huésped de la invención muestra al menos o 15% de actividad de glicosiltransferasa inferior de la célula huésped parental de la que la célula huésped transformada deriva evaluado
35 usando un ensayo específico para dicha actividad, que es preferiblemente el ensayo descrito bajo la sección polipéptidos. Según otra forma de realización preferida, el nivel de actividad de glicosiltransferasa de la célula huésped de la invención se compara con la actividad correspondiente de la cepa B213 tal y como se define anteriormente, que se toma como control.

40 [0028] Según una forma de realización más preferida, la célula huésped no produce ninguna cantidad detectable de glicosiltransferasa de la invención y/o no muestra ninguna actividad detectable de glicosiltransferasa. Preferiblemente, la célula huésped no produce o produce sustancialmente ninguna glicosiltransferasa.

45 Alternativamente, según otra forma de realización más preferida, la célula huésped produce una cantidad inducible de la glicosiltransferasa de la invención y/o muestra una actividad de glicosiltransferasa inducible.

La disminución del nivel de expresión de la glicosiltransferasa de la invención y/o la disminución de su nivel de actividad puede haberse conseguido por métodos convencionales conocidos en la técnica, tales como inactivación o disminución de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la glicosiltransferasa endógena del huésped. Esta inactivación o
50 reducción puede haberse conseguido por eliminación de uno o más nucleótidos en el gen codificante. En otra forma de realización, la invención se refiere a un huésped, preferiblemente una *Bordetella pertussis*, que tiene una mutación en su secuencia de ácidos nucleicos que codifica la glicosiltransferasa. Preferiblemente, para construir un huésped con una secuencia de ácidos nucleicos inactivada que codifica la glicosiltransferasa, una sustitución o vector de inactivación se prepara y se introduce posteriormente en el huésped por transformación. El experto en la materia sabrá construir tal vector.

55 [0029] Alternativamente o en combinación con la inactivación de la secuencia de ácidos nucleicos endógena, la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la glicosiltransferasa puede disminuir fusionándola a un promotor débil adecuado para expresión de proteína de nivel bajo en el organismo seleccionado.

60 Alternativamente o en combinación con la inactivación de la secuencia de ácidos nucleicos endógena, la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la glicosiltransferasa puede restituirse inducible fusionándola a un promotor inducible adecuado para expresión de proteína de nivel inducible en el organismo seleccionado. Preferiblemente, cuando la célula huésped es una cepa de *Bordetella pertussis*, el promotor inducible es el promotor tac del vector PMMB67EH tal y como se define anteriormente.

65 [0030] Sorprendentemente, la célula huésped de la invención tiene propiedades atractivas, lo que la hace muy atractiva para ser usada como vacuna para tos ferina completa o como adyuvante: potencialidad mejorada para interactuar con

DC y para inducir posteriormente su maduración, e inducir la producción de citocinas proinflamatorias. Alternativamente o en combinación, el LPS obtenible de estas células es también muy adecuado para ser usado como una vacuna o como adyuvante como se presenta más adelante.

- 5 [0031] Por consiguiente, en otro aspecto de la invención, se proporciona una célula huésped como se define anteriormente para uso como un medicamento. Preferiblemente dicho medicamento es una vacuna o un adyuvante como más adelante se define en este documento.

LPS obtenible por la célula huésped

10

[0032] En otro aspecto, la invención se refiere al LPS obtenible de la célula huésped de la invención como se define anteriormente en este documento. Preferiblemente, la célula huésped es una especie de *Bordetella*, más preferiblemente, una *Bordetella pertussis*, incluso más preferiblemente, una *Bordetella pertussis* que lleva una sobreexpresión de la polisacárido desacetilasa de la invención y/o una inactivación de la glicosiltransferasa de la invención. Más preferiblemente, el LPS de la invención es obtenible a partir del mutante 2331 como se prepara en los ejemplos.

15

Incluso más preferiblemente, cuando se analiza después de aislamiento con extracción de fenol/agua caliente (Westphal and Jann, 1965), O-desacilación por hidrólisis moderada (Holst 2000) y análisis por ESI-MS en el modo de ión negativo, el espectro ESI-MS del LPS de la invención se caracteriza por el hecho de que da más iones que el correspondiente espectro ESI-MS del LPS derivado de una *Bordetella pertussis* de tipo salvaje, nombrado LPS de tipo salvaje. Preferiblemente la *Bordetella pertussis* de tipo salvaje es la cepa B213 tal y como se define anteriormente. Sin querer estar atados por cualquier teoría, estos iones adicionales pueden reflejar al menos parcialmente la sustitución aumentada de los grupos fosfato 1 o 4' de la parte del lípido A de LPS con residuos de hexosamina.

20

Típicamente el espectro ESI-MS del LPS de tipo salvaje se caracteriza por dar 7 iones (ver tabla 3), mientras que el espectro ESI-MS del LPS de la invención se caracteriza por el hecho de dar más de 7 iones, al menos 8, al menos 10, al menos 12 y, más preferiblemente, 14 iones.

25

Alternativamente o en combinación con la forma de realización anterior, preferiblemente, el espectro ESI-MS del LPS de la invención comprende más iones comprendiendo hexosamina que el espectro ESI-MS del LPS de tipo salvaje. Típicamente, el espectro ESI-MS del LPS de tipo salvaje da dos iones con hexosamina (ver tabla 3), mientras que el espectro ESI-MS del LPS de la invención se caracteriza por el hecho de que da más de dos iones, al menos 4, al menos 6 y, más preferiblemente, 8 iones.

30

Composiciones farmacéuticas y usos médicos

35

[0033] La invención además se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo la célula huésped de la invención y/o el LPS de la invención ambos como anteriormente se definen en este documento. La composición farmacéutica se puede utilizar como una vacuna o como un adyuvante. La vacuna se puede usar para inmunización (aumentando una respuesta inmunitaria) o vacunación de un mamífero. Adyuvantes se definen aquí para incluir cualquier sustancia o compuesto que, cuando se usa en combinación con un antígeno, inmuniza a un mamífero, preferiblemente un humano, estimula el sistema inmunológico, provocando así, aumento o facilidad de la respuesta inmunitaria contra el antígeno, preferiblemente, sin generar una respuesta inmunitaria específica al propio adyuvante. Adyuvantes preferidos mejoran la respuesta inmunitaria contra un antígeno dado por al menos un factor de 1,5, 2, 2,5, 5, 10 o 20, en comparación con la respuesta inmunitaria generada contra el antígeno bajo las mismas condiciones pero en ausencia del adyuvante. Pruebas para determinar la mejora de promedio estadístico de la respuesta inmunitaria contra un antígeno dado como producido por un adyuvante en un grupo de animales o seres humanos sobre un grupo de control correspondiente están disponibles en la técnica. El adyuvante es preferiblemente capaz de aumentar la respuesta inmunitaria contra al menos dos antígenos diferentes. El adyuvante de la invención normalmente será un compuesto que es externo a un mamífero, excluyendo así compuestos de inmunoestimuladores que son endógenos a mamíferos, tales como, por ejemplo, interleucinas, interferones y otras hormonas.

40

En una forma de realización preferida, cuando la composición farmacéutica se usa como un adyuvante, la composición comprende además un antígeno.

50

Cuando la composición se usa como una vacuna, el antígeno está presente en la superficie de la célula huésped de la invención y/o está presente en el LPS obtenible de tales células. En este caso la vacuna es preferiblemente una vacuna contra el huésped de la invención y/o contra cualquier huésped capaz de expresar una molécula LPS relacionada.

55

Cuando la composición se usa como un adyuvante, está presente preferiblemente un antígeno. El antígeno es preferiblemente un antígeno de o producido por una bacteria, un virus, un hongo, un parásito, una célula cancerosa o un alérgeno como se define además más adelante. El antígeno y la célula huésped de la invención y/o el LPS obtenible por tales células se usan preferiblemente en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad infecciosa provocada por la bacteria, virus, hongo, o parásito, o el tumor provocado por la célula cancerosa, o la alergia provocada por el alérgeno.

60

En otra forma de realización preferida, la composición farmacéutica comprendiendo una célula huésped de la invención y/o un LPS obtenible desde a partir del cual y opcionalmente un antígeno como se define aquí anteriormente comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además agentes estabilizantes farmacéuticamente aceptables, agentes osmóticos, agentes tampón, agentes de dispersión y similares. La forma preferida de la composición farmacéutica depende del modo pretendido de administración y uso terapéutico. El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible no tóxica adecuada para entregar los ingredientes activos, es decir, la célula huésped de la invención y/o el LPS obtenible de esta célula huésped y

65

opcionalmente el antígeno, al paciente. Portadores farmacéuticamente aceptables para entrega intranasal se ejemplifican por agua, soluciones salinas tamponadas, glicerina, polisorbato 20, cremophor EL y una mezcla acuosa de caprílico/cáprico glicérido, y se pueden tamponar para proporcionar un entorno de pH neutro. Portadores farmacéuticamente aceptables para entrega parenteral se ejemplifican por 0,9% NaCl o 5% glucosa estériles tamponados opcionalmente complementados con 20% albúmina. La preparaciones para administración parental deben ser estériles. La vía parental para administración de los ingredientes activos es acorde con métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial o intralesional. Las composiciones de la invención se administran preferiblemente por inyección en bolo. Una composición farmacéutica típica para inyección intramuscular se compondría, por ejemplo, de 1 - 10 ml de suero tamponado con fosfato y 1 a 100 µg, preferiblemente, 15-45 µg de antígeno y 1 a 100 µg, preferiblemente, 15-45 µg de la célula huésped y/o LPS de la invención. Para administración oral, la sustancia activa se puede administrar en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. Formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener colorantes y aromatizantes para aumentar aceptación del paciente. Métodos para preparar parental, oral o intranasalmente composiciones administrables se conocen bien en la técnica y se describen con más detalle en varias fuentes, incluyendo, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Science* (15ª ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980).

[0034] El antígeno en la composición de la invención es preferiblemente un antígeno que es de o producido por una bacteria, un virus, un hongo, un parásito, una célula cancerosa o un alérgeno. Antígenos víricos que se pueden combinar con la célula huésped y/o LPS de la invención pueden derivar de todos los tipos de virus, ejemplos no limitativos de tales virus son: *Retroviridae* tal como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); un virus de la rubéola; *paramyxoviridae* tal como virus de *parainfluenza*, sarampión, paperas, virus respiratorio sincitial, *metapneumovirus* humano; *flaviviridae* tal como virus de fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la hepatitis C (VHC), virus de encefalitis japonesa (VEJ), encefalitis transmitida por garrapatas, encefalitis de St. Louis u virus del Nilo Occidental; *Herpesviridae* tal como virus herpes simple, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr; *Bunyaviridae*; *Arenaviridae*; *Hantaviridae* tal como *Hantaan*; *Coronaviridae*; *Papovaviridae* tal como papilomavirus humano; *Rhabdoviridae* tal como virus de la rabia. *Coronaviridae* tal como coronavirus humano; *Alfaviridae*, *Arteriviridae*, *filoviridae* tal como *Ebolavirus*, *Arenaviridae*, *poxviridae* tal como virus de botulismo, y virus de fiebre de puerca africana. Asimismo la célula huésped y/o LPS de la invención se puede combinar con antígenos derivado de bacterias patógenas, hongos (levaduras inclusivos), o parásitos. Tales antígenos incluyen antígenos bacterianos de, por ejemplo, *Helicobacter*, tal como *H. pylori*, *Neisseria*, tal como *N. meningitidis*, *Haemophilus*, tal como *H. influenza*, *Bordetella*, tal como *B. pertussis*, *Chlamydia*, *Streptococcus*, tal como *Streptococcus sp.* serotipo A, *Vibrio*, tal como *V. cholera*, patógenos gram-negativos entéricos incluyendo, por ejemplo, *Salmonella*, *Shigella*, *Campilobacter* y *Escherichia*, al igual que antígeno de bacterias causantes de ántrax, lepra, tuberculosis, difteria, enfermedad de Lyme, sífilis, fiebre tifoidea y gonorrea. Antígenos de parásitos, por ejemplo, incluyen antígenos de protozoos, tales como *Babesiosis bovis*, *Plasmodium*, *Leishmania spp.* *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma*, tal como *T. cruzi*. Antígenos fúngicos pueden incluir antígenos de hongos tales como *Aspergillus sp.*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*, tal como, por ejemplo, *C. neoformans* e *Histoplasma capsulatum*.

[0035] Aunque la vacunación se aplica generalmente para la protección profiláctica contra los patógenos o para el tratamiento de enfermedades después de la infección patógena, el experto en la técnica es consciente de la aplicación de vacunas para tratamiento de tumores. Por otra parte, un número en aumento de proteínas específicas de tumores se encuentran por ser entidades apropiadas que pueden ser focalizadas por anticuerpos humanos o humanizados. Tales proteínas específicas de tumores están también dentro del campo de la presente invención. Muchos antígenos tumorales específicos se conocen en la técnica. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la invención proporciona composiciones comprendiendo un antígeno específico de tumores y una célula huésped y/o LPS tal como se ha definido anteriormente. Antígenos tumorales adecuados incluyen, por ejemplo, antígeno carcinoembrionario, antígeno de membrana específica de próstata, antígeno específico de la próstata, proteína MZ2-E, mucina polimórfica epitelial (PEM), unión de folato-proteína LK26, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (truncado), HER2, antígeno Thomsen-Friedenreich (T), gangliósidos GM-2 y GD-2, EP-CAM, mucina-1, glicoproteína-2 epitelial y antígeno específico de colon.

[0036] Además, antígenos puede ser focalizados a DC para inducir tolerancia en la prevención de enfermedad auto-inmunológica. Tales alérgenos están también dentro del campo de la presente invención.

[0037] Por consiguiente, en otro aspecto, la célula huésped de la invención, preferiblemente una *Bordetella pertussis* y/o el LPS obtenible de tal células es/son para uso como una medicina. Preferiblemente, la medicina es una vacuna contra la tos ferina. En otra forma de realización preferida, la célula huésped de la invención, preferiblemente una *Bordetella pertussis* y/o el LPS obtenible de tal célula es/son para uso como un adyuvante. Más preferiblemente, la célula huésped de la invención, preferiblemente una *Bordetella pertussis* y/o el LPS obtenible de tal célula se usan en combinación con un antígeno.

[0038] Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se refiere al uso de la célula huésped de la invención, preferiblemente una *Bordetella pertussis* y/o el LPS obtenible de tal célula para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de tos ferina. En una forma de realización preferida, la célula huésped de la invención, preferiblemente una *Bordetella pertussis* y/o el LPS obtenible de tal célula se usan como adyuvante para la preparación de un medicamento para aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno. Más preferiblemente, la célula huésped de la invención y/o el LPS obtenible de tal célula se usan como adyuvante en combinación con dicho antígeno.

[0039] La descripción además se refiere al uso de un polipéptido de la invención como anteriormente se define aquí y/o una secuencia de ácidos nucleicos de la invención tal y como se define aquí para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de tos ferina.

[0040] La descripción además se refiere al uso de un polipéptido como anteriormente se define aquí y/o una secuencia de ácidos nucleicos como anteriormente se define aquí para la preparación de un adyuvante. Preferiblemente, en este aspecto, el polipéptido como anteriormente se define aquí y/o la secuencia de ácidos nucleicos como anteriormente se define aquí se usan en combinación con un antígeno para la preparación de un medicamento para aumentar una respuesta inmunitaria contra el antígeno.

[0041] En los métodos y usos de la invención, el mamífero es preferiblemente un humano.

[0042] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que unidades después de la palabra se incluye, pero unidades no específicamente mencionadas no se excluyen. Además, referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que deba haber uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" así normalmente significa "al menos una".

Descripción de las figuras

[0043]

La Fig. 1. (A) Representación esquemática del operón de glicosiltransferasa identificado. Flechas gris oscuras indican los genes que codifican glicosiltransferasas putativas, mientras que las flechas blancas y gris claras indican el gen que codifica una desacetilasa putativa monosacárida y los ORFs flanqueantes, respectivamente. (B) Análisis de perfiles LPS de la cepa de *B. pertussis* de tipo salvaje (WT), y las cepas mutantes BP2329, BP2328 y BP2331 por tricina-SDS-PAGE.

La Fig. 2. Ión negativo ESI-MS de LPS O-desacetilado de cepas de *B. pertussis* mutante y *B. pertussis* (A) de tipo salvaje BP2328 (B), BP2329 (C) y BP2331 (D).

La Fig. 3. Análisis espectrométrico de masa en serie de modo negativo de LPS O-desacetilado de la cepa mutante BP2331. (A) Espectro MS/MS extraído del ión a m/z 118,3, (B) Espectro MS/MS extraído del ión a m/z 1162,0, (C) Espectro MS³ extraído del ión a m/z 1112,6 del iónico a m/z 1162,0.

La Fig. 4. Activación DC después de estimulación con las células de *B. pertussis* de tipo salvaje y mutantes. (A) Análisis de expresión en superficie de células CD83, HLA-DR, CD86 y CD40 en DCs humanas después de 24 h de estimulación con células de *B. pertussis* mutantes y de tipo salvaje PFA-fijas a MOI 10 (línea negra) o 100 (línea discontinua). DC no estimulados sirvieron como control (histograma relleno de gris). Se muestran histogramas FACS para las cepas de *B. pertussis* indicadas de 5000 eventos contados. El eje vertical representa el número celular, mientras el eje horizontal representa la intensidad de coloración. (B) IL-10 y IL-12p70 producción por cultivo de DCs humanas después de estimulación con células de *B. pertussis* mutantes y de tipo salvaje PFA-fijas a MOI 10 o 100. Los resultados se expresan como concentraciones de citocina medias ($\pm$ SD).

La Fig. 5. Activación DC después de estimulación con LPS de *B. Pertussis* de tipo salvaje y mutante purificado. (A) Análisis de expresión de superficie de la célula CD83, CD86 y CD40 en DCs humano después de 24 h de estimulación con 1 μ g/ml LPS purificado. DC no estimulados sirvieron como control (histograma relleno de gris). Se muestran histogramas FACS para el LPS de las cepas de *B. pertussis* indicadas de 5.000 eventos contados. El eje vertical representa el número celular, mientras el eje horizontal representa la intensidad de coloración. (B) IL-10 producción por cultivo de DCs humanas después de estimulación con 1 μ g/ml de LPS purificado. Los resultados se expresan como concentraciones de citocina medias.

La Fig. 6. Inducción IL-6 por LPS de *B. pertussis* purificado y células bacterianas enteras. La producción de IL-6 por la línea celular humana macrófaga MM6 se estimuló con diluciones en serie de soluciones madre de LPS purificado (A) o células bacterianas enteras (B) de la cepa de *B. pertussis* de tipo salvaje (WT), o las cepas mutantes BP2328, BP2329 y BP2331. Concentraciones IL-6 en los sobrenadantes de cultivo se cuantificaron en un ELISA contra el IL-6 humano. Los datos representan los promedios de tres experimentos individuales.

Fig. 7. Estructura de LPS de *B. pertussis*. Estructuras de OS de núcleo truncado propuestas de las cepas mutantes BP2328 y BP2329 se indican por flechas rojas. Adaptado de Caroff *et al.* (2000).

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

[0044] Todas las cepas bacterianas usadas se describen en la tabla 1. Típicamente, las cepas de *E. coli* crecieron a 37°C en caldo Luria-Bertani mientras agitación a 200 r.p.m. Cuando fue apropiado, bacterias crecieron en presencia de 100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de kanamicina, o 10 µg/ml de gentamicina, para mantenimiento plásmido o selección de cepa. *B. pertussis* creció a 35°C en agar de Bordet-Gengou (BG) complementado con 15% de sangre de oveja desfibrinada (Tritium).

Técnicas de ADN recombinante

[0045] Todos los plásmidos usados se describen en la tabla 1. ADN plásmido se aisló usando el sistema Promega Wizard® Plus SV Minipreps. Endonucleasas de restricción se usaron según las instrucciones del fabricante (Roche). Fragmentos de ADN se aislaron de geles de agarosa que usan el gel Promega Wizard® SV y el sistema PCR Clean-Up. Ligaduras se realizaron usando el kit de rapid DNA ligation (Roche).

[0046] Todos los cebadores usados se describen en la tabla 2. Molde de ADN cromosómico para reacciones PCR se preparó resuspendiendo ~10⁹ bacterias en 50 µl de agua destilada, después de lo que la suspensión se calentó durante 15 min a 95°C. La suspensión se centrifugó luego durante 1 min a 16.100 x g, después de lo cual el sobrenadante se usó como molde de ADN. Para construcción de cepas mutantes de *B. pertussis* B213ΔBP2328 y ΔBP2329, amplificamos segmentos de ADN que circundan la región 5' y secuencias corriente arriba de los ORF correspondientes usando los cebadores BP2328_FW_{up}, BP2329_FW_{up}, y los cebadores BP2328_REV_{up} y BP2329_REV_{up}, ambos contuvieron un sitio de BamHI. Además, fragmentos de ADN con las regiones 3' y secuencias corriente abajo de los ORF se obtuvieron por PCR con los cebadores BP2328_FW_{down}, BP2329_FW_{down}, ambos con un sitio BamHI, y los cebadores BP2328_REV_{down} y BP2329_REV_{down}. Para construcción de una cepa mutante de *B. pertussis* BP2331, el ORF correspondiente se amplificó usando los cebadores BP2331_FW y BP2331_REV. Los PCR se analizaron usando perlas puras de PCR Taq Ready-to-go (Amersham Biosciences) en un volumen total de reacción de 25-µl con 5 pmol de cada cebador. El programa de temperatura fue de la siguiente manera: 95°C durante 3 min, 30 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 55°C, y 1 min a 72°C, seguidos de 7 min a 72°C y enfriamiento posterior a 4°C. Los productos PCR fueron purificados a partir de gel de agarosa y posteriormente se clonaron en pGEM-T Easy dando como resultado plásmidos pGEM-BP2328_{up}, pGEM-BP2328_{down}, pGEM-BP2329_{up}, pGEM-BP2329_{down} y pGEM-BP2331, respectivamente. Los fragmentos de BamHI-SpeI de pGEM-BP2328_{down} y pGEM-BP2329_{down} se ligaron en BamHI-SpeI-restringido pGEM-BP2328_{up} y pGEM-BP2329_{up}, respectivamente. Los plásmidos resultantes y el plásmido pGEM-BP2331 se cortaron con BamHI y EcoRV, respectivamente, para permitir inserción del casete de resistencia a la kanamicina del plásmido pBSL128 obtenido por digestión con BamHI y HindIII, respectivamente. Finalmente, fragmentos EcoRI de las construcciones obtenidas se ligaron en el plásmido suicida de EcoRI-restringido pSS1129. Las construcciones finales, designadas pSS1129-BP2328KO, pSS1129-BP2329KO y pSS1129-BP2331KO, respectivamente, contuvieron el casete de resistencia a la kanamicina en la misma orientación que la dirección de transcripción del operón. Los plásmidos basados en pSS 1129 se usaron para transformar *E. coli* SM 10(λpir), lo que permitió transferencia posterior de los plásmidos a *B. pertussis* y construcción de mutantes de *B. pertussis* BP2328, BP2329 y BP2331 por intercambio alélico. Transformantes se seleccionaron por PCR usando varios conjuntos de cebadores.

Aislamiento de LPS y preparación de LPS des-O-acilado

[0047] LPS se aisló usando el método de extracción de fenol/agua caliente (Westphal and Jann, 1965) con ligeras modificaciones (Geurtsen *et al.*, 2006). De-O-acilación de LPS se consiguió por hidracinólisis moderada (Holst, 2000). Brevemente, LPS se disolvió en hidracina anhidra (200 µl), y se incubó a 37°C durante 50 min con agitación constante para liberar las cadenas de acilo graso O-unidas. La mezcla se enfrió y 600 µl de acetona fría se añadió en pequeñas partes para convertir hidracina en hidrazono de acetona. El precipitado del LPS des-O-acilado se recogió por centrifugado (4000 x g, a 7°C durante 30 min). El granulado se lavó dos veces con 600 µl de acetona fría, se centrifugó y se disolvió en agua antes de liofilización.

Espectrometría de masas de electropulverización-electroforesis capilar

[0048] Un sistema Prince CE (Prince Technologies) se acopló a un espectrómetro de masas 4000 QTRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex). Una solución de envoltura (isopropanol-metanol, 2: 1) se entregó a una velocidad de flujo de 1,0 µl/min. Separaciones se obtuvieron en un capilar de sílice fundido descubierto de longitud ~90-cm usando 15 mM de acetato amónico en agua desionizada, pH 9,0. Los voltajes de ionización por electropulverización 5 kV y -5 kV se usaron para detecciones de modo de ión negativo y positivo, respectivamente. Para todos los experimentos espectrométricos de masa, nitrógeno se usó como cortina de gas y colisión. En el MS² (escaneado de ión de producto mejorado o EPI) y experimentos MS³, la velocidad de escaneado se estableció en 4000 Da/s con trampeado Q₀, el tiempo de relleno de la trampa se estableció como "dinámico" y la resolución de Q1 se estableció como "unidad". Para experimentos MS³, el coeficiente de excitación se estableció a un valor para excitar solo el primer isótopo para un único precursor cargado con tiempo de excitación establecido a 100 ms.

Análisis LPS por Tricina-SDS-PAGE

[0049] Aproximadamente 10^9 bacterias se suspendieron en 50 μ l de tampón de muestra (Laemmli, 1970), y 0,5 mg/ml de proteinasa K (concentración final) se añadió. Las muestras se incubaron durante 60 min a 55°C, seguido de 10 min a 95°C para inactivar proteinasa K. Las muestras se diluyeron luego 10 veces añadiendo tampón de muestra, después de los cuales 2 μ l de cada muestra se aplicaron a un gel de Tricina-SDS-PAGE (Lesse *et al.*, 1990). Al azul de bromofenol se le permitió ejecutarse en el gel de separación a 35 V, después de lo cual voltaje se aumentó a 105 V. Después de que la parte delantera alcanzó el fondo del gel, electroforesis se continuó durante otros 45 min. Los geles se fijaron durante toda la noche en agua/etanol/ácido acético 11:8:1 (v/v/v) y posteriormente teñido con plata según se describe (Tsai y Frasch, 1982).

10 Preparación de suspensiones de células bacterianas

[0050] Bacterias se inactivaron en 0,5% paraformaldehído (PFA) en la solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 min y lavada íntegramente en medio RPMI 1640 sin de rojo de fenol (Gibco). Suspensiones bacterianas con una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 1, correspondientes a $\sim 10^9$ bacterias/ml, se prepararon en medio RPMI 1640 sin rojo de fenol.

Generación y cultivo de DC humanas

[0051] DC humanas inmaduras se generaron de células mononucleares sanguíneas periféricas humanas (PBMCs) como se describe previamente con modificaciones secundarias (Sallusto y Lanzavecchia, 1994). Brevemente, PBMCs se aislaron de sangre heparinizada de centrifugado de voluntarios saludables usando gradiente de densidad sobre un gradiente Ficoll (Amersham Biosciences). Fracciones PBMC recuperadas se lavaron tres veces en medio RPMI 1640, complementado con 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor (FCS) (Bodinco BV). Después, monocitos se prepararon a partir de PBMCs por centrifugado sobre un gradiente de tres capas Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences AB) (60%, 47,5% y 34% Percoll en RPMI 1640, 10% FCS). Monocitos se recogieron de la interfaz superior y se lavó tres veces con RPMI 1640, 10% medio FCS y se incubó en una placa de seis pocillos (4 ml por pocillo, $0,5 \times 10^6$ células/ml) en RPMI 1640, 10% FCS, complementado con 2,4 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich), 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (Gibco), 100 ng/ml de GM-CSF recombinante humano (Peprotech), y 50 ng/ml de IL-4 recombinante humano (Strathmann-Biotec AG). Después de seis días de cultivo, DC inmaduras (imDC) se recogieron, que fueron negativas para CD14 y CD83, expresaron niveles bajos de CD86 y HLA-DR, y expresaron niveles altos de CD40 y CD11c como se evaluó por citometría de flujo.

Estimulación de DC

[0052] ImDC se lavaron y resuspendieron a una concentración de 5×10^5 células/ml en RPMI 1640 10% FCS, y se co-incubaron con bien células de *B. pertussis* PFA-fijadas a una pluralidad de infección (MOI) de 10 o 100, o LPS purificado a una concentración de 10 o 1000 ng/ml. ImDC no estimulado sirvió como control en todos los experimentos. DC se cosecharon después de 24 h y directamente se tiñeron para la expresión de marcadores de superficie celular; los sobrenadantes se almacenaron a -80°C antes de mediciones de citocina.

Análisis citométrico de flujo de marcadores de superficie celular

[0053] Expresión de superficie de marcadores de maduración DC y moléculas coestimuladoras se evaluaron por citometría de flujo. DC estimuladas o inmaduras se recogieron, se lavaron en RPMI 1640, 10% FCS y se resuspendieron en filtro esteralizado PBS conteniendo 0,1 % de albúmina de suero bovino (tampón FACS). Después, células se incubaron durante 30 min a 4°C con bien uno de los siguientes anticuerpos: anti-humano CD11c (mIgG1) y CD83 (mIgG1) FITC-conjugados, anti-humano (mIgG1) y CD40 (mIgG1) ficoeritrina-conjugados, anti-humano CD14 (mIgG1) y HLA-DR (mIgG2b) alofocianina-conjugados y controles de isotipos apropiados marcados con fluorocromo (CD11c, CD40 y CD14 de eBioscience; CD83, CD86 y HLA-DR de BD Pharmingen). Células se lavaron dos veces con tampón FACS y se analizaron usando citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson).

Mediciones de citocina

[0054] Concentraciones de IL-10 y IL-12p70 humano en los sobrenadantes de DCs estimuladas se determinaron usando un Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences Pharmingen).

Ensayos de actividad endotóxicos

[0055] La línea celular humana macrófaga MM6 (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988) se estimuló con diluciones en serie de suspensiones de células bacterianas enteras o LPS purificado como se describe (Geurtsen *et al.*, 2006). Las suspensiones celulares bacterianas se prepararon recogiendo las células de los cultivos por centrifugado, después de lo que se resuspendieron en PBS a un OD_{590} de 1,0, inactivado por calor durante 10 min en presencia de 8 mM de formaldehído, y almacenado a 4°C. Después de la estimulación, concentraciones de IL-6 en los sobrenadantes de cultivo se cuantificaron con un ELISA contra el IL-6 humano según las instrucciones del fabricante (PeliKine Compact™).

Resultados

Identificación de un operón de biosíntesis de LPS nuevo en *B. pertussis*

[0056] Encontramos un clúster de cuatro genes (BP2328 a BP2331, números de acceso GenBank NP_880966 a NP_880969) tres de los cuales mostraron similitud de secuencia alta para glicosiltransferasas LPS de varias bacterias, es decir, BP2328, BP2329 y BP2331. BP2330 muestra la similitud máxima a un polisacárido desacetilasa de *Xylella fastidiosa*. Los cuatro ORF están cerca el uno del otro y en algunos casos incluso se superponen, sugiriendo que ellos constituyen un operón (Fig. 1A). Los genes corriente arriba y, en la orientación inversa, corriente abajo del operón, putativamente codifican homólogos de la subunidad alfa DnaE de ADN polimerasa III y de la sulfatasa putativa YhbX de *E. coli*, respectivamente. Para estudiar la función de las glicosiltransferasas LPS putativas, se hacen construcciones en el plásmido suicida pSS1129 que lleva los genes BP2328, BP2329 y BP2331 individuales interrumpidos por un casete de resistencia a la kanamicina para inactivación insercional por intercambio alélico. Usando este enfoque, mutantes bloqueados para todos los tres genes podrían obtenerse fácilmente en la cepa de *B. pertussis* B213. Análisis de su LPS por Tricina-SDS-PAGE de lisatos de célula entera mostraron claramente LPS truncado para los mutantes BP2328 y BP2329 (Fig. 1B). En cambio, el LPS de la cepa mutante BP2331 fue más heterogéneo y consistió en múltiples bandas, incluyendo la longitud de tipo salvaje.

Análisis estructural de LPS

[0057] Para determinar su estructura, LPS de tipo salvaje y cepas mutantes BP2328, BP2329 y BP2331 se aislaron O-desacetilaron y analizaron por ESI-MS en el modo de iones negativos (Fig. 2). Las composiciones LPS propuestas están resumidas en la tabla 3. El espectro de tipo salvaje LPS (Fig. 2A) reveló un ión principal triplemente cargado a m/z 1108,5 correspondiente a LPS de *B. pertussis* en toda su longitud con la composición $\text{GlcNAc} \cdot \text{Man}2\text{NAc}3\text{NAcA} \cdot \text{Fuc}2\text{NAc}4\text{NMe} \cdot \text{Gal} \cdot \text{NA} \cdot \text{Glc} \cdot \text{GlcN}2 \cdot \text{GlcA} \cdot \text{Hep}3 \cdot \text{P} \cdot \text{Kdo} \cdot \text{lípido A-OH}$. Iones adicionales estaban presentes a m/z 770,1 ($[\text{M}-3\text{H}]^3$), 811,1 ($[\text{M}-4\text{H}]^4$), 831,4 ($[\text{M}-4\text{H}]^4$), 888,3 ($[\text{M}-3\text{H}]^3$), 951,8 ($[\text{M}-\text{H}]$), 987,1 ($[\text{M}-2\text{H}]^2$), 1081,7 ($[\text{M}-3\text{H}]^3$), 1121,1 ($[\text{M}-3\text{H}+\text{K}]^3$), 1155,0 ($[\text{M}-2\text{H}]^2$) y 1162,1 ($[\text{M}-3\text{H}]^3$). La mayor parte de estos iones correspondieron a glicoforamas truncados o defosforilados; no obstante, el triplemente cargado a m/z 1162,1 correspondió a LPS de *B. pertussis* en su total longitud sustituido con una fracción de hexosamina adicional (tabla 3). El espectro ESI-MS del LPS mutante BP2328 (Fig. 2B) mostró iones triplemente cargados a m/z 743,6, 770,0 y 823,7, junto con sus iones doblemente cargados correspondientes a m/z 1115,2, 1155,1 y 1235,7. Picos adicionales estaban presentes a m/z 777,3 ($[\text{M}-3\text{H}+\text{Na}]^3$), 952,1 ($[\text{M}-\text{H}]$), 1034,6 ($[\text{M}-2\text{H}]^2$), 1074,6 ($[\text{M}-2\text{H}]^2$) y 1166,1 ($[\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^2$). Asignación de los picos reveló que la estructura de núcleo OS mas completa estuvo representada por los iones a m/z 823,7 y 1235,7 correspondiente a la composición $\text{GalNAc} \cdot \text{Glc} \cdot \text{GlcN}2\text{GlcA} \cdot \text{Hep}2 \cdot \text{P} \cdot \text{Kdo} \cdot \text{lípido A-OH}$. LPS mutante BP2329 (Fig. 2C) mostró iones triplemente cargados a m/z 603,9 y 657,6, junto con sus iones doblemente cargados a m/z 906,0 y 986,6. Además, aductos de sodio y de potasio de estos iones estuvieron presentes a m/z 917,4 y 997,6 y m/z 925,0 y 1005,6, respectivamente. Picos adicionales estuvieron presentes a m/z 866,0 ($[\text{M}-2\text{H}]^2$), 937,4 ($[\text{M}-2\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^2$) y 1067,1 ($[\text{M}-2\text{H}]^2$). En este caso, la estructura de núcleo más completa estuvo representada por el ión doblemente cargado a m/z 1067,1 correspondiente a la composición $\text{GlcN}2 \cdot \text{GlcA} \cdot \text{Hep}2 \cdot \text{P} \cdot \text{Kdo} \cdot \text{lípido A-OH}$. LPS mutante BP2331 (Fig. 2D) mostró un gran número de picos, incluyendo iones triplemente cargados a m/z 1108,3 y 1162,0 correspondiente a LPS de *B. pertussis* en toda su longitud y LPS de *B. pertussis* en toda su longitud sustituido con una hexosamina adicional, respectivamente.

[0058] Para resolver la ubicación de la fracción de hexosamina adicional, que se observó en ambos LPS de tipo salvaje y mutante BP2331, estudios ESI-MS² se realizaron en el modo de ión negativo (Fig. 3). Espectros MS/MS de los iones a m/z 1108,3 (Fig. 3A) y 1162,0 (Fig. 3B) ambos mostraron un fragmento de ión de una sola carga a m/z 951,5, que reveló que lípido A-OH, que resulta de la escisión entre el enlace Kdo-lípido A bajo disociación inducida por colisión, consistió en un disacárido unido en β -(1→6) de residuos de glucosamina *N*-acilados (30H C14), cada residuo siendo sustituido por un grupo de fosfato. El espectro de ión a m/z 1162,0 también mostró un ión adicional a m/z 1112,6, que indica que el residuo de hexosamina extra se fijó directamente a lípido A. MS³ en m/z 1112,6 además apoyó esta conclusión (Fig. 3C).

Activación de célula dendrítica por mutantes de LPS de *B. pertussis*

[0059] Para determinar la influencia de las mutaciones de LPS en la activación de DCs, DCs inmaduras se cocultivaron con *B. pertussis* de tipo salvaje PFA-fijado y bacterias mutantes a un MOI de 10 y 100. La activación de DC se monitoreó por análisis de marcador de maduración (CD83 y HLA-DR) y expresión de molécula coestimuladora (CD86 y CD40) por citometría de flujo (Fig. 4A) y IL-10 e inducción IL12p70 por ELISA (Fig. 4B). Bacterias de tipo salvaje y todas las mutantes indujeron la expresión de CD83, HLA-DR, CD86 y CD40, demostrando que todas las cepas fueron capaces de activar DC. No obstante, las bacterias mutantes BP2329 y BP2331 fueron claramente menos y más estimuladoras, respectivamente, que las bacterias de tipo salvaje, mientras que la cepa mutante BP2328 fue tan eficaz como la de tipo salvaje. La maduración de DC inferior observada en el caso de la cepa mutante BP2329 se acompañó por inducción inferior de IL-10 y IL-12p70 (Fig. 4B). De forma similar, el mutante BP2331, que muestra una capacidad de maduración de DCs mejorada, indujo cantidades más altas de IL-10 y IL-12p70. La cepa de tipo salvaje y mutante BP2328 indujo niveles comparables de cepa de IL-10, que concuerdan con la expresión igual de moléculas co-estimuladoras y

marcadores de maduración en las DC en respuesta a estas cepas. No obstante, mientras que la cepa de tipo salvaje claramente indujo producción IL-12p70, esto difícilmente fue el caso para la cepa mutante BP2328 (Fig. 4B), sugiriendo que expresión IL-10 y IL-12p70 puede regularse diferencialmente.

- 5 [0060] Para valorar si las diferencias observadas en la capacidad de activación de DCs entre las cepas de tipo salvaje y las mutantes están directamente relacionadas con las diferencias en la composición de LPS, estudios de activación DC se realizaron con 10 y 1000 ng/ml de LPS purificado. A diferencia del alto aumento en la expresión de marcadores de maduración y moléculas coestimuladoras en DCs en respuesta a bacterias de tipo salvaje, BP2328 y mutante BP2331, solo tuvieron aumentos secundarios en expresión de CD83, CD86 y CD40 (Fig. 5A) y ningún aumento en expresión de HLA-DR (datos no mostrados) se encontró incluso con 1000 ng/ml de LPS de estas cepas. De forma similar, inducción de IL-10 fue baja (Fig. 5B) y IL-12p70 podría no ser detectada en sobrenadantes de DCs estimulados con LPS (datos no mostrados). Sin embargo, comparación mutua (Figs. 5A y 5B) demostró que, conforme a los resultados obtenidos con bacterias intactas, la capacidad de activación de DC máxima se encontró para el LPS aislado de la cepa mutante BP2331, seguido de aquellos de la cepa mutante BP2328 y la cepa de tipo salvaje, mientras que aquel de la cepa mutante BP2329 fue incapaz de maduración de DCs. Así, las alteraciones en la estructura de LPS de los mutantes diferencialmente afectan a la capacidad de activación de DCs.

Actividad endotóxica de LPS y células bacterianas enteras

- 20 [0061] Para valorar las consecuencias de las mutaciones de LPS en la actividad endotóxica de LPS, la potencia del LPS purificado para estimular la línea celular humana macrófaga MM6 para producción de IL-6 se evaluó. Como comparado con LPS de tipo salvaje, LPS purificado de la cepa mutante BP2331 tuvo una potencia fuertemente aumentada para estimular a los macrófagos (Fig. 6A). En cambio, LPS de la cepa mutante BP2329 tuvo una potencia reducida para estimular producción de IL-6, mientras que LPS del mutante BP2328 fue de forma similar activo como LPS de tipo salvaje (Fig. 6A). Solo a las dos concentraciones de LPS máximas evaluadas, el último LPS fue más activo de lo que fue el LPS de tipo salvaje. Consistente con los datos obtenidos con LPS purificado, suspensiones de células enteras del mutante BP2331 mostraron, en comparación con células de tipo salvaje, una potencia claramente aumentada para estimular a los macrófagos (Fig. 6B). No obstante, también las células mutantes BP2328 mostraron este efecto (Fig. 6B), mientras que las células mutantes BP2329 tuvieron actividad similar a la de las células de tipo salvaje a pesar de su LPS purificado menos activo (Fig. 6A).

Discusión

- 35 [0062] El objetivo del presente estudio fue identificar glicosiltransferasas de LPS nuevas en el genoma de *B. pertussis*. Usando secuencias de glicosiltransferasas de LPS conocidas como guías, fuimos capaces de identificar un operón de cuatro genes. En un estudio precedente, en el que la secuencia del genoma de la *Bordetella avium* de ave de corral patógena fue en comparación con las secuencias del genoma de otras *Bordetellae*, un clúster de genes homólogo al aquí identificado se describió como estando implicado en la biosíntesis de LPS (Sebahia *et al.*, 2006). No obstante, ningún estudio funcional se proporcionó que pudiera confirmar esta atribución.

- 40 [0063] Para estudiar la función de este operón en biosíntesis de LPS de *B. pertussis*, inactivamos los genes de glicosiltransferasa putativos por intercambio alélico y los comparamos con los perfiles de LPS de cepas de tipo salvaje y mutantes usando Tricina-SDS-PAGE y ESI-MS. De forma imprevista, encontramos que la cepa de tipo salvaje no solo contuvo LPS de *B. pertussis* en toda su longitud, sino que también albergó una especie en toda su longitud sustituida con una fracción de hexosamina extra, que, como nosotros mostramos, se fijó directamente a lípido de A. Sustitución de lípido A de *B. pertussis* con hexosamina no se ha observado previamente y, por lo tanto, representa una modificación nueva de lípido A de *B. pertussis*.

- 50 [0064] Las estructuras de oligosacárido truncadas propuestas para las cepas mutantes BP2328 y BP2329 se resumen en la Fig. 7. La estructura del OS del núcleo más completa en la cepa mutante BP2328 consistió en GalNA•Glc•GlcN₂•GlcA•Hep₂•P•Kdo•lípido A-OH•HexN, indicando que la cepa mutante BP2328 carece del trisacárido terminal, un residuo de heptosa y uno de los residuos GlcN. Esta composición sugiere que la proteína codificada BP2328 funciona como un GlcN (1-4) a Glc transferasa (Fig.7). Análisis del LPS del mutante BP2329 mostró que este LPS se truncó además y que su estructura más completa consistió en GalNA•Glc•GlcN₂•GlcA•Hep₂•P•Kdo•lípido A-OH•HexN. Como a esta estructura le falta el Glc al que el segundo GlcN del OS del núcleo debería conectarse, el residuo GlcN restante presente debe fijarse a la segunda heptosa. Por lo tanto, esta composición sugiere que la proteína codificada BP2329 funciona como una glucosiltransferasa que se fija Glc a la primera subunidad de heptosa (Fig. 7). Esto concordaría con la alta homología de este producto genético con glucosa (β1-4) heptosa transferasas, tales como *rfaK* y *lgtFlicsB*, que se usaron para identificar el gen en primer lugar. El fenotipo más complicado se observó en el caso del mutante BP2331. Aunque la proteína muestra similitud de secuencia alta a varias glicosiltransferasas LPS, LPS de *B. pertussis* en toda su longitud estuvo presente todavía en la cepa mutante. Esta observación sugiere o bien que el BP2331 gen no codifica una glicosiltransferasa LPS activa o que la enzima codificada muestra redundancia. Consistente con esta última opción, hemos identificado un gen, es decir, BP3671 con número de acceso GenBank CAE43928, en el genoma de *B. pertussis* que codifica una proteína que muestra 69% de identidad con la proteína codificada BP2331. Aunque los perfiles de LPS de la cepa de tipo salvaje y mutante BP2331 fueron más o menos comparables, una observación sorprendente fue que el LPS mutante fue más heterogéneo. Aunque la razón exacta

para este fenómeno aún no se ha dilucidado, una explicación posible podría ser que el mutante BP2331 de alguna manera muestra una sustitución aumentada no estequiométrica de su LPS, posiblemente con hexosamina. Modificación de lípido A con amino azúcares se ha descrito en varias bacterias, por ejemplo, sustitución con 4-aminoarabinosa en *E. coli* y *Salmonella* (Trent *et al.*, 2001b), y con galactosamina en *Francisella tularensis* (Phillips *et al.*, 2004). La ruta de aminoarabinosa se ha estudiado en detalle en *E. coli* y ha mostrado estar implicada en el ensamblaje de la fracción de azúcar en un portador de undecaprenil fosfato separado antes de su transferencia a lípido A (Trent *et al.*, 2001). Puesto que es concebible que inserción del casete de resistencia a la kanamicina en BP2331 ha aumentado la expresión del gen corriente abajo BP2330, se podría especular que una expresión BP2330 aumentada puede haber llevado a una modificación de hexosamina aumentada de lípido A y, consecuentemente, una heterogeneidad de LPS aumentada en las células mutantes BP2331. Apoyando esta interpretación está el nivel aumentado de modificación de hexosamina en el mutante BP2331, ver la tabla 3.

[0065] Después de haber dirigido la estructura del LPS, LPS purificado y células bacterianas enteras se evaluaron para su capacidad para inducir maduración de DCs y para estimular la producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos humanos. Los resultados mostraron que, en comparación con la cepa de tipo salvaje, la cepa mutante BP2331 mostró una capacidad aumentada para inducir maduración de DCs y producción de citocina proinflamatoria. Consecuencias similares se obtuvieron con LPS purificado. En cambio, células bacterianas enteras y LPS purificados de la cepas mutantes BP2328 y BP2329 mostraron una capacidad similar y disminuida para madurar DC y estimular macrófagos, respectivamente. Estos resultados muestran que alteraciones en composición del OS del núcleo de LPS diferencialmente afectan a las propiedades biológicas de LPS de *B. pertussis*. Desde la perspectiva de desarrollo de la vacuna, esto es un hallazgo interesante, ya que este puede permitir el desarrollo de cepas que ceban más eficazmente respuestas inmunitarias. Además, mutantes que muestran un heterogeneidad de LPS aumentada, tal como la cepa mutante BP2331, puede suscitar una variedad más grande de anticuerpos anti-LPS, que, en sí mismos, pueden influir positivamente la eficacia de la vacuna. La buena correlación encontrada entre el nivel de DC y activación macrófaga por un lado, y el grado de modificación de hexosamina de lípido A en el otro (ver tabla 3), sugiere fuertemente que la modificación aumentada en el mutante BP2331 es crucial a este respecto.

Tabla 1

Cepas bacterianas y plásmidos		
Cepa o plásmido	Genotipo o descripción	Fuente o referencia
<i>Cepas de B. pertussis</i>		
B213	Estreptomycin resistente a derivado de cepa de <i>B. pertussis</i> Tohama	Kasuga <i>et al.</i> , 1953
B213 ΔBP2328	Mutante BP2328 de la cepa B213, Str ^R , Km ^R	Este estudio
B213 ΔBP2329	Mutante BP2329 de la cepa B213, Str ^R , Km ^R	Este estudio
B213 ΔBP2331	Mutante BP2331 de la cepa B213, Str ^R , Km ^R	Este estudio
<i>E. coli</i>		
TOP10F'	<i>F'</i> { <i>lacI</i> ^R <i>Tn10</i> (<i>Tet</i> ^R)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> -ησδPMΣ-μχρBX) <i>Φ80lacZΔM15 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen Δ <i>lacX74</i>
DH5α	<i>F</i> Δ(<i>lacZYA</i> -αλγΦ)Y169 τη1-1 ησδP17 γψA96 ρεχA1 <i>endA1 supE44 relA1 phoA Φ80 dlacZΔM15</i>	Hanahan, 1983
SM10(λpir)	<i>thi thr leu fhyA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu λ pir R6K Km^R</i>	N.V.I. ^a
Plásmidos		
pGEM-T Easy	<i>E. coli</i> que clona el vector Amp ^R	Promega
pUC4K	Vector de <i>E. coli</i> que alberga cassette resistente a la kanamicina, Amp ^R Km ^R	Vieira y Messing, 1982
pSS1129	Vector de intercambio alélico, <i>bla</i> <i>gen rpsL oriVColE1 oriT λ cos</i>	Stibitz, 1994
pGEM-BP2328 _{up}	Derivado de pGEM-T Easy que alberga secuencia corriente arriba BP2328	Este estudio
pGEM-BP2328 _{down}	Derivado de pGEM-T Easy que alberga secuencia corriente abajo BP2328	Este estudio
pGEM-BP2329 _{up}	Derivado de pGEM-T Easy que alberga secuencia corriente	Este estudio

	arriba BP2329	
pGEM-BP2329 _{down}	Derivado de pGEM-T Easy que alberga secuencia corriente abajo BP2329	Este estudio
pGEM-BP2331	Derivado de pGEM-T Easy que alberga secuencia BP2331	Este estudio
pSS1129-BP2328 _{KO}	Derivado de pSS1129 que alberga construcción <i>knockout</i> BP2328, Km _R	Este estudio
pSS1129-BP2329 _{KO}	Derivado de pSS1129 que alberga construcción <i>knockout</i> BP2329, Km _R	Este estudio
pSS1129-BP2331 _{KO}	Derivado de pSS1129 que alberga construcción <i>knockout</i> BP2331, Km _R	Este estudio
^a Netherlands Vaccine Institute, Bilthoven, Países bajos		

Tabla 2

Cebadores	
Nombre	Secuencia (5'-3') ^a
BP2328_FW _{up}	TTCCGCACTTACTGGCTGAG
BP2328_FW _{dow}	<u>GGATCCT</u> CGCGGTACGACAGCACAT
BP2328_REV _{up}	<u>GGATCCT</u> GTTGCGCGAGATGCTGGAG
BP2328_REV _{down}	CCTCATCGCCAAGGTCAATC
BP2329_FW _{up}	TCACCTTCGACGACGGATAC
BP2329_FW _{down}	<u>GGATCCG</u> TGCGCATCTACCTGATCC
BP2329_REV _{up}	<u>GGATCCG</u> AATCGACCACGATGAAC
BP2329_REV _{down}	GATCCAGCTTGGCCTGGTTG
BP2331_FW	GTGACGTGGTGGTACATCAG
BP2331_REV	TGGTCTACCGCAGGAACAAT
^a Sitios de restricción BamHI están subrayados	

Tabla 3

Datos de ESI-MS de ión negativo y composiciones propuestas para LPS O-desacetilado de cepas de tipo salvaje de <i>B. pertussis</i> y mutantes de <i>B. pertussis</i> BP2331 BP2328 y BP2329. Unidades de masa medias se usaron para cálculo de valores de masa molecular basado en composiciones propuestas de la siguiente manera: glucosa (Glc), 162,14; heptosa (Hep), 192,17, ácido 2-ceto-3- deoxiiclosulósico (Kdo), 220,18; fosfato (P), 79,88, glucosamina (GlcN), 161,17, hexosamina (HexN), 161,17, ácido glucurónico (GlcA), 176,13, N-acetil-glucosamina (GlcNAc), 203,19, 2-acetamido-4-N-metil-2,4-didesoxi-fucosa (Fuc2NAc4NMe), 200,12, ácido 2,3-acetamido-2,3-didesoxi-manurónico (Man2NAc3NAcA), 258,09, ácido galactosaminurónico (GalNA), 175,13 y lípido A-OH, 953,02. La tabla no incluye aductos de sodio y de potasio y de iones de lípido A-OH con un sola carga (m/z 952 ([M-H] ⁻))									
Muestra	Iones observados [m/z]				Masa molecular [Da]			Abundancia relativa [%]	Composición propuesta
	[M-4H] ⁻	[M-H] ⁻	[M-2H] ⁻		Observada	Calculada			
WT		770 1	987 1		1976 2	1975 8	16 6		Glc•GlcA•Hep ₂ •P•Kdo•lípido A-OH
		888 3	1155 0		2312 7	2312 1	12 8		GalNA•Glc•GlcN•GlcA•hEP ₂ •P•Kdo•lípido A-OH
		1081 7			2667 9	2665 4	4 9		GalNA•Glc•GlcN ₂ •GlcA•Hep ₃ •P•Kdo•lípido A-OH
	811 1				3248 3	3246 9	11 8		GlcNAc•Man2NAc3NAcA•Fuc2NAcANMe•GalNA-Glc-GlcN ₂ -GlcA•Hep ₃ •Kdo•lípido A-OH
	831 4	1108 5			3329 0	3326 8	27 4		GlcNAc•Man2NAc3NAcA•Fuc2NAc4NMe•GalNA-Glc-GlcN ₂ -GlcA•Hep ₃ •P•Kdo•lípido A-OH
							9 8		GlcNAc•Man2NAc3NAcA•Fuc2NAc4NMe•GalNA-Glc-GlcN-GlcA•Hep ₃ •P•Kdo•lípido A-OH•HexN
		1162 1			3489 3	3488 0	16 7		GlcNAc•Man2NAc3NAcA•Fuc2NAcANMe•GalNA•Glc•GlcN ₂ •GlcA•Hep ₃ •P•Kdo•lípido
BP2328		743 6	1115 2		2233 1	2232 1	13 8		GalNA•Glc•GlcN•GlcA•Hep ₂ •Kdo•lípido A-OH
		770 0	1155 1		2312 6	2312 1	46 5		GalNA•Glc•GlcN•GlcA•Hep ₂ •P•Kdo•lípido A-OH
		823 7	1235 7		2473 8	2473 3	15 3		GalNA•Glc•GlcA•Hep ₂ •P•Kdo•lípido A-OH•HexN
			1034 6		2071 2	2070 8	12 1		GalNA•Glc•GlcN•GlcA•Hep ₂ •P•Kdo•lípido A-OH•HexN
			1074 6		2151 2	2150 8	6 7		GalNA•Glc•GlcA•Hep ₂ •Kdo•lípido A-OH
							5 6		GalNA•Glc•GlcA•Hep ₂ •P•Kdo•lípido A-OH
BP2329			866 0		1734 0	1733 7	8 6		GlcA•Hep ₂ •Kdo•lípido A-OH
		603 9	906 0		1814 4	1813 6	36 8		GlcA•Hep ₂ •P•Kdo•lípido A-OH

		657 6	986 6	1975 5	1974 8	28 8	GlcN•GlcA•Hep ₂ •P•Kdo- lípido A-OH GlcA•Hep ₂ •P•Kdo-lípido A-OH-HexN GlcN•GlcA•Hep ₂ •P•Kdo•lípido A-OH•HexN
BP2331		684 9	1027 5	2057 4	2057 0	16 3	Glc•GlcN•GlcA•Hep ₂ •Kdo•lípido A-OH Glc•GlcA•Hep ₂ •Kdo•lípido A-OH•HexN Glc•GlcN•GlcA•Hep ₂ •P•Kdo•lípido A-OH Glc•GlcA•Hep ₂ •P•Kdo•lípido A-OH-HexN Glc•GlcN•GlcA•Hep ₂ •Kdo•lípido A-OH•HexN Glc•GlcN•GlcA•Hep ₂ •P•Kdo•lípido A-OH•HexN GalNA•Glc•GlcN ₂ •GlcA•Hep ₃ •Kdo•lípido A-OH GalNA•Glc•GlcN•GlcA•Hep ₃ •P•Kdo- lípido A-OH•HexN GalNA•Glc•GlcN ₂ -GlcA•Hep ₃ •P•Kdo-lípido A-OH GalNA•Glc•GlcN•GlcA•Hep ₃ •P•Kdo-lípido A-OH•HexN GlcNAc•Man2NAc3NAcA•Fuc2NAcANMe•GalNA-Glc-GlcN ₂ - GlcA•Hep ₃ •lípido A-OH GlcNAc•Man2NAc3NAcA•Fuc2NAcANMe•GalNA-Glc-GlcN ₂ - GlcA•Hep ₃ •P•Kdo•lípido A-OH GlcNAc•Man2NAc3NAcA•Fuc2NAc4NMe•GalNA-Glc-GlcN ₂ - GlcA•Hep ₃ •P•Kdo•lípido A-OH•HexN GlcNAc•Man2NAc3NAcA•Fuc2NAc4NMe•GalNA-Glc-GlcN ₂ - GlcA•Hep ₃ •P•Kdo•lípido A-OH•HexN
		711 5	1067 4	2137 2	2137 0	6 4	
		738 5		2218 5	2218 2	3 7	
		765 2	1148 0	2298 3	2298 1	6 3	
			1291 6	2585 2	2585 5	4 1	
		887 8	1332 0	2666 2	2665 4	5 6	
		1081 7		3247 9	3246 9	9 8	
810 9		1108 3		3328 2	3326 8	11 7	
831 1						7 3	
871 2		1162 0		3488 9	3488 0	9 3	

Referencias

[0066]

- 5 Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., and Croughan, T. P. (1995) Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for Escherichia coli vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160: 63-67.
- Allen, A. G., Isobe, T., and Maskell, D. J. (1998a) Identification and cloning of waaF (rfaF) from Bordetella pertussis and use to generate mutants of Bordetella spp. with deep rough lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 180: 35-40.
- 10 Allen, A. G., Thomas, R. M., Cadisch, J. T., and Maskell, D. J. (1998b) Molecular and functional analysis of the lipopolysaccharide biosynthesis locus wlb from Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. *Mol. Microbiol.* 29: 27-38.
- 15 Allen, A., and Maskell, D. (1996) The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in Bordetella pertussis. *Mol. Microbiol.* 19: 37-52.
- Caroff, M., Brisson, J., Martin, A., and Karibian, D. (2000) Structure of the Bordetella pertussis 1414 endotoxin. *FEBS Lett.* 477: 8-14.
- 20 Clementz, T., and Raetz, C. R. H. (1991) A gene coding for 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase in Escherichia coli. Identification, mapping, cloning, and sequencing. *J. Biol. Chem.* 266: 9687-9696.
- Di Fabio, J. L., Caroff, M., Karibian, D., Richards, J. C., and Perry, M. B. (1992) Characterisation of the common antigenic lipopolysaccharide O-chains produced by Bordetella bronchiseptica and Bordetella parapertussis. *FEMS Microbiol. Lett.* 76: 275-281.
- 25 Geurtsen, J., Steeghs, L., Hamstra, H-J., ten Hove, J., de Haan, A., Kuipers, B., Tommassen, J., and van der Ley, P. (2006) Expression of the lipopolysaccharide-modifying enzymes PagP and PagL modulates the endotoxic activity of Bordetella pertussis. *Infect. Immun.* 74: 5574-5585.
- 30 Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Holst, O. (2000) Deacylation of lipopolysaccharides and isolation of oligosaccharides phosphates. in *Methods in Molecular Biology, Bacterial Toxins: Methods and Protocols* (Holst, O., Ed.) pp 345-353, Humana Press, Totowa, NJ.
- 35 Heinrichs, D. E., Yethon, J. A., and Whitfield, C. (1998) Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of Escherichia coli and Salmonella enterica. *Mol. Microbiol.* 30: 221-232.
- 40 Isobe, T., White, K. A., Allen, A. G., Peacock, M., Raetz, C. R. H., and Maskell, D. J. (1999) Bordetella pertussis waaA encodes a monofunctional 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase that can complement an Escherichia coli waaA mutation. *J. Bacteriol.* 181: 2648-2651.
- 45 Kasuga, B., Nakase, Y., Ukishima, K., and Takatsu, K. (1953) Studies on Haemophilus pertussis. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 27: 21-28. Kurzai, O., Schmitt, C., Claus, H., Vogel, U, Frosch, M, and Kolb-Maurer, A. (2005) Carbohydrate composition of meningococcal lipopolysaccharide modulates the interaction of Neisseria meningitidis with human dendritic cells. *Cell. Microbiol.* 7: 1319-1334.
- 50 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lesse, A. J., Campagnari, A. A., Bittner, W. E., and Apicella, M. A. (1990) Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods* 126: 109-117.
- 55 MacLachlan, P. R., Kadam, S. K., and Sanderson, K. E. (1991) Cloning, characterization, and DNA sequence of the rfaLK region for lipopolysaccharide synthesis in Salmonella typhimurium LT2. *J. Bacteriol.* 173: 7151-7163.
- 60 O'Neill, L. A. J. (2006) How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 3-9.
- Pålsson-McDermott, E. M., and O'Neill, L. A. J. (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113: 153-162.

Peppler, M. S. (1984) Two physically and serologically distinct lipopolysaccharide profiles in strains of *Bordetella pertussis* and their phenotype variants. *Infect. Immun.* 43: 224-232.

Phillips, N. J., Schilling, B., McLendon, M. K., Apicella, M. A., and Gibson, B. W. (2004) Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 72: 5340-5348.

Plüddeman, A., Mukhopadhyay, S., and Gordon, S. (2006) The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. *Exp. Rev. Mol. Med.* 8: 1-25.

Raetz, C. R. H., and Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 635-700.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179: 1109-1118.

Schnaitman, C. A., and Klena, J. D. (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 655-682.

Sisti, F., Fernández, J., Rodriguez, M. E., Lagares, A., Guiso, N., and Hozbor, D. F. (2002) In vitro and in vivo characterization of a *Bordetella bronchiseptica* mutant strain with a deep rough lipopolysaccharide structure. *Infect. Immun.* 70: 1791-1798.

Steeghs, L., van Vliet, S. J., Uronen-Hansson, H., van Mourik, A., Engering, A., Sanchez-Hernandez, M., Klein, N., Callard, R., van Putten, J. P. M., van der Ley, P., van Kooyk, Y., and van de Winkel, J. G. J. (2006) *Neisseria meningitidis* expressing lgtB lipopolysaccharide targets DC-SIGN and modulates dendritic cell function. *Cell. Microbiol.* 8: 316-325.

Stibitz, S. (1994) Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Methods Enzymol.* 235: 458-465.

Takada H, and Kotani S. (1989) Structural requirements of lipid A for endotoxicity and other biological activities. *Crit. Rev. Microbiol.* 16: 477-523.

Trent, M. S., Ribeiro, A. A., Doerrler, W. T., Lin, S., Cotter, R. J., and Raetz, C. R. H. (2001a) Accumulation of a polyisoprene-linked amino sugar in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structural characterization and transfer to lipid A in the periplasm. *J. Biol. Chem.* 276: 43132-43144.

Trent, M. S., Ribeiro, A. A., Lin, S., Cotter, R. J., and Raetz, C. R. H. (2001b) An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J. Biol. Chem.* 276: 43122-43131.

Tsai, C. M., and Frasch, C. E. (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119: 115-119.

Uronen-Hansson, H., Steeghs, L., Allen, J., Dixon, G.L.J., Osman, M., van der Ley, P., Wong, S.Y.C., Callard, R., and Klein, N. (2004) Human dendritic cell activation by *Neisseria meningitidis*: phagocytosis depends on expression of lipooligosaccharide (LOS) by the bacteria and is required for optimal cytokine production. *Cell. Microbiol.* 6: 625-637.

van Amersfoort, E. S., Van Berkel, T. J., and Kuiper, J. (2003) Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 379-414.

Westphal, O., and Jann, J. K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides, extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.* 5: 83-91.

Ziegler-Heitbrock, H. W. L., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., and Riethmüller, G. (1988) Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* 41: 456-461.

Listado de secuencias

[0067]

<110> NVI

<120> Vacunas mejoradas contra B. pertussis basadas en mutantes de glicosiltransferasa LPS

<130> P6014031PCT

<150> EP 07104885.4

<151> 2007-03-26

5 <160> 14

<170> Versión de patentIn 3.3

<210> 1

10 <211> 283

<212> PRT

<213> Bordetella pertussis

<400> 1

15

```

Met Arg Asn Ala Pro Asn Val Pro Val Leu Met Tyr His His Val Thr
 1      5      10      15

Pro Ala Gly Gly Met Ile Ala Ala Thr Pro Glu Val Phe Glu Arg Gln
      20      25      30

Ile Ala Ala Leu Ala Arg Ala Gly Tyr Arg Ser Leu Gly Thr Ala Glu
      35      40      45

Phe Ala Ala Tyr Leu Asp Gly Ala Pro Val Pro Glu Lys Ser Val Leu
      50      55      60

Ile Thr Phe Asp Asp Gly Tyr Leu Asn Asn Trp Val Tyr Ala His Pro
65      70      75      80

Ile Leu Gln Arg His Gly Met Lys Ala Val Leu Phe Leu Ile Thr Gly
      85      90      95

Leu Leu Gly Asp Gly Pro Ala Arg Pro Cys Ala Gly Gln Asp Gly Pro
      100      105      110

Leu Pro Pro Ala Pro Asp His Asp Glu Ser Lys Arg Leu Ile Ala Ala
      115      120      125

Gly Arg Ala Asp Glu Val Met Leu Arg Trp Ser Glu Val Gln Ala Met
      130      135      140

Leu Ala Ala Gly Thr Phe Glu Val His Ser His Thr His Thr His Thr
145      150      155      160

Arg Trp Asp Lys Gln Cys Gly Pro Asp Val Ala Ala Lys Arg Ala His
      165      170      175

Ile Val Gln Glu Leu Ala Asp Ser Arg Arg Ala Leu Gln Ala Arg Leu
      180      185      190

```

Gly Glu Val Ser Asp His Leu Cys Trp Pro Gln Gly Tyr Phe Asp Ala
195 200 205
Asp Tyr Val Gln Ala Ala Arg Asp Ala Gly Phe Arg His Leu Tyr Thr
210 215 220
Thr Asp Ala Leu Gly Gln Asn Val Pro Gly Gly Asp Pro Ala His Ile
225 230 235 240
Tyr Arg Phe Ala Val Arg Asn Arg Ala Gly Gly Trp Leu Asn Arg Arg
245 250 255
Ile Trp Leu Ala Arg His Pro Trp Ile Gly Pro Arg Tyr His Ala Trp
260 265 270
Lys Ala Trp Lys Lys Lys Leu Arg Arg Arg Ala
275 280

<210> 2
<211> 367
5 <212> PRT
<213> Bordetella pertussis
<400> 2

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

ES 2 393 682 T3

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

<210> 3
 <211> 852
 <212> ADN
 <213> Bordetella pertussis
 <400> 3

ES 2 393 682 T3

```

atgcgtaacg cgcccaatgt cccggtgctg atgtaccacc acgtcacccc ggccggcggc 60
atgatcgccg ccacgcccga ggtgttcgaa cggcagatcg ccgcgctggc gcggggccggc 120
taccgctcgc tgggcacggc cgagttcgcc gcctacctgg acggcgcccc ggtgcccag 180
aaatcggtgc tgatcacctt cgacgacgga tacctgaaca actgggtgta tgcccacccg 240
atcctgcagc gccacggcat gaaggccgtg ctgttcctga tcaccggcct gctgggcat 300
ggtccggcgc ggccctgcgc cgggcaggac gggcgctgc cgcccgcgcc cgaccacgac 360
gaaagcaagc gcctgatcgc cgccggacgc gccgacgagg tcatgctgcg ctggagcgaa 420
gtgcaggcca tgctggcggc gggcaccttc gaggtgcatt cgcacacca taccatac 480
cgctgggaca agcagtgcgg ccccgacgtc gccgccaagc gcgcccata cgtccaggag 540
ctggccgatt cgcgccgggc gctgcaggcc cggctgggag aggtcagcga ccacctgtgc 600
tggccccagg gctatttcga cgccgactat gtgcaggcgg cgcgcgacgc cggctttcgc 660
catctctaca ccaccgacgc cctgggcccag aacgtcccgg gcggcgatcc cgcacacata 720
taccgcttcg cgggtgcgaa ccgcgcccgc ggctggctca accgccgat ctggctggcg 780
cgccatccct ggatcgcccc gcgctatcac gcctggaagg cctggaagaa aaagctgagg 840
aggcgcgcat ga 852

```

5

<210> 4
 <211> 1104
 <212> ADN
 <213> Bordetella pertussis

10

```

<400> 4
atgcggccat tgcgtatcgt gcattccgaa gccgccacca gtttcggcgg ccaggaaggg 60
cgcatcttca aggaaatgac ggccatgcgc gagcgcgcc atcacatgga ggcgatctgc 120
cagccgcagg cccagctggc gcgcccctg gccgaggcca gcttcaccgt gcacacgtg 180
gaaatggacg ggccgcgcaa ttacctgcgc ggctgtctga gcctgcgccg cctgctgcgc 240
cagggccgct acgacgtgct gaacacgcac agccggcgcg atacctgat cgccgcggcc 300
gccggccggc tggcgggcac gccgtgatc gtgcgtaccc gccacctgct caacagggctc 360
ggctcgtctt ggtcctatac cgggctgccg caccgctca ccacggtcag cgaccacgtg 420
cgccagcacc tcatcgaacg cggcgtagcc gccggccata tcgccacggg gtattcgccc 480
atcgtgctgc cgctcccat cgaacactcg accctgcgcg gcgagctggg cctggcggcc 540
gacgatatcg tggtcggctg cgtggcggtg atgcgcgcca ccaaggggca ccgcgaactc 600
atcgacgcca tgcggccgct gatggccgag cgtgccaacc tgcacctggt gttcgtcggc 660
ggcggctcgc cgatgttcga gcagaccag gcctacgtgg ccgaactggg cctgcaggcg 720
cgcatccacc tgatgggcac gcgcaacgac gtccccaacc tgctggccgg tttcgacctg 780
ttcgccctgg ccaccgcca ggaggcttcg ggcaccgtct atgtcgaggc cgaagcctgt 840
ggcctgccgg tcgtcggcac cgacgtgggc ggcgtgtccg agatgatgcg cgatggcgag 900
accggcatcc tggtgccggt ggacgaccgc gcggcgctgg gcgccgcgct gcgccgcctg 960
atcgacgacc gcgcgttcgc gcgccgatg ggcgaggcgg gccggcgcat ggtgcgcgac 1020
gaaaaggctt tcgcgcccga acggctggcc gagcgaccg aggccatcta ccggcagtg 1080
ctggcggagc gcggccatgc gtaa 1104

```

5 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 5
 ttccgcactt actggctgag 20
 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 6
 ggatcctcgc ggtacgacag cacat 25
 <210> 7
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 7
 ggatcctgtt gcgcgagatg ctggag 26
 <210> 8
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 8
 cctcatcgcc aaggtaatc 20
 45 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 9
 55 tcaccttga cgacggatac 20
 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 60 <220>
 <223> cebador
 <400> 10
 65 ggatccgtgc gcatctacct gatcc 25

ES 2 393 682 T3

5 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 11
 ggatccgaat cgaccacgat gaac 24
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 12
 gatccagctt ggcctggttg 20
 <210> 13
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 13
 gtgacgtggt ggtacatcag 20
 <210> 14
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 14
 tggctaccg caggaacaat 20
 45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Células huésped de *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica* o *Bordetella parapertussis* con una mutación en una secuencia de ácidos nucleicos endógenos que codifica una glicosiltransferasa con al menos 98% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2, donde la mutación causa al menos 90% de reducción en la actividad de la glicosiltransferasa en comparación con una cepa parental no mutada correspondiente.
- 10 2. Célula huésped según la reivindicación 1, donde la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos endógenos que codifica la glicosiltransferasa es inactivada.
3. LPS obtenible de una célula huésped tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 15 4. Composición farmacéutica comprendiendo una célula huésped tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o un LPS tal y como se define en la reivindicación 3, y un portador farmacéuticamente aceptable.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, comprendiendo además un antígeno.
- 20 6. Célula huésped tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o un LPS tal y como se define en la reivindicación 3, para uso como un medicamento.
7. Célula huésped tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o un LPS tal y como se define en la reivindicación 3, para la prevención y/o tratamiento de tos ferina.
- 25 8. Célula huésped tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o un LPS tal y como se define en la reivindicación 3, para inmunización de un mamífero donde la célula huésped o el LPS se usa como un adyuvante.
9. Célula huésped o un LPS según la reivindicación 8, donde la célula huésped o LPS se usa en combinación con un antígeno.
- 30 10. Uso de una célula huésped tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o un LPS tal y como se define en la reivindicación 3, para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de tos ferina.
- 35 11. Uso de una célula huésped tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o un LPS tal y como se define en la reivindicación 3, para la preparación de un medicamento para inmunización de un mamífero donde la célula huésped o el LPS se usa como adyuvante.
12. Uso según la reivindicación 11, donde la célula huésped o el LPS se usa en combinación con un antígeno.

Fig 1

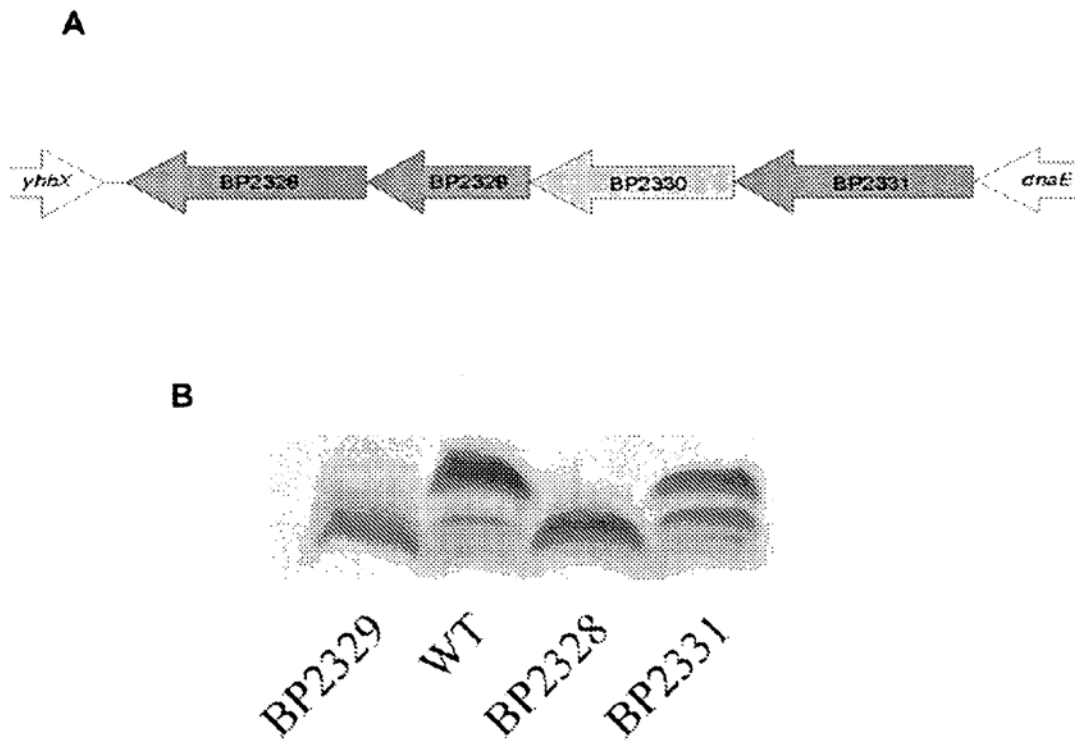


Fig 2

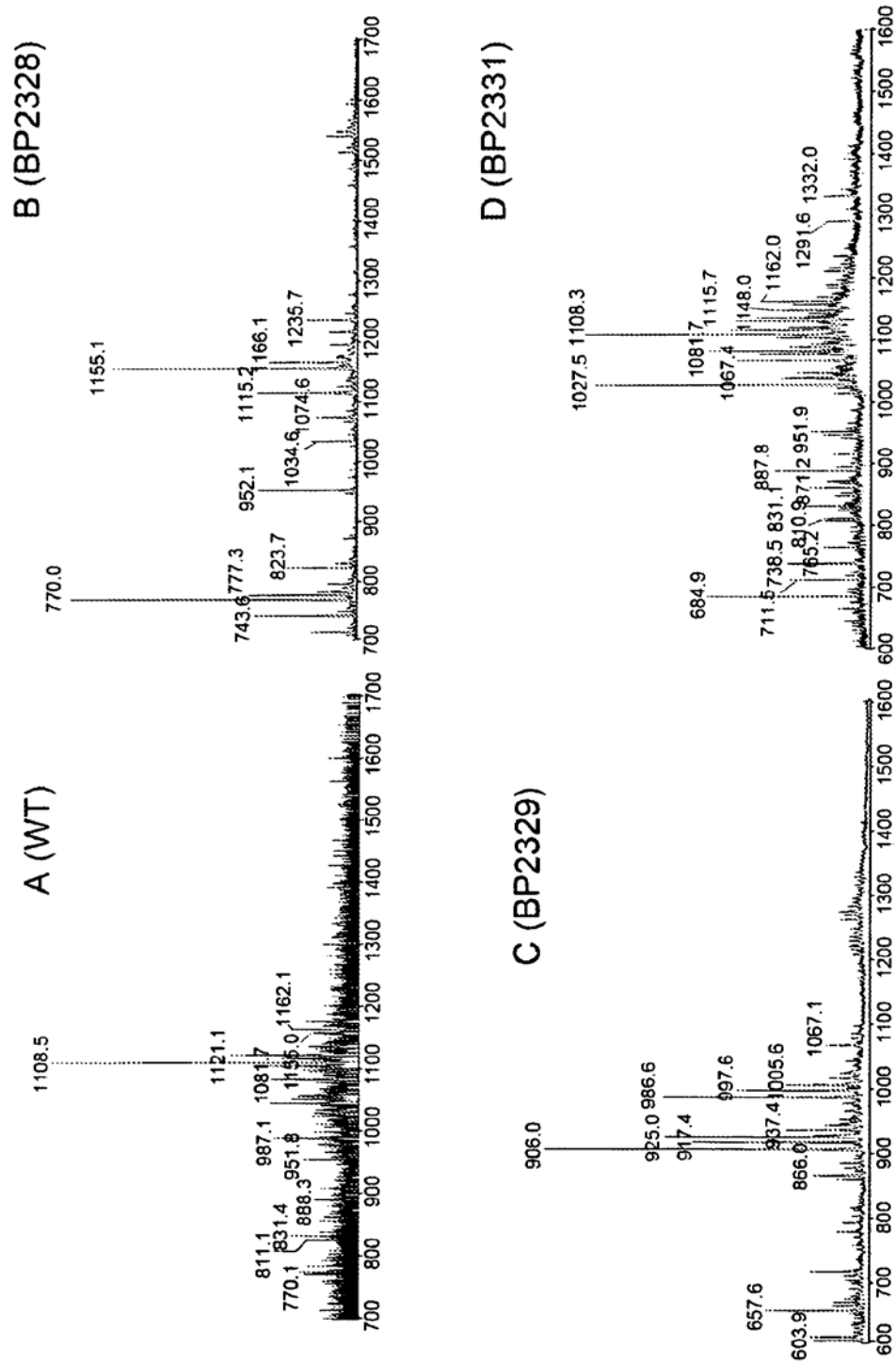
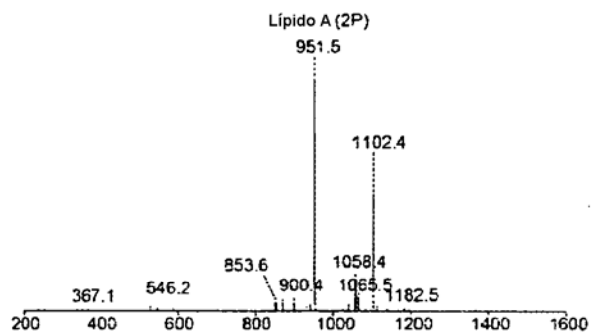
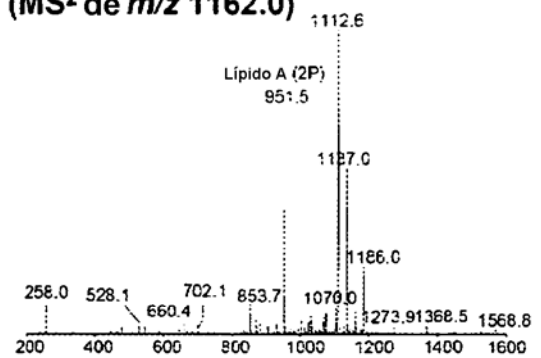


Fig 3

A (MS² de m/z 1108.3)



B (MS² de m/z 1162.0)



C (MS³ de m/z 1112.6)

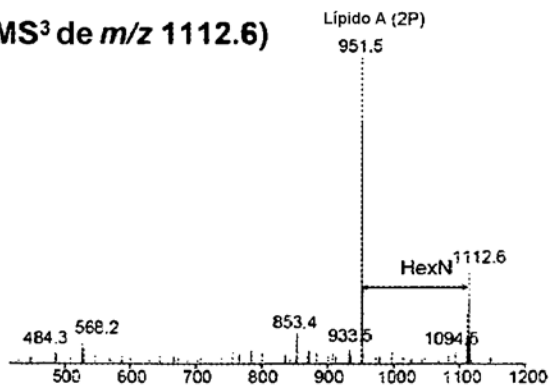


Fig 4a

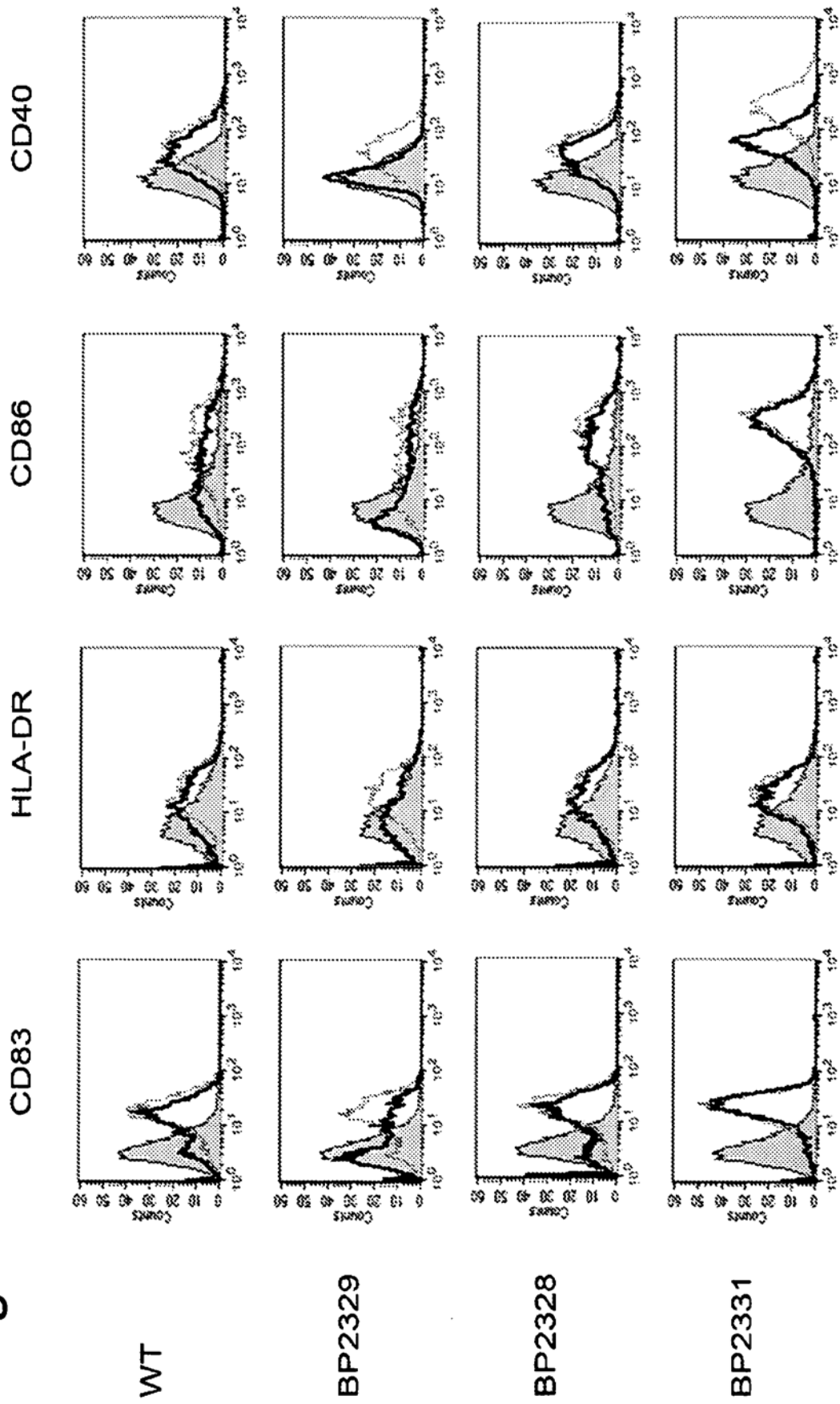


Fig 4

B

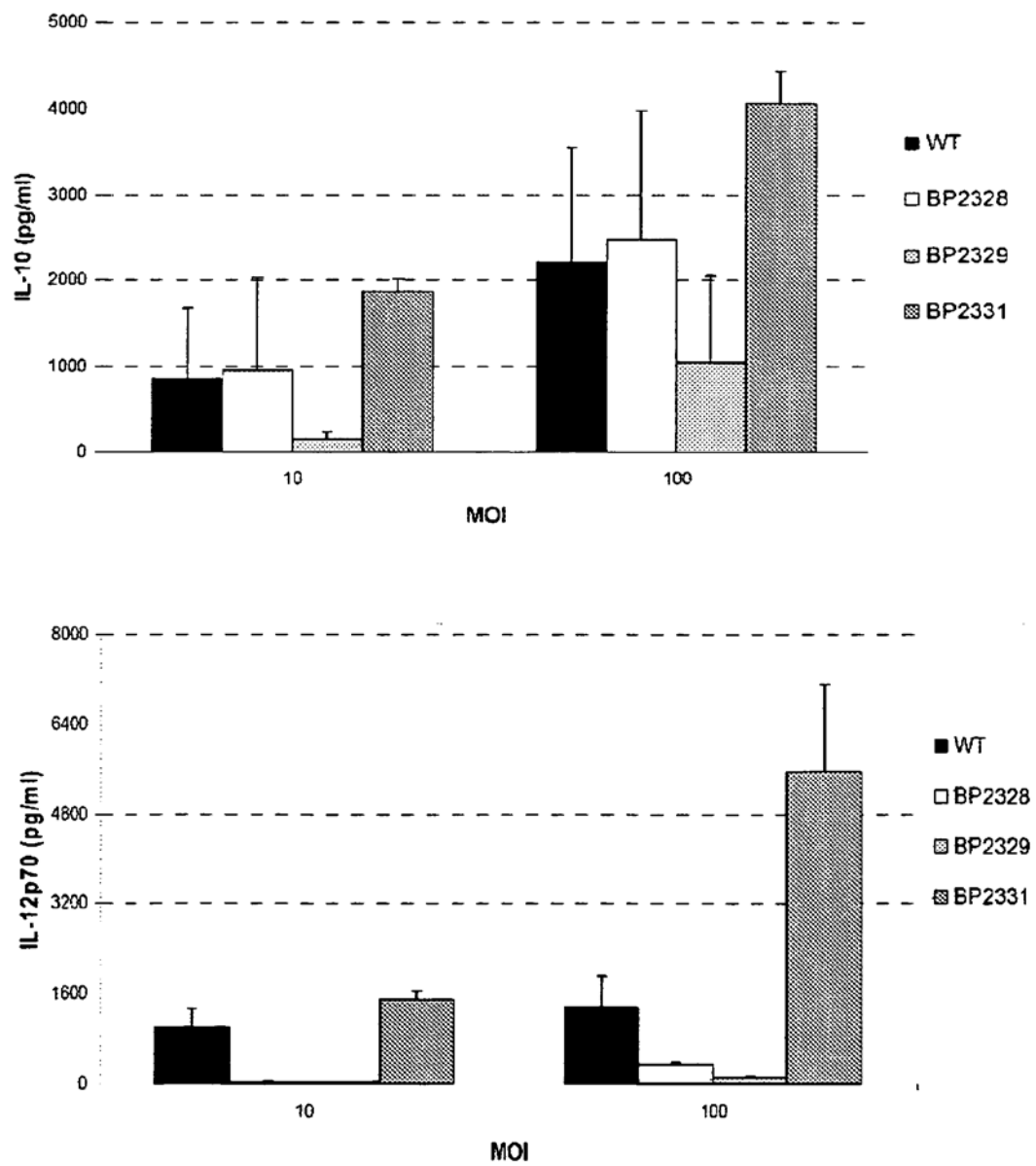


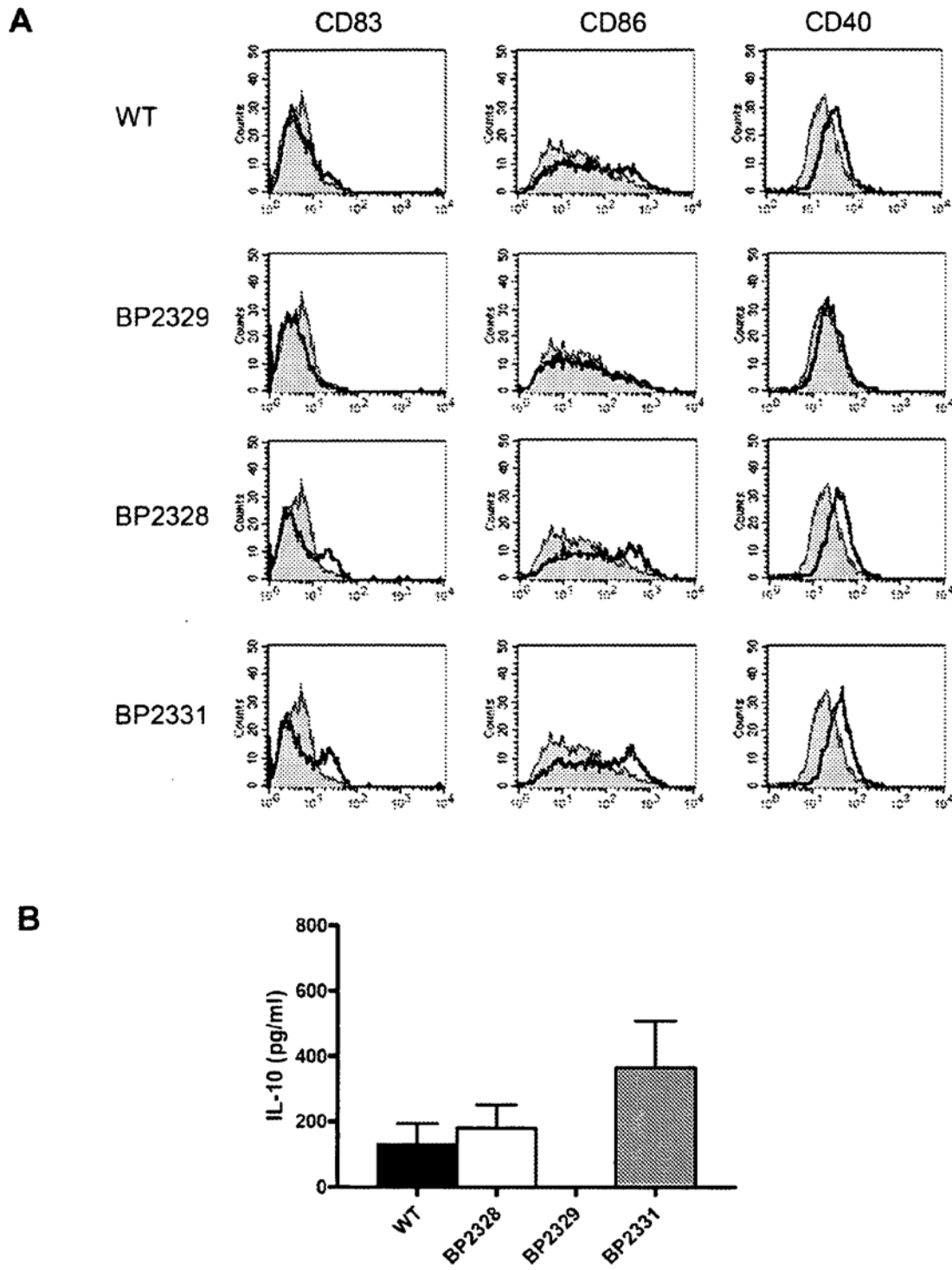
Fig 5

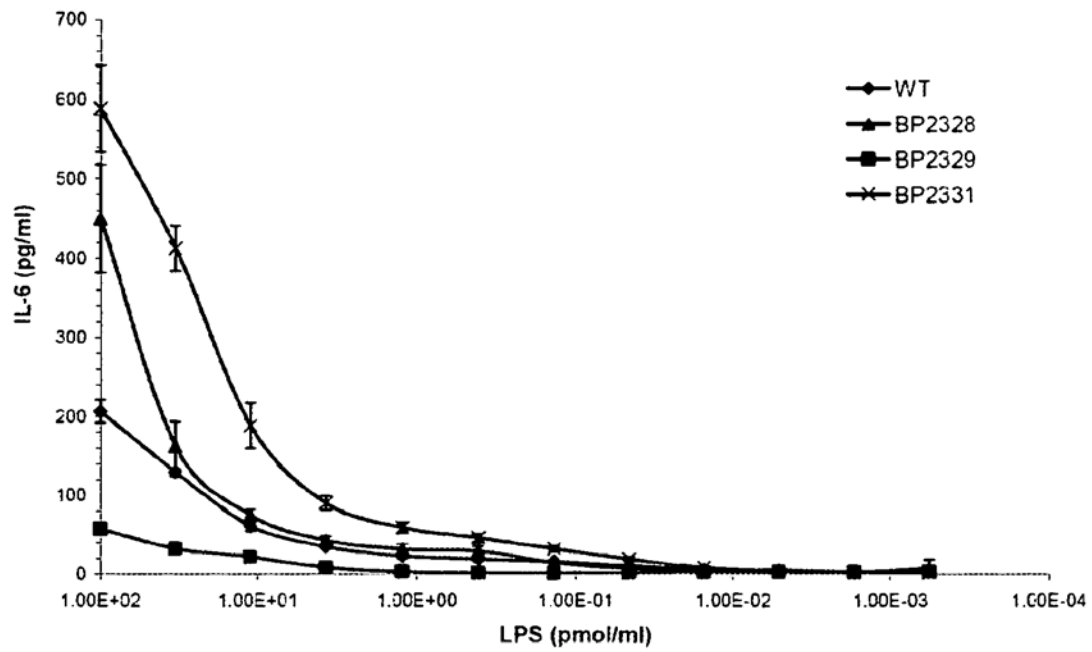
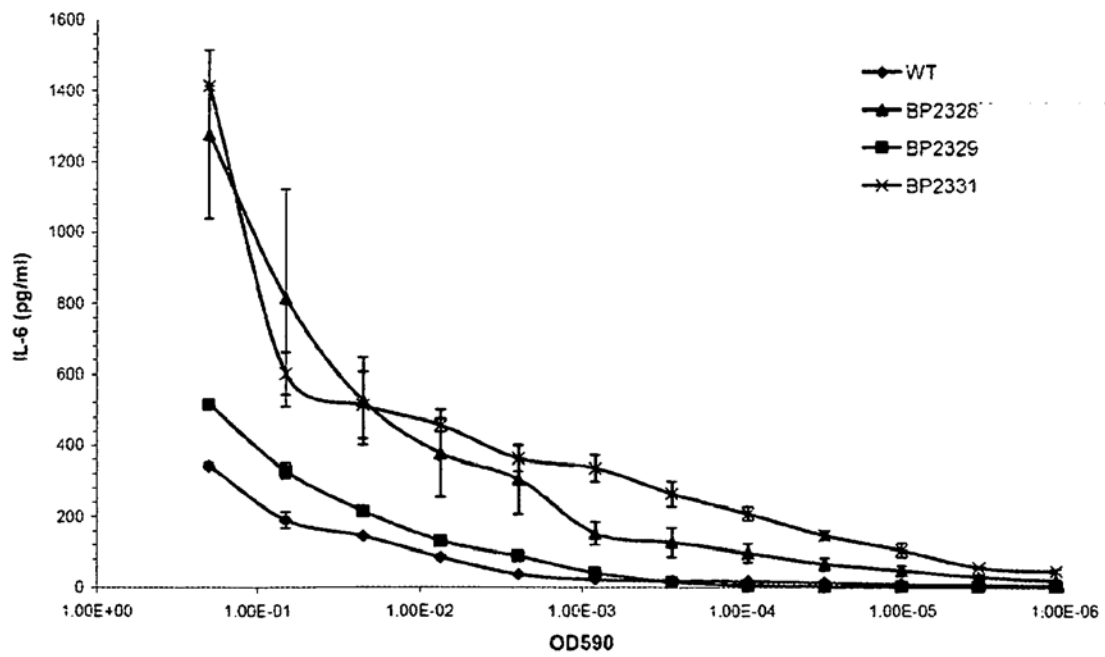
Fig 6**A****B**

Fig 7

