

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 412**

51 Int. Cl.:

A61K 39/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2010 E 10715245 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2424564**

54 Título: **Vacuna para la profilaxis o el tratamiento de una patología de las vías respiratorias originada por un alérgeno**

30 Prioridad:

28.04.2009 EP 09305371

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

11.05.2015

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris , FR;
INSTITUT PASTEUR DE LILLE (33.3%) y
NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND,
MAYNOOTH (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LOCHT, CAMILLE;
MAHON, BERNARD y
KAVANAGH, HEATHER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 535 412 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna para la profilaxis o el tratamiento de una patología de las vías respiratorias originada por un alérgeno

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una vacuna para la profilaxis o el tratamiento de una patología de las vías respiratorias originada por un alérgeno.

Antecedentes de la invención

La patogénesis del asma alérgica sigue sin estar clara, sin embargo, los conocimientos actuales implican la expansión de linfocitos Th2 CD4⁺, y un deterioro de la tolerancia a alérgenos ambientales que de otro modo son inocuos (Romagnani et al. J Allergy Clin Immunol 2004; 113(3):395-400). Una predisposición genética, junto con influencias ambientales parece que afectan a la supresión regular de respuestas mediadas por Th2. Se ha planteado la hipótesis de que anomalías en la maduración del pulmón durante el desarrollo fetal y neonatal pueden hacer que las vías respiratorias sean más susceptibles a los alérgenos ambientales, favoreciendo una polarización hacia el fenotipo Th2 y, por lo tanto, predisponiendo al individuo a una atopía y asma. La producción de origen alérgico de IL-4, IL-5 e IL-13 es típica de patologías alérgicas y la secreción de citocinas Th2 de este tipo inicia el cambio de clase de isotipo de linfocitos B a IgE, aumenta la producción de mucosidad y el reclutamiento de eosinófilos hacia las vías respiratorias. Ya que los linfocitos Th2 CD4⁺ representan un tipo celular de coordinación en algunas alergias, se sugirió que la inducción de respuestas neutralizantes podría impedir el desarrollo posterior de una enfermedad atópica. De acuerdo con esta modificación de la hipótesis de la higiene de Strachan (Romagnani et al. Int Arch Allergy Immunol 1992; 98(4): 279-85), una exposición microbiana puede activar las vías inmunitarias innatas que alteran las respuestas de Th1, Th2 y Treg. Esto da como resultado la supresión de la expansión de linfocitos T cooperadores Th2, y la consiguiente inhibición del cambio de isotipo a IgE. Sin embargo, varios estudios han sugerido que las infecciones víricas y bacterianas tienen un papel en el agravamiento de la enfermedad respiratoria. Por ejemplo, el virus sincitial respiratorio y la infección con *Bordetella pertussis* virulenta que induce Th1 (Ennis et al. Clin Exp Allergy 2004; 34(9): 1488-1497) agravan la inflamación alérgica en modelos animales. *B. pertussis* Gram negativa causa la tos ferina, una enfermedad respiratoria grave responsable de una morbilidad y mortalidad infantil significativas a nivel mundial. Aunque las inmunizaciones, ya sea con vacunas a base de células enteras muertas (Pe) o vacunas más recientes con subunidades acelulares (Pa) han tenido éxito, se ha informado de un resurgimiento de la enfermedad en adultos jóvenes (Das P. Lancet Infect Dis 2002; 2(6):322). Típicamente, *B. pertussis* no afecta de forma aguda a este grupo de edad; sin embargo, los adultos infectados pueden actuar como reservorio, y aumentar la probabilidad de que los infantes contraigan la enfermedad antes de la vacunación. La mayoría de los regímenes de vacunación actuales requieren tres dosis, comenzando a los 2 meses de edad, siendo necesarios 6 meses para tener una protección óptima. Por lo tanto, existe una necesidad de vacunas que induzcan una protección fuerte contra *B. pertussis* en los recién nacidos.

Una infección con *B. pertussis* virulenta agrava la patología de las vías respiratorias en un modelo murino de inflamación originada por un alérgeno, a pesar de la inducción de inmunidad de tipo Th1 (Ennis et al. Clin Exp Allergy 2004; 34(9):1488-1497). Las vacunas Pa que inducen Th2 protegen contra un agravamiento del asma alérgica inducida por *B. pertussis*, pero inducen IL-13, tanto a nivel sistémico como local (Ennis et al. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12(3):409-17). Por el contrario, la inmunización sistémica con Pe que induce Th1 inhibe la capacidad de respuesta alérgica de las vías respiratorias (Mills et al. Dev Biol Stand. 1998; 95:31-41), lo que sugiere que la protección frente a una patología originada por un alérgeno no es simplemente una modulación de las respuestas Th1/Th2, sino que está asociada con el grado de lesión de las vías respiratorias en el momento del cebado, de manera que el cebado con el alérgeno a través de las vías del tracto respiratorio durante el deterioro de la unidad mesenquimática epitelial de las vías aéreas, puede ser un factor más significativo que la polarización Th1/Th2/Treg.

Recientemente, se ha desarrollado una vacuna viva atenuada de forma genética contra *B. pertussis*, BPZE1, como una vacuna neonatal candidata contra la tos ferina (Mielcarek et al. PLoS Pathog 2006; 2(7):e65). Esta cepa de *B. pertussis* viva recombinante induce fuertes respuestas inmunes locales y sistémicas después de una administración intranasal. La administración a través de la vía nasal imita una infección natural y se espera que promueva una inmunidad de larga duración en niños a partir de 1 mes de edad (Mascart et al. J Immunology 2003; 170(1):1504-9). Tres factores de virulencia han sido objeto de atenuación; la toxina pertussis, la citotoxina traqueal y la toxina dermonecrótica. Con el uso de intercambio alélico, los genes que codificaban estas toxinas se deleccionaron o se reemplazaron con análogos inactivados genéticamente con el fin de inducir una protección, sin la patología grave asociada con la infección de tipo silvestre. Sin embargo, no se conoce cómo influye la administración de BPZE1 sobre el cebado con un alérgeno externo y la patología inducida con alérgenos.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* que carece de la citotoxina traqueal (TCT), la toxina pertussis (PTX) y la toxina dermonecrótica (DNT) para la profilaxis o el tratamiento de una patología de las vías respiratorias originada por un alérgeno.

En esta memoria se describe un método para la profilaxis o el tratamiento de una patología de las vías respiratorias

originada por un alérgeno en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis*, en donde dicha vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* carece de la citotoxina traqueal (TCT), la toxina pertussis (PTX) y la toxina dermonecrótica (DNT).

5 La presente invención también se refiere al uso de una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis*, que carece de la citotoxina traqueal (TCT), la toxina pertussis (PTX) y la toxina dermonecrótica (DNT), en la preparación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de una patología de las vías respiratorias originada por un alérgeno.

Descripción detallada de la invención

10 Ejemplos de una patología de las vías respiratorias originada por un alérgeno son el asma alérgica, la fiebre del heno, las enfermedades pulmonares intersticiales que incluyen la fibrosis pulmonar.

15 Las enfermedades pulmonares intersticiales que incluyen la fibrosis pulmonar, pueden estar causadas por exposiciones ocupacionales o ambientales. Sin desear estar ligado a la teoría, una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* que carece de TCT, PTX y DNT reduciría el daño de las vías respiratorias y la remodelación durante un período de exposición ambiental (al agente desencadenante de las enfermedades pulmonares intersticiales), y también protegería contra el agravamiento de la fibrosis pulmonar debido a *B. pertussis* virulenta.

Por "sujeto" se entiende un ser humano. Normalmente, el sujeto es un recién nacido, un infante o un adulto.

Las vacunas vivas atenuadas contra *Bordetella pertussis* que carecen de citotoxina traqueal (TCT), toxina pertussis (PTX) y toxina dermonecrótica (DNT) se han descrito en el documento WO2007/104451 y en Mielcarek et al. (PLoS Pathog 2006; 2(7):e65).

20 Avances recientes en la comprensión de la virulencia de *B. pertussis* a nivel molecular han permitido diseñar de forma racional una estrategia para la atenuación, eliminando o alterando genes que están involucrados en la patogénesis de la tos ferina. Tres factores de virulencia se utilizaron como diana genética: la citotoxina traqueal (TCT), la toxina pertussis (PTX) y la toxina dermonecrótica (DNT).

25 La TCT es responsable de la destrucción de las células ciliadas en la tráquea de hospedadores infectados y por lo tanto puede estar implicada en el síndrome de la tos. La TCT es un producto de degradación de peptidoglicano en la pared celular de bacterias Gram negativas, que generalmente es internalizado en el citosol a través de la proteína transportadora de AmpG para ser utilizado de nuevo durante la biosíntesis de la pared celular. AmpG de *B. pertussis* no es capaz de internalizar los productos de degradación de peptidoglicano. El gen *ampG* de *B. pertussis* puede ser reemplazado por *amps* de *E. coli*. La cepa resultante expresaba menos de 1% de actividad residual de TCT. Cualquier gen *ampG* heterólogo procedente de bacterias Gram negativas que liberan cantidades muy pequeñas de fragmentos de peptidoglicano en el medio, se puede utilizar en la presente invención. Ejemplos de gen *ampG* heterólogo adecuado incluyen, pero no se limitan al gen *ampG* de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Legionella*.

35 La PTX es un importante factor de virulencia responsable de los efectos sistémicos de las infecciones con *B. pertussis* y está compuesto por un resto enzimáticamente activo, llamado S1, y un resto responsable de la unión a receptores de células diana. También es uno de los principales antígenos protectores. Los genes *ptx* naturales pueden ser sustituidos por una versión mutada que codifica una toxina enzimáticamente inactiva. Esto se puede lograr mediante la sustitución de Arg-9 por Lys, y Glu-129 por Gly en S1, dos residuos clave implicados en la unión al sustrato y la catálisis, respectivamente. El intercambio alélico se puede utilizar para eliminar primero el operón de *ptx*, y luego para insertar la versión mutada.

40 La presencia de la toxina relevante en el material sobrenadante de cultivos de *B. pertussis* se puede detectar por análisis de inmunotransferencia.

45 También se pueden realizar otras mutaciones tales como las descritas en el documento de patente de EE.UU. 6.713.072, así como cualquier mutación conocida u otras mutaciones capaces de reducir la actividad de la toxina a niveles indetectables.

El intercambio alélico también se puede utilizar para eliminar el gen *dnt*. Aunque el papel de la DNT en la virulencia de *B. pertussis* no está seguro, se ha identificado como una toxina importante en la especie estrechamente relacionada *Bordetella bronchiseptica* y muestra actividad letal después de la inyección de cantidades mínimas.

En una realización preferida, la vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* es la cepa BPZE1.

50 La cepa BPZE1 se ha depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia) el 9 de marzo de 2006 con el número CNCM I-3585.

Por lo general, las vacunas vivas atenuadas contra *Bordetella pertussis* de la invención también pueden ser portadoras de antígenos heterólogos. Las vacunas vivas atenuadas contra *Bordetella pertussis* se pueden utilizar como vector, para ser portadoras de al menos una secuencia heteróloga adicional de ácido nucleico que codifica una pro-

teína de interés. Normalmente, la proteína codificada por al menos una secuencia heteróloga adicional de ácido nucleico es una proteína de la que se desea su expresión en el tracto respiratorio. Normalmente, la proteína de interés puede ser un antígeno, tal como un antígeno vírico o bacteriano, contra el que se desea una respuesta inmune. Ejemplos de vacunas vivas atenuadas contra *Bordetella pertussis* que son portadoras de antígenos heterólogos han sido descritos, por ejemplo, por Si Ying Ho et al. (Infection and Immunity, 2008, 76(1), 111-119).

La formulación de las vacunas de la presente invención se puede lograr usando métodos reconocidos en la técnica. La cantidad de vacunas de la invención que se van a administrar a un sujeto y el régimen de administración, se pueden determinar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas por los expertos normales en la técnica farmacéutica y veterinaria, teniendo en cuenta factores tales como el adyuvante (si está presente), la edad, el sexo, el peso, la especie y el estado del sujeto particular y la vía de administración. La administración de la vacuna es por lo general en una sola dosis. Alternativamente, la administración de la vacuna de la invención se realiza una primera vez (vacunación inicial), seguida por al menos un refuerzo (administración posterior), con la vacuna.

Típicamente, las vacunas se pueden administrar mediante administración nasal o por inhalación. Este tipo de administración es de bajo coste y permite que la vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* de la invención colonice las vías respiratorias. La administración nasal se puede realizar con una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* en forma de solución líquida, suspensión, emulsión. Las soluciones y suspensiones se administran en forma de gotas. Las soluciones también se pueden administrar como una niebla fina desde una botella de vaporización nasal o desde un inhalador nasal. Los geles se administran en pequeñas jeringas que contienen la dosificación requerida para una aplicación. La inhalación se puede realizar con una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* en forma de soluciones, suspensiones y polvos; estas formulaciones se administran a través de un aerosol, gotas o un inhalador de polvo seco. Los polvos se pueden administrar con insufladores o inhaladores.

A continuación, la invención se ilustrará por medio del siguiente ejemplo, así como las figuras.

Leyendas de las figuras

Figura 1. *B. pertussis* BPZE1 atenuada reduce la gravedad de una patología de las vías respiratorias inducida a través de alérgenos sensibilizantes. Cambios morfológicos representativos a los 38 días en secciones transversales bronquiolares de los pulmones de ratones (A) no sensibilizados, (B) sensibilizados con OVA, (C) sensibilizados con OVA e infectados con *B. pertussis*, (D) sensibilizados con OVA e inmunizados con BPZE1. La inflamación de las vías aéreas se detectó utilizando una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de secciones de pulmón fijadas. Aumento original A, C, E y G x100. B, D, F y H x400.

Figura 2. *B. pertussis* BPZE1 atenuada reduce la gravedad de la hiperplasia de la mucosidad frente a un alérgeno sensibilizante. Cambios morfológicos representativos a los 37 días en secciones transversales de bronquiolo de ratones (A) no sensibilizados, (B) sensibilizados con OVA, (C) sensibilizados con OVA e infectados con *B. pertussis*, (D) sensibilizados con OVA y vacunados con BPZE1. La inflamación de las vías aéreas se detectó empleando una tinción combinada con Discombes/azul Alcian/PAS en secciones de pulmón. Aumento original x400.

Figura 3. *B. pertussis* BPZE1 atenuada reduce el infiltrado de células de fluido LBA. Efecto de la infección con BPSM virulenta, estimulación con BPZE1 atenuada y/o sensibilización con OVA en una composición de LBA, 24 h después de la exposición final a OVA. Los controles negativos se infectaron/sensibilizaron de forma simulada con solución salina. El fluido BAL se examinó para el recuento del número total de células (A), o la presencia de neutrófilos (B), eosinófilos (C) o linfocitos (D). Los resultados se expresan como media \pm E.E.M. del número de células. * P <0,05.

Figura 4. *B. pertussis* BPZE1 atenuada reduce la IgE inducida por alérgeno. IgE específica de OVA en suero se obtuvo como respuesta a la sensibilización con OVA y/o a la estimulación con *B. pertussis* virulenta (BPSM) o atenuada (BPZE1). Los sueros se recogieron el día 38 y los niveles séricos de IgE específica de OVA se midieron con ELISA. Las concentraciones inferiores a 100 pg/ml se consideraron negativas. Los resultados se expresan como concentraciones medias de anticuerpos \pm E.E.M. P <0,05.

Figura 5. Respuestas inmunes mediadas por células procedentes de esplenocitos frente a OVA, provocadas por sensibilización con OVA 10 días después de una exposición previa a una infección con *B. pertussis* atenuada (BPZE1) o virulenta (BPSM). Los símbolos negativos indican una sensibilización simulada o una estimulación con PBS. Las respuestas de citocinas procedentes de cultivos similares sometidos a ensayo, se muestran para (A) IL-5, (B) IL-10, (C) IL-13 y (D) IFN- γ . La proliferación de linfocitos T (E) representa Δ cpm de la proliferación en bazo frente a OVA a 200 μ g/ml, después de la sustracción del ruido de fondo típicamente de 2000-4000 cpm. Los resultados se expresan como media \pm E.E.M.

Tabla I. Resumen de las características patológicas de la sensibilización con *B. pertussis*/alérgeno. Características de la inflamación de las vías respiratorias en ratones no sensibilizados (Control), sensibilizados con OVA (OVA), sensibilizados e inmunizados con BPZE1 (ZeOVA) o sensibilizados e infectados con BPSM (SmOVA).

Grupo	Inflamación del tejido	Eosinófilos en BALF	Metaplasia de células caliciformes	Cultivo de esplenocitos				OVA-IgE
				IL-5	IL-13	IL-10	IFN- γ	
				-				
Control	-	-	-	-	-	-	-	-
OVA	++	++	++	+++	+++	-	-	++
ZeOVA	+	+	+	-	+	-	++	+
SmOVA	++	+++	+++	+	-	-	-	+++
BPZE1	-	-	-	-	-	-	-	-
BPSM	-	-	-	-	-	-	-	-

Ejemplo

RESUMEN

5 En este estudio preclínico se examinó si la vacuna candidata contra *B. pertussis*, BPZE1, influye en el cebado con un alérgeno externo y en la patología, utilizando modelos animales caracterizados previamente. A diferencia de las cepas virulentas de tipo silvestre, BPZE1 viva atenuada no agravaba sino que protegía frente a una patología originada por un alérgeno.

Abreviaturas utilizadas

10 OVA: Ovoalbúmina; BAL: lavado broncoalveolar; BPZE1: *Bordetella pertussis* viva atenuada; Pa: vacuna acelular contra la tos ferina; Pe: vacuna de células enteras contra la tos ferina

MATERIALES

Inmunización, sensibilización y administración de OVA y *B. pertussis* en las vías respiratorias

15 Se utilizaron ratones Balb/c hembras de ocho a doce semanas de edad (Harlan, Oxon, Reino Unido) y se mantuvieron según las normas y directrices del Departamento de Salud de Irlanda y el Comité de Ética para la Investigación de la Universidad Nacional de Irlanda, Maynooth. Los ratones fueron expuestos a bacterias vivas virulentas o atenuadas, y fueron sensibilizados frente al alérgeno durante la infección. *B. pertussis* BPSM virulenta o BPZE1 atenuada se cultivaron como se ha descrito previamente (Mills et al. Dev Biol Stand 1998; 95:31-41). Las cepas atenuadas o virulentas en crecimiento semilogarítmico se administraron a ratones mediante un aerosol. En el pico de la infección (10d) y a los 24d, los ratones fueron sensibilizados mediante inyección intraperitoneal de 100 μ g/ml de ovoalbúmina (OVA) en adyuvante (AlumImject[®], Pierce, I11). Los ratones fueron estimulados por vía intranasal con OVA (50 μ g/ml) los días 24, 35, 36 y 37. Varios grupos de control recibieron una administración simulada de PBS estéril en lugar del agente activo (Ennis et al. Clin Exp Allergy 2004; 34(9): 1488-1497).

Lavado broncoalveolar (BAL) e histología del tracto respiratorio

25 El día 37d, los ratones fueron sacrificados mediante inyección letal de pentobarbital sódico y se recogió el líquido BAL (Ennis et al. Clin Exp Allergy 2004; 34(9):1488-1497). Se realizaron recuentos de los leucocitos totales y de células diferenciales según lo descrito, utilizando Diff Quik/Rapi-Diff II[®] (Triangle Biomedical Sciences, NC, EE.UU.). Los pulmones de ratones no sometidos a lavado se extirparon y se fijaron en 10% (v/v) de formalina/PBS, se embebieron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E), azul alcian (identificación de moco), Discombes (identificación de eosinófilos) o ácido periódico de Schiff (para la evaluación del espesor de la membrana basal). Los cambios histopatológicos se clasificaron de acuerdo con un sistema establecido de puntuación semicuantitativa, en leves, moderados o graves. La puntuación de la patología fue realizada por dos observadores independientes, sin un conocimiento previo del grupo de tratamiento, como se ha descrito anteriormente (Ennis et al. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12(3):409-17).

Ensayo de proliferación de linfocitos T

35 Los esplenocitos procedentes de ratones se prepararon como se ha descrito previamente (Mahon et al. J Exp Med 1997; 186(11):1843-1851) y se incubaron durante 72 h, con medio (control negativo), OVA (200 μ g/ml) o concanavalina A (5 μ g/ml). El material sobrenadante se retiró a las 48 horas para un análisis de las citocinas, y los cultivos recibieron medio de nuevo aporte. Las células se incubaron durante las 6 h finales con [³H]-timidina y la proliferación se midió por la radioactividad incorporada mediante un contador de centelleo líquido.

40 Medición de citocinas y respuestas de anticuerpos

El análisis de IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ a partir del fluido BAL y del material sobrenadante de esplenocitos se llevó a cabo utilizando un equipo Flex de matriz citométrica de microesferas (del inglés, "Cytometric Bead Array Flex Sets") (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) según las instrucciones del fabricante, y se analizó por citometría de flujo (Becton-Dickinson, NJ, EE.UU.). Las curvas de calibración y los datos brutos se generaron para cada citocina utilizando el programa informático FCAP Array v1.0.1 (BD Biosciences). La IgE sérica específica de OVA se midió por ELISA como se ha descrito previamente (Morokata Tet al. Immunology 1999; 98(3): 345-351) utilizando un anticuerpo monoclonal de rata anti-IgE de ratón (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.). La concentración de IgE se expresó como $\mu\text{g/ml}$ después de la comparación con patrones de IgE murina (BD, Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.).

Análisis estadístico

Los valores para todas las mediciones se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa informático GraphPad Prism[®] (GraphPad, San Diego, CA). La comparación se realizó mediante la prueba de Kruskal Wallis o la prueba de Mann Whitney, según fuera adecuado. El nivel de significación se especificó con un valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

15 ***B. pertussis* BPZE1 atenuada impide una patología alérgica agravada de las vías respiratorias originada por OVA**

B. pertussis virulenta puede agravar el cebado con un alérgeno externo en modelos animales (Ennis et al. Clin Exp Allergy 2004; 34(9):1488-1497) y se ha asociado con una agravación de la alergia en los seres humanos (Harju et al. Thorax 2006; 61(7):579-584). Para evaluar la influencia de *B. pertussis* atenuada sobre el cebado con un alérgeno externo, los ratones fueron cebados con cepas virulentas o atenuadas de *B. pertussis*, y se sensibilizaron frente a OVA en el pico de portador de bacterias (un modelo mostrado previamente por revelar la influencia de una infección sobre la inflamación originada por un alérgeno). En ausencia de infección, los ratones sensibilizados frente a OVA mostraron inflamación peribronquial y perivascular típica el día 38, lo que no se observó en ratones control no tratados (Fig. 1A y B). En ese momento, la patología debida solo a una infección bacteriana virulenta remitió. El cebado en el pico de una infección con *B. pertussis* virulenta incrementa la patología de las vías respiratorias cuando se compara con la sensibilización solo con OVA, en donde los ratones muestran hiperplasia epitelial y metaplasia mucosa moderada (Fig. 1C). Por el contrario, se observó una patología mínima en ratones sensibilizados, infectados con BPZE1 atenuada, en comparación con los sensibilizados solo con OVA (Fig. 1D). Un examen de las células caliciformes que contenían moco mostró que la inmunización previa con BPZE1 en ratones sensibilizados con OVA, reducía la secreción de moco y la hiperplasia, en comparación con los sensibilizados solo con OVA (Fig. 2). De este modo, a diferencia de la infección con *B. pertussis* virulenta, la inmunización con la vacuna viva atenuada contra *B. pertussis* candidata, BPZE1, no incrementó sino que redujo la patología asociada con la sensibilización a alérgenos.

La cepa BPZE1 de la vacuna atenuada contra *B. pertussis* evita la inflamación alérgica de las vías respiratorias originada por OVA

La inmunización con BPZE1 viva atenuada de *B. pertussis* moderaba la propiedad de afluencia inflamatoria en el tracto respiratorio inducida por OVA. Los ratones control mostraron una celularidad mínima en el lavado broncoalveolar (Fig. 3), mientras que la sensibilización/estímulo con OVA dio como resultado una infiltración significativa con células inflamatorias ($>3 \times 10^6$ células, Fig. 3A, $p < 0,05$). Había pocas diferencias notables en el número de linfocitos o neutrófilos. La inmunización solo con BPZE1 no fomentó una infiltración de neutrófilos el día 38d y la infiltración de neutrófilos en ratones sensibilizados de forma combinada con BPZE1/OVA era típicamente menor que solo con OVA o en combinación con bacterias virulentas, sin embargo esto no alcanzó un nivel de significación estadística en este estudio. Las observaciones más importantes eran que una infección previa con *B. pertussis* virulenta aumentaba la infiltración celular en comparación con una sensibilización solo con OVA, acompañada por un aumento de la eosinofilia (Fig. 3C) como se ha observado anteriormente (Ennis et al. Clin Exp Allergy 2004; 34(9):1488-1497). Sin embargo, en un claro contraste, la inmunización con BPZE1 viva atenuada antes de la sensibilización con OVA, dio como resultado una infiltración de eosinófilos en las vías aéreas, originada por OVA, significativamente reducida (Fig. 3C, $p < 0,05$). Por lo tanto, la vacuna candidata viva atenuada contra *B. pertussis*, BPZE1, evita la eosinofilia alérgica de las vías respiratorias originada por OVA, una característica clave de la inflamación en este modelo.

50 **La vacuna candidata viva atenuada contra *B. pertussis*, BPZE1, no potencia las respuestas de IgE sérica frente a un alérgeno sensibilizante**

Se conoce que la sensibilización con OVA en ratones induce IgE y una respuesta potente específica de Th2, mientras que una infección con *B. pertussis* induce una fuerte respuesta de Th1. Sin embargo, la toxina pertussis por sí sola puede elevar las concentraciones de IgE. Por lo tanto, era importante investigar si BPZE1 atenuada tenía un efecto adyuvante o potenciaba la IgE específica de alérgeno. La influencia de BPZE1 sobre la sensibilización alérgica se examinó midiendo la concentración de IgE específica de OVA en el suero de ratones sensibilizados frente a OVA, infectados con BPSM, inmunizados con BPZE1 o que habían recibido combinaciones de estos tratamientos (Fig. 4). Como es bien sabido, la sensibilización con OVA inducía niveles significativos de IgE. Anteriormente, un aumento significativo de IgE específica de OVA después de una infección con *B. pertussis* W28 virulenta se había

observado en ratones sensibilizados con OVA (Ennis et al. Clin Exp Allergy 2004; 34(9):1488-1497). Las respuestas de IgE en ratones expuestos a BPZE1 atenuada antes de la sensibilización con OVA, no difirieron significativamente de los que recibieron solo OVA. Sin embargo, en claro contraste, la inmunización con BPZE1 atenuada daba como resultado una inducción significativamente reducida ($p < 0,05$) de IgE inducida con OVA, en comparación con ratones infectados con BPSM virulenta en combinación con sensibilización con OVA (Fig. 4). Por lo tanto, la vacuna candidata viva atenuada contra *B. pertussis*, BPZE1, administrada antes del cebado con un alérgeno, no mostraba una respuesta incrementada de IgE, como se observó con *B. pertussis* W28¹¹ y BPSM.

La vacuna viva atenuada contra *B. pertussis* BPZE1 modula las respuestas de memoria de citocinas frente a un alérgeno sensibilizante

Está claro que BPZE1 atenuada tiene un efecto radicalmente diferente sobre una patología de las vías respiratorias originada por un alérgeno, que en comparación con *B. pertussis* virulenta. Con el fin de descubrir la base de los mecanismos de acción de este efecto, se caracterizó la influencia de la exposición a bacterias sobre el patrón de respuestas inmunes inducidas por alérgenos. La inducción de citocinas específicas de alérgeno a través de preparaciones de células de bazo, se evaluó después de la inmunización con BPZE1 y la sensibilización/estimulación con OVA, con el fin de evaluar la influencia de BPZE1 sobre el cebado inducido por alérgeno. Como era de esperar, la sensibilización solo con OVA inducía niveles elevados de las citocinas de Th2 IL-5 e IL-13 (Fig. 5) en la respuesta de memoria frente a OVA. Ni BPSM virulenta ni BPZE1 atenuada solas inducían una respuesta de memoria frente a OVA (Fig. 5E), pero producían fuertes respuestas de Th1 frente a antígenos de *B. pertussis*. La estimulación con BPSM no modulaba la respuesta inmune frente a un alérgeno sensibilizante, con una reducción no significativa de IL-5, IL-13 específicas de OVA o de las respuestas proliferativas observadas en ratones cosensibilizados frente a OVA, y un incremento no significativo de IFN- γ (Fig 5). Por el contrario, BPZE1 atenuada alteraba el patrón de las citocinas inducidas mediante sensibilización con alérgenos. BPZE1 reducía significativamente los niveles de IL-5 ($p < 0,005$) e IL-13 ($p < 0,05$) inducidas con OVA, así como las respuestas proliferativas específicas de OVA ($p < 0,001$), pero inducía de forma significativa una IFN- γ incrementada como respuesta a OVA ($p < 0,05$). Resumiendo, BPZE1 no favorecía la inducción de citocinas Th2 frente a un antígeno externo sino que más bien las modulaba hacia una respuesta de tipo Th1.

DISCUSIÓN

El presente estudio empleaba modelos de infección/sensibilización combinados para demostrar que una cepa atenuada de *B. pertussis*, BPZE1, no potenciaba sino que reducía una patología de las vías respiratorias originada por un alérgeno. *B. pertussis* atenuada reducía la eosinofilia pulmonar originada por un alérgeno y disminuía la gravedad de una inflamación de las vías respiratorias. Además, BPZE1 evitaba un aumento de IL-5 e IL-13 inducidas por OVA y modulaba respuestas de memoria frente a alérgenos hacia una respuesta de tipo Th1. BPZE1 mostraba una disminución de las respuestas de IgE sérica inducida por alérgenos, cuando se comparaba con ratones infectados con *B. pertussis* virulenta antes de la sensibilización con OVA (véase la Tabla I). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que BPZE1 atenuada no agrava una patología de las vías respiratorias inducida por alérgenos en un modelo murino y apoyan el uso de esta vacuna candidata en poblaciones en donde la atopía es prevalente.

La hipótesis de la higiene sugiere que infecciones que inducen Th1 pueden tener un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la atopía. Sin embargo, estudios previos han demostrado que *B. pertussis* virulenta incrementa la gravedad de una patología de las vías respiratorias (Ennis et al. Clin Exp Allergy 2004; 34(9):1488-1497) a pesar de la inducción de la inmunidad de tipo Th1. Por el contrario, una inmunización sistémica con una vacuna Pe que inducía Th1 inhibía la capacidad de respuesta alérgica de las vías respiratorias, lo que sugiere que la protección frente a una patología originada por un alérgeno está ligada no solo a un perfil de linfocitos T CD4⁺, sino también con el grado de lesión de las vías respiratorias en el momento del cebado.

El propósito de este estudio era investigar si una inmunización con una cepa atenuada genéticamente de *B. pertussis* podría proteger contra una inflamación de las vías respiratorias inducida por OVA. Anteriormente, se había investigado el potencial de otras vacunas para moderar el riesgo de una atopía, y en una variedad de estudios se ha encontrado una relación inversa entre la inmunización y un riesgo incrementado de enfermedad alérgica. Ennis *et al.* encontraron que una vacuna Pe protegida contra un agravamiento, debido a *B. pertussis*, de la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por OVA en un modelo murino de inflamación alérgica de las vías respiratorias (Mills et al. Dev Biol Stand 1998; 95:31-41). Del mismo modo, Grüber *et al.* no encontraron ningún efecto que favoreciera la alergia como respuesta a vacunas infantiles comunes, incluidas las vacunas contra la tos ferina (Grüber et al. Allergy 2008; 63(11):1464-1472). La relación entre la vacunación infantil y el desarrollo de enfermedades atópicas en una muestra poblacional de 718 adolescentes mostró que las vacunas vivas atenuadas inhibían el desarrollo del asma y de enfermedades alérgicas (Martignon et al. Pediatr Allergy Immunol 2005; 16(3):193-200). El estudio actual demuestra que la vacuna candidata BPZE1 inhibe una patología originada por alérgeno a través de un mecanismo que modula las respuestas mediadas por células contra OVA, tanto a nivel de la mucosa como sistémico.

El reclutamiento de eosinófilos hacia el pulmón mediado por IL-5 contribuye a una patología de las vías respiratorias inducida por alérgenos mediante la generación de productos citotóxicos potentes, que incluyen la proteína básica principal (MBP) y la peroxidasa de eosinófilos, que conjuntamente contribuyen al daño tisular (Gleich G. J Allergy Clin Immunol 2000; 105(4):651-63). La infección con *B. pertussis* virulenta agrava el grado de afluencia inflamatoria

inducida por OVA en el tracto respiratorio, con un aumento de los eosinófilos (Fig. 3C), acompañado por un incremento marcado de la gravedad de la patología de las vías respiratorias (Fig. 1G). Por el contrario, la administración de BPZE1 atenuada antes de la sensibilización con el alérgeno dio como resultado una reducción significativa de la infiltración de eosinófilos. Este estudio demuestra que BPZE1 evita el incremento de IL-5 inducida por OVA asociado con un adyuvante (Fig. 1A), observado cuando los animales están infectados con cepas virulentas de *B. pertussis*. IL-13 también contribuye a la patogénesis del asma favoreciendo respuestas de tipo Th2, aumentando el reclutamiento de eosinófilos y contribuyendo a la inflamación mediada por IgE (Humbert et al. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(5):657-65; Temann et al. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16(4):471-8). BPZE1 atenuada disminuía significativamente la IL-13 inducida por OVA en ratones sensibilizados (Fig. 5C). La hipersecreción de moco en las vías respiratorias también está relacionada con IL-13 y es una característica fisiopatológica principal tanto del asma alérgica como de la tos ferina. No es de extrañar, por tanto, que la producción de moco refleje los niveles de IL-13 en este estudio y se haya reducido significativamente en los ratones sensibilizados expuestos previamente a BPZE1 (Fig 5C).

Este estudio sugiere que uno, o una combinación, de los factores de virulencia atenuados en BPZE1 (la toxina pertussis, la citotoxina traqueal y la toxina dermonecrotica) tienen una función en el efecto adyuvante observado con cepas virulentas de *B. pertussis*, a través de la inducción de IL-5 o IL-13, o de ambas.

La protección contra una patología originada por un alérgeno observada en esta memoria, está asociada con tres modificaciones genéticas contenidas dentro de BPZE1 y la modulación de la respuesta inmune alérgica es compatible con algunas versiones de la hipótesis de la higiene. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a la influencia beneficiosa de BPZE1 atenuada sobre una patología originada por un alérgeno, pueden ser múltiples y estar relacionados entre sí. Estudios anteriores han demostrado un aumento significativo de la IgE total en suero como un resultado de la sensibilización frente a OVA en modelos animales (Holgate et al. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(3):459-465; Hamelmann et al. *Allergy* 1999; 54(4):297-305). En esta memoria, las respuestas de IgE específicas del alérgeno, inducidas por una sensibilización respiratoria, se redujeron significativamente en los ratones que recibieron *B. pertussis* atenuada en comparación con *B. pertussis* virulenta. Esto es compatible con la regulación de respuestas inmunes sistémicas frente a OVA inducidas por BPZE1 atenuada, reduciendo IL-5 e IL-13, incrementando IFN- γ , una respuesta que se asocia con una reducción de IgE (Lack et al. *J Immunol* 1994; 152(5):2546-54). Sin embargo la inflamación alérgica de las vías respiratorias no es simplemente un equilibrio entre las respuestas de tipo Th1 y Th2. Hansen *et al.* han mostrado que la modulación de las respuestas de tipo Th CD4⁺ en las vías respiratorias no reduce necesariamente la patología de las vías respiratorias (Hansen et al. *J Clin Invest* 1999; 103(2):175-183). Puede ser que la característica clave beneficiosa de BPZE1 sea la combinación de una respuesta de tipo Th1 sesgada, combinada con la ausencia de patología inducida de las vías respiratorias. Esto es consistente con informes previos en los que el agravamiento de una patología de las vías aéreas frente a un alérgeno se asociaba con el cebado con un alérgeno durante un período de lesión o de remodelación de las vías respiratorias (Marsland et al. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(8):1299-306; Gem. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(2 Pt 2):S497-502).

Este beneficio combinado hace que la vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* que carece de TCT, PTX y DNT sea un candidato atractivo como agente protector contra la atopía.

Referencias

A lo largo de toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* que carece de la citotoxina traqueal (TCT), la toxina pertussis (PTX) y la toxina dermonecrótica (DNT) para uso en la profilaxis o el tratamiento de una patología de las vías respiratorias originada por un alérgeno.
- 5 2. Una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* según la reivindicación 1 para el uso definido en la reivindicación 1, en donde la patología de las vías respiratorias originada por un alérgeno se selecciona a partir del grupo que consiste en asma alérgica, fiebre del heno y enfermedades pulmonares intersticiales.
3. Una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* según la reivindicación 1 o 2 para el uso definido en dichas reivindicaciones, en donde el sujeto es un recién nacido o un infante.
- 10 4. Una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso definido en dichas reivindicaciones, en donde la vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* es la cepa de *Bordetella pertussis* depositada con el número de orden CNCM I-3585.
5. Una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso definido en dichas reivindicaciones, en donde la vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* es portadora de un antígeno heterólogo.
- 15 6. Una vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para el uso definido en dichas reivindicaciones, en donde la vacuna viva atenuada contra *Bordetella pertussis* se administra mediante administración nasal o mediante inhalación.

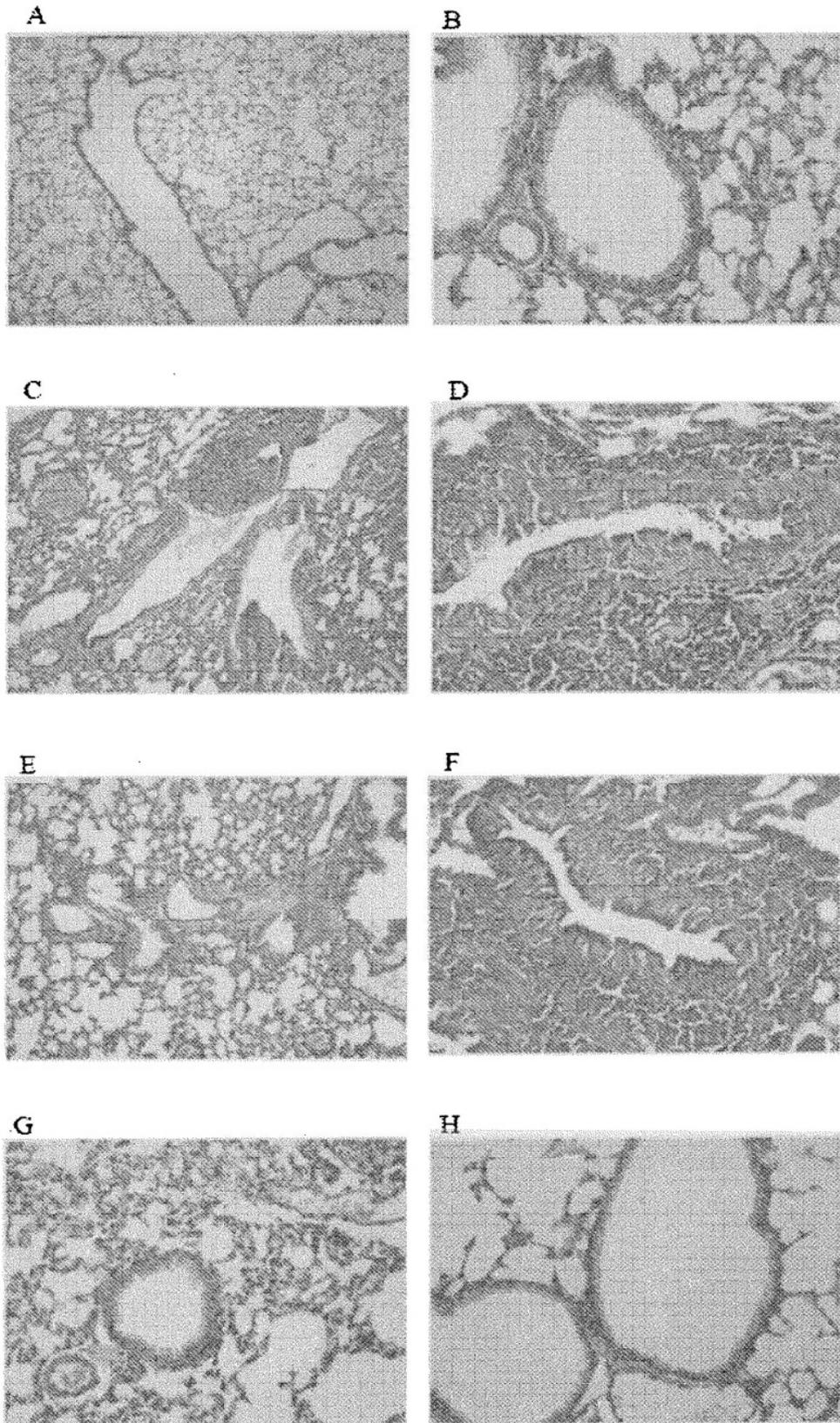


Figura 1

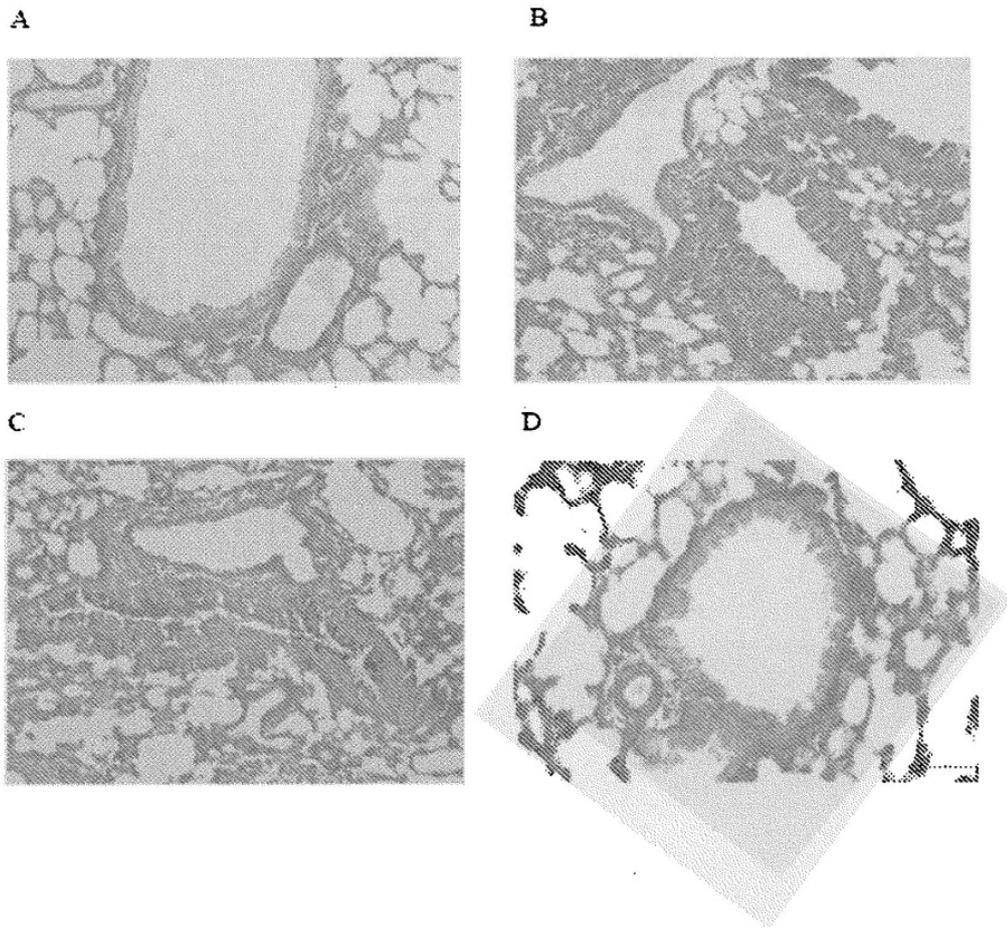


Figura 2

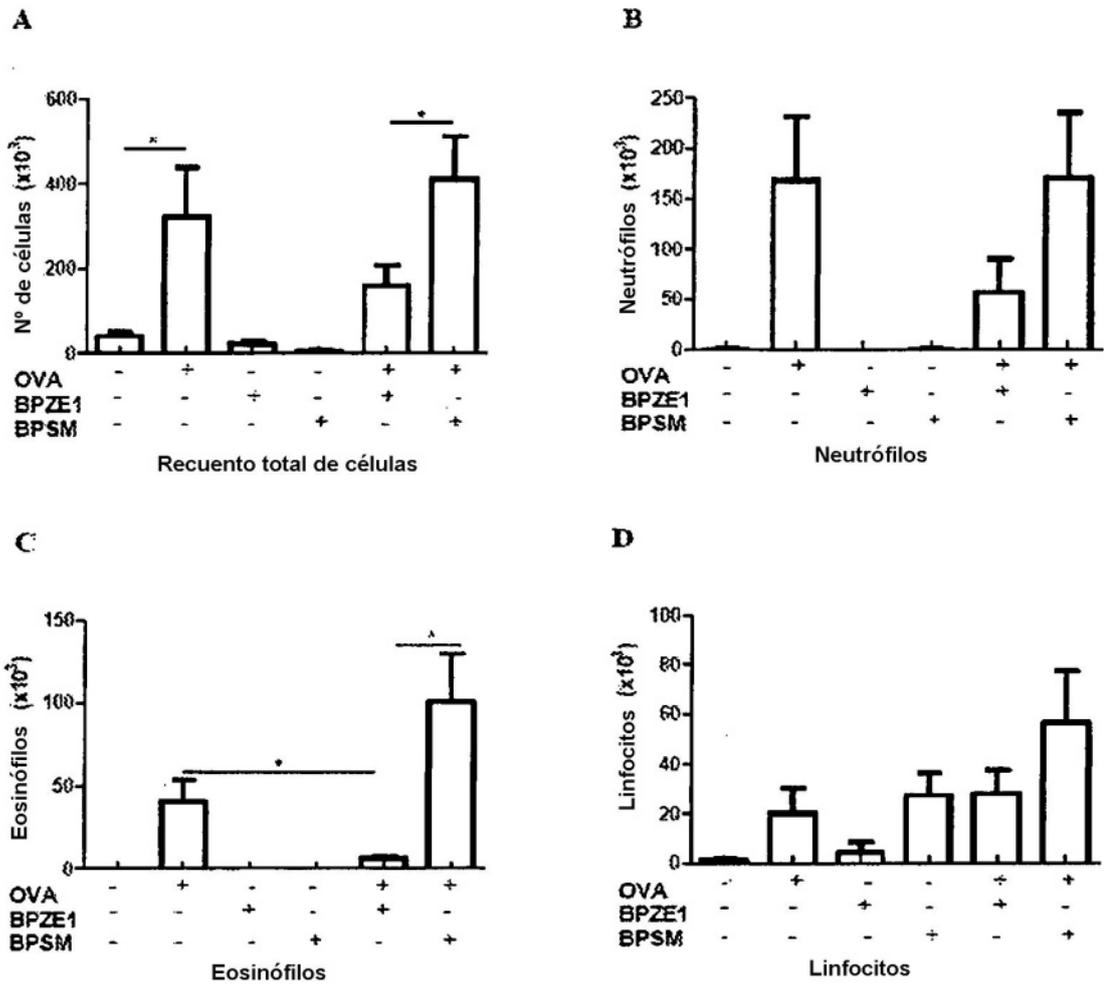


Figura 3

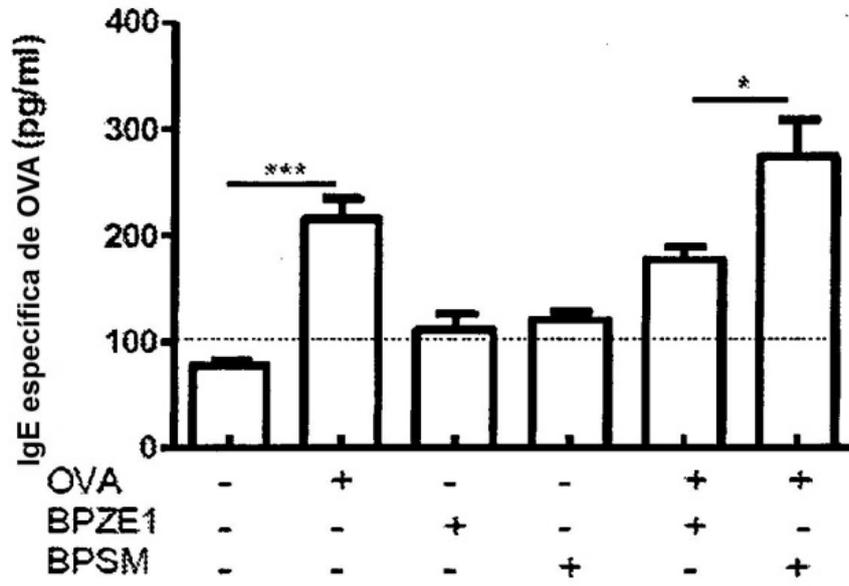


Figura 4

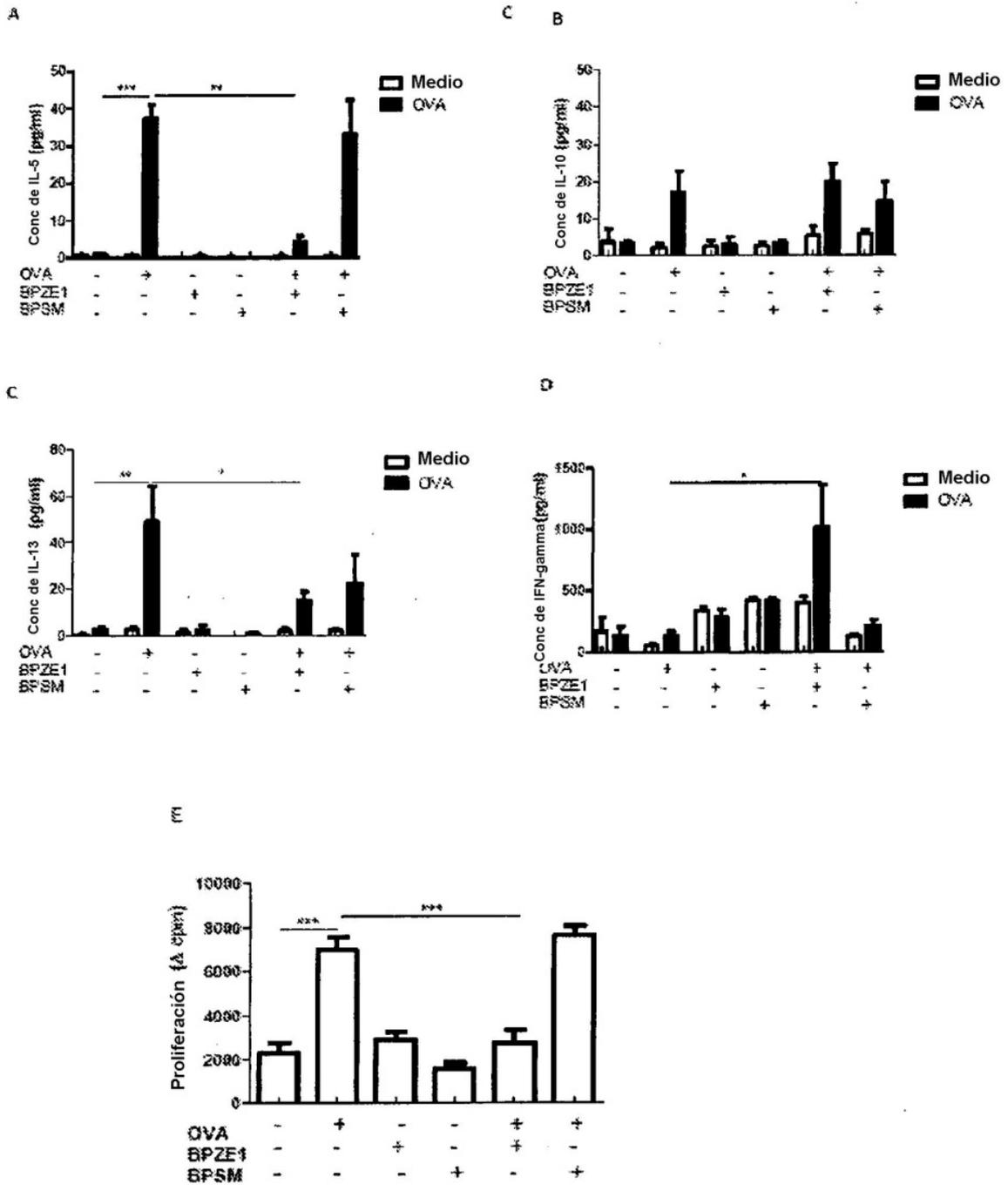


Figura 5