

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 094**

51 Int. Cl.:

C12N 1/36 (2006.01)

A61K 39/10 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2007 PCT/EP2007/001942**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2007 WO07104451**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2007 E 07711815 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 1994139**

54 Título: **Cepas de Bordetella vivas, atenuadas, como vacuna de dosis única contra la tos ferina**

30 Prioridad:

10.03.2006 US 780827 P
30.06.2006 US 817430 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2016

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR DE LILLE (50.0%)
1, rue du Professeur Calmette BP 245
59019 Lille Cédex, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (50.0%)

72 Inventor/es:

LOCHT, CAMILLE;
MIELCAREK, NATHALIE;
DEBRIE, ANNE-SOPHIE;
RAZE, DOMINIQUE y
BERTOUT, JULIE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 595 094 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

Cepas de *Bordetella* vivas, atenuadas, como vacuna de dosis única contra la tos ferina

5 Campo de la invención

La solicitud describe una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo. La invención se refiere a una cepa de *Bordetella* mutada, más particularmente a una cepa de *Bordetella* atenuada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo según se define en las reivindicaciones. La cepa de *Bordetella mutada, atenuada*, se puede utilizar en una composición inmunógena o una vacuna para el tratamiento o la prevención de una infección por *Bordetella*. En la solicitud se describen el uso de la cepa de *Bordetella* atenuada para la fabricación de una vacuna o composiciones inmunógenas, así como a métodos para proteger a los mamíferos contra la infección por *Bordetella*. La invención se refiere a composiciones inmunógenas y vacunas, así como a los usos de una cepa de la invención en la fabricación de vacunas.

Antecedentes de la invención y estado de la técnica relacionado

La tos ferina sigue estando entre las principales causas de muerte en todo el mundo, y su incidencia está aumentando incluso en países con alta cobertura de vacuna. Aunque todas las edades son susceptibles, es más grave en los niños demasiado pequeños para ser protegidos por las vacunas disponibles en la actualidad.

La tos ferina o *pertussis* es una enfermedad infantil grave responsable de altas tasas de mortalidad antes de la introducción de vacunas eficaces en la segunda mitad del siglo XX. El éxito de estas vacunas ha llevado a la opinión de que la enfermedad está esencialmente bajo control, aunque todavía se registran anualmente en todo el mundo 200 000 a 400 000 muertes vinculadas a la tos ferina, y la enfermedad todavía ocupa el sexto lugar entre las causas de mortalidad debido a agentes infecciosos [1]. Aunque sobre todo es frecuente en los países en desarrollo, la enfermedad también está resurgiendo en el mundo desarrollado [2, 3], incluso en Estados Unidos, donde la incidencia ha aumentado cinco veces en los últimos veinte años [4]. Inesperadamente, la epidemiología de la tos ferina ha cambiado en países con alta cobertura de vacuna, donde los casos de tos ferina de adolescentes y adultos son cada vez más frecuentes [5]. Esto se debe probablemente a la progresiva disminución de la inmunidad inducida por la vacuna durante la adolescencia. La tos ferina a menudo atípica y por lo tanto difícil de diagnosticar, no es generalmente mortal en adultos y en muchos casos pasa desapercibida. Sin embargo, los adultos infectados constituyen un importante reservorio para la transmisión de la enfermedad a niños muy pequeños, demasiado pequeños para ser vacunados completamente, y por lo tanto que corren riesgo de sufrir la enfermedad grave asociada a altas tasas de mortalidad.

La vacuna contra la tos ferina comienza generalmente a los dos meses de edad y la protección total requiere al menos tres vacunas a intervalos de uno a dos meses. Por lo tanto, los recién nacidos no quedan totalmente protegidos antes de los 6 meses de edad con las vacunas disponibles en la actualidad. Para reducir la incidencia de tos ferina en los grupos etarios muy jóvenes y más vulnerables, sería muy deseable la inmunización temprana, posiblemente al nacer. Sin embargo, numerosos estudios en humanos y en modelos animales han sugerido que el sistema inmunitario neonatal es demasiado inmaduro para inducir eficazmente inmunidad protectora mediante una vacuna [6, 7]. Especialmente la producción de IFN- γ , indicativa de una respuesta Th1 que es esencial para el desarrollo de la inmunidad protectora a la tos ferina [8], parece reducirse significativamente en humanos recién nacidos, en comparación con niños mayores o con los adultos [9]. Esto también se refleja en el hecho de que sólo se producen cantidades importantes de IFN- γ en respuesta a antígenos específicos después de varios meses (≥ 6 meses) en los niños vacunados con vacunas contra la tos ferina, especialmente con las vacunas acelulares (aPV) [10].

Se ha considerado durante mucho tiempo que la infección natural con *Bordetella pertussis* induce una inmunidad fuerte y duradera, que disminuye mucho después que la inmunidad inducida por la vacuna [5, 11]. Además, la infección con *B. pertussis* induce una respuesta inmunitaria medible tipo Th1 específica para el antígeno, incluso en niños muy pequeños (de tan sólo un mes de edad) [12]. Estas observaciones sugieren que las vacunas de microorganismos vivos aplicables por vía nasal para imitar tanto como sea posible la infección natural, pueden ser alternativas atractivas respecto a las vacunas disponibles en la actualidad.

Se conocen muchas composiciones de vacunación para tratar infecciones por *Bordetella* en el área. Sin embargo, estas composiciones inmunógenas no se utilizan para el tratamiento de los niños recién nacidos o en los casos en que se requiere una inmunidad epidémica y protectora rápida.

Por lo tanto, la patente francesa FR 0206666 y la solicitud PCT WO 03/102170 dan a conocer cepas de *Bordetella* vivas que se han tornado deficientes en al menos dos toxinas entre PTX, DNT, AC y TCT. Esta patente da a conocer la sobreexpresión de un gen *ampG* endógeno mediante la adición de un promotor fuerte y la adición de 11

aminoácidos terminales del gen *ampG* de *E. coli*.

5 Mielcarek et al., *Vaccine* (2006; 24S2: S2/54-S2-55) dan a conocer una cepa de *Bordetella pertussis* atenuada de PTX, DTN y TCT para utilizar en la inmunización de ratones. Esta referencia da a conocer que para reducir la producción de citotoxina traqueal, se debe sobreexpresar el gen *ampG*. Sin embargo, con la evaluación posterior, los autores se dieron cuenta de que mediante la sobreexpresión del gen *ampG* hay un aumento en la citotoxina traqueal y no una disminución como se pensó originalmente.

10 Mielcarek et al in *Advance Drug Delivery Review* 51 (2001) págs. 55-69 dan a conocer que las vacunas de microorganismos vivos pueden inducir respuestas sistémicas y en las mucosas cuando se administran por vía oral o nasal.

15 Roduit et al en *Infection and Immunity* (2002 Jul; 70(7): 3521-8) describen la vacunación de neonatos y lactantes con cepas de *Bordetella* mutadas con una composición de DTP.

Mattoo et al., en *Frontiers of Bioscience* 6, e168-e186 (2001), sugieren reemplazar el gen *ampG* endógeno de *Bordetella* con el gen *ampG* de *E. coli*, lo que resulta en una disminución de la cantidad de TCT producida.

20 Mattoo y Cherry 2005 (*Clinical Microbiology Reviews* 18(2): 326-382) se refieren a la patogenia molecular, la epidemiología y las manifestaciones clínicas de las infecciones respiratorias por *Bordetella pertussis* y otras subespecies de *Bordetella*.

25 Por lo tanto, el estado anterior de la técnica aunque da a conocer varios tipos de composiciones de vacunación no aborda el problema de proporcionar una vacuna o una composición inmunógena que pueda proporcionar protección a un recién nacido antes de los seis meses. Además, el estado anterior de la técnica no da a conocer un sistema inmunógeno o una vacuna que proporcione rápida inmunidad protectora contra una infección por *Bordetella*. El estado anterior de la técnica también falla en dar a conocer una composición inmunógena o una vacuna que proporcione rápida inmunidad protectora contra una infección por *Bordetella*, donde dicha inmunidad protectora aumente durante al menos los dos meses siguientes a la vacunación.

30 Por lo tanto, un objetivo de la invención es superar las deficiencias del estado anterior de la técnica.

35 Otro objetivo de la invención es producir una posible vacuna de microorganismo vivo atenuado o una composición inmunógena, a través de la atenuación genética de una cepa de *Bordetella* como *B. pertussis* o *B. parapertussis* a fin de disminuir la patogenicidad, manteniendo la capacidad de colonizar e inducir inmunidad protectora.

Otro objetivo de la invención es producir una vacuna o una composición inmunógena que induzca protección en los recién nacidos después de una sola administración intranasal que sea superior a la protección proporcionada por la aPV actual.

40 Aún otro objetivo de la invención es proporcionar protección contra la infección por *Bordetella parapertussis* así como por *Bordetella pertussis* que no se observó después de la vacunación con aPV.

45 Otro objetivo de la invención es inducir inmunidad protectora fuerte en recién nacidos contra la infección por *Bordetella*.

Todavía otro objetivo de la invención es proporcionar una vacuna o una composición inmunógena que induzca inmunidad en las mucosas y sistémica.

50 Otro objetivo de la invención es producir una cepa de *Bordetella pertussis* viva, atenuada, como una vacuna nasal monodosis en los primeros años de vida, denominada BPZE1.

55 Aún otro objetivo de la invención es proporcionar una vacuna que no sólo pueda ser utilizada para vacunar a los recién nacidos, sino que pueda ser utilizada en todos los mamíferos de cualquier edad en el caso de una epidemia de tos ferina.

Otro objetivo de la invención es proporcionar una vacuna contra la infección por *Bordetella* que induzca una rápida inmunidad protectora y/o una inmunidad protectora que aumente durante al menos los dos meses siguientes a la vacunación.

60 Todavía otro objetivo de la invención es proporcionar prevención o tratamiento contra la infección por *Bordetella* que tenga costos de producción relativamente bajos.

Estos y otros objetivos se logran mediante la invención como lo demuestran el resumen de la invención, la

descripción de las realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

Resumen de la invención

5 Las reivindicaciones definen la materia para la cual se busca protección, cualquier afirmación que vaya más allá de lo que se define en las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos.

10 La invención proporciona una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen de toxina *pertussis* (*ptx*) mutado, un gen de toxina dermonecrótica (*dnt*) eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo según se define en las reivindicaciones.

15 En otro aspecto la invención se refiere a una composición inmunógena que comprende una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen de toxina *pertussis* (*ptx*) mutado, un gen de toxina *pertussis* dermonecrótica (*dnt*) eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo según se define en las reivindicaciones.

Aún en otro aspecto la invención proporciona una vacuna que comprende la cepa de *Bordetella* atenuada que comprende al menos un gen de toxina *pertussis* (*ptx*) mutado, un gen de toxina *pertussis* dermonecrótica (*dnt*) eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo según se define en las reivindicaciones.

20 Aún en otro aspecto, la invención proporciona el uso de una cepa de *Bordetella* atenuada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo según se define en las reivindicaciones, para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de una infección por *Bordetella*.

25 Todavía en otro aspecto, la invención proporciona el uso de una cepa de *Bordetella* atenuada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo según se define en las reivindicaciones, para la fabricación de una vacuna destinada a inducir una respuesta inmunitaria dirigida preferentemente a la vía Th1 contra dicha *Bordetella* atenuada.

30 La solicitud también proporciona un método de protección de un mamífero contra la enfermedad causada por la infección por *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* que comprende administrar a dicho mamífero que necesita dicho tratamiento una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo.

35 También es parte de la solicitud un método para proporcionar una rápida inmunidad protectora contra una infección por *Bordetella* que comprende administrar a dicho mamífero que necesita dicho tratamiento una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo.

40 También es otro aspecto de la solicitud un método para proporcionar una rápida inmunidad protectora contra una infección por *Bordetella* que comprende administrar a un mamífero que necesita dicho tratamiento una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo, o una vacuna que comprende dicha cepa de *Bordetella* mutada, donde dicho método proporciona además un aumento en dicha inmunidad protectora durante al menos dos meses después de la vacunación.

45 Aún es otro aspecto de la invención el uso de la cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo según se define en las reivindicaciones, para la preparación de una vacuna polivalente (es decir, una vacuna para prevenir o tratar las infecciones causadas por diferentes patógenos) destinada al tratamiento de las enfermedades respiratorias.

50 También es parte de la solicitud, el uso de una cepa de *Bordetella* atenuada de la invención, mediante administración a los mamíferos que necesitan una rápida inmunidad protectora contra una infección por *Bordetella*, donde dicha inmunidad protectora aumenta durante al menos dos meses después de la administración.

55 Todavía es otro aspecto de la solicitud, un método para proporcionar una respuesta en las mucosas y una respuesta sistémica para tratar infecciones por *Bordetella* en mamíferos o proteger contra ellas.

60 La invención se refiere a una cepa de *Bordetella* mutada como se define en las reivindicaciones, así como a una composición inmunógena que comprende una cepa de *Bordetella* mutada de la invención, a una vacuna de una cepa de *Bordetella* atenuada de la invención, a una cepa de *Bordetella* mutada de la invención para utilizar como vector para expresar al menos un antígeno heterólogo, al uso de una cepa de *Bordetella* atenuada de la invención para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de una infección por *Bordetella*, al uso de una cepa de *Bordetella* atenuada de la invención para la fabricación de una vacuna para la prevención simultánea de una infección por *B. pertussis* y *B. parapertussis* y al uso de una cepa de *Bordetella* mutada de la invención para la preparación de una vacuna polivalente destinada al tratamiento de enfermedades respiratorias.

Breve descripción de las figuras

- 5 Fig. 1 es un gráfico de barras que ilustra la TCT presente en los sobrenadantes de cultivos de BPSM y BPZE1 expresada como las medias de nM/DO_{540nm} (\pm error estándar) de 3 cultivos separados para cada cepa.
- Fig. 2 es un análisis de inmunotransferencia enzimática de la producción de PTX en los sobrenadantes del cultivo de BPSM (carril 1) y BPZE1 (carril 2). Los tamaños de los marcadores Mr se expresan en kDa y se indican en el margen izquierdo.
- 10 Fig. 3 es un análisis de transferencia de Southern del locus *dnt* en BPSM (carril 1) y BPZE1 (carril 2). Las longitudes de los marcadores de tamaño se indican en pares de bases (bp) y se muestran en el margen izquierdo.
- Fig. 4 es un gráfico que ilustra el ritmo de crecimiento de BPSM (línea negra) y BPZE1 (línea punteada) en cultivo líquido.
- 15 Fig. 5 son micrografías electrónicas representativas de BPSM (izquierda) y BPZE1 (derecha) cultivados en medio líquido durante 24 h.
- Fig. 6 es un gráfico que ilustra la adherencia *in vitro* de BPSM (columnas negras) y BPZE1 (columnas blancas) a células epiteliales pulmonares humanas A549 (izquierda) y a células múridas tipo macrófagos J774 (derecha). Los resultados se expresan como las medias de los porcentajes de bacterias que se unen en relación con las bacterias presentes en el inóculo de tres experimentos diferentes.
- 20 Fig. 7 es un gráfico que ilustra la colonización pulmonar por BPSM (líneas negras) y BPZE1 (líneas punteadas) de ratones adultos infectados por vía intranasal con 10⁶ ufc de BPZE1 o BPSM. Los resultados se expresan como la media (\pm error estándar) de unidades formadoras de colonias de tres a cuatro ratones por grupo y son representativos de dos experimentos independientes.* , P = 0.004.
- 25 Fig. 8 son fotografías de un análisis histológico de los pulmones de ratones adultos infectados con BPZE1 (panel superior) o BPSM (panel central) en comparación con los controles que recibieron PBS (panel inferior). Una semana después de la infección, los pulmones se extrajeron asépticamente y se fijaron en formaldehído. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron por microscopía de luz.
- 30 Fig. 9 son gráficos que ilustran la protección contra *B. pertussis* en ratones adultos (a) y ratones recién nacidos (b) o *B. parapertussis* en ratones recién nacidos (d). Los ratones inmunizados con BPZE1, aPV o PBS (sin exposición) fueron provocados con BPSM (a y b) o *B. parapertussis* (d), y se determinaron los recuentos de UFC pulmonares 3 h (barras blancas) o 7 días (barras negras) más tarde. Los resultados se expresan como la media (\pm error estándar) de unidades formadoras de colonias de 3-4 ratones por grupo y son representativos de dos experimentos independientes. (b,*, P = 0.009; d,*, P = 0.007) (c) recuentos de UFC 3 h después de la provocación con BPSM en ratones adultos vacunados con BPZE1 o aPV, en comparación con los controles. Los resultados de 3 experimentos independientes se expresan como porcentajes de UFC de cada ratón en relación con la media de UFC en el grupo de no vacunados del mismo experimento.
- 35 Fig. 10 son gráficos de barras que ilustran las respuestas inmunitarias inducidas por inmunización con BPZE1 o aPV. (a) títulos de IgG(H+L) anti-FHA y (b) cocientes IgG1/IgG2a antes (barras blancas) o 1 semana después de la provocación con BPSM (barras negras) en ratones inmunizados con BPZE1 o aPV, en comparación con los controles. (c) cocientes entre IFN- γ e IL-5 producidos por esplenocitos de ratones estimulados con FHA, PTX o ConA vacunados 2 meses antes con BPZE1 (barras negras) o aPV (barras blancas), en comparación con los controles (barras grises). Se midieron los anticuerpos y las citocinas en cada ratón, y los resultados se expresan como la media de los valores (\pm error estándar) para los 4 ratones por grupo analizados, por triplicado.
- 40 Fig. 11 es la secuencia de aminoácidos de la toxina *pertussis* (SEQ ID NO: 1) (proteína S1 activadora de islotes). Los primeros 34 aminoácidos son la secuencia señal, mientras que los aminoácidos 35 a 269 son la cadena madura.
- 45 Fig. 12 es la secuencia de aminoácidos de la toxina dermonecrótica (SEQ ID NO:2).
- 50 Fig. 13 es la secuencia de aminoácidos de AmpG de *Bordetella pertussis* (SEQ ID NO:3).
- Fig. 14 es la secuencia de aminoácidos de AmpG de *Escherichia coli* (SEQ ID NO:4).

Descripción de las realizaciones preferidas de la invención

- 55 Según se usa en este documento, la abreviatura "PTX" se refiere a la toxina *pertussis*, que sintetiza y segrega una toxina ADP-ribosilante. PTX está compuesta por seis polipéptidos S1 a S5, la porción enzimáticamente activa se denomina S1. PTX tiene una secuencia señal de 34 aminoácidos, mientras que la cadena madura consiste en los aminoácidos 35 a 269. PTX es el factor de virulencia principal expresado por *B. pertussis*. La porción A de estas toxinas tiene actividad de ADP-ribosiltransferasa y la porción B hace de mediadora de la unión de la toxina a los receptores de las células huésped y la traslocación de A a su sitio de acción (57).
- 60

Según se usa en este documento la abreviatura "DNT" se refiere a la toxina *pertussis* dermonecrótica, que es una toxina termolábil que induce lesiones localizadas en ratones y otros animales de laboratorio cuando se inyecta por

vía intradérmica. Es mortal para los ratones cuando se inyecta en dosis bajas por vía intravenosa (58 a 61). DNT se considera un factor de virulencia para la producción de atrofia del cornete nasal en la rinitis atrófica porcina (62, 63).

5 Según se usa en este documento la abreviatura "TCT" se refiere a la citotoxina traqueal, que es un factor de virulencia sintetizado por *Bordetella*. TCT es un fragmento de peptidoglicano y tiene la capacidad de inducir la producción de interleucina-1 y óxido nítrico sintasa. Tiene la capacidad de causar estasis ciliar y tiene efectos mortales en las células epiteliales respiratorias.

10 El término "mamífero" abarca cualquiera de los diversos animales vertebrados de sangre caliente de la clase Mammalia, incluidos los seres humanos, caracterizados por una cubierta de pelo sobre la piel y en las hembras, glándulas mamarias productoras de leche para alimentar a las crías.

15 El término "atenuada" significa una cepa de *Bordetella* debilitada, menos virulenta que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria y crear inmunidad protectora, pero no causa ninguna enfermedad.

20 La terminología "rápida inmunidad protectora" significa que la inmunidad contra la *Bordetella* es conferida en un plazo corto después de la administración de la cepa de *Bordetella* mutada de la invención. Por "plazo corto" se quiere dar a entender vacunados y provocados una semana más tarde. Más específicamente, hay una rápida expansión de los linfocitos periféricos específicos para los patógenos, CD8⁺ efectores citotóxicos (CTL) y linfocitos cooperadores CD4⁺. Los linfocitos cooperadores CD4⁺ inducen la maduración de los linfocitos B y la producción de anticuerpos. Por lo tanto, los linfocitos con el acúmulo de memoria están a punto de proliferar rápidamente en el momento de la infección subsiguiente.

25 La expresión "cepa de *Bordetella*" abarca cepas de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*.

La expresión "Infección por *Bordetella*" significa una infección causada por al menos una de las tres cepas siguientes: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*.

30 Por "niño" se entiende una persona o un mamífero entre 6 meses y 12 años de edad.

Mediante la expresión "recién nacido" se entiende, una persona o un mamífero entre 1 día de edad y 24 semanas de edad.

35 El término "tratamiento" según se usa en este documento no se restringe a curar una enfermedad y eliminar sus causas sino particularmente significa curar, mitigar, eliminar o disminuir los síntomas asociados a la enfermedad de interés, o prevenir o reducir la posibilidad de contraer cualquier trastorno o cualquier disfunción del organismo del huésped.

40 Los términos "protección" y "prevención" se utilizan aquí indistintamente y significan que una infección por *Bordetella* es impedida.

"Vacuna profiláctica" significa que esta vacuna previene la infección por *Bordetella* en una futura exposición.

45 Por "preferencialmente hacia la vía Th1" significa que la vía Th1 es favorecida respecto a la vía Th2.

50 La expresión "composición inmunógena" significa que la composición puede inducir una respuesta inmunitaria y por lo tanto es antigénica. Por "respuesta inmunitaria" se quiere dar a entender cualquier reacción del sistema inmunitario. Estas reacciones incluyen la alteración en la actividad del sistema inmunitario de un organismo en respuesta a un antígeno y pueden implicar, por ejemplo, la producción de anticuerpos, la inducción de inmunidad mediada por células, la activación del complemento o el desarrollo de tolerancia inmunológica.

55 Más específicamente, la invención proporciona una cepa de *Bordetella* al menos triplemente mutada que puede ser utilizada como una composición inmunógena o una vacuna. Se apreciará que la cepa de *Bordetella* al menos triplemente mutada contiene un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo. El producto del gen *ampG* heterólogo reduce en gran medida la cantidad de citotoxina traqueal que se produce.

60 La invención no se limita sólo a los triplemente mutantes descritos antes. Se pueden llevar adelante otras mutaciones adicionales como mutantes deficientes en adenilato ciclasa (AC) (64), mutantes deficientes en lipopolisacárido (LPS) (65), hemaglutinina filamentosa (FHA) (66) y cualquiera de los componentes regulados por *bvg* (67).

La cepa de partida que se muta puede ser cualquier cepa de *Bordetella* como *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*. En un aspecto la cepa de partida utilizada para obtener la cepa de

Bordetella mutada es *B. pertussis*.

La construcción de la cepa de *Bordetella* mutada comienza con el remplazo del gen *ampG* de *Bordetella* en la cepa con un gen *ampG* heterólogo. Se puede usar cualquier gen *ampG* heterólogo en la invención. Estos incluyen todas las bacterias gramnegativas que liberan muy pequeñas cantidades de fragmentos de peptidoglicano en el medio por generación. Los ejemplos de bacterias gramnegativas incluyen, pero no exclusivamente, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Legionella* y similares.

Al reemplazar el gen *ampG* de *Bordetella* con un gen *ampG* heterólogo, la cantidad de citotoxina traqueal (TCT) producida en la cepa resultante expresa menos del 1% de actividad de TCT residual. En otra realización, la cantidad de toxina TCT expresada por la cepa resultante está entre 0.6% y 1% de actividad de TCT residual o entre 0.4% y 3% de actividad de TCT residual o entre 0.3% y 5% de actividad de TCT residual.

PTX es un factor de virulencia importante responsable de los efectos sistémicos de las infecciones por *B. pertussis*, así como uno de los principales antígenos protectores. Debido a sus propiedades, el gen *ptx* natural es reemplazado por una versión mutada de modo que la porción enzimáticamente activa S1 codifica una toxina enzimáticamente inactiva, pero las propiedades inmunógenas de la toxina *pertussis* no son afectadas. Esto se puede lograr reemplazando la arginina (Arg) de la posición 9 de la secuencia con una lisina (Lys). Además, se reemplaza un ácido glutámico (Glu) de la posición 129 con una glicina (Gly).

Se pueden llevar a cabo otras mutaciones como las descritas en la patente de Estados Unidos 6,713,072, así como cualquier mutación conocida u otras capaces de reducir la actividad de la toxina a niveles indetectables. Se usa primero intercambio alélico para eliminar el operón *ptx* y luego insertar la versión mutada.

Finalmente, el gen *dnt* es eliminado de la cepa de *Bordetella* mediante intercambio alélico. Además de la eliminación total, la actividad enzimática también puede ser inhibida por una mutación puntual. Dado que DNT está constituida por un dominio de unión a receptores en la región N-terminal y un dominio catalítico en la parte C-terminal, una mutación puntual en el gen *dnt* para reemplazar Cys-1305 con Ala-1305 inhibe la actividad enzimática de DNT (68). DNT ha sido identificada como una toxina importante de *Bordetella bronchiseptica* y muestra una actividad letal luego de la inyección de cantidades diminutas (26).

Además del intercambio alélico para insertar el gen *ptx* mutado y el gen *dnt* inhibido o eliminado, el marco de lectura abierto de un gen puede ser interrumpido por inserción de una secuencia genética o un plásmido. Este método también está contemplado en la invención.

La cepa triplemente mutada de la invención se denomina una cepa BPZE1 y fue depositada en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM) en París, Francia el 9 de marzo de 2006 con el número CNCM I-3585. Las mutaciones introducidas en BPZE1 resultan en la atenuación drástica, pero permiten a las bacterias colonizar y persistir. Por lo tanto, en otra realización la invención proporciona BPZE1, que puede inducir inmunidad en las mucosas e inmunidad sistémica al ser administrada. En otro aspecto, BPZE1 se administra por vía intranasal.

Las cepas mutadas de *Bordetella* de la invención pueden ser utilizadas en composiciones inmunógenas. Dichas composiciones inmunógenas son útiles para aumentar una respuesta inmunitaria, ya sea una respuesta de anticuerpos y/o preferentemente una respuesta de linfocitos T, en los mamíferos. Ventajosamente, la respuesta de los linfocitos T es tal, que protege a un mamífero contra la infección por *Bordetella* o contra sus consecuencias.

Las cepas de *Bordetella* mutadas de la invención se pueden utilizar en las vacunas o composiciones inmunógenas como cepas vivas o cepas muertas eliminadas química o térmicamente. En un aspecto, se utilizan las cepas vivas para la administración nasal, mientras que las cepas muertas eliminadas química o térmicamente se pueden utilizar para la administración sistémica o en las mucosas.

La composición inmunógena puede contener además un excipiente, portador y/o vehículo farmacéuticamente adecuado, cuando se utiliza para la administración sistémica o local. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no exclusivamente, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua destilada, emulsiones tales como emulsiones de un aceite en agua, diversos tipos de soluciones estériles de humectantes y similares.

La composición inmunógena de la invención también puede contener adyuvantes, es decir, cualquier sustancia o compuesto capaz de promover o aumentar una respuesta mediada por linfocitos T y particularmente una respuesta inmunitaria mediada por CD4⁺ o CD8⁺ contra el principio activo de la invención. Se pueden utilizar adyuvantes como péptidos muramílicos por ejemplo MDP, IL-12, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre o Montanide®, en las composiciones inmunógenas de la invención.

Un experto en el área apreciará que se utilizan adyuvantes y emulsiones en las composiciones inmunógenas cuando se utilizan en las vacunas o composiciones inmunógenas cepas de *Bordetella* mutadas tratadas química o

térmicamente.

Las composiciones inmunógenas de la invención contienen además al menos una molécula con un efecto profiláctico contra una infección por *Bordetella* o los efectos perjudiciales de la infección por *Bordetella*, como un ácido nucleico, una proteína, un polipéptido, un vector o un fármaco.

La composición inmunógena de la invención se utiliza para provocar una respuesta inmunitaria de los linfocitos T en un huésped al cual se administra la composición. Todas las composiciones inmunógenas descritas antes se pueden inyectar en un huésped a través de diferentes vías: inyección subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.), administración oral y administración intranasal o inhalación.

Cuando se formula para inyección subcutánea, la composición inmunógena o vacuna de la invención, comprende preferentemente entre 10 y 100 µg de la cepa de *Bordetella* por dosis de inyección, más preferentemente de 20 a 60 µg/dosis, especialmente alrededor de 50 µg/dosis, en una única inyección.

Cuando se formula para la administración intranasal, la cepa de *Bordetella* se administra en una dosis de aproximadamente 1×10^3 a 1×10^6 bacterias, dependiendo del peso y la edad del mamífero que la recibe. En otro aspecto, se puede utilizar una dosis de 1×10^4 a 5×10^6 .

Las cepas de *Bordetella* mutadas de la invención se pueden utilizar como una vacuna atenuada para proteger contra futuras infecciones por *Bordetella*. En este sentido, una ventaja de la invención es que se puede administrar una única dosis a los mamíferos y la protección puede persistir durante al menos más de dos meses, particularmente más de seis meses. La vacuna de la invención puede ser administrada a los recién nacidos y protege contra la infección de tos ferina. Esto es especialmente importante ya que la tasa de mortalidad de las infecciones por *Bordetella pertussis* es de alrededor de 1.3% para recién nacidos menores de 1 mes.

Por otra parte, las vacunas de la invención se pueden utilizar en mamíferos adultos cuando hay una epidemia o en adultos mayores mayores de 60 años, puesto que el riesgo de complicaciones puede ser más alto que el de los niños mayores o los adultos sanos.

Las vacunas se pueden formular con los excipientes fisiológicos indicados antes de la misma manera que en las composiciones inmunógenas. Por ejemplo, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no exclusivamente, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua destilada, emulsiones tales como emulsiones de un aceite en agua, diversos tipos de soluciones estériles de humectantes y similares. Se pueden utilizar adyuvantes como péptidos muramílicos por ejemplo MDP, IL-12, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre y/o Montanide®, en las vacunas.

Las vacunas de la invención son capaces de inducir altos títulos de IgG sérica contra FHA. El análisis de los patrones de citocinas específicas de los antígenos reveló que la administración de las cepas de *Bordetella* mutadas, atenuadas, de la invención favoreció una respuesta TH1 fuerte.

Las vacunas de la invención proporcionan un alto nivel de protección contra una infección por *Bordetella*, es decir, un nivel de protección superior al 90%, particularmente superior al 95%, más particularmente superior al 99% (calculado 7 días después de la infección como se detalla en el ejemplo 9). El nivel de protección de la vacuna que contiene la cepa BPZE1 alcanza más del 99.999% en comparación con ratones no vacunados (sin exposición), al menos dos meses después de la vacunación.

Las vacunas se pueden administrar por inyección subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.), administración oral y administración intranasal o inhalación. La administración de la vacuna es generalmente en una única dosis. Alternativamente, la administración de la vacuna de la invención se hace una primera vez (vacunación inicial), seguida por al menos un refuerzo (administración subsiguiente), con la misma cepa, composición o vacuna, o con vacunas acelulares, o una combinación de ambas.

En un aspecto, se lleva a cabo la administración intranasal o inhalación de las vacunas, este tipo de administración tiene bajo costo y permite la colonización por las cepas atenuadas de la invención del aparato respiratorio: el aparato respiratorio superior (nariz y fosas nasales, senos paranasales y garganta o faringe) y/o las vías respiratorias (caja de voz o laringe, tráquea, bronquios y bronquiólos) y/o los pulmones (bronquiólos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares y alvéolos).

La administración intranasal se lleva a cabo con una composición inmunógena o una vacuna en forma de solución líquida, suspensión, emulsión, liposoma, una crema, un gel o similar como una composición multifásica. Las soluciones y suspensiones se administran como gotas. Las soluciones también se pueden administrar como una niebla fina desde un frasco de aerosol nasal o desde un inhalador nasal. Los geles se dispensan en jeringas pequeñas que contienen la dosis necesaria para una aplicación.

La inhalación se lleva a cabo con una composición inmunógena o una vacuna en forma de soluciones, suspensiones y polvos; estas formulaciones se administran a través de un aerosol o un inhalador de polvo seco. Los polvos compuestos se administran con insufladores o sopladores.

5 Aún otro aspecto de la invención es el uso de las cepas de *Bordetella* mutadas que comprenden al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo para la preparación de una vacuna polivalente destinada al tratamiento de enfermedades respiratorias. En este sentido, la cepa de *Bordetella mutada, atenuada*, descrita antes, se puede usar como una plataforma de expresión heteróloga para transportar antígenos heterólogos a la mucosa respiratoria. Por lo tanto, patógenos respiratorios tales como Neisseria, Pneumophila, Yersinia, Pseudomonas, micobacterias, el virus de la gripe y similares, pueden prevenir la infección utilizando BPZE1 como un portador.

15 También está comprendido por la invención el uso de las cepas vivas mutadas, atenuadas, de *Bordetella* descritas aquí, para la fabricación de una vacuna destinada al tratamiento o la prevención de la infección por *Bordetella*. En este sentido, la vacuna se puede usar para el tratamiento simultáneo o la prevención de una infección por *B. pertussis* y *B. parapertussis*.

20 También está comprendido por la invención el uso de la vacuna para proporcionar rápida inmunidad protectora en caso de una epidemia de tos ferina.

También está comprendido por la invención el uso de la vacuna para proporcionar una rápida inmunidad protectora, que aumente durante los al menos dos meses siguientes a la vacunación.

25 La vacuna o composición inmunógena también se proporcionan en un kit. El kit comprende la vacuna o composición inmunógena y un prospecto con las instrucciones para la inmunización.

30 La aplicación de un método para la inducción de respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T y particularmente una respuesta inmunitaria mediada por CD4⁺ -o una respuesta inmunitaria mediada por CD8⁺, que comprende administrar las cepas de *Bordetella* vivas atenuadas de la solicitud a un mamífero no humano o un mamífero humano.

35 Otra realización de la solicitud es un método para proteger a un mamífero contra una infección por *Bordetella* que comprende administrar a dicho mamífero que necesita dicho tratamiento una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo. Este método abarca tratar o prevenir infecciones por *Bordetella pertussis* y/o *Bordetella parapertussis*. En un aspecto, se usa la cepa BPZE1 en este método.

40 También está comprendido por la solicitud un método para proporcionar una rápida inmunidad protectora contra una infección por *Bordetella* que comprende administrar a dicho mamífero que necesita dicho tratamiento una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen heterólogo *ampG*. En un aspecto, se usa la cepa BPZE1 en este método.

45 Además, las cepas de *Bordetella* vivas mutadas, atenuadas, de la solicitud inducen inmunidad en las mucosas, así como inmunidad sistémica. Por lo tanto, en otro aspecto la solicitud también se refiere a un método para inducir inmunidad en las mucosas e inmunidad sistémica al administrar a un mamífero que necesita dicho tratamiento las cepas de *Bordetella* vivas mutadas atenuadas de la solicitud. En un aspecto se usa la cepa BPZE1 en este método.

50 Además de su papel en la prevención y/o el tratamiento de la infección por *Bordetella*, la cepa mutada de la invención se puede usar como un vector, para que porte al menos una secuencia adicional de ácido nucleico heterólogo que codifique un ARN (como el ARN antisentido) o una proteína de interés. Esto significa que la cepa mutada tiene al menos una secuencia adicional de ácido nucleico heterólogo además del gen *ampG* heterólogo. En un aspecto, la proteína codificada por esta al menos otra secuencia de ácido nucleico heterólogo es una proteína cuya expresión se desea en el aparato respiratorio. En otro aspecto, la proteína de interés es un antígeno, como un antígeno viral, bacteriano o tumoral, contra el cual se desea una respuesta inmunitaria. Por consiguiente, la cepa de *Bordetella* mutada que porta al menos otra secuencia de ácido nucleico heterólogo también se puede usar como una vacuna. Las definiciones brindadas antes para la administración de la vacuna o composición inmunógena también aplican a una vacuna que contiene una cepa de *Bordetella* mutada que porta al menos otra secuencia de ácido nucleico heterólogo. Los ejemplos de proteínas heterólogas son antígenos de patógenos que causan infecciones o enfermedades asociadas al aparato respiratorio: poliomielitis, gripe (virus de la gripe de la familia *Orthomyxoviridae*) o antígenos de neumococos (como *Streptococcus pneumoniae*).

60 La solicitud describe los aspectos siguientes:

1. Una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen de toxina *pertussis* (*ptx*) mutado, un gen (*dntf*) eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo.
2. La cepa de *Bordetella* mutada según el aspecto 1, que es una cepa de *Bordetella pertussis*.
3. La cepa de *Bordetella* mutada según el aspecto 1 o 2, en la que el gen *ampG* de *Bordetella* es reemplazado por un gen *ampG* de *E. coli*.
4. La cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de los aspectos 1 a 3, donde la cepa resultante expresa menos de 5% de actividad de TCT residual.
5. La cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de los aspectos 1 a 3, donde la cepa resultante expresa menos de 1% de actividad de TCT residual.
6. La cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de los aspectos 1 a 5, en la que la mutación del gen *ptx* consiste en la sustitución de un aminoácido implicado en la unión al sustrato y/o un aminoácido implicado en la catálisis.
7. La cepa de *Bordetella* mutada según el aspecto 6, que es una cepa de *Bordetella pertussis* en la que la sustitución del aminoácido implicado en la unión al sustrato es R9K y la sustitución del aminoácido implicado en la catálisis es E129G.
8. La cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de los aspectos 1 a 7 que es una cepa triplemente mutante.
9. La cepa de *Bordetella* triplemente mutada según el aspecto 8, que es una cepa BPZE1 depositada en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (C.N.C.M.) el 9 de marzo de 2006, con el número I-3585.
10. La cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de los aspectos 1 a 9 que es atenuada.
11. Una composición inmunógena que comprende una cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de los aspectos 1 a 10.
12. La composición inmunógena según el aspecto 11, que contiene además un excipiente, vehículo y/o portador farmacéuticamente adecuado.
13. La composición inmunógena según el aspecto 11 o 12, que contiene además un adyuvante.
14. La composición inmunógena según cualquiera de los aspectos 11 a 13, que comprende además una molécula con un efecto profiláctico contra una infección por *Bordetella* o los efectos perjudiciales de la infección por *Bordetella*.
15. La composición inmunógena según alguno de los aspectos 11 a 14, en la que dicha cepa de *Bordetella* mutada es BPZE1.
16. Una vacuna que comprende la cepa de *Bordetella* atenuada del aspecto 10.
17. Una vacuna según el aspecto 16, formulada para la administración intranasal.
18. Un kit que comprende una vacuna según el aspecto 16 o 17, y un prospecto.
19. La cepa de *Bordetella* atenuada según el aspecto 10 para usar como una vacuna contra las infecciones causadas por especies de *Bordetella*.
20. La cepa de *Bordetella* atenuada según el aspecto 19 para usar como una vacuna profiláctica contra las infecciones causadas por especies de *Bordetella*.
21. La cepa de *Bordetella* atenuada según el aspecto 19 o 20, donde la especie de *Bordetella* es *B. pertussis* o *B. parapertussis*.
22. La cepa de *Bordetella* atenuada del aspecto 10 o de cualquiera de los aspectos 19 a 21, donde dicha cepa de *Bordetella* mutada es BPZE1.
23. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según el aspecto 10 para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de una infección por *Bordetella*.
24. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según el aspecto 10 para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención simultánea de una infección por *B. pertussis* y *B. parapertussis*.
25. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según el aspecto 10, para la fabricación de una vacuna destinada a inducir una respuesta inmunitaria dirigida preferentemente hacia la vía Th1 contra dicha *Bordetella* atenuada.
26. El uso de una *Bordetella* atenuada según cualquiera de los aspectos 23 a 25, donde la vacuna se administra por vía subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), oral o intranasal, por inyección o por inhalación.
27. El uso de una *Bordetella* atenuada según cualquiera de los aspectos 23 a 25, donde la vacuna se administra por vía intranasal.
28. El uso de una *Bordetella* atenuada según cualquiera de los aspectos 23 a 25, donde la vacuna se administra a mamíferos que necesitan una rápida inmunidad protectora contra una infección por *Bordetella*.
29. El uso de una *Bordetella* atenuada según el aspecto 28, donde la vacuna se administra a recién nacidos.
30. El uso de una *Bordetella* atenuada según el aspecto 28, donde la vacuna se administra a niños.
31. El uso de una *Bordetella* atenuada según cualquiera de los aspectos 28 a 30, donde la vacuna se administra por vía intranasal.
32. El uso de una *Bordetella* atenuada según cualquiera de los aspectos 28 a 31, donde la vacuna se administra una vez en una única dosis.
33. El uso de una *Bordetella* atenuada según cualquiera de los aspectos 23 a 27, que comprende a) administrar una cepa según el aspecto 10 o cualquiera de los aspectos 19 a 22; y b) llevar a cabo al menos un refuerzo con la misma cepa o con una vacuna acelular o una combinación de ambas.
34. El uso de una *Bordetella* atenuada según el aspecto 23, donde la vacuna se administra a mamíferos que

necesitan una rápida inmunidad protectora contra una infección por *Bordetella*, donde dicha inmunidad protectora aumenta durante al menos dos meses después de la vacunación.

35. El uso de la cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo para la preparación de una vacuna polivalente destinada a tratar enfermedades respiratorias.

36. El uso según cualquiera de los aspectos 23 a 35, donde dicha cepa de *Bordetella* mutada es BPZE1.

37. El uso según cualquiera de los aspectos 23 a 36, donde el nivel de protección contra una infección por *Bordetella* es superior al 95%, particularmente superior al 99%.

38. El uso según el aspecto 37, donde dicho nivel de protección contra una infección por *Bordetella* alcanza más del 99.999%.

39. Un método para proteger a un mamífero contra una enfermedad causada por una infección por *Bordetella* que comprende administrar a dicho mamífero que necesita dicho tratamiento una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo.

40. Un método para proporcionar una rápida inmunidad protectora contra una infección por *Bordetella* que comprende administrar a dicho mamífero que necesita dicho tratamiento una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo.

41. El método según el aspecto 39 o 40, donde dicha infección por *Bordetella* es por *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*.

42. El método según cualquiera de los aspectos 39 a 41, donde dicho mamífero es un recién nacido.

43. El método según cualquiera de los aspectos 39 a 41, donde dicho mamífero es un niño.

44. El método según cualquiera de los aspectos 39 a 43, donde dicha cepa de *Bordetella* mutada se administra por vía subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), oral o intranasal, por inyección o por inhalación.

45. El método según cualquiera de los aspectos 39 a 43, donde dicha cepa de *Bordetella* mutada se administra por vía intranasal.

46. Un método para proporcionar una respuesta en las mucosas y una respuesta sistémica para tratar infecciones por *Bordetella* en mamíferos donde dicho método comprende administrar a los mamíferos que necesitan dicho tratamiento la cepa de *Bordetella* atenuada según el aspecto 10.

47. Un método para proporcionar una rápida inmunidad protectora contra una infección por *Bordetella* que comprende administrar a dicho mamífero que necesita dicho tratamiento una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo, donde dicho método proporciona además un aumento de dicha inmunidad protectora durante al menos dos meses después de la vacunación.

48. El método del aspecto 39, 40 o 47, donde dicha cepa de *Bordetella* mutada es BPZE1.

49. El método de cualquiera de los aspectos 39 a 41 o del 47, donde el nivel de protección contra una infección por *Bordetella* es superior al 95%, particularmente superior al 99%.

50. El método según el aspecto 49, donde dicho nivel de protección contra una infección por *Bordetella* alcanza más de 99.999%.

51. La cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de los aspectos 1 a 10, que comprende además al menos una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un ARN o una proteína.

52. La cepa de *Bordetella* mutada según el aspecto 51, donde dicha al menos una secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica un antígeno.

53. La cepa de *Bordetella* mutada según el aspecto 52, donde dicha al menos una secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica un antígeno viral o bacteriano.

54. El uso de una cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de los aspectos 1 a 10 como un vector para expresar al menos un antígeno heterólogo.

55. Una cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de los aspectos 51 a 53, para usar como una vacuna.

Ejemplos

Materiales y métodos

Ejemplo 1 - Cepas de *Bordetella* y condiciones de cultivo

Las cepas de *B. pertussis* utilizadas en este estudio se derivaron de *B. pertussis* BPSM [13] y *B. parapertussis* es un derivado resistente a la estreptomina de la cepa 12822 (amablemente provista por el Dr. N. Guiso, Instituto Pasteur, París, Francia). Todas las cepas de *Bordetella* se cultivaron en agar Bordet-Gengou (BG) (Difco, Detroit, Michigan) complementado con 1% de glicerol, 20% de sangre de carnero desfibrinada y 100 de µg/ml de estreptomina. Para los ensayos de adherencia celular, se inoculó *B. pertussis* en crecimiento exponencial a una densidad óptica de 0.15 a 600 nm, en 2.5 ml de medio de Stainer-Scholte modificado [14] que contenía 1 g/l de heptakis(2,6-di-o-metil) β-ciclodextrina (Sigma) y complementado con 65 µCi/ml de L-[³⁵S]metionina más L-[³⁵S]cisteína (NEN, Boston, Massachusetts) y se cultivó durante 24 h a 37 °C. Las bacterias se recogieron por centrifugación, se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, N. Y.) a la densidad deseada.

Ejemplo 2 - Construcción de *B. pertussis* BPZE1.

5 Para construir *B. pertussis* BPZE1, el gen *ampG* de *B. pertussis* se reemplazó con *ampG* de *Escherichia coli* usando intercambio alélico. Un fragmento de PCR denominado *met* y ubicado en la posición 49,149 a 49,990 del genoma de *B. pertussis* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_pertussis/), en dirección 5' del gen *ampG* de *B. pertussis*, se amplificó utilizando oligonucleótidos A: 5'-TATAAATCGATATTCCTGCTGGTTTCGTTCTC-3' (SEQ ID No: 5) y B: 5'-TATAGCTAGCAAGTTGGGAAACGACACCAC-3' (SEQ ID No: 6) y ADN genómico de *B. pertussis* BPSM [13] como
10 plantilla. Este fragmento de 634-bp se insertó en Topo PCRII (Invitrogen Life Technology, Groningen, los Países Bajos) y después se escindió como un fragmento *Clal-NheI* y se insertó en pBP23 digerido con *Clal* y *NheI* [50], un vector suicida que contenía el gen *ampG* de *E. coli* con ADN flanqueante de *B. pertussis* de 618 bp (de la posición 50,474 a 51,092 del genoma de *B. pertussis*) y 379 bp (de la posición 52,581 a 52,960 del genoma de *B. pertussis*) en el extremo 5' y 3' del *ampG* de *E. coli*, respectivamente. El plásmido resultante se transfirió a *E. coli* SM10 [51], que luego se conjugó con BPSM y se seleccionaron dos eventos de recombinación homóloga sucesivos como se describió [52]. Se analizaron diez colonias individuales por PCR como sigue. Las colonias se suspendieron en 100 µl de H₂O, se calentaron durante 20 min a 95 °C y se centrifugaron durante 5 min a 15 000 x g. Se utilizó un µl de los sobrenadantes como plantilla para la PCR usando los oligonucleótidos A y C: 5'-TAAGAAGCAAATAAGCCAGGCATT-3' (SEQ ID No: 7) para verificar la presencia del *ampG* de *E. coli* y usando los oligonucleótidos D: 5'-TATACCATGGCGCCGCTGCTGGTGCTGGGC-3'(SEQ ID No:8) y E: 5'-TATATCTAGACGCTGGCCGTAACCTTAGCA-3'(SEQ ID No:9) para verificar la ausencia del *ampG* de *B. pertussis*. Se seleccionó una de las cepas que contenía el *ampG* de *E. coli* y carecía del *ampG* de *B. pertussis*, y se secuenció todo el locus *ampG*. Esta cepa se usó después para ingeniería adicional.

25 Los genes *ptx* se eliminaron del cromosoma de esta cepa como se describió [21] y luego se reemplazaron con *ptx* mutado que codifica a PTX inactiva. El fragmento *EcoRI* que contenía el locus mutado *ptx* de pPT-RE [16] se insertó en el sitio *EcoRI* de pJQ200mp18rpsI [53]. El plásmido resultante se integró en el cromosoma de *B. pertussis* en el locus *ptx* por recombinación homóloga después de la conjugación vía *E. coli* SM10. El locus *ptx* del cromosoma de la cepa *B. pertussis* resultante, se secuenció para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas. Se analizó la producción de toxinas por inmunotransferencia enzimática usando una mezcla de anticuerpos monoclonales IB7 [54] específicos para la subunidad S1, y 11 E6 [55] específicos para las subunidades S2 y S3 de PTX.

Finalmente, el gen *dnt* se eliminó de la cepa *B. pertussis* resultante, a medida que se amplificaron las regiones flanqueantes de *dnt* por PCR usando el ADN genómico de BPSM como plantilla y los oligonucleótidos F: 5'-TATAGAATTCGCTCGGTTTCGCTGGTCAAG G-3' (SEQ ID No:10) y G: 5'-TATATCTAGAGCAATGCCGATTCATCTTTA-3' (SEQ ID No:11) para la región en dirección 5' de *dnt* y H: 5'-TATATCTAGAGCGGCTT TATTGCTTTTCC-3' (SEQ ID No:12) e I: 5'-TATAAAGCTTCTCATGCACGCCG GCTTCTC-3' (SEQ ID No:13) para la región en dirección 3' de *dnt*, como cebadores. Los fragmentos de ADN resultantes de 799-bp y 712-bp se digirieron con *EcoRI/XbaI* y *XbaI/HindIII*, respectivamente, y se unieron con el kit Fast Link (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). El fragmento ligado se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos F e I, y el fragmento de PCR de 1505-bp se insertó luego en pCR2.1-Topo (Invitrogen), se volvió a aislar el plásmido resultante como un fragmento *EcoRI* y se insertó después en el sitio único *EcoRI* de pJQmp200rpsL18. El plásmido resultante se introdujo en *B. pertussis* por conjugación vía *E. coli* SM10. La eliminación exitosa del gen *dnt* por intercambio alélico se verificó por análisis de transferencia de Southern en ADN genómico de *B. pertussis* digerido con PvuII empleando el fragmento de PCR correspondiente a la región en dirección 5' de *dnt* como sonda. La sonda se marcó con digoxigenina (DIG) con el kit de marcado DIG Easy Hyb (Roche, Meylan, Francia). Se determinaron los tamaños de las bandas de hibridación a partir de la distancia de migración del marcador molecular III de ADN marcado con Dig (Roche). Se secuenció el locus *dnt* de esta cepa final, denominada BPZE1.

Ejemplo 3 - Análisis de la producción de TCT.

50 Para la cuantificación sensible de la producción de TCT, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos de *B. pertussis* cultivado hasta la fase logarítmica, se sometieron a extracción en fase sólida [15] y se derivatizaron con fenilisotiocianato (PITC, Pierce). Los derivados de feniltiocarbamilato (PTC) resultantes se separaron por HPLC de fase inversa utilizando una columna C8 (Perkin Elmer) y se detectaron a 254 nm. La cantidad de PTC-TCT de *B. pertussis* en cada muestra se determinó por comparación del área del pico y el tiempo de elución del pico con un estándar de TCT procesado idénticamente.

Ejemplo 4 - Ensayo de adherencia celular.

60 Para analizar las propiedades de adherencia de las cepas de *B. pertussis*, se midieron sus tasas de unión a la línea de células epiteliales pulmonares humanas A549 (ATCC N° CCL-185) y a la línea celular de macrófagos murinos J774 (ATCC N° TIB-67) como se describió previamente [16].

Ejemplo 5 - Microscopía electrónica de transmisión.

El procedimiento de tinción negativa de una sola gota se utilizó como se describió previamente [17] con las modificaciones siguientes. Se absorbieron durante 2 min. 20 μ l de una suspensión de aproximadamente 10^9 bacterias/ml sobre rejillas de níquel recubiertas de formvar impregnada de carbono (400 mesh; Electron Microscopy Sciences EMS, Washington, PA). Después de 30 segundos de secado al aire las rejillas se tiñeron durante 2 minutos con 20 μ l de ácido fosfotúngstico al 2% (pH 7; EMS) y se examinaron después de secar al aire con un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi 7500, Japón) a 60 kvolts y alta resolución.

Ejemplo 6 - Infección intranasal y vacunación.

Se mantuvieron ratones hembra Balb/C de 3 semanas y 8 semanas de vida exentos de patógenos específicos, y se llevaron a cabo todos los experimentos bajo las directrices de la Junta de estudios en animales del Instituto Pasteur de Lille. Los ratones se infectaron por vía intranasal con aproximadamente 4×10^6 bacterias en 20 μ l de PBS, y se midió la cinética de las UFC en los pulmones como se describió previamente [18]. Para la vacunación con aPV (Tetravac; Aventis-Pasteur, Francia), los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal (i.p.) con 20% de la dosis humana y se les administró un refuerzo un mes más tarde, usando la misma dosis.

Ejemplo 7 - Determinación de anticuerpos.

Se recogieron los sueros y se estimaron los títulos de los anticuerpos por enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) como se describió previamente [18].

Ejemplo 8 - Ensayos de citocinas.

Se analizaron células de bazo de ratones individuales en diferentes momentos después de la inmunización para la producción de citocinas *in vitro* en respuesta a *B. pertussis* BPSM (10^6 células/ml) muerta, eliminada térmicamente, 5.0 μ g/ml de PTX (purificada de *B. pertussis* BPGR4 como se describió previamente [19] [20] e inactivada térmicamente a 80 °C durante 20 min) 5.0 μ g de hemaglutinina filamentosa (FHA, purificada de *B. pertussis* BPRA [21] como se describió previamente [22]), 5 μ g/ml de concanavalina A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.) o solamente medio como control. Se retiraron los sobrenadantes de cultivos por triplicado después de 72 h de incubación a 37 °C y 5% de CO₂, y se determinaron las concentraciones de IFN- γ e IL-5 mediante inmunoensayos (sistema BD OptEIA, Pharmingen).

Ejemplo 9 - Infección intranasal y vacunación: provocación a 1, 2, 3 y 4 semanas.

Se usó un modelo de ratón recién nacido (3 semanas de vida) [29] para comparar la eficacia de la vacunación con BPZE1 con la de la vacunación con vacuna a celular contra la tos ferina (aPv). Se infectaron por vía intranasal ratones hembra Balb/C con aproximadamente 1×10^6 de cepa BPZE1 en 20 μ l de PBS. Para la vacunación con aPv (Tetravac; Aventis-Pasteur, Francia), los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal con 20% de la dosis humana. Una, dos, tres o cuatro semanas después de la vacunación con BPZE1 o aPv, los ratones se provocaron por vía intranasal con la cepa virulenta de *B. pertussis* BPSM/bctA-lacZ [53]. Esta cepa es un derivado de BPSM resistente a la gentamicina que permite la discriminación con la BPZE1 (sensible a la gentamicina) en placas de agar de Bordet-Gengou que contenían 10 μ g/ml de gentamicina y 100 μ g/ml de estreptomina (BGgs). El grupo de control correspondió a ratones sin exposición provocados con BPSM/bctA-lacZ. Una semana después de la infección de provocación, se extrajeron asépticamente los pulmones, se homogeneizaron y se sembraron en placas en BGgs para la determinación de UFC como se describió previamente [18].

Los ratones se vacunaron con BPZE1 o aPv y se provocaron con *B. pertussis* virulenta una, dos, tres o cuatro semanas después de la vacunación. Los recuentos de unidades formadoras de colonias pulmonares se determinaron 3 horas o 7 días más tarde. Los resultados se expresan como la media de unidades formadoras de colonias (\pm error estándar) de tres a cinco ratones por grupo. Los niveles de protección se calculan para cada infección de provocación como la media de los porcentajes de UFC de cada grupo en relación con el promedio de UFC en el grupo no inmunizado, 7 días después de la infección de provocación (Tablas 2 a 5).

Ejemplo 10 - Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron utilizando la prueba t de Student con datos no apareados y el test de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn (programa GraphPad Prism) cuando procedía. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$.

Resultados

Construcción de *B. pertussis* BPZE1

Tres factores de virulencia fueron modificados genéticamente: la citotoxina traqueal (TCT), la toxina *pertussis* (PTX) y la toxina dermonecrótica (DNT).

TCT es responsable de la destrucción de las células ciliadas de la tráquea de huéspedes infectados [24, 25] y por lo tanto puede estar implicada en el síndrome de tos. TCT es un producto de descomposición del peptidoglicano de la pared celular de bacterias gramnegativas, que generalmente la internalizan en el citosol mediante la proteína transportadora AmpG para ser reutilizada durante la biosíntesis de la pared celular. AmpG de *B. pertussis* es ineficaz para internalizar los productos de descomposición del peptidoglicano. Por lo tanto sustituimos el gen *ampG* de *B. pertussis* por *ampG* de *E. coli*. La cepa resultante expresó menos de 1% de actividad de TCT residual (Fig. 1).

PTX es un factor de virulencia importante responsable de los efectos sistémicos de las infecciones por *B. pertussis* y está compuesta por una porción enzimáticamente activa, denominada S1 y una porción responsable de la unión a los receptores de las células blanco (por una revisión, véase 26). Sin embargo, también es uno de los principales antígenos protectores, lo que nos ha llevado a sustituir los genes *ptx* naturales por una versión mutada que codifica una toxina enzimáticamente inactiva. Esto se logró mediante la sustitución de Arg-9 por Lys y Glu-129 por Gly en S1, dos residuos claves involucrados en la unión al sustrato y la catálisis, respectivamente. Se usó primero intercambio alélico para eliminar el operón *ptx* y luego para insertar la versión mutada. La presencia de los análogos de la toxina pertinentes en los sobrenadantes de los cultivos de *B. pertussis* se evaluó por análisis de inmunotransferencia enzimática (Fig. 2).

Finalmente, se usó intercambio alélico para eliminar el gen *dnt* (Fig. 3). Aunque el papel de DNT en la virulencia de *B. pertussis* no es seguro, ha sido identificada como una toxina importante en la especie estrechamente relacionada *Bordetella bronchiseptica* y muestra actividad letal luego de la inyección de cantidades diminutas (por una revisión, véase 26).

Caracterización *in vitro* de *B. pertussis* BPZE1

Como algunas de las alteraciones genéticas en BPZE1 pueden afectar potencialmente la síntesis de la pared celular bacteriana, se compararon el tamaño y la forma así como el ritmo de crecimiento *in vitro* de BPZE1 con los de la cepa parental BPSM. El ritmo de crecimiento de BPZE1 no difirió del de BPSM (Fig. 4), y no se detectaron diferencias en la forma ni el tamaño bacterianos entre BPZE1 y BPSM, según lo evidenciado por el análisis de microscopía electrónica (Fig. 5). Sin embargo, la pared celular de BPZE1 pareció ser uniformemente algo más delgada que la de BPSM.

Para determinar si la ausencia o las alteraciones de cualquiera de las toxinas modificadas en BPZE1 afectan las propiedades de adherencia de *B. pertussis*, las tasas de unión de BPZE1 se compararon con las de BPSM, utilizando la línea de células epiteliales pulmonares humanas A549 y la línea celular de macrófagos murinos J774, como dos modelos celulares de uso frecuente para el estudio de la adherencia de *B. pertussis*. No se observó ninguna diferencia significativa en la capacidad de adherencia a ninguna de las líneas celulares entre las dos cepas (Fig. 6).

Atenuación de *B. pertussis* BPZE1

Para determinar si las mutaciones introducidas en *B. pertussis* BPZE1 habían resultado en atenuación, pero permitiendo al organismo colonizar el aparato respiratorio, se infectaron por vía intranasal ratones Balb/C con BPZE1 o BPSM y se siguió la colonización en el tiempo. BPZE1 fue capaz de colonizar y persistir en los pulmones de los ratones tanto tiempo como BPSM (Fig. 7). Sin embargo, el pico de multiplicación observado 7 días después de la infección con BPSM faltó constantemente en ratones infectados con BPZE1. Los estudios realizados con cepas mutadas en los genes individuales de la toxina indicaron que esto se debe a las mutaciones en el locus *ptx* (no se muestran los datos). Cuando se examinaron los pulmones en busca de cambios histopatológicos e infiltración inflamatoria, se encontró que la infección con BPSM induce infiltrados peri-bronquiovasculares fuertes y reclutamiento de células inflamatorias 7 días después de la infección, asociados a una fuerte hipertrofia de las células epiteliales bronquiales (Fig. 8). En contraposición, no se observaron cambios de ese tipo en animales infectados con BPZE1, y la histología de los ratones infectados con BPZE1 fue similar a la de los ratones de control que habían recibido PBS en lugar de las bacterias. La inflamación inducida por la infección con BPSM duró al menos dos meses (no se muestran los datos). Estos resultados indican que las mutaciones introducidas en BPZE1 resultaron en una atenuación drástica, pero permitiendo a las bacterias colonizar y persistir en los pulmones.

Protección contra la provocación con *B. pertussis* luego de la vacunación intranasal de ratones adultos con BPZE1

Para evaluar la protección ofrecida por BPZE1, se comparó el efecto de una sola administración intranasal de esta cepa en ratones Balb/C de 8 semanas de vida en la colonización subsiguiente por la cepa de provocación de tipo natural BPSM con la de dos vacunas i.p. de 1/5 de una dosis humana de aPV. Este protocolo de inmunización con aPV ha sido descrito como el que mejor se correlaciona con la eficacia de la vacuna de tos ferina en ensayos

clínicos en humanos [27, 28]. Como se muestra por la depuración total de recuentos de colonias bacterianas en los pulmones siete días después de la infección de provocación, una sola administración intranasal de BPZE1 y dos inmunizaciones i.p. con aPV proporcionan niveles de protección similares (Fig. 9a). Se encontraron altas cargas bacterianas en los ratones de control que habían recibido dos inyecciones de PBS en lugar de la vacuna.

5 Protección contra la provocación con *B. pertussis* luego de la vacunación intranasal de ratones recién nacidos con BPZE1

10 Puesto que los principales objetivos de las nuevas vacunas contra la tos ferina son los bebés pequeños, que no están protegidos con las vacunas disponibles en la actualidad, se desarrolló un modelo de ratón recién nacido (3 semanas de vida) [29] y se usó para comparar la eficacia de la vacunación con BPZE1 con la de la vacunación con aPV. Una sola administración nasal de BPZE1 protegió totalmente a ratones recién nacidos contra la infección de provocación (Fig. 9b), puesto que se observó la depuración bacteriana total en los pulmones una semana después de la provocación. En contraposición, una cantidad considerable de bacterias permaneció en los animales vacunados con aPV una semana después de la infección de provocación. La diferencia en la carga bacteriana entre los ratones vacunados con BPZE1 y los vacunados con aPV fue estadísticamente significativa, lo que indica que en el modelo de ratón recién nacido una sola administración intranasal de BPZE1 ofrece una mejor protección que dos administraciones sistémicas de aPV.

15 Además, se observó regularmente una fuerte reducción en la carga bacteriana de la cepa de provocación, 3 horas después de la administración cuando los ratones habían sido inmunizados con BPZE1 en comparación con los animales inmunizados con aPV (Fig. 9c), lo que indica que la vacunación con BPZE1 reduce la susceptibilidad a la infección por la cepa de provocación. Este efecto se observó tanto en ratones de 8 semanas de vida como en recién nacidos. Por el contrario, aPV no tuvo efecto sobre los recuentos bacterianos 3 horas después de la infección, en comparación con los ratones de control.

20 Protección contra provocación con *B. parapertussis* después de la vacunación intranasal con BPZE1

30 Hay una preocupación creciente sobre la infección por *B. parapertussis* en niños, especialmente en las poblaciones vacunadas [30, 31]. *B. parapertussis* causa un síndrome semejante a la tos ferina, más leve, cuya frecuencia está probablemente en gran medida subestimada. Además, la incidencia de infecciones por *B. parapertussis* se ha incrementado en las últimas décadas, posiblemente debido a que se sabe que las vacunas contra la tos ferina tienen una eficacia muy baja o no protegen contra *B. parapertussis* [32, 33]. En contraste, se ha informado recientemente que la infección por *B. pertussis* protege contra la infección por *B. parapertussis* [34]. También se evaluó BPZE1 en relación con la protección contra *B. parapertussis* utilizando el modelo de ratón recién nacido. Mientras que dos administraciones de aPV no ofrecieron ninguna protección contra *B. parapertussis*, según lo informado previamente, una sola administración intranasal de BPZE1 proporcionó una fuerte protección, medida por los bajos recuentos de *B. parapertussis* en los pulmones de los ratones vacunados, 1 semana después de la provocación (Fig. 9d).

40 Respuestas inmunitarias inducidas por la vacunación con BPZE1

Aunque los mecanismos de la inmunidad protectora contra la infección por *B. pertussis* aún no se comprenden completamente, se ha demostrado en ratones una clara evidencia de un papel tanto de los linfocitos B como del IFN- γ [28]. La vacunación ya sea con una dosis nasal de BPZE1 o dos administraciones i.p. de aPV indujeron altos títulos de IgG sérica contra FHA, un importante antígeno de superficie de *B. pertussis* [35], también presente en aPV (Fig. 10a). Tras la provocación con *B. pertussis*, se midieron las respuestas positivas anamnésicas en animales vacunados con BPZE1 y aPV, según se indicó por el aumento de títulos de IgG anti-FHA, en comparación con las respuestas primarias antes de la infección con *B. pertussis*. El examen de los cocientes IgG1 anti-FHA/IgG2a mostraron que esos cocientes fueron superiores después de la administración de aPV, característico de una respuesta tipo Th2, que después de la vacunación con BPZE1 (Fig. 10b). Aunque el cociente IgG1-anti-FHA/IgG2a disminuyó después de la provocación en los ratones vacunados con aPV, siguió siendo sustancialmente superior que en los animales vacunados con BPZE1 después de la provocación con *B. pertussis*.

55 El análisis de los patrones de citocinas específicas del antígeno de *B. pertussis* inducidas por vacunación con BPZE1 o aPV confirmó que la administración de BPZE1 favorece una respuesta tipo Th1 más fuerte que la vacunación con aPV. Esto fue revelado por el hecho de que los cocientes entre IFN- γ y IL-5 producidos por los esplenocitos estimulados con FHA o PT, o con el activador policlonal ConA, fueron significativamente mayores en los ratones vacunados con BPZE1 que en los ratones vacunados con aPV (Fig. 10c).

60 Inmunidad protectora de BPZE1 en el tiempo (desde 1 semana hasta 4 semanas)

Como se muestra en las tablas 1 a 5 a continuación, aunque la administración de aPV proporcionó protección limitada (reducción del 75% de la carga bacteriana en comparación con ratones no vacunados a 1 semana) contra *B. pertussis*, una sola administración intranasal de BPZE1 ya proporcionó un alto nivel de protección (reducción del

97.64% de la carga bacteriana) contra una infección provocada con *B. pertussis* realizada una semana después de la vacunación. Cuando la infección de provocación ocurrió dos semanas después de la vacunación, el nivel de protección inducido por BPZE1 alcanzó más del 99. 999% en comparación con los ratones no vacunados y es significativamente superior a la protección inducida por la vacuna aPv (aproximadamente el 92% en comparación con ratones no vacunados). Por lo tanto, la eficacia de la vacuna con BPZE1 contra la provocación con *B. pertussis* ya es significativa una semana después de la vacunación y aumenta durante los al menos dos meses siguientes.

Tabla 1: Cinética de la eficacia de las vacunas contra la provocación con *B. pertussis* en ratones recién nacidos.

Tiempo entre la vacunación y la provocación	Tiempo entre la recuperación de los pulmones y la provocación	Log10 ufc / pulmones de ratones		
		Sin exposición	Vacunados con aPv	Vacunados con BPZE1
1 semana	3 horas	5.71 ± 0.03	5.8 ± 0.07	5.74 ± 0.01
	7 días	6.71 ± 0.06	5.97 ± 0.20	4.86 ± 0.35
2 semanas	3 horas	5.77 ± 0.10	5.60 ± 0.02	5.49 ± 0.05
	7 días	6.49 ± 0.08	5.31 ± 0.16	3.22 ± 0.33
3 semanas	3 horas	6.03 ± 0.11	5.88 ± 0.04	5.33 ± 0.08
	7 días	6.58 ± 0.09	5.62 ± 0.11	3.14 ± 0.38
4 semanas	3 horas	6.31 ± 0.01	6.15 ± 0.02	5.83 ± 0.05
	7 días	6.36 ± 0.04	5.21 ± 0.11	1.83 ± 0.46

10 Tabla 2: Nivel de protección de los ratones vacunados con aPv y vacunados con BPZE1 en comparación con los ratones no vacunados a 1 semana.

Ratones no vacunados	Número de bacterias en los pulmones	Media del número de bacterias		
No vacunados 1	4.7 × 10 ⁶			
No vacunados 2	3.8 × 10 ⁶			
No vacunados 3	8.2 × 10 ⁶	5.36.10 ⁶		
No vacunados 4	4.1 × 10 ⁶			
No vacunados 5	6 × 10 ⁶			
	Número de bacterias en los pulmones	Porcentaje de bacterias restantes ⁽¹⁾	Media del porcentaje de bacterias restantes	Nivel de protección
Ratones vacunados con aPv				
aPv1	1.95 × 10 ⁶	36.38	25%	75%
aPv2	2.9 × 10 ⁶	54.1		
aPv3	2.9 × 10 ⁵	5.41		
aPv4	3.6 × 10 ⁵	6.72		
aPv5	1.2 × 10 ⁶	22.39		
Ratones vacunados con BPZE1				
BPZE1-1	3.2 × 10 ⁵	5.97	2.36%	97.64%
BPZE1-2	2 × 10 ⁴	0.004		
BPZE1-3	6 × 10 ⁴	1.12		
<small>(1) Porcentaje de bacterias restantes = numero de bacterias por cada raton / media del número de bacterias de todos los ratones no vacunados</small>				

15 Tabla 3: Nivel de protección de ratones vacunados con aPv y ratones vacunados con BPZE1 en comparación con ratones sin vacunar a 2 semanas.

Ratones no vacunados		Número de bacterias en los pulmones	Media del número de bacterias	
No vacunados 1		5×10^6	3.34×10^6	
No vacunados 2		3.6×10^6		
No vacunados 3		1.7×10^6		
No vacunados 4		2.4×10^6		
No vacunados 5		4×10^6		
	Número de bacterias en los pulmones	Porcentaje de bacterias restantes ⁽¹⁾	Media del porcentaje de bacterias restantes	Nivel de protección de
Ratones vacunados con aPv				
aPv1	9.5×10^4	2.84	8.11%	91.89%
aPv2	2.9×10^5	8.68		
aPv3	1×10^5	2.99		
aPv4	6.8×10^5	20.36		
aPv5	1.9×10^5	5.69		
Ratones vacunados con BPZE1				
BPZE1-1	9.5×10^3	2.8×10^{-3}	$1.03 \times 10^{-3}\%$	99.999%
BPZE1-2	450	1.35×10^{-4}		
BPZE1-3	3500	1.05×10^{-3}		
BPZE1-4	500	1.5×10^{-4}		
<small>(1) Porcentaje de bacterias restantes = número de bacterias por cada ratón / media del número de bacterias de todos los ratones no vacunados</small>				

Tabla 4: Nivel de protección de ratones vacunados con aPv y ratones vacunados con BPZE1 En comparación con ratones sin vacunar a 3 semanas.

Ratones no vacunados		Número de bacterias en los pulmones	Media del número de bacterias	
No vacunados 1		1.8×10^6	4.04×10^6	
No vacunados 2.		5.75×10^6		
No vacunados 3		4.7×10^6		
No vacunados 4		3.2×10^6		
No vacunados 5		4.75×10^6		
	Número de bacterias en los pulmones	Porcentaje de bacterias restantes ⁽¹⁾	Media del porcentaje de bacterias restantes	Nivel de protección de
Ratones vacunados con aPv				
aPv1	1.99×10^5	4.94	11.26%	88.74%
aPv2	6×10^5	14.85		
aPv3	6×10^5	14.85		
aPv4	4.2×10^5	10.40		
Ratones vacunados con BPZE1				
BPZE1-1	3640	9.01×10^{-4}	$8.65 \times 10^{-4}\%$	99.999%
HPZE1-2	9720	2.4×10^{-3}		

Ratones vacunados con BPZE1				
BPZE1-3	300	7.43×10^{-5}		
BPZE1-4	340	8.42×10^{-5}		
(1) Porcentaje de bacterias restantes = número de bacterias por cada ratón / media del número de bacterias de todos los ratones no vacunados				

Tabla 5: Nivel de protección de ratones vacunados con aPv y ratones vacunados con BPZE1 en comparación con ratones sin vacunar a 4 semanas.

Ratones no vacunados		Número de bacterias en los pulmones	Media del número de bacterias	
No vacunados 1		2.1×10^6	2.36 x 10 ⁶	
No vacunados 2		2.2×10^6		
No vacunados 3		3.1×10^6		
No vacunados 4		2.6×10^6		
No vacunados 5		1.8×10^6		
	Número de bacterias en los pulmones	Porcentaje de bacterias restantes ⁽¹⁾	Media del porcentaje de bacterias restantes	Nivel de protección de
Ratones vacunados con aPv				
aPv1	2.52×10^5	10.68	7.76%	92.24%
aPv2	3.28×10^5	13.90		
aPv3	1.04×10^5	4.41		
aPv4	8.4×10^5	3.56		
aPv5	1.48×10^5	6.27		

Ratones vacunados con BPZE1				
BPZE1-1	190	8.05×10^{-5}	7.13 x 10 ⁻⁵ %	99.999%
BPZE1-2	0	0		
BPZE1-3	110	4.66×10^{-5}		
BPZE1-4	320	1.36×10^{-4}		
BPZE1-5	220	9.32×10^{-5}		
(1) Porcentaje de bacterias restantes = número de bacterias por cada ratón / media del número de bacterias de todos los ratones no vacunados				

5

Discusión

La tos ferina es la primera enfermedad infecciosa cuya incidencia está aumentando en los países con alta cobertura de vacuna. Esta situación paradójica está probablemente ligada a los cambios epidemiológicos observados desde la introducción masiva de vacunas sumamente eficaces. En contraste con la época de prevacunación, los casos de tos ferina en adolescentes y adultos son ahora cada vez más frecuentes. Aunque generalmente no es mortal en este grupo etario, los adultos infectados con *B. pertussis* son un reservorio importante para la infección de los niños muy pequeños, demasiado pequeños para ser protegidos por la vacunación. La vacunación temprana, posiblemente al nacer, sería por lo tanto muy deseable, pero es obstaculizada por la inmadurez del sistema inmunitario de los recién nacidos y lactantes. Sin embargo, el hecho de que la infección con *B. pertussis* natural, incluso muy precozmente en la vida, sea capaz de inducir una fuerte respuesta de tipo Th1 en niños [12] nos impulsó a desarrollar una cepa para vacuna de *B. pertussis* viva, atenuada, que se administre por vía nasal, como una alternativa a las vacunas disponibles en la actualidad.

20 Basándose en las infecciones experimentales de primates, Huang et al. ya en 1962 llegaron a la conclusión de que la máxima protección contra la tos ferina seguía probablemente a una inoculación de *B. pertussis* viva [36]. En medicina veterinaria, se han utilizado las cepas de *Bordetella* atenuadas para vacunar contra bordetelosis en perros y cerdos. Una cepa de *Bordetella bronchiseptica* viva, atenuada, mostró que proporcionaba una fuerte protección contra la tos de las perreras (traqueobronquitis infecciosa canina) en perros [37] después de la administración nasal.

Esta protección se observó tan pronto como a las 48 h después de la vacunación. La vacunación intranasal con *B. bronchiseptica* viva, atenuada, también mostró que protegía contra la rinitis atrófica en cerdos de dos días de vida [38], lo que indica que las vacunas de *Bordetella* en forma viva, atenuada, pueden ser muy activas en animales recién nacidos.

Los intentos previos de atenuar genéticamente a *B. pertussis* como candidata para una vacuna de microorganismo vivo, han tenido un éxito bastante limitado. Basándose en una estrategia utilizada para la atenuación exitosa de cepas para vacuna de *Salmonella* [39], Roberts et al han eliminado el gen *aroA* de *B. pertussis* [40]. El mutante *aroA* fue en efecto muy atenuado, pero también perdió su capacidad para colonizar el aparato respiratorio de los animales vacunados por vía intranasal e indujo inmunidad protectora sólo después de repetidas administraciones de dosis altas. Aprovechamos el conocimiento de los mecanismos moleculares de la virulencia de *B. pertussis* y desarrollamos la cepa muy atenuada BPZE1. Esta cepa contiene alteraciones genéticas que conducen a la ausencia o la inactivación de tres toxinas principales, PTX, TCT y DNT. En contraste con el mutante *aroA*, esta cepa fue capaz de colonizar el aparato respiratorio del ratón y de proporcionar protección completa después de una sola administración intranasal. La protección en ratones adultos fue indistinguible de la inducida por las dos administraciones de 1/5 de la dosis humana de aPV. Una diferencia importante, sin embargo, se observó en ratones recién nacidos, en los que una sola administración de BPZE1 protegió completamente, mientras que aPV sólo ofreció protección parcial. En el contexto de las dificultades para inducir protección en los recién nacidos con las vacunas disponibles en la actualidad, precozmente en la vida, estos resultados proporcionan esperanza para el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación que se puedan utilizar en los niños muy pequeños, posiblemente al nacer. Además, BPZE1 protegió contra *B. parapertussis*, mientras que aPV no lo hizo. Por lo tanto el uso de BPZE1 también debería tener un impacto sobre la incidencia de tos ferina causada por *B. parapertussis* en recién nacidos.

Aunque el reciente reemplazo en muchos países de vacunas de primera generación de células enteras por nuevas aPV ha reducido significativamente las reacciones adversas sistémicas observadas con la vacuna de células enteras, no ha abolido la necesidad de vacunación repetida para lograr la protección. Esto hace que sea poco probable obtener protección en los niños muy pequeños (< 6 meses) que presentan el mayor riesgo de sufrir la enfermedad grave. Además, el uso extendido de aPV ha revelado nuevos problemas imprevistos. La administración repetida de aPV puede causar una importante inflamación en el sitio de inyección [41], que no se observó con vacunas de células enteras. En aproximadamente el 5% de los casos esta inflamación abarca casi toda la extremidad y dura más de una semana. Aunque todavía no se ha caracterizado el mecanismo de esta inflamación, se ha propuesto que se debe a una reacción de hipersensibilidad de Arthus causada por niveles altos de anticuerpos inducidos por la inmunización primaria [42]. Sin embargo, también podría estar relacionada con el sesgo Th2 de la respuesta inmunitaria, ya que, en comparación con las vacunas de células enteras, la administración de aPV induce citocinas de tipo Th2 en niños vacunados [10] y causa un retraso en el desarrollo de Th1 (Mascart et al., en preparación). La maduración tardía de la función Th1 se ha asociado a un riesgo de atopía en individuos genéticamente predispuestos [33]. Los dos mecanismos no son mutuamente excluyentes. En comparación con aPV, la respuesta inmunitaria a la administración de BPZE1 está menos sesgada hacia la rama Th2, y dado que BPZE1 se administra en las mucosas, no se produce ninguna reacción de inflamación.

El uso de bacterias vivas atenuadas como vacunas plantea el tema de la bioseguridad. Como tal, caen bajo las directivas y directrices para los organismos genéticamente modificados susceptibles de ser liberados en el medio ambiente. Estas directrices y directivas describen varios objetivos que se deben cumplir, que incluyen la identificación de los peligros y la evaluación del riesgo ambiental [44]. Se debe considerar cuidadosamente la potencial patogenicidad, especialmente en individuos inmunodeprimidos, como los infectados con VIH. La biología natural de *B. pertussis* es particularmente interesante en ese sentido. Aunque la tos ferina en sujetos infectados por el VIH se ha descrito ocasionalmente, es bastante rara en pacientes con SIDA [45]. En su forma genéticamente atenuada, no se esperaría, por tanto, que *B. pertussis* causara grandes problemas en niños infectados por el VIH, especialmente si el SIDA grave es un criterio de exclusión, como lo es para muchas vacunas. La colonización de *B. pertussis* está estrictamente limitada al epitelio respiratorio, sin diseminación extrapulmonar de la bacteria, lo que excluye naturalmente la bacteriemia sistémica de la cepa para vacuna BPZE1. Si, sin embargo, ocurrieran problemas de seguridad imprevistos, la cepa para vacuna puede ser fácilmente eliminada mediante el uso de antibióticos macrólidos, como eritromicina, a los cuales esencialmente todas las cepas de *B. pertussis* son muy sensibles.

Otra preocupación, como para cualquier vacuna, es la liberación potencial de la cepa para vacuna en el medioambiente y las consecuencias de dicha liberación. *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano, y no hay un animal vector o reservorio. Además, a diferencia de *B. bronchiseptica*, la supervivencia de *B. pertussis* de tipo natural en el medio ambiente es extremadamente limitada [46]. La tos ferina es propagada sólo por individuos con tos y parece no haber portadores asintomáticos [47]. La tos no se puede evaluar en los modelos de ratón utilizados en este estudio. No obstante, debido a la naturaleza de las alteraciones genéticas en BPZE1, en particular la fuerte reducción de TCT y la inactivación genética de PTX, no se espera que esta cepa induzca tos. Se ha demostrado que es necesaria la PTX activa para la inducción de la tos en un modelo de tos en ratas, aunque se desconoce el mecanismo [48]. Si, no obstante, la cepa para vacuna fuera a transmitirse a individuos no vacunados,

en el peor de los casos el resultado sería un aumento de la cobertura por vacunación. Las consecuencias de cada uno de estos posibles peligros pueden ser calificadas por lo tanto como insignificantes y pueden ser controladas fácilmente y rápidamente con antibioticoterapia si fuera necesario.

5 Las ventajas del uso de BPZE1 incluyen los costos de producción relativamente bajos, lo que la hace especialmente atractiva para los países en desarrollo, su modo de administración fácil, sin aguja, y seguro, y su potencial para inducir inmunidad en las mucosas además de inmunidad sistémica. Aunque el papel de la inmunidad en las mucosas contra la tos ferina sorprendentemente no se ha abordado mucho, el hecho de que *B. pertussis* sea un patógeno estrictamente mucoso, hace probable que la respuesta inmunitaria de la mucosa pueda contribuir significativamente a la protección. Ninguna de las vacunas disponibles en la actualidad induce ninguna respuesta significativa en las mucosas.

Otras ventajas del uso de BPZE1 en la vacunación son:

- 15
- la rápida respuesta inmunitaria protectora obtenida después de una sola dosis intranasal de BPZE1, ya que la inducción de la inmunidad puede ser detectada 1 semana después de la vacunación,
 - un aumento de la inmunidad protectora durante los al menos dos meses siguientes a la vacunación, y
 - la inmunidad protectora completa, dado que se obtiene un nivel de protección de más del 99.999% 2 semanas después de la vacunación.

20 El uso de *B. pertussis viva, atenuada*, para la vacunación en las mucosas ofrece otra ventaja. *B. pertussis* se puede utilizar para la presentación de antígenos heterólogos a la mucosa respiratoria (por una revisión véase 49). El uso de BPZE1 como plataforma de expresión heteróloga puede, por lo tanto, ser útil para la generación de vacunas polivalentes contra diversos patógenos respiratorios. Sin embargo, puesto que la administración intranasal de BPZE1 también induce fuertes respuestas inmunitarias sistémicas, como se muestra en este documento, tanto por los niveles de anticuerpos anti-FHA como por la producción de IFN- γ específico del antígeno, también se puede usar para la producción de antígenos para los cuales se desea una respuesta inmunitaria sistémica.

Referencias

- 30
1. WHO (2004) The world health report 2004-changing history, Geneva, WHO.
 2. Das P (2002) Whooping cough makes global comeback. *Lancet* ii: 322.
 3. Tan T, Trindade E, Skowronski D (2005) Epidemiology of Pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 24: S10-S18.
 4. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis. Available : <http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/pert.pdf> via the Internet.
 - 35 5. Wirsing von König CH, Halperin S, Riffelmann M, Guiso N (2002) Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis* 2: 744-750.
 6. Lewis DB, Yu CC, Meyer J, English BK, Kahn SJ, et al. (1991) Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin-4 and interferon- γ production by neonatal T cells. *J Clin Invest* 87: 194-202.
 - 40 7. Siegrist CA (2001) Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine*. 19: 3331-3346.
 8. Mills KHG (2001) Immunity to Bordetella pertussis. *Microbes Infect* 3: 655-677.
 9. Lewis DB, Larsen A, Wilson CB (1986) Reduced interferon- γ mRNA levels in human neonates. *J Exp Med* 163: 1018-1023.
 - 45 10. Ausiello CM, Urbani F, La Sala A, Lande R, Cassone A (1997) Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination in infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infect Immun* 65: 2168-2174.
 11. Wirsing von König CH, Postels-Multani S, Bock HL, Schmitt HJ (1995) Pertussis in adults : frequency of transmission after household exposure. *Lancet* 346: 1326-1329.
 - 50 12. Mascart F, Verscheure V, Malfroot A, Hainaut M, Piérard D, et al. (2003) Bordetella pertussis infection in 2-months-old infants promotes Type 1 T cell responses. *J Immunol* 170: 1504-1509.
 13. Menozzi FD, Mutombo R, Renauld G, Gantiez C, Hannah JH, et al. (1994) Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of Bordetella pertussis. *Infect Immun* 62: 769-778.
 14. Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y (1983) Effect of heptakis (2,6-O-dimethyl)-beta-cyclodextrin on the production of pertussis toxin by Bordetella pertussis. *Infect Immun* 41: 1138-1143.
 - 55 15. Cookson BT, Cho H-L, Herwaldt LA, Goldman WE (1989) Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of Bordetella pertussis. *Infect Immun* 57: 2223-2229.
 16. Alonso S, Pethe K, Mielcarek N, Raze D, Loch C (2001) Role of ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during Bordetella pertussis infection. *Infect Immun* 69: 6038-6043.
 - 60 17. Collyn F, Lety MA, Nair S, Escuyer V, Ben Younes A, et al. (2002) Yersinia pseudotuberculosis harbors a type IV pilus gene cluster that contributes to pathogenicity. *Infect Immun* 70: 619-620.
 18. Mielcarek N, Cornette J, Schacht AM, Pierce RJ, Loch C, et al. (1997) Intranasal priming with recombinant Bordetella pertussis for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen. *Infect*

- Immun 65: 544-550.
19. Locht C, Geoffroy MC, Renaud G (1992) Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families. *EMBO J* 11: 3175-3183.
- 5 20. Sekura RD, Fish F, Manclark CR, Meade B, Zhang YL (1983) Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 258: 14647-14651.
21. Antoine R, Locht C (1990) Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect Immun* 58: 1518-1526.
- 10 22. Menozzi FD, Gantiez C, Locht C (1991) Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* 62: 59-64.
23. Locht C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F (2001) *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* 4: 82-89.
24. Heiss LN, Flak TA, Lancaster JR, McDaniel ML, Goldman WE (1993) Nitric oxide mediates *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin damage to the respiratory epithelium. *Infect Agents Dis* 2: 173-177.
- 15 25. Goldman WE, Cookson BT (1988) Structure and functions of the *Bordetella* tracheal cytotoxin. *Tokai J Exp Clin Med* 13 Suppl: 187-191.
26. Locht C, Antoine R (1999) *Bordetella pertussis* protein toxins. In: Alouf JE, Freer JH, editors. *Comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. Academic Press, pp. 130-146.
27. Guiso N, Capiou C, Carletti G, Poolman J, Hauser P (1999) Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine* 17: 2366-2376.
- 20 28. Mills KH, Ryan M, Ryan E, Mahon BP (1998) A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 66: 594-602.
29. Roduit C, Bozzotti P, Mielcarek N, Lambert PH, Del Giudice G, et al. (2002) Immunogenicity and protective efficacy of neonatal immunization against *Bordetella pertussis* in a murine model: Evidence for early control of Pertussis. *Infect Immun* 70: 3521-3528.
- 25 30. He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, Mertsola J (1998) Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA* 280: 635-637.
31. Watanabe M, Nagai M (2004) Whooping cough due to *Bordetella parapertussis*: an unresolved problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2: 447-454.
- 30 32. Mastrantonio P, Stefanelli P, Giuliano M, Herrera Rojas Y, Ciofi degli Atti M, et al. (1998) *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. *J Clin Microbiol* 36: 999-1002.
33. Liese JG, Renner C, Stojanov S, Belohradsky BH, Munich Vaccine Study Group. (2003) Clinical and epidemiological picture of *B. pertussis* and *B. parapertussis* infections after introduction of acellular pertussis vaccines. *Arch Dis Child* 88: 684-687.
- 35 34. Watanabe M, Nagai M (2001) Reciprocal protective immunity against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a murine model of respiratory infection. *Infect Immun* 69: 6981-6986.
35. Locht C, Bertin P, Menozzi FD, Renaud G (1993) The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* 9: 653-660.
- 40 36. Huang CC, Chen PM, Kuo JK, Chui WH, Lin ST, et al. (1962) Experimental whooping cough. *N Engl J Med* 266: 105-111.
37. Bey RF, Shade FJ, Goodnow RA, Johnson RC (1981) Intranasal vaccination of dogs with live avirulent *Bordetella bronchiseptica* : correlation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis. *Am J Vet Res* 42: 1130-1132.
- 45 38. De Jong MF (1987) Prevention of atrophic rhinitis in piglets by means of intranasal administration of a live non-AR-pathogenic *Bordetella bronchiseptica* vaccine. *Vet Q* 9: 123-133.
39. Hoiseth SK, Stocker BAD (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238 - 239.
- 50 40. Roberts M, Maskell D, Novotny P, Dougan G (1990) Construction and characterization in vivo of *Bordetella pertussis* aroA mutants. *Infect Immun* 58: 732-739.
41. Rennels MB (2003) Extensive swelling reactions occurring after booster doses of diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccines. *Semin Pediatr Infect Dis* 14: 196-198.
42. Robbins JB, Schneerson R, Trollfors B, Sato H, Sato Y, et al. (2005) The diphtheria and pertussis components of diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine should be genetically inactivated mutant toxins. *J Infect Dis* 191: 81-88.
- 55 43. Holt PG, Clough JB, Holt BJ, Baron-Hay MJU, Rose AH, et al. (1992) Genetic "risk" for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence. *Clin Exp Allergy* 22: 1093-1099.
44. Favre D, Viret JF (2006) Biosafety evaluation of recombinant live oral bacterial vaccines in the context of European regulation. *Vaccine*. May 1;24(18):3856-64.
- 60 45. Cohn SE, Knorr KL, Gilligan PH, Smiley ML, Weber DJ (1993) Pertussis is rare in human immunodeficiency virus disease. *Am Rev Respir Dis* 147: 411-413.
46. Porter JF, Wardlaw AC (1993) Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients. *FEMS Microbiol Lett* 110: 33-36.

47. Linnemann CCJr, Bass JW, Smith MHD (1968) The carrier state in pertussis. *Am J Epidemiol* 88: 422-427.
48. Parton R, Hall E, Wardlaw AC (1994) Responses to *Bordetella pertussis* mutant strains and to vaccination in the coughing rat model of pertussis. *J Med Microbiol* 40: 307-312.
- 5 49. Mielcarek N, Alonso S, Loch C (2001) Nasal vaccination using live bacterial vectors. *Adv Drug Del Rev* 51: 55-69.
50. Lyon RS, Engle JT, Goldman WE. Manuscript in preparation
51. Simon R, Priefer U, Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 784-791.
- 10 52. Stibitz S (1994) Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Method Enzymol* 235: 458-465.
53. Antoine R, Huvent I, Chemlal K, Deray I, Raze D, et al. (2005) The periplasmic binding protein of tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction. *J Mol Biol* 351: 799-809.
54. Sato H, Ito A, Chiba J, Sato Y (1984) Monoclonal antibodies against pertussis toxin: effect on toxin activity and pertussis infections. *Infect Immun* 46: 422-428.
- 15 55. Sato H, Sato Y, Ito A, Ohishi I (1987) Effect of monoclonal antibody to pertussis toxin on toxin activity. *Infect Immun* 55: 909-915.
56. Tuomanen, E. And Weiss A. (1985) Characterization of two adhesions of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 152:118-125.
- 20 57. Loch, C., Antoine, R., Veithen A. and Raze D. 2000. Pertussis Toxin: Structure-Function-Relationship. In Aktories K. Just I editors. *Handbook of Experimental Pharmacology, Bacterial Protein Toxins*, Springer, vol 145, pp. 167-185.
58. Horiguchi Y, Matsuda, H. Koyama H, Nakai T and Kume K. (1992) *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin suppresses in vivo antibody responses in mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 69:229-234.
- 25 59. Bordet et Genysa (1909) L'endotoxine coquelucheuse ; *Ann. Inst. Pasteur* 23 : 415-419.
60. Iida & Okonogi (1971) L'endotoxine coquelucheuse ; *J. Med. Microbiol.* 4: 51-61.
61. R. Parton (1985) Effect of prednisone on the toxicity of *Bordetella pertussis* in mice, *J. Med. Microbiol.* 19: 391-400.
62. Magyar et al (1988) The pathogenesis of turbinate atrophy in pigs caused by *Bordetella bronchiseptica*, *Vet. Microbiol.* 3 : 1719-1728.
- 30 63. Roop et al (1987) Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine, *Infect. Immun.* 55 : 217-222.
64. Weiss & Goodman (1989) Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model, *Infect. Immun.* 57 : 3757-3764.
- 35 65. Allan & Maskell (1996) The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*, *Mol. Microbiol.* 19: 37-52.
66. Alonso et al (2002) Eighty kilodalton N-terminal moiety of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: adherence, immunogenicity, and protective role, *Infection & Immunity*, 70, 4142-4147.
67. Cummings, C.A., Bootsma, H.J., Relman D.A. and Miller J.F. (2006) Species- and Strain-specific Control of a Complex, Flexible Regulon by *Bordetella BvgAS*. *J. Bacteriol.* 188:1775-1785.
- 40 68. Kashimoto T., Katahira J, Cornejo WR, Masuda M, Fukuoh A, Matsuzawa T, Ohnishi T, Horiguchi Y. (1999) Identification of functional domains of *Bordetella dermonecrotizing* toxin. *Infect. Immun.* 67(8) 3727-32.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos:

- 5 (a) un gen de toxina *pertussis* (*ptx*) mutado, en el cual la porción S1 de dicho gen *ptx* mutado codifica una toxina, que es enzimáticamente inactiva pero no está afectada inmunológicamente,
 (b) un gen dermonecrótico (*dnt*) eliminado o un gen *dnt* mutado, donde dicho gen *dnt* mutado está mutado por mutación puntual o por inserción de una secuencia genética o un plásmido que interrumpe el marco de lectura abierto del gen *dnt*, y en donde dicho gen *dnt* mutado codifica una proteína DNT enzimáticamente
 10 inhibida, y
 (c) un gen *ampG* de *E. coli* que sustituye el gen *ampG* de *Bordetella*,

donde dicha cepa expresa menos de 5% de actividad de TCT residual.

15 2. La cepa de *Bordetella* mutada según la reivindicación 1, en la que dicha mutación puntual del gen *dnt* resulta en el reemplazo de Cys-1305 por Ala-1305.

3. La cepa de *Bordetella* mutada según la reivindicación 1 o 2, que es una cepa de *Bordetella pertussis*.

20 4. La cepa de *Bordetella* mutada según la reivindicación 3, donde dicha toxina enzimáticamente inactiva que mantiene sus propiedades inmunógenas se obtiene reemplazando la arginina de la posición 9 por una lisina y el ácido glutámico de la posición 129 por una glicina.

25 5. La cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es una cepa triplementemente mutante.

6. La cepa de *Bordetella* triplementemente mutada según la reivindicación 5, que es una cepa BPZE1 depositada en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (C.N.C.M.) el 9 de marzo de 2006, con el número I-3585.

30 7. La cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que está atenuada.

8. La cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además al menos una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un ARN o una proteína.

35 9. La cepa de *Bordetella* mutada según la reivindicación 8, donde dicha al menos una secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica un antígeno.

40 10. La cepa de *Bordetella* atenuada según la reivindicación 7, para usar como una vacuna contra las infecciones causadas por especies de *Bordetella*, donde dicha(s) especie(s) de *Bordetella* es o son al menos una entre *B. pertussis*, *B. parapertussis*, y *B. bronchiseptica*.

45 11. La cepa de *Bordetella* atenuada según la reivindicación 10, para usar como una vacuna profiláctica contra las infecciones causadas por especies de *Bordetella*, donde dicha(s) especie(s) de *Bordetella* es o son al menos una entre *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*.

50 12. Una composición inmunógena que comprende una cepa de *Bordetella* mutada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

13. La composición inmunógena según la reivindicación 12, que contiene además un excipiente, vehículo y/o portador farmacéuticamente adecuado.

14. La composición inmunógena según la reivindicación 12 o 13, que contiene además un adyuvante.

55 15. Una vacuna que comprende la cepa de *Bordetella* atenuada de la reivindicación 7.

16. Una vacuna según la reivindicación 15, formulada para la administración intranasal.

17. Un kit que comprende una vacuna según la reivindicación 15 o 16 y un prospecto.

60 18. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según la reivindicación 7, para la fabricación de una vacuna destinada a la prevención de una infección por *Bordetella*, donde dicha especie(s) de *Bordetella* es o son una entre *B. pertussis*, *B. parapertussis*, y *B. bronchiseptica*.

19. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según la reivindicación 7, para la fabricación de una vacuna

destinada a la prevención simultánea de una infección por *B. pertussis* y *B. parapertussis*.

- 5 20. El uso de una *Bordetella* atenuada según la reivindicación 18 o 19, donde la vacuna se administra por vía subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), oral o intranasal, por inyección o por inhalación.
21. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según la reivindicación 18 o 19, donde la vacuna se administra por vía intranasal.
- 10 22. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según la reivindicación 18 o 19, donde la vacuna se administra a mamíferos que necesitan una rápida inmunidad protectora contra una infección por *Bordetella*.
23. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según la reivindicación 22, donde la vacuna se administra a recién nacidos.
- 15 24. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según la reivindicación 22, donde la vacuna se administra a niños.
25. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, donde la vacuna se administra por vía intranasal.
- 20 26. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, donde la vacuna se administra una vez en una sola dosis.
- 25 27. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según la reivindicación 18 o 19, que comprende a) administrar una cepa según la reivindicación 7; y b) llevar a cabo al menos un refuerzo con la misma cepa o con una vacuna acelular o una combinación de ambas.
- 30 28. El uso de la cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos (a) un gen *ptx* mutado, donde la porción S1 de dicho gen *ptx* mutado codifica una toxina, que es enzimáticamente inactiva pero que no está afectada inmunológicamente, (b) un gen *dnt* eliminado o un gen *dnt* mutado, donde dicho gen *dnt* mutado está mutado por mutación puntual o por inserción de una secuencia genética o un plásmido que interrumpe el marco de lectura abierto del gen *dnt*, y donde dicho gen *dnt* mutado codifica una proteína DNT inhibida enzimáticamente, y (c) un gen *ampG* de *E. coli* que reemplaza el gen *ampG* de *Bordetella*, donde dicha cepa expresa menos de 5% de actividad de TCT residual, para la preparación de una vacuna polivalente destinada a tratar enfermedades respiratorias.
- 35 29. El uso de la reivindicación 28, donde dicha mutación puntual del gen *dnt* resulta en el reemplazo de Cys-1305 por Ala-1305.
- 40 30. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 29, donde el nivel de protección contra una infección por *Bordetella* es superior al 95%, preferentemente superior al 99%.
- 45 31. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según la reivindicación 7, para la fabricación de la vacuna destinada a proporcionar una respuesta en las mucosas y una respuesta sistémica para tratar las infecciones por *Bordetella* en mamíferos.
32. El uso de una cepa de *Bordetella* atenuada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para utilizar como un vector destinado a expresar al menos un antígeno heterólogo.

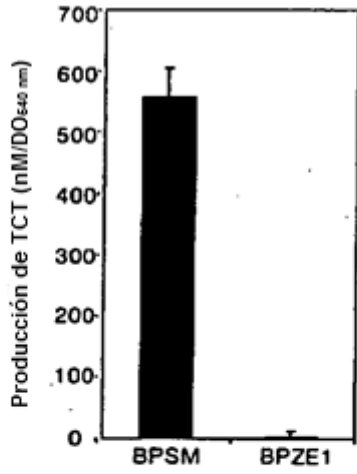


Fig. 1

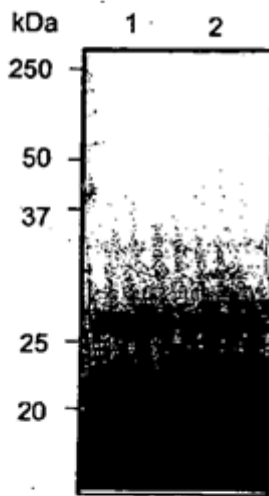


Fig. 2

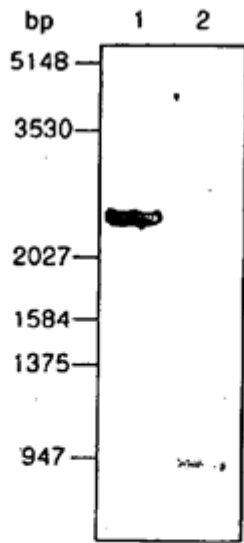


Fig. 3

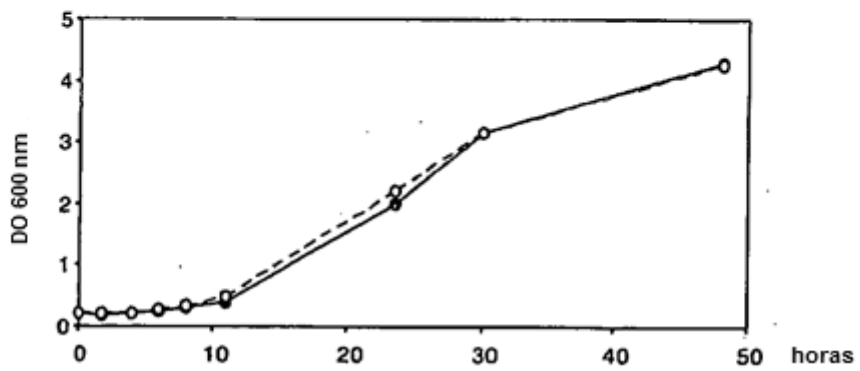


Fig. 4

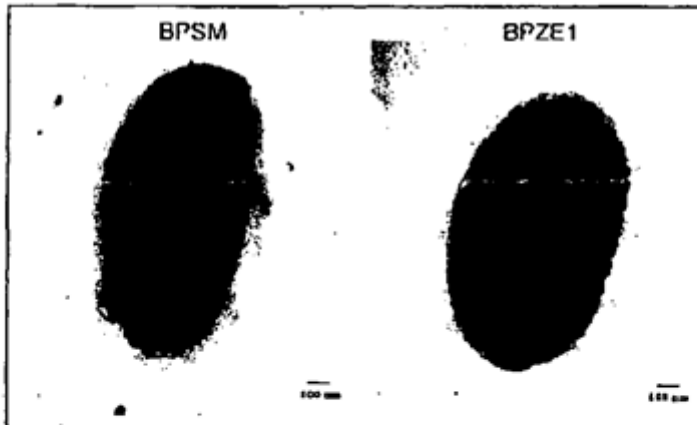


Fig. 5

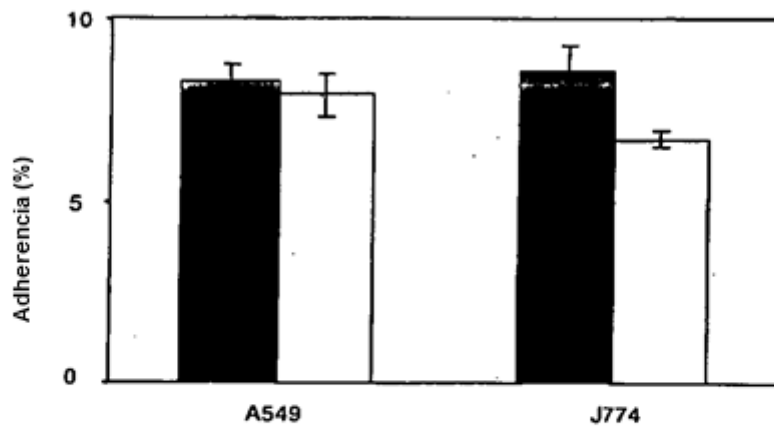


Fig. 6

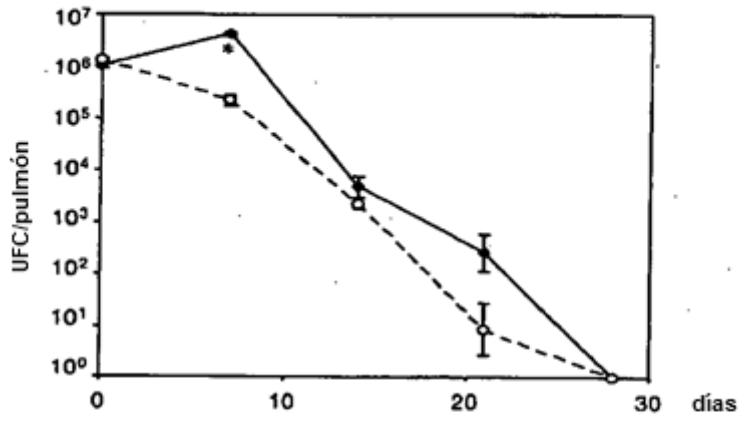


Fig. 7

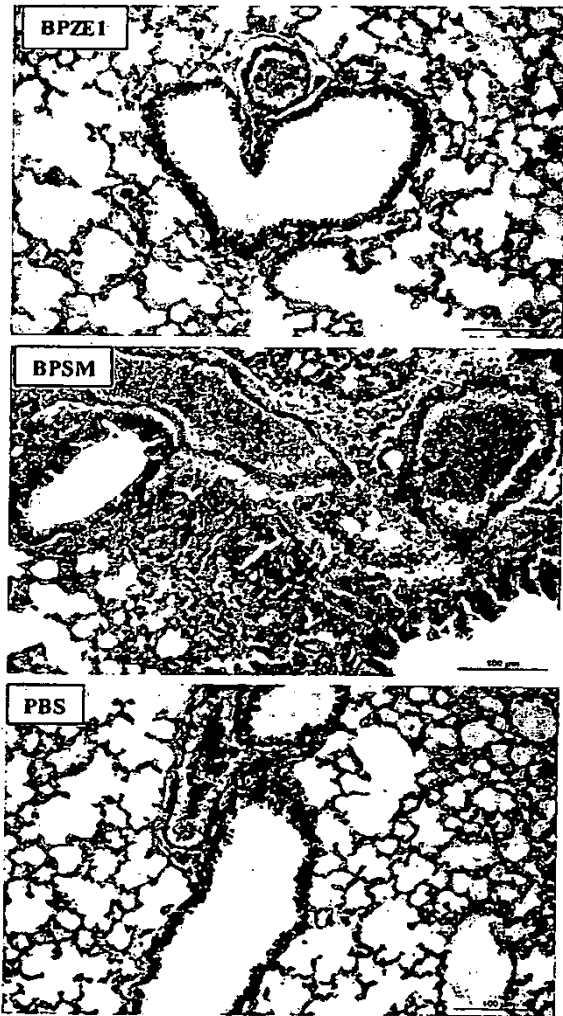


Fig. 8

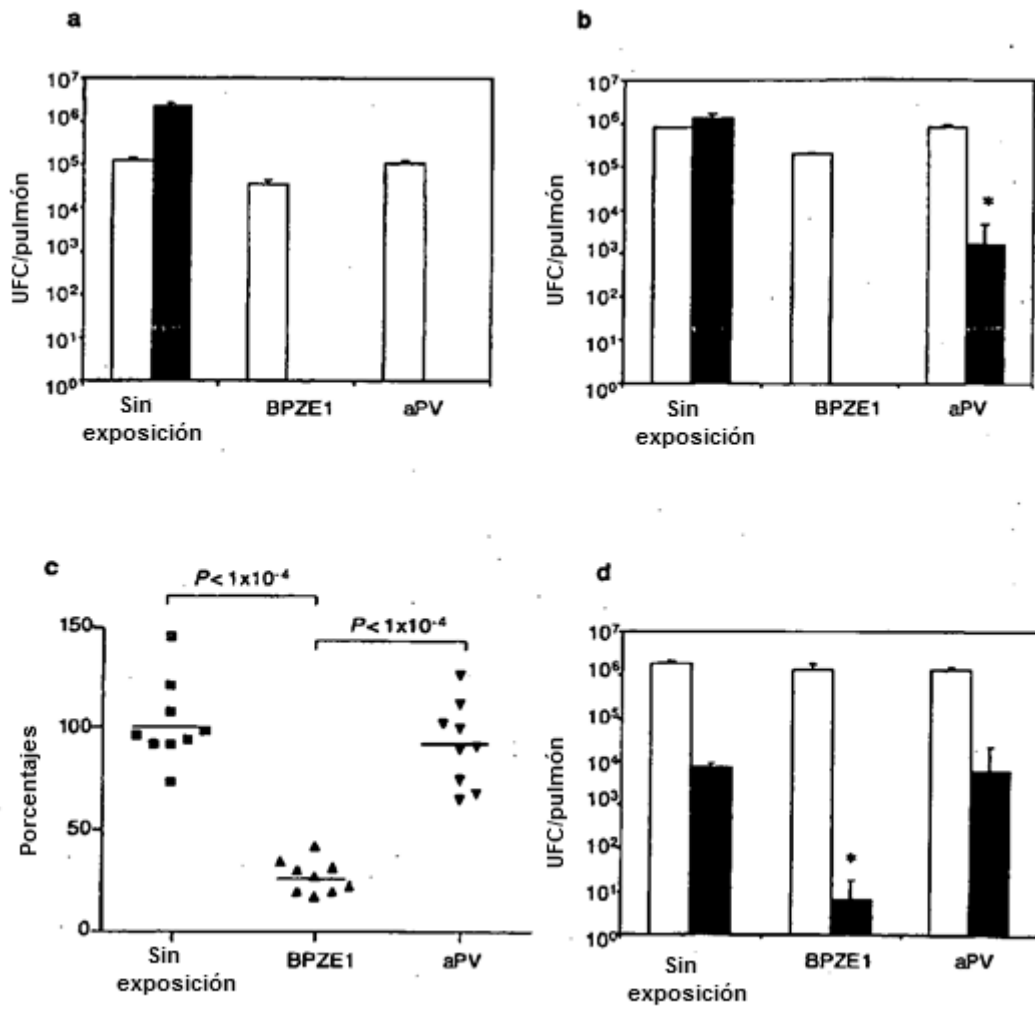


Fig. 9

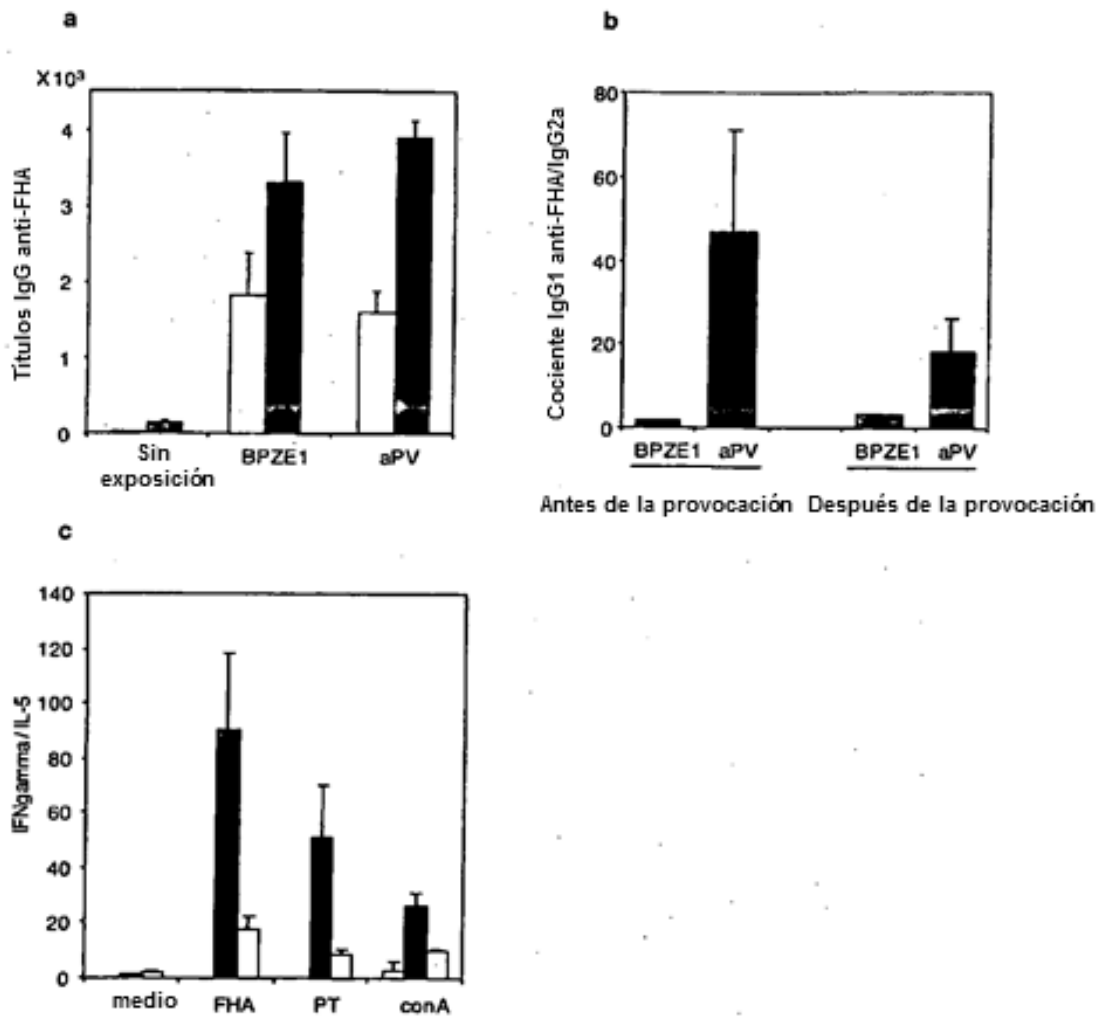


Fig. 10

Proteína S1 activadora de islotes (NP_882282)

MRCRAIRQTARTGWLTLWLA I LAVTAPVTSPA WADDPPATVYRYDSRPPEDVF
 QNGFTAWGNNDNVLDHLTGRSCQVGSNSAFVSTSSRRRYTEVYLEHRMQEAV
 EAERAGRGTGHFIGYIYEV RADNNFYGAASSYFEYVD TYGDNAGRILAGALAT
 YQSEYLAHRRIPPENIRRVTRVYHNGITGETTTTEYSNARYVSQQTRANPNPY
 TSRRSVASIVGTLVRMAPVIGACMARQAESSEAMA AW SERAGEAMVLVYYESI
 AYSF

Fig. 11

Toxina dermonecrótica (NP_881965)

MDKDESALRQLVDMALVGYDGVVEELLALPSEESGDLAGGRAKREKAEFALFS
 EAPNGDEPIGQDARTWFYFPKYRPVAVSNLKKMQVAIRARLEPESLILQWLIA
 LDVYLGVLIAALSRTVISDLVFEYVKARYEIIYLLNRVPHPLATAYLKRRRQR
 PVDRSGRLGSVFEHPLWFPAYDELAGTVDLADIEQALAESIERRMDGEPDDG
 SLDTAEHDVWRLCRDGINRGEQAI FQASGPYGVVADAGYMRTVADLAYADALA
 DCLHAQLRIRAQGSVDS PGDEMPRKLDAWEIAKFHLAATQQARVDLLEAAFAL
 DYAAALRDVRVYGDYRNALALRFIKREALRLLGARRGNASTMPAVAAGEYDEIV
 ASGAANDAAAYVSMAAALIAGVLCDESAQRTL PVVLARFRPLGVLARFRRLEQ
 ETAGMLLDQEPPEPRGFI SFTDFRDSDAFASYAEYAAQFNIDYIDQYSILEAQR
 LARILALGSRMTVDQWCLPLQKVRHYKVLTSQPGLIARGIENHNRGIEYCLGR
 PPLTDLPGLFTMFQLHDSSWLLVSNINGELWSDVLANA EVMQNPTLAALAEPQ
 GRFRTGRRRTGGWFLGGPATEGPSLRDNYLLKLRQSNPGLDVKKCWYFGYRQEY
 RLPAGALGVPLFAVSVALRHSLLDDLAHAKSALYKPSEWQKFAFWIVPFYREI
 FFSTQDRSYRVDVGSIVFDSISLLASVFSIGGKLSFTRTQYGNLRNFVVRQR
 IAGLSGQRLWRSVLKELPALIGASGLRLSRSLLDLYEIFEPVPIRRLVAGFV
 SATTVGGRNQAFRLRQAFSAASSAGRTGGQLASEWRMAGVDATGLVESTSGGR
 FEGIYTRGLGPLSECTEHFIVESGNAYRVIWDAYTHGWRVVNGRLPPRLTYTV
 PVRLNGQGHWETHLDVPGRGGAPEIFGRIRTRNLVALAAEQAAPMRLLNQAR
 RVALRHIDTCRSRLALPRAESDMDAAIRIFFGEPDAGLRQRIGRRLQEVRAI
 GDLSPVNDVLYRAGYDLDDVATL FNAVD RNTSLGRQARMELYLDAIVDLHARL
 GYENARFVDLMAFHLLSLGHAATASEVVEAVSPRLLGNVFDISNVAQLERGIG
 NPASTGLFVMLGAYSESSPAIFQS FVNDIFPAWRQASGGGPLVWNFGPAAISP
 TRLDYANTDIGLLNHGDISPLRARPPLGGRRIDLPPGLDISFVRYDRPVRMS
 APRALDASVFRPVDGPVHGYIQSWTGAEIEYAYGAPAAAREVMLTDNVRIISI
 ENGDEGAIGVRVRLDTPVPVATPLILTGGSLSGCTTMVGVKEGYLAFYHTGKST
 ELGDWATAREGVQALYQAHLAMGYAPISIPAPMRNDDLVSIAATYDRAVIAYL
 GKDVPPGGGSTRITRHDEGAGSVVSFDYNAAVQASAVPRLGQVYVLI SNDGQGA
 RAVLLAEDLAWAGSGSALDVLNERLVTLPAPV

Fig. 12

Proteína AmpG (NP_878961.1)

MAPLLVLGFASGLPLALSSGTLQAWATVENVSLQSIGFLTLAGTAYTLKFLWA
PLIDRYVPPFLGRRRGWMLLTQVLLAAAIMVMGMLSPGSALLPLALVAVLVAF
LSASQDIAFDAYSTDVLRQEERGAGAAMRVMGYRLAMIVSGGLALIVADRWL
WGNTYVLMGGLMLACALGTLWAPEPERPANPPRDLGAAVVEPFREFFSRRGAI
DMLLLIVLYKLGDAFAGALSTTFLLRGAGFSATEVGTVNKVLGLAATIVGALA
GGSIMTRWGLYRSLMAFGLLQAVSNLGYWLIIVSPKNLYLMGLAVGVENLCGG
LGTASFVALLMAMCRQQFSATQFALLSALAAVGRTYLAGPLTPVLVEWLDWPG
FFIVTVLIALPGLWLLRLRRNVIDELDAQTAR

Fig. 13

Proteína AmpG (NP_752478.1)

MSSQYLRIFFQQPRSAILLILGFASGLPLALTSGLQAWMTVENIDLKTIGFFS
LVGQAYVFKFLWSPLMDRYTPPFFGRRRGWLLATQILLLVAIAAMGFLEPGTQ
LRWMAALAVVIAFCSASQDIVFDAWKTDVLPAAEERGAGAAISVLGYRLGMLVS
GGLALWLADKWLGWQGMWYWLMAALLIPCI IATLLAPEPTDTIPVPKTLQAVV
APLRDFFGRRNNAWLILLIIVLYKLGDAFAMSLTTTFLIRGVGFDAGEVGVVVK
TLGLLATIVGALYGGILMQRLSLFRALLIFGILQGASNAGYWLLSITDKHLYS
MGAAVFFENLCGGMGTSAFVALLMTLCNKSFSAATQFALLSALS AVGRVYVGPV
AGWFVEAHGWSTFYLFVAAAVPGLILLVCRQTLEYTRVNDNFISRTEYPAG
YAFAMWTLAAGISLLAVWLLLLTMDALDLTHFSFLPALLEVGVVVALSGVVVG
GLLDYLALRKTHLM

Fig. 14