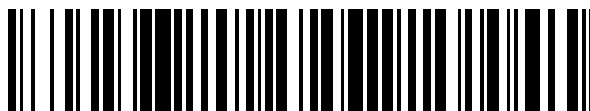


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 138**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 39/10 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012** **PCT/TH2012/000052**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013** **WO13141823**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012** **E 12871942 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017** **EP 2802646**

54 Título: **Cepas de Bordetella pertussis modificadas**

30 Prioridad:

21.12.2011 ZA 201109417

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2017

73 Titular/es:

BIONET-ASIA CO. LTD (100.0%)
19 Soi Udomsuk 37 Sukhumvit 103 Road Bangjak
Prakanong
Bangkok 10260, TH

72 Inventor/es:

PETRE, JEAN;
PANBANGRED, WATANALAI;
BOONCHIRD, CHUENCHIT y
BUASRI, WASIN

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 642 138 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 pertussis* modificadas

5 Campo de la invención

La presente invención describe la construcción de cepas de *Bordetella pertussis* recombinantes derivadas de una cepa original designada Tohama y usando el vector pSS4245 para la integración de mutaciones y copias adicionales de genes.

10 Antecedentes de la invención

Pertussis o tos ferina es una enfermedad de los lactantes grave provocada por la infección de *Bordetella pertussis* de las vías respiratorias altas [1]. Durante décadas ha habido vacunas disponibles, que consisten en células completas inactivadas de *B. pertussis*. Se administran como combinación trivalente de difteria-tétanos-pertussis o combinaciones más nuevas que también proporcionan inmunidad frente a la hepatitis B y enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* tipo b [2]. El uso de vacunas de células completas se ha reducido, disuadió o incluso prohibido en algunos países debido a su perfil de seguridad cuestionable, que se debe a altos niveles de endotoxina y otras toxinas bacterianas asociadas con las células completas inactivadas [3, 4].

Las vacunas acelulares, nombradas por el hecho de que no contienen células completas sino únicamente antígenos bacterianos parcial o extensamente purificados, se introdujeron en Japón en 1981 [5]. La mayor pureza de los antígenos de componente en las vacunas acelulares se tradujo en un perfil de seguridad clínico mejorado. Estas vacunas se introdujeron a mediados de los años 90 en países industrializados después de ensayos de campo extensos que demostraron su seguridad y eficacia [6]. Sin embargo, se obstaculizó una introducción más amplia por la OMS en el Programa Expandido de Inmunización debido al coste significativamente más alto de las vacunas acelulares.

Un factor de virulencia principal de *B. pertussis* es la toxina pertussis (PT) [7, 8] y toxoide pertúsico (PTd) es el principal antígeno en vacunas acelulares [8]. Al contrario que las toxinas diftéricas y tetánicas, que pueden inactivarse mediante tratamiento simple con formaldehído, PT demostró ser más difícil de inactivar mediante medios químicos [9]. Actualmente, se usan diferentes procesos de inactivación para producción comercial. Todos tienen en común desnaturalización extensa de PT provocada por el tratamiento químico. Se exploraron dos vacunas candidatas usando una toxina genéticamente inactivada (rPT) [10-12] y uno de estos candidatos se incluyó en un ensayo de eficacia de campo [11-12].

Sin embargo, aún no están disponibles vacunas que contienen rPT.

40 Sumario de la invención

Según una primera realización de la invención, se proporciona una cepa de *Bordetella pertussis* genéticamente modificada, en la que el gen *S1* de toxina pertussis tiene las mutaciones Arg9→Lys9 y Glu129→Gly129, no incluye ningún gen de resistencia a antibióticos y puede expresar toxina pertussis detoxificada (rPT).

Puede usarse el vector pSS4245 para introducir las mutaciones de *S1* sin integración de un gen de resistencia a antibióticos.

La cepa modificada puede ser una cepa Tohama.

La cepa puede haberse modificado adicionalmente mediante integración de al menos una copia del operón *ptx* en una región no funcional del cromosoma de la cepa modificada, en la que el operón *ptx* integrado comprende un conjunto de genes *S2* - *S5* y un gen *S1* que se ha modificado para incluir las mutaciones Arg9→Lys9 y Glu129→Gly129, teniendo de este modo la cepa modificada dos operones *ptx* que se ubican separados en el cromosoma, y pudiendo expresar niveles potenciados de toxina pertussis detoxificada en relación con una cepa con sólo un operón *ptx*; y/o mediante integración de al menos una copia de un gen *prn* que codifica para pertactina en una región no funcional del cromosoma de la cepa modificada, teniendo de este modo la cepa modificada al menos dos genes *prn* que se ubican separados en el cromosoma y pudiendo expresar niveles potenciados de pertactina en relación con una cepa con sólo un gen *prn*; en la que la cepa modificada no incluye ningún gen de resistencia a antibióticos integrado.

Puede usarse el vector pSS4245 para introducir la copia del operón *ptx* y/o gen *prn* en la cepa modificada sin integración de un gen de resistencia a antibióticos.

La copia del operón *ptx* y/o gen *prn* puede integrarse dentro de o entre pseudogenes no funcionales.

La cepa puede comprender al menos dos operones *ptx* modificados y/o al menos dos genes *prn*.

Según una segunda realización de la invención, se proporciona un método de producción de una cepa de *B. pertussis* modificada, comprendiendo el método la etapa de introducir las mutaciones Arg9→Lys9 y Glu129→Gly129 en el gen *S1* de una cepa de *B. pertussis*, dando como resultado de este modo que se produzca una cepa modificada que puede expresar toxina pertussis detoxificada (rPT) y que no incluye ningún gen de resistencia a antibióticos.

Puede usarse el vector pSS4245 para introducir las mutaciones de *S1* en la cepa modificada sin integración de un gen de resistencia a antibióticos.

La cepa de *B. pertussis* usada puede ser una cepa Tohama.

El método puede incluir además la etapa de integrar al menos una copia del operón *ptx* en una región no funcional del cromosoma de la cepa modificada, en el que el operón *ptx* integrado comprende un conjunto de genes *S2* - *S5* y un gen *S1* que se ha modificado para incluir las mutaciones Arg9→Lys9 y Glu129→Gly129, produciendo así una cepa modificada que tiene al menos dos operones *ptx* que se ubican separados en el cromosoma y pudiendo expresar niveles potenciados de toxina pertussis detoxificada en relación con una cepa con sólo un operón *ptx*; y/o la etapa de integrar al menos una copia de un gen *prn* que codifica para pertactina en una región no funcional del cromosoma de la cepa modificada, produciendo así una cepa modificada que tiene al menos dos genes *prn* que se ubican separados en el cromosoma y pudiendo expresar niveles potenciados de pertactina en relación con una cepa con sólo un gen *prn*; en el que el operón *ptx* y/o gen *prn* se integra sin integración de ningún gen de resistencia a antibióticos.

Puede usarse el vector pSS4245 para introducir la copia del operón *ptx* y/o gen *prn* en la cepa modificada sin integración de un gen de resistencia a antibióticos.

El operón *ptx* y/o el gen *prn* pueden integrarse en o entre pseudogenes no funcionales.

Puede insertarse una copia del operón *ptx* modificado y una copia del gen *prn* en el cromosoma de la cepa modificada.

Según una tercera realización de la invención, se proporciona un método de producción de antígenos de *Bordetella pertussis* que comprende las etapas de: cultivar una cepa de *B. pertussis* genéticamente modificada descrita anteriormente en un medio de cultivo para efectuar la expresión de los antígenos, en el que los antígenos incluyen toxina pertussis detoxificada (rPT), pertactina y hemaglutinina filamentosa (FHA) codificados por genes presentes en la cepa; y recuperar los antígenos del medio de cultivo o extracto celular para su uso como vacuna.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Estructura esquemática del vector de intercambio alélico pSS4245

Figura 2: Vectores para la construcción de un gen *S1* modificado en el vector de intercambio alélico pSS4245. A: Elemento de intercambio alélico para reemplazar el gen *S1* por un casete de resistencia a cloramfenicol, insertado entre las regiones flanqueantes de *S1*. B: Elemento de intercambio alélico para devolver el gen *S1* modificado a su ubicación exacta en el operón *ptx-ptl*. Para obtener el intercambio alélico, estos vectores se linealizan y se insertan en pSS4245, que se introduce entonces en *B. pertussis* mediante transferencia conjugativa de *E. coli* SM10.

Figura 3: Procedimiento de intercambio alélico. A: Acontecimientos de recombinación doble que conducen al reemplazo del gen *S1* por un marcador de resistencia a cloramfenicol. B: Acontecimientos de recombinación doble que conducen a la reinserción del gen *S1* modificado en su ubicación original.

Figura 4: Vectores para la inserción de una segunda copia del operón *ptx* en el cromosoma de *B. pertussis*. A: El sitio de inserción para una segunda copia del operón *ptx* se seleccionó entre dos genes abandonados que portaban cada uno dos mutaciones de desplazamiento del marco de lectura. B: Elementos de intercambio alélico usados para insertar un marcador de cloramfenicol en el sitio seleccionado. C: Estructura esquemática del operón *ptx* con su promotor original. Se clonó el terminador *ptx-ptl* y se insertó pasado el gen *S3*. Esta agrupación se integró finalmente en el derivado SS4245 para reemplazar el marcador de cloramfenicol y generar el segundo acontecimiento de intercambio alélico para insertar la segunda copia de los genes estructurales de PT.

Figura 5: Identificación de las mutaciones R9K y E129G en Bp-WWC y Bp-WWD. Se muestran los datos de secuencias sin procesar alrededor de las mutaciones para la cepa Bp-WWD, que tiene dos copias de la agrupación estructural de PT. Las alineaciones de secuencia correspondientes se muestran para *B. pertussis* Tohama (secuencia de consenso) y derivados Bp-WWC y Bp-WWD.

Figura 6: Vectores para la inserción de una segunda copia del gen *prn* en el cromosoma de *B. pertussis*. A: El sitio de inserción para una segunda copia del gen *prn* se seleccionó entre dos genes abandonados que portaban mutaciones de desplazamiento del marco de lectura y una delección. B: Estructura esquemática del gen *prn* bajo el

control del promotor *fha* y flanqueante con el sitio de integración diana. C: Estructura esquemática del gen *prn* bajo el control de su propio promotor y flanqueante con el sitio de integración diana.

Figura 7: Prueba de agrupación de células de CHO. Se crecieron las células hasta casi confluencia, luego se añadieron diluciones de PT y se puntuó la agrupación después de 2 días. A: 800 ng de PT (cepa Bp-WWC). B: Control, sin PT añadida. C: 2,6 pg de PT de tipo natural (cepa Tohama) correspondiente al umbral de detección. D: 43 pg de PT de tipo natural (cepa Tohama).

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describen cepas de *Bordetella pertussis* recombinantes derivadas de una cepa original designada Tohama. Las nuevas cepas se obtienen mediante recombinación homóloga usando un vector de intercambio alélico pSS4245 [41]. Este vector permite el reemplazo de secciones del cromosoma bacteriano sin dejar ninguna mutación accesorio.

Los genes para PT, FHA y pertactina (PRN) se han clonado y secuenciado [35-39]. La toxina pertussis es una proteína compleja compuesta por seis subunidades de polipéptido codificadas por cinco genes estructurales diferentes expresados a partir de un solo promotor. Sus actividades enzimáticas y la mayoría de las tóxicas están mediadas por su subunidad S1, mientras que sus propiedades de unión celular y mitogénicas se deben a otras subunidades que forman la subunidad B.

En una primera realización, el segmento que codifica para la subunidad S1 de PT se reemplazó para introducir dos mutaciones que provocan la inactivación de la actividad tóxica. En una segunda realización, una segunda copia de la agrupación *ptx* de los cinco genes estructurales de PT del operón *ptx-ptl* con su promotor y el terminador *ptl* y que contenía las mutaciones anteriores se insertó en otro sitio en el cromosoma. La organización de genes auxiliares *ptl* presentes en el operón *ptx-ptl* no se modificó. Esta cepa produjo cantidades aumentadas de rPT. En una tercera realización, una segunda copia del gen *prn* se insertó en el cromosoma. En ambos casos, se seleccionaron loci de genes abandonados como sitio de inserción para evitar la introducción de alteraciones genéticas no deseadas y la expresión de antígeno se impulsó por los promotores autólogos, sujeta por tanto a la misma regulación que en la cepa Tohama original.

PT e incluso más PRN, son los antígenos limitantes en cultivos de alta densidad, mientras que FHA se sobreproduce naturalmente por *B. pertussis* bajo estas condiciones. Sin embargo, pudo obtenerse PRN con alto rendimiento a partir de *E. coli* o *Pichia pastoris* recombinantes [14, 15] mientras que sólo las subunidades de PT pudieron expresarse en *E. coli* pero no se ensamblaron para dar la toxina madura y fueron insuficientemente inmunogénicas para considerarse candidatos de vacuna potenciales [16]. Ahora se entiende que el ensamblaje y la secreción de la toxina madura requieren varios genes auxiliares descubiertos en una fase más tardía, que forman parte de la sección *ptl* del operón *ptx-ptl* [17].

Aunque se ha notificado que una producción potenciada mediante la manipulación del número de copias de genes potencia la producción de toxinas bacterianas [18, 19], en particular PT [20], esto se ha usado ampliamente con vectores de plásmido de múltiples copias o se repitieron en tándem los genes. Esto puede tener consecuencias en la estabilidad genética de la cepa, en particular en un entorno de producción. Por ejemplo, las cepas de *B. pertussis* generadas por Lee *et al.* [40] que usan vectores de plásmido de múltiples copias no mostraron ningún aumento en la producción de PT, y el plásmido se reordenó, el operón de PT se delecionó o los transconjugantes experimentaron conversión a una fase avirulenta.

Contrario a los vectores de intercambio alélico usados anteriormente en *B. pertussis*, pSS4245 no requiere o deja mutaciones auxiliares en el cromosoma, en particular la mutación que afecta a *rpsL* que resulta de la selección de mutantes resistentes a estreptomicina espontáneos tal como se requiere en procedimientos de intercambio alélico anteriores [22]. Tales mutaciones que afectan a los genes constitutivos pueden perjudicar la virulencia y, por tanto, la expresión de factores de virulencia incluyendo PT, FHA y PRN. Las cepas de la presente invención producen niveles inalterados de los otros antígenos, en particular FHA, y pueden usarse para la producción de vacunas contra pertussis acelulares económicas.

Resultados

Mutación del gen *S1* en el cromosoma de *B. pertussis*

Para introducir las dos mutaciones R9K y E129G en la subunidad S1, se usó un enfoque de dos fases, para evitar la posibilidad de recombinación en la región entre las dos mutaciones, que provocaría la pérdida de una de las mutaciones. Este enfoque también permite la selección de las colonias deseadas mediante siembra en placas de repetición simple en medios selectivos. En primer lugar, se construyeron dos vectores de *E. coli* en pBluescript II SK+ donde el gen *S1* de tipo natural se reemplazó por un gen de resistencia a cloramfenicol (*Cm^R*) (figura 2A) o por un gen *S1* modificado que incluye las mutaciones deseadas (figura 2B), ambos flanqueados por 1,2-1,5 kB de las regiones de *S1* hacia 5' y hacia 3'. Entonces estos vectores se procesaron y se introdujeron sus insertos en

pSS4245. Estos derivados se transfirieron al *E. coli* SM10 para transferencia conjugativa e intercambio alélico en la cepa *B. pertussis* Tohama. El plásmido pSS5Cm3 generó un reemplazo del gen *S1* por el marcador *Cm^R* (figura 3A). El plásmido pSS5S13-9K-129G restableció el gen *S1* en su ubicación original, ahora con las dos mutaciones deseadas (figura 3B). Después de la selección de aislados en medios selectivos, se confirmó la integración del *Cm^R* y genes *S1* modificados en la posición esperada mediante amplificación por PCR (datos no mostrados). La integración del gen *S1* mutado en la ubicación esperada fue evidente tal como se confirma mediante PCR con cebadores específicos que podían unirse a las regiones flanqueantes hacia 5' y hacia 3' e internamente en el gen *S1* (datos no mostrados). Las mutaciones en el gen *S1* del clon seleccionado para elaboración adicional se confirmaron mediante secuenciación de ADN. La nueva cepa se designó Bp-WWC.

Inserción de un segundo sitio de integración para un segundo conjunto de genes estructurales de PT

Los intentos iniciales de aumentar la expresión de PT insertando el operón *ptx-ptl* completo en un plásmido de múltiples copias compatible con *B. pertussis* no han podido proporcionar cepas útiles, lo que sugiere que la sobreexpresión de PT es potencialmente tóxica y debe permanecer dentro de determinados límites para obtener cepas viables. Con el fin de aumentar el rendimiento de la toxina PT, se introdujo un segundo conjunto de genes estructurales de PT en el cromosoma de Bp-WWC. Para identificar un sitio de inserción diana, la secuencia del genoma de *B. pertussis* Tohama se examinó y se identificaron muchos pseudogenes. Se seleccionó la secuencia de ADN entre un gen transportador de amonio putativo y un gen autotransportador putativo para la inserción (posn. 2.903.988-2.905.228 y 2.905.291-2.908.277). Estos genes llevan cada uno mutaciones de desplazamiento del marco de lectura que estropean su funcionalidad (figura 4A). Se siguió la estrategia general señalada en la sección anterior. En primer lugar, se construyó el vector pSKPD5Cm3 de *E. coli* insertando el gen *Cm^R* dentro de las regiones que flanquean el sitio de integración seleccionado (figura 4B). Después de la inserción de las secuencias de interés en pSS4245, se seleccionó intercambio alélico mediante el marcador *Cm^R*. La integración del gen *Cm^R* en la posición designada se confirmó mediante PCR (datos no mostrados). En el segundo vector, se insertaron los cinco genes estructuras de PT *S1...S3* con el promotor *ptx* y el terminador *ptl* tras el *S3* dentro de las mismas regiones flanqueantes para generar el vector pSKptxter que incluye las dos mutaciones en *S1* (figura 4C). El intercambio alélico en el sitio de integración diana insertó una segunda copia de la agrupación funcional de los genes estructurales de PT en la cepa Bp-WWC. La nueva cepa se designó Bp-WWD. El resultado de integración se verificó mediante amplificación usando cebadores que se unían a regiones hacia 5' o hacia 3' y dentro del operón *ptx*, que mostró la integración esperada sin interrupción de las regiones en las que se había producido recombinación.

Secuenciación del gen S1 e identificación de las mutaciones R9K y E129G

Se aplicó secuenciación automática para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas. En el caso de la cepa Bp-WWD que tiene dos copias integradas del gen *S1*, la amplificación por PCR produce en principio una mezcla de las copias de los dos genes. Aparecería una mutación puntual inesperada en uno de los insertos como doble asignación de nucleótido en la posición correspondiente. El único pico de señal de fluorescencia en las posiciones R9K y E129G indicó la secuencia correcta en Bp-WWC y que las dos copias de *S1* en Bp-WWD tenían mutaciones idénticas. La secuencia alrededor de las dos mutaciones deseadas se notifica en la figura 5, que muestra los registros de secuenciación para la cepa Bp-WWD y las alineaciones de secuencia para Tohama de tipo natural, Bp-WWC y Bp-WWD.

Inserción de una segunda copia de los genes PRN en la cepa Bp-WWD

Debido a la limitación de la producción de PRN, se introdujo una segunda copia de gen estructural *prn* bajo el control del promotor *fha* y su propio terminador en el cromosoma de Bp-WWD entre los dos pseudogenes de pseudogen de glutatión S-transferasa putativo y de aspartato racemasa putativo (figura 6A). Se construyó el vector pSKPD2Cm3 de *E. coli* en el que se insertó el gen *Cm^R* entre las regiones hacia 5' y hacia 3' que flanquean el sitio de inserción seleccionado. Se construyó otro vector usando las mismas regiones flanqueantes y el gen *prn* bajo el control del promotor de FHA (figura 6B). Tras la inserción del marcador *Cm^R* en la ubicación deseada, se reemplazó el gen *Cm^R* por el bloque funcional de *prn* usando los procedimientos de selección de intercambio alélico y detección usuales.

Las cepas de *B. pertussis* aisladas a partir de esta construcción no expresaron PRN y finalmente el nivel de los demás antígenos no fue detectable. Se concluyó provisionalmente que el producto de PRN es tóxico si se sobreproduce bajo el control del promotor de FHA más fuerte y sólo los mutantes de escape que habían perdido la capacidad de producir PRN o todos los factores de virulencia fueron viables. Por tanto, se decidió introducir el promotor *prn* natural en lugar del promotor *fha*. Se usó pSKPD25FpPRN3 para reemplazar el promotor de FHA por el promotor de PRN original para generar un bloque funcional con su propio promotor y terminador natural (figura 6C). Se insertó este bloque funcional en el sitio seleccionado mediante el procedimiento habitual de intercambio alélico para obtener una cepa con una segunda copia no repetida en tándem del gen *prn* bajo el control de su propio promotor. La inserción esperada se confirmó mediante amplificación por PCR con cebadores que se unían a las regiones flanqueantes e internamente en el gen *prn*. Esta cepa era normalmente viable y se designó Bp-WWE.

Estabilidad genética de constructos de PT y PRN

La cepa Bp-WWE se cultivó y se subcultivó en serie en medio MSS para alcanzar aproximadamente un total de 50 generaciones. El último cultivo se diluyó y se sembró en placa en MSS-agar. Se seleccionaron aleatoriamente treinta colonias aisladas. Se analizaron treinta colonias para determinar sus genes *S1* y *pm* mediante PCR (datos no mostrados). El resultado mostró que todas las colonias contenían dos copias de genes *S1* y *pm* en las posiciones esperadas.

Expresión de PT y FHA en frasco de agitación

Se analizó la producción de PT y FHA en cultivos de frascos de agitación mediante ELISA. Los cultivos de frascos de agitación estaban en medio modificado Stainer-Scholte (MSS) que contenía heptakis(2,6-O-dimetil)- β -ciclodextrina [23, 24]. Los resultados de las cepas Bp-WWC y Bp-WWD se muestran en las tablas 1 y 2. La producción de PT se duplicó aproximadamente en la cepa Bp-WWD en comparación con Bp-WWC y wt. Tohama mostraba la correlación esperada del nivel de expresión y el número de copias de la agrupación de genes estructurales.

Tabla 1: Producción de PT por las cepas Tohama, Bp-WWC y Bp-WWD. Se hicieron crecer células en frascos de agitación durante 48 h (expt. n.º 1) o 20-24 h (expt. n.º 2) en medio MSS. Se muestran los resultados de dos frascos independientes para el expt. n.º 2. Después de recoger mediante centrifugación, se sometieron a ensayo los sobrenadantes mediante un ELISA directo con un anticuerpo policlonal de conejo (expt. n.º 1) o mediante un ELISA tipo sándwich usando un anticuerpo policlonal de conejo como reactivo de captura y un anticuerpo monoclonal específico de S2 (Abcam) para la detección.

Cepa	Medio	PT, $\mu\text{g/ml}$	
		Expt. n.º 1	Expt. n.º 2
Tohama de tipo natural	MSS	2,24	nd
Bp-WWC	MSS	2,64	2,1-2,6
Bp-WWD	MSS	5,25	4,5-5,3

Tabla 2: Producción de PT y FHA por las cepas Bp-WWC y Bp-WWD y Bp-WWE. Se hicieron crecer células en frascos de agitación durante 24 o 36 h en medio MSS. Después de recoger mediante centrifugación, se sometieron a ensayo los sobrenadantes para determinar PT y FHA mediante un ELISA tipo sándwich usando un anticuerpo policlonal de conejo como reactivo de captura y un anticuerpo monoclonal específico de S2 (Abcam) o un reactivo monoclonal de FHA (NIBSC) para la detección.

Cepa	Medio	PT, $\mu\text{g/ml}$		FHA, $\mu\text{g/ml}$	
		24 h	36 h	24 h	36 h
Bp-WWC	MSS	3,16	2,96	10,9	20,5
Bp-WWD	MSS	4,21	4,03	5,7	12,8
Bp-WWE	MSS	4,63	4,97	11,4	18,9

Expresión de PRN en frasco de agitación

La producción de PRN en cultivos de frascos de agitación de Bp-WWC, Bp-WWD y Bp-WWE crecidos en medio MSS. Puesto que la liberación de PRN de su precursor unido a membrana es el resultado de una escisión imprecisa por proteasas no identificadas [25], se determinó la expresión de PRN mediante análisis densitométrico de inmunotransferencia de tipo Western para evaluar también la integridad del antígeno. También se halló que en cultivos de fermentación de alta densidad, se libera espontáneamente una fracción significativa de PRN en el sobrenadante de cultivo a partir del precursor unido a membrana (observaciones no publicadas). Por tanto, se investigó si esta propiedad se modificó mediante las modificaciones genéticas introducidas. Se evaluó la PRN en los sobrenadantes de cultivo clarificados y en el extracto a 60°C de las células separadas. Los resultados se muestran en la tabla 3. La cantidad de toxina PRN en Bp-WWC y Bp-WWD fue similar. Se halló un aumento de dos veces en Bp-WWE mostrando de nuevo una buena correlación del nivel de expresión y el número de copias del gen. Sin embargo, con Bp-WWE, se aumentó la fracción de PRN hallada en el sobrenadante de cultivo aunque en estos cultivos de frascos, la fracción de sobrenadante permaneció pequeña o despreciable.

Tabla 3: Producción de PRN por las cepas Bp-WWC, Bp-WWD y Bp-WWE. Se hicieron crecer células en frascos de agitación durante 48 h. Se separaron el sobrenadante y las células mediante centrifugación. Se suspendieron las células en el volumen de cultivo original de tampón de extracción y se calentaron hasta 60°C durante 30 min, luego se centrifugaron de nuevo para recoger el extracto. Se evaluó la PRN en ambas fracciones mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Cepa	PRN, $\mu\text{g/ml}$		
	Extracto, $\mu\text{g/ml}$	Sobrenadante, $\mu\text{g/ml}$	Total
Bp-WWC	3,34	0,08 (2,3%)	3,42

Bp-WWD	3,04	0,04 (1,3%)	3,08
Bp-WWE	6,77	0,60 (8,2%)	7,37

El nivel de PRN en todos estos cultivos de frascos estaba bien por debajo de la concentración de PT y FHA en condiciones similares y aunque se produce PRN de manera menos eficiente que PT, este resultado no refleja los hallazgos realizados generalmente en cultivos de fermentación de alta densidad. Esta discrepancia puede explicarse por el hecho de que PRN es una proteína de la superficie celular mientras que PT y FHA se secretan y, por necesidad, en frascos de agitación, el tiempo de crecimiento está limitado para evitar la lisis celular y la degradación de antígeno, por tanto el tiempo de crecimiento de la biomasa está limitado a 24-36 h y los cultivos pueden alcanzar una DO₆₅₀ máxima de 1-1,5, que limita de manera correspondiente la fuente primaria de PRN.

Evaluación de la inactivación de PT

Se purificó PT a partir de sobrenadantes de cultivo mediante una modificación del proceso de Ozcengiz [26] en el que se reemplazó la precipitación de sulfato de amonio inicial por cromatografía de intercambio de ligandos [27, 28]. La toxicidad de la toxina PT de *B. pertussis* de tipo natural y Bp-WWC (PT genéticamente inactivada) se analizó y se comparó mediante agrupación de células de CHO [29]. Esta prueba tiene una sensibilidad mucho mayor que otros ensayos funcionales notificados para PT. La toxina nativa, purificada a partir de la cepa de *B. pertussis* Tohama demostró un punto final de agrupación a 2,6 pg por pocillo. La PT genéticamente inactiva no promovió la agrupación en sus concentraciones más altas obtenidas en esta prueba, concretamente 0,8-1,6 µg por muestra (figura 7). Esta prueba puede, por tanto, demostrar una reducción de la toxicidad por un factor de 5×10^5 a 10^6 , considerando las limitaciones impuestas por la baja solubilidad de PT. El resultado muestra que la toxina PT de Bp-WWC se inactivó satisfactoriamente mediante cinco reemplazos de nucleótidos dando como resultado dos sustituciones de aminoácido en la subunidad S1 de PT.

Discusión

La inserción y reemplazo de genes no marcados en estos experimentos fue satisfactoria usando pSS4245 como vector en *B. pertussis*. Tras la segunda recombinación homóloga que provocaba la escisión del plásmido, no se dejó ningún marcador de genes de antibiótico o ninguna marca en el cromosoma en comparación con el sistema con cre-lox [30] o los procedimientos de intercambio alélico anteriores usados en *Bordetella* [22]. Se notificó la sobreproducción de toxina PT genéticamente desactivada en 1992 [20] usando repeticiones en tándem de genes *ptx* u otra copia insertada en el gen *fha*. La cepa resultante sobreprodujo PT hasta 80 mg/l. Se sabe que los genes repetidos en tándem son una causa potencial de inestabilidad genética. Por esta razón, se examinó la secuencia genómica de *B. pertussis* para encontrar sitios de integración adecuados. La posición de ADN entre dos terminadores de pseudogenes se seleccionó como sitios de integración para la agrupación de *ptx*. El número de copias para la agrupación estructural de PT se limitó a dos, ya que la sobreproducción de estos factores de virulencia impone una carga en el metabolismo celular, que puede dar como resultado una tasa de crecimiento más lenta y finalmente inestabilidad genética, como habían sugerido los intentos preliminares.

Los inventores notificaron que la sobreexpresión del gen *pm* por el promotor *fha* para impulsar una expresión mayor fue aparentemente tóxica para la célula de *B. pertussis*, posiblemente en asociación con una expresión mayor de PT. Sus hallazgos no confirmaron el aumento de expresión de PRN mediante el reemplazo del promotor de PRN por un promotor más fuerte [21]. Por tanto, aumentar el número de copias del gen bajo el control del promotor de PRN nativo fue el enfoque seleccionado. El promotor *fha* de la segunda copia del gen se reemplazó por el promotor *pm* nativo para generar una cepa con una segunda copia del gen de PRN y se insertó su promotor nativo en otra ubicación en el cromosoma. La toxicidad de PRN con respecto a la célula huésped también se notificó en *E. coli* [31]. Entonces se reemplazó el promotor *fha* por el promotor *pm* nativo, la cepa resultante presentó crecimiento normal en frascos de agitación y produjo de manera correspondiente cantidades dobles de PRN. La distribución de PRN entre el sobrenadante del cultivo y el extracto celular estaba modificada en cierta medida con una mayor fracción de la PRN total en el sobrenadante aunque, en frascos de agitación, las cantidades que se liberaron de manera espontánea en el sobrenadante son mínimas.

Aunque el crecimiento en frasco de agitación está limitado debido al rápido aumento de pH y la intoxicación que resulta de la liberación de amoníaco por el metabolismo de la fuente de carbono glutamato [32], proporciona un indicio útil del potencial de la cepa en condiciones de fermentación optimizadas. Se demostró la construcción de cepas estables con expresión potenciada de PT (Bp-WWD) o de los dos antígenos limitantes PT y PRN (Bp-WWE). Con producción potenciada de PT sola, Bp-WWD solamente puede generar cantidades insuficientes de PRN y en este caso, se indicaría el uso de un suministro independiente de PRN en *E. coli* o *P. pastoris* recombinantes. Como el nivel de los dos antígenos PT y PRN se ha aumentado por igual con Bp-WWE, se espera que se obtengan cantidades coincidentes de los dos antígenos también en cultivos de alta densidad, simplificando así las operaciones de producción.

Conclusiones

Las cepas de *B. pertussis* que contiene una subunidad S1::R9K-E129G genéticamente modificada de PT se construyeron sin dejar ningún marcador o ninguna marca en su cromosoma. Se halló un aumento de dos veces de la

toxina PT en frascos de agitación mediante integración de 5 genes estructurales (*ptx* con *S1* mutado) bajo el control del promotor del operón *ptx-ptl* y terminador *ptl* entre dos pseudogenes en el cromosoma. La inactivación de PT se confirmó mediante ensayo de agrupación de células de CHO. Además, se aumentó la producción de PRN mediante integración de una segunda copia del gen *prn* entre otros pseudogenes en otro sitio en el cromosoma. Las cepas se hallaron genéticamente estables en subcultivos de frascos de agitación reproduciendo un mayor número de generaciones que sería necesario en fermentación a gran escala (>1000 l). Estas cepas, en particular Bp-WWE, en la que las cantidades relativas de los antígenos PT y PRN coinciden con la composición de vacunas, van a ser útiles para permitir la producción de vacunas acelulares contra pertussis económicas, contribuyendo a la reducción del coste mediante dosis menores requeridas por antígenos nativos para una inmunogenicidad adecuada y la mayor productividad de la cepa para los dos antígenos limitantes PT y PRN.

Métodos

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

Todos los productos químicos y reactivos usados en este estudio fueron o bien de calidad analítica o bien de calidad biología molecular. Los productos químicos se adquirieron de Merck y Sigma. Se obtuvieron medios de cultivo bacterianos de Difco (EE.UU) y Merck (Alemania). Las enzimas de restricción y de modificación se adquirieron de New England Biolabs (EE.UU).

Se usó *E. coli* DH5 α (Invitrogen, EE.UU) como huésped de clonación. Se hizo crecer esta cepa a 37°C en medio Luria Bertani (LB). Los transformantes de *E. coli* DH5 α se hicieron crecer en LB complementado con antibióticos adecuados: ampicilina (50 μ g/ml) o cloramfenicol (15 μ g/ml). Se obtuvo *E. coli* SM10 de Dr. Earle S. Stibitz (División de Productos Bacterianos, Parasíticos y Alergénicos, Centro para la Evaluación e Investigación de Productos Biológicos, Administración de Alimentos y Medicamentos, EE.UU), y se usaron como cepa donante de conjugación. Esta cepa se hizo crecer a 37°C en LB complementado con kanamicina (50 μ g/ml). Los transformantes de *E. coli* SM10 se hicieron crecer en LB complementado con kanamicina (50 μ g/ml), ampicilina (50 mg/ml) y neomicina (10 μ g/ml). Se obtuvo *B. pertussis* Tohama de ATCC y tiene el número de registro ATCC BAA-589 (*Bordetella pertussis* Tohama Ph. I cromosoma n.º de registro NC_002929, EMBL/GenBank n.º de registro BX470248, secuencia disponible del Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/bordetella.html>) [42]).

Las cepas de *B. pertussis* se hicieron crecer a 35°C en agar Bordet-Gengou (BG) o medio Stainer-Scholte modificado (MSS). Se obtuvo el plásmido pBluescript II SK+ de Stratagene, EE.UU, se obtuvo pSS4245 de Dr. Earle S. Stibitz y se obtuvo pACYC184 de New England Biolabs (EE.UU).

Tabla 4: Cebadores

Nombre	Secuencia	
5'F-PT-Sall	GCGGTCGACGGCGCGCAATGCGGCGCGGAC	Seq ID No: 1
	GGGGGCGGCGCGAGATCTCTAGACGGTACCATCGC	Seq ID No:2
5'R-PT-MCS 3'F-PT-XbaI	GCGACTTTGCGCCGAAGGA	
	CGTTCTAGACCTGGCCAGCCCCGCCAAC	Seq ID No:3
3'R-PT-BglII	GGCAGATCTGCAATTGAGCAGATCGCCGG	Seq ID No:4
CmF-KpnI	CGCGGTACCTGATGTCCGGCGGTGCTTTTG	Seq ID No:5
CmR-XbaI	AATCTAGATATCGTCAATTATTACCTCCAC	Seq ID No:6
S1F-PT-KpnI	GATGGTACCGGTACCGTCCGACCGTGCT	Seq ID No:7
S1R-PT-XbaI	CAGGTCTAGAACGAATACGCGATGCTTTTG	Seq ID No:8
R-R9K	GGGCGGGAGTCATACTTGATACGGTGGCGG	Seq ID No:9
F-R9K	CCGCCACCGTATACAAGTATGACTCCCGCCC	Seq ID No:10
F-E129G	CCACCTACCAGAGCGGGTATCTGGCACACCGG	Seq ID No:11
R-E129G	CCGGTGTGCCAGATACCCGCTCTGGTAGGTGG	Seq ID No:12
	GGAGGGCCCATGAACTCGTCATCGCCATCATCAAGCC	Seq ID No:13
5'F-PD-ApaI	C	
	TACGGTACCGGATCCCGCATCGCAACAACGGGGTCATC	Seq ID No:14
5'R-PD-MCS	GCGACCC	
	CGTTCTAGAACTAGTCCGCTACCAGGTGTAGCGATAGCC	Seq ID No: 15
3'F-PD-MCS	CAGGTG	
3'R-PD-BglII	TGTAGATCTCGGCGAGATACTTGCCTTCGGCGTTGTG	Seq ID No:16
PtxF-BamHI	TTGGGATCCAGCGCAGCCCTCCAACGCGCCATCC	Seq ID No:17
	TCTACTAGTAAGAATTCTCGCGGTATCCGTCAAGGAAA	Seq ID No:18
PtxR-MCS	AACATGGAC	
TerF-EcoRI	GCGGAATCCGCCTGCCGCCTGCACGCAT	Seq ID No:19
TerR-SpeI	TCCACTAGTCAAGGCATCGGGCGCCGCGC	Seq ID No:20
5'F-PD2-SpeI	CGCACTAGTCTATTCCAGCGGCGGGTCAAAATGGC	Seq ID No:21

5'R-PD2-MCS	CCCCAGGCGGCCGCTGTCTAGAGTGGATCCCAGGCCGA	Seq ID No:22
	TGCGTCCGCCGTGCAGGC	
3'F-PD2-XbaI	ATCTCTAGAATGGGCACCTCGGCCACGCTGGCGCTG	Seq ID No:23
	AAGTATCGCGGCCGATGAGCGAAACCTGTTGAAAGTA	Seq ID No:24
3'R-PD2-NotI	TC	
CmF-BamHI	CGCGGATCCTGATGTCCGGCGGTGCTTTTG	Seq ID No:25
FHAProF-BamHI	TCTGGATCCCTGCGCTGGCACCCGCGGCGGCCG	Seq ID No:26
	GCCTCTAGATTTCATATGATTCCGACCAGCGAAGTGAAGT	Seq ID No:27
FHAR-MCS	AAT	
PRNF-NdeI	CTGGTCGGCATATGAACATGTCTCTGTCACGCATTG	Seq ID No:28
PRNR-XbaI	GCCTCTAGAGCCTGGAGACTGGCACCGGCCAAGC	Seq ID No:29
PmProF-BamHI	CGGGGATCCGCACCCCTGGCCTGCGGGGCGGGACC	Seq ID No:30
PRNProR-NdeI	AGACATGTTTCATATGGATGCCAGGTGGAGAGCAGA	Seq ID No:31
5'F-int	CTAGCGTTCGCATACCAAATCCTTGC	Seq ID No:32
5'RCM-int	CCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGG	Seq ID No:33
3'FCM-int	TCTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAG	Seq ID No:34
3'R-int	AGCATGTTGCGGTGTTCCCGGAATG	Seq ID No:35
5'FPD-int	ATGACGGAAAGCCGCATGGGCATTGGGTCC	Seq ID No:36
3'RPD-int	TTCGTACGTGTTTCAGGTGCCGATTGCCGG	Seq ID No:37
5'FPD2-int	TGGGCTGGCTGTTCTGGCACGAAACG	Seq ID No:38
3'RPD2-int	TTCATCGAATCGGCGCTGATCCTGGC	Seq ID No:39
PRNF-int	AGGTGCAGCCATACATCAAGGCCAGC	Seq ID No:40

Clonación de regiones flanqueantes de S1 e inserción de un gen de cloramfenicol

Se usó el ADN cromosómico de la cepa de *B. pertussis* Tohama como material de fuente. La región hacia 5' del gen S1 se amplificó mediante PCR usando los cebadores 5'F-PT-SalI y 5'R-PT-MCS. El último contiene los sitios *KpnI*, *XbaI*, *BglII* y *NotI*. Se recuperó el producto de amplificación a partir del gel de agarosa y se purificó mediante el kit de extracción QIAEX II (Qiagen). Se digirió el producto de amplificación de 1287 pb con *SalI* y *NotI* y se clonó en el vector de *E. coli* pSKΔ*KpnI* digerido con las mismas enzimas. pSKΔ*KpnI* es un derivado de pBluescript II SK+ en el que el sitio *KpnI* se ha eliminado mediante digestión, llenado con la enzima Klenow y recircularización. Se transformó el constructo resultante mediante choque térmico en células competentes de *E. coli* DH5α y se designó pSK5'. La región hacia 3' se obtuvo del mismo modo mediante amplificación con los cebadores 3'F-PT-XbaI y 3'R-PT-BglII. El producto de 1531 pb se digirió con *XbaI* y *BglII* y se insertó el fragmento recuperado en pSK5' digerido con las mismas enzimas para obtener pSK53.

Se obtuvo el gen *Cm^R* a partir del plásmido pACYC184. Se amplificó el gen usando los cebadores CmF-*KpnI* y CmR-*XbaI*. Se purificó el producto de PCR de 1295 pb y se digirió con *KpnI* y *XbaI* y se insertó en pSK53 cortado con las mismas enzimas. El plásmido resultante se designó pSK5Cm3. Este plásmido incorpora el gen de resistencia a cloramfenicol flanqueado por las regiones hacia 5' y hacia 3' del gen S1 (figura 2A).

Intercambio del gen S1 mediante recombinación homóloga

Para realizar el intercambio alélico en *B. pertussis*, se usó el vector recién desarrollado pSS4245 (figura 1). No se ha publicado una descripción completa de este vector y, por tanto, en el presente documento se notifica una perspectiva general de esta estructura. Este vector se diseñó específicamente para intercambio alélico en especies de *Bordetella*. Contiene un sitio de clonación de múltiples ligadores en el que pueden insertarse el gen de interés y sus secuencias flanqueantes en el cromosoma, varios genes de resistencia a antibióticos, incluyendo ampicilina, usados para seleccionar el vector y sus derivados en *E. coli*. El origen de replicación se deriva de pBR322, que implica que el vector puede replicarse en *E. coli* pero es suicida en *B. pertussis*. También existe un gen de estreptomicina fosfotransferasa derivado de Tn5: este gen confiere resistencia a estreptomicina a *B. pertussis* pero no a *E. coli* [33]. La transferencia conjugativa entre un *E. coli* donante y un *B. pertussis* receptor puede ocurrir debido a la presencia de un origen de transferencia derivado del plásmido RP4. Esto requiere el uso de *E. coli* SM10 como cepa donante, que proporciona en trans las funciones conjugativas necesarias derivadas de RP4 [22]. La conjugación ocurre meramente cultivando juntos en línea el *B. pertussis* receptor y el *E. coli* donante sobre placas de agar que soportan el crecimiento de las dos bacterias. Puesto que el vector es suicida en *B. pertussis*, la estreptomicina selecciona células de *B. pertussis* que han integrado todo el vector y su marcador *Str^R* mediante recombinación homóloga en una de las regiones que flanquean el gen de interés y al mismo tiempo elimina el *E. coli* donante. Para resolver esto, cointegrar y eliminar la mayor parte del vector salvo el gen de interés, pSS4245 incorpora el gen I-SceI meganucleasa junto con el sitio de escisión correspondiente (figura 1) [34]. La nucleasa se ubica bajo el control del promotor del operón *ptx-ptl*. No hay sitio de escisión correspondiente en el cromosoma de *B. pertussis*. La selección de cointegrados ha de llevarse a cabo en condiciones de modulación, donde todos los factores de virulencia de *B. pertussis* incluyendo PT están suprimidos. Esta condición se obtuvo añadiendo ácido nicotínico 20 mM a las placas de MSS-agar usadas en el proceso de emparejamiento. La transferencia de la mezcla de exconjugantes a MSS-agar sin ácido nicotínico añadido libera la represión del promotor *ptx* y, por tanto, la I-SceI

nucleasa se expresa entonces. Esto provoca una rotura de dobles cadenas en el cromosoma bacteriano al nivel del sitio de nucleasa en el vector integrado. Este acontecimiento es letal si no se repara. El daño al ADN también activa la respuesta SOS para la reparación: la frecuencia de recombinación se aumenta en 2-3 log y la lesión se elimina finalmente mediante una segunda recombinación homóloga [34]. En cualquier caso, se pierde la mayor parte del vector. Si ocurre la segunda recombinación en la misma región flanqueante, la cepa original se regenera, si ocurre en la otra región flanqueante, se obtiene la cepa deseada. Necesitan examinarse algunas colonias para determinar su estado de resistencia a cloramfenicol como con las regiones flanqueantes que son de aproximadamente el mismo tamaño, los dos tipos de cepas resultantes, concretamente original y recombinante, se distribuyen aproximadamente por igual.

Se digirió el plásmido pSK5Cm3 con *SacI* y *BglII* y se ligó el fragmento recuperado en pSS4245 cortado con *SacI* y *BamHI*. Tras la transformación en *E. coli* SM10, el plásmido resultante se designó pSS5Cm3. Se rasparon cultivos nuevos de la cepa de *B. pertussis* Tohama (4 días en MSS-agar con ácido nicotínico 20 mM) y de *E. coli* SM10 que alberga el vector (durante la noche en LB-agar con ampicilina, kanamicina y cloramfenicol) y se mezclaron en placas de agar que contenían LB:MSS (1:1) con ácido nicotínico 20 mM y $MgCl_2$ 10 mM. Después de 3 h a 35°C, la mezcla se aplicó con hisopo en MSS con ácido nicotínico 20 mM, estreptomicina 50 µg/ml y cloramfenicol 5 µg/ml. El crecimiento del hisopo se cultivó en línea en MSS-agar con cloramfenicol 5 µg/ml para el segundo acontecimiento de recombinación. Las colonias individuales resultantes se sometieron a prueba mediante siembra en placas de repetición y algunas colonias con el fenotipo Sm^S y Cm^R se retuvieron para pruebas adicionales (figura 3A). Las colonias se confirmaron como *B. pertussis* mediante amplificación por PCR con cebadores específicos de *B. pertussis*. La integración del gen Cm^R en la posición designada se confirmó mediante PCR con los cebadores que se unían específicamente a las regiones flanqueantes hacia 5' (cebadores 5'F-int y 5'RCMint) y hacia 3' (cebadores 3'FCM-int y 3'R-int) e internamente en el gen Cm^R . A partir del análisis por PCR, se confirmó que las regiones flanqueantes 5' y 3' estaban presentes y que el gen Cm^R se había insertado en la ubicación esperada en lugar del gen *S1*. Estas verificaciones también confirmaron que el proceso de intercambio alélico no había provocado ninguna alteración en las regiones flanqueantes de *S1* en las que había tenido lugar la recombinación.

Construcción de un gen *S1* modificado

El gen *S1* se clonó mediante amplificación por PCR y se mutó mediante mutagénesis de sitio dirigido por PCR. Los cebadores S1F-PT-*KpnI* y S1R-PT-*XbaI* se usaron para amplificar el gen del ADN cromosómico. El producto de PCR purificado se digirió con *XbaI* y *KpnI* y el fragmento de 908 pb recuperado se ligó en pSK53 cortado con las mismas enzimas. Tras la transformación y selección de colonias, el plásmido resultante se designó pSK5S13.

La mutagénesis de sitio dirigido por PCR usó los cebadores F-R9K y R-R9K internos con el apareamiento erróneo de la secuencia CGC→AAG, provocando la sustitución R9K. Estos cebadores se usaron en ciclos de reacción separados. Entonces, se combinaron los productos de amplificación y se continuó la amplificación durante 4-5 ciclos tras la hibridación. Los cebadores externos se añadieron entonces a la reacción para generar el fragmento de *S1* entero que contenía la mutación deseada. Se aplicó el mismo procedimiento para generar la segunda mutación usando los cebadores de apareamiento erróneo internos F-E129G y RE129G, para la generar la secuencia GAA→GGG, provocando la sustitución E129G.

Se digirió el fragmento resultante con *XbaI* y *KpnI* y se insertó en pSK53 cortado con las mismas enzimas para obtener el plásmido pSK5S13-9K-129G (figura 2B). Esto se digirió con *SacI* y *BglII* y se ligó el fragmento recuperado en pSS4245 cortado con *SacI* y *BamHI*. Tras la transformación en *E. coli* SM10, el plásmido resultante se designó pSS5S13-9K-129G.

Se realizó intercambio alélico para insertar el gen *S1* modificado de nuevo en su ubicación original en el cromosoma de *B. pertussis* tal como se describió anteriormente pero sin selección de los exconjugantes mediante cloramfenicol. Las cepas deseadas en este caso han perdido este marcador y, por tanto, fue necesario examinar mediante siembra en placas de repetición para identificar colonias con el fenotipo deseado Cm^S y Sm^S . El derivado de Tohama resultante se designó Bp-WWC (figura 3B). La integración del gen *S1* mutado en la posición designada se confirmó mediante PCR con los cebadores específicos. Los cebadores podían unirse a las regiones flanqueantes hacia 5' (cebadores 5'F-int y R-R9K) y hacia 3' (cebadores F-E129G y 3'R-int) y dentro del gen *S1*.

Insertión de un segundo conjunto de los cinco genes estructurales de PT

En primer lugar, se clonaron las secuencias que flanquean el sitio de inserción diana (figura 4A) para obtener pSKPD5Cm3. El fragmento de 1688 pb hacia 5' se amplificó con los cebadores 5'F-PD-*Apal* y 5'R-PD-MCS, se digirió con *Apal* y *KpnI* y se ligó en pSK5Cm3 cortado con las mismas enzimas para dar pSKPD5'-Cm. El fragmento de 2980 pb hacia 3' se amplificó con los cebadores 3'F-PD-MCS y 3'R-PD-*BglII*, se digirió con *XbaI* y *BglII* y se ligó en pSKPD5'-Cm cortado con las mismas enzimas. El plásmido resultante se designó pSKPD5Cm3 (figura 4B).

Se obtuvo el constructo conjugativo mediante digestión de este plásmido con *NotI* y *BglII* y ligación en pSS4245 digerido con *NotI* y *BamHI*. El plásmido resultante pSSPD53-Cm. La transferencia conjugativa y selección de Sm^S y Cm^R proporcionó el derivado de *B. pertussis* deseado Bp-PD53-Cm, en el que se confirmó la presencia del inserto

intacto hacia 5', hacia 3', y de Cm^R mediante amplificación por PCR. Los cebadores podían unirse a las regiones flanqueantes hacia 5' (cebadores 5'FPD-int y 5'RCM-int) y hacia 3' (cebadores 3'FCM-int y 3'RPD-int) y dentro del gen Cm^R .

Se generó una copia funcional del operón *ptx* con su promotor mediante inserción del terminador *ptx-ptl* al lado del gen S3. Se amplificaron los cinco genes estructurales de PT (S1, S2, S4, S5, S3 modificados) con su promotor de operón a partir de ADN de Bp-WWC usando los cebadores PtxF-BamHI y PtxR-MCS. El producto de amplificación de 3469 pb se digirió con *Bam*HI y *Spe*I y el fragmento recuperado se ligó en pSKhRI cortado con las mismas enzimas para dar pSKptx. pSKhRI es una variante de pBluescript II SK+ en donde se ha eliminado el sitio *Eco*RI mediante digestión y llenado con la enzima Klenow y recircularización.

El terminador de operón *ptx-ptl* se amplificó entonces con los cebadores TerF-*Eco*RI y TerR-*Spe*I. El producto de 223 pb se digirió doblemente con *Eco*RI y *Spe*I y se ligó en pSKptx cortado con las mismas enzimas. Tras la transformación y selección de colonias, el plásmido resultante se designó pSKptxter (figura 4C). Este plásmido se digirió doblemente con *Bam*HI y *Spe*I y se ligó en pSSPD5Cm3 cortado con las mismas enzimas para dar el vector conjugativo pSSPDptxter. Se realizó intercambio alélico en Bp-PD53Cm tal como se describió anteriormente con selección de réplicas para las colonias Sm^S y Cm^S para obtener la cepa designada Bp-WWD. La integración del gen S1 mutado en la posición designada se confirmó mediante PCR con cebadores específicos. Los cebadores podían unirse a las regiones flanqueantes hacia 5' (cebadores 5'FPD-int y R-R9K) y hacia 3' (cebadores F-E129G y 3'RPD-int) y dentro del gen S1.

Inserción de una segunda copia del gen estructural de PRN

Integración de un gen de resistencia a cloramfenicol en el sitio diana seleccionado para integrar una segunda copia del gen estructural de PRN.

Se construyó un derivado de pBluescript SK+ que carecía del sitio *Bam*HI mediante digestión con la enzima, llenado con la enzima Klenow y ligación. El plásmido resultante se transformó en *E. coli* y se designó pSKΔH1.

La secuencia de la cepa de *B. pertussis* Tohama se examinó y se identificaron pseudogenes. Se seleccionó la secuencia de ADN entre un pseudogen de glutatión S-transferasa putativo y un pseudogen de aspartato racemasa putativo como sitio de inserción (posn. 1.344.710-1.345.685 y 1.345.693-1.346.049). Estos genes portan mutaciones de desplazamiento del marco de lectura y no son funcionales (figura 6A).

Se amplificó la región hacia 5' con respecto al sitio de inserción seleccionado como diana usando cebadores que portaban *Spe*I (5'F-PD2-*Spe*I) y un ligador múltiple incluyendo los sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I (5'R-PD2-MCS). Se aisló el producto amplificado mediante electroforesis en gel y se digirió doblemente con *Spe*I y *Not*I. Se ligó el fragmento resultante en un fragmento de pSKΔH1 digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se transformó en *E. coli* y se designó pSKPD25. El fragmento hacia 3' se amplificó de manera similar con cebadores que portaban los sitios de restricción *Xba*I (3'F-PD2-*Xba*I) y *Not*I (3'R-PD2-*Not*I). Tras la digestión con las mismas enzimas, se ligó el fragmento resultante en un fragmento de pSKPD25 digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se transformó en *E. coli* y se designó pSKPD253.

El sitio de resistencia a cloramfenicol se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir del plásmido pACYC184 usando cebadores que portaban sitios de restricción *Bam*HI (CmF-*Bam*HI) y *Xba*I (CmR-*Xba*I). Se digirió el producto de PCR con las dos enzimas y se clonó en pSKPD253 cortado con las mismas enzimas. Tras la ligación, el plásmido resultante se transformó en *E. coli*, se verificó mediante análisis de restricción y se designó pSKPD25Cm3.

Tras la verificación mediante mapeo de restricción, se digirió el plásmido con *Not*I y *Spe*I y se ligó el fragmento resultante en pSS4245 digerido doblemente con las mismas enzimas. El plásmido resultante se designó pSSPD25Cm3 y se transformó en *E. coli* SM10.

Se llevó a cabo la conjugación tal como se describió anteriormente, usando Bp-WWD como la cepa de *B. pertussis* receptora, con selección de colonias individuales de Cm^R y Sm^S . La integración del gen Cm^R en la posición designada se confirmó mediante PCR con los cebadores que se unían específicamente a sólo las regiones flanqueantes hacia 5' (cebadores 5'FPD2-int y 5'RCM-int) y hacia 3' (cebadores 3'FCM-int y 3'RPD2-int) y dentro del gen Cm^R .

Integración del gen prn bajo el control del promotor fha

Se amplificó el gen estructural de PRN a partir de ADN de *B. pertussis* usando un cebador que empezó en el codón de inicio ATG (F) y un cebador que portaba un sitio de restricción *Xba*I (R). El producto amplificado de 2808 pb que contenía sólo la región codificante y el terminador se trataron mediante un protocolo de resolución "A" (Promega). El fragmento resultante se clonó en el vector pGEM-T Easy. El plásmido resultante designado pGEM-TPRN se verificó mediante análisis de restricción. En un proceso de elaboración inicial para crear una segunda copia del gen *prn* impulsado por el promotor de FHA más fuerte, se aisló el promotor de FHA a partir de ADN de *B. pertussis* mediante

amplificación por PCR y se insertó por delante del gen PRN. El promotor de FHA se amplificó mediante cebadores que portaban *Bam*HI (FHAproF-BamHI) y un poliligador que contenía *Nde*I-XbaI (FHAR-MCS). Se cortó el producto purificado con *Bam*HI y *Xba*I, luego se ligó el fragmento de ADN recuperado en pSKPD253 también cortado con las mismas enzimas. El plásmido resultante designado pSKPD253Fp se verificó mediante análisis de restricción. Este plásmido se cortó con *Nde*I y *Xba*I, luego se ligó con el producto de PCR del gen *prn* que se amplificó de pGEMTPRN mediante los cebadores PRNF-NdeI y PRNRXbaI y cortado con las mismas enzimas. El plásmido resultante se designó pSKPD25FpPRN3 (figura 6B). El constructo conjugativo se obtuvo mediante digestión de este plásmido con *Not*I y *Spe*I y ligación en pSS4245 digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se designó pSSPD2FpPRN. Este constructo se insertó en la ubicación seleccionada del cromosoma de Bp-WWD para reemplazar el marcador de resistencia a cloramfenicol introducido mediante el uso del procedimiento habitual de intercambio alélicos y examinación tal como se describió anteriormente.

Expresión del gen prn bajo el control del promotor prn

Se clonó el promotor de PRN mediante amplificación por PCR del ADN de *B. pertussis* usando cebadores con los sitios de restricción *Bam*HI (PrnProF-BamHI) y *Nde*I (PRNProR-NdeI). Se cortó el plásmido pSKPD25FpPRN3 con *Bam*HI y *Nde*I para generar un fragmento que había perdido el promotor de FHA. El promotor de PRN se ligó en su lugar. Tras la transformación en *E. coli* y verificación mediante análisis de restricción, el plásmido resultante se designó pSKPD25PRN3 (figura 6C). El plásmido se cortó con *Not*I y se insertó en pSS4245 cortado con la misma enzima. El constructo resultante, pSSPD2prn, se transfirió en *E. coli* SM10 para llevar a cabo el intercambio alélico. La cepa de *B. pertussis* resultante se designó Bp-WWE. La integración del gen *prn* en la posición designada se confirmó mediante PCR con los cebadores que se unían específicamente a sólo las regiones flanqueantes hacia 5' (cebadores 5'FPD2-int y PRNProR-NdeI) y hacia 3' (cebadores PRNF-int y 3'RPD2-int) y dentro del gen *prn*.

Expresión de PT, FHA y PRN en cultivo de frasco de agitación

Se hicieron crecer Bp-WWC, Bp-WWD y Bp-WWE en frascos de agitación con 100 ml de medio MSS complementado con β -ciclodextrina metilada a 35°C, 200 rpm. Después de 32-48 h de crecimiento, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se sometieron a ensayo mediante ELISA para cuantificar el nivel de expresión de PT y FHA. La expresión de PRN se determinó mediante análisis densitométrico de inmunotransferencia de tipo Western para evaluar también la integridad del antígeno. Este ensayo se llevó a cabo tanto en el sobrenadante de cultivo clarificado como en el extracto celular obtenido calentando a 60°C en tampón isotónico.

Ensayo ELISA para PT y FHA

Se recubrieron anticuerpos policlonales de conejo purificados frente a PT o FHA (1:1000, NLAC, Tailandia) en placas de 96 pocillos (NUNC Maxisorp) con 100 μ l por pocillo en tampón carbonato/bicarbonato (pH 9,6) y se incubaron durante la noche a 4°C. Después de lavar 3 veces con solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 con Tween 20 (PBST) al 0,1%, se realizó bloqueo con 100 μ l por pocillo de PBST que incluyó albúmina sérica bovina (BSA) al 3% y después se incubaron a 37°C durante 1 h. Después de descartar el tampón de bloqueo y lavado, se cargaron las diluciones de las muestras, FHA o PT patrón y se incubaron a 37°C durante 1 h. Después de lavar 3 veces con PBST, se añadieron 100 μ l de anticuerpo monoclonal de ratón anti-subunidad S2 de PT (1:30,000, Abcam, EE.UU.) o anticuerpo monoclonal de ratón anti-FHA (1:10,000, NIBSC, R.U) en tampón de bloqueo y se incubaron en las mismas condiciones. Después de lavar el pocillo 3 veces con PBST, se usaron 100 μ l de dilución 1:10.000 en tampón de bloqueo de conjugado de HRP-IgG de conejo anti-ratón (H + L) (Abcam, EE.UU) como anticuerpo secundario y se incubó de nuevo a 37°C durante 1 h. Después de lavar con PST, se añadieron 100 μ l de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (KPL, EE.UU) como sustrato enzimático. Se terminó la reacción de color con 100 μ l de HCl 1 N por pocillo. Se midió la densidad óptica a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación.

Ensayo de inmunotransferencia de tipo Western para PRN

Se resolvieron diluciones de muestras y PRN patrón en un gel SDS-PAGE al 10%, luego se transfirieron a una membrana de PVDF usando un sistema de inmunotransferencia semiseco. Se bloqueó la membrana con el 5% de leche desnatada en PBST durante 1 h. Después de descartar esta disolución de bloqueo, se incubó la membrana con 20 ml de suero de oveja anti-PRN (1:10,000, NIBSC, R.U) en tampón de bloqueo durante 1 h, luego se lavó 3 veces con PBST. Entonces se incubó la membrana en las mismas condiciones con 20 ml de conjugado de HRP-IgG de conejo anti-oveja (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU) y se lavó de nuevo. Entonces se sumergieron las membranas en 3,3'-diaminobenzamida hasta que se desarrolló el color marrón. Se terminó la reacción aclarando 2-3 veces con agua desionizada, luego se dejó secar a temperatura ambiente. Se examinó la membrana y se convirtió a un archivo de imagen. Las concentraciones de PRN se derivaron mediante análisis densitométrico de la muestra y bandas de referencia usando un software especializado.

Estabilidad genética

Se cultivaron las cepas en 100 ml de medio MSS a 35°C y 200 rpm durante 48 h, luego se transfirieron 0,1 ml de

cultivo en 100 ml de MSS y se incubaron en la misma condición y esta etapa se repitió 4 veces más. Cada transferencia se corresponde a 10 generaciones. Se diluyó el cultivo y se sembró en placa en MSS agar. Se escogieron aleatoriamente treinta colonias aisladas. De las treinta colonias seleccionadas, dos se analizaron mediante PCR para detectar la presencia esperada de los insertos de PT y PRN.

Ensayo de agrupación de células de CHO

Se determinó la actividad de agrupación de células de ovario de hámster chino (CHO) mediante el método de Hewlett *et al.* [28] En resumen, se cultivaron células de CHO en el medio cRPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10%. Se incubaron las células a 37 °C bajo una atmósfera del 5% de CO₂. Se tripsinizaron las células cultivadas y se ajustaron a 2 x 10⁴ células/ml con medio cRPMI 1640 para distribuir una porción de 200 µl a cada pocillo de una microplaca de cultivo de 96 pocillos. Se diluyeron en serie las muestras de prueba y la toxina PT de referencia en intervalos de diez veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4 y se añadió un volumen de 25 µl de las diluciones a los pocillos. Tras la incubación durante 48 h en la misma condición para permitir la agrupación máxima, las células se tiñeron con violeta cristal y se fotografiaron.

Bibliografía

1. Mattoo S, Cherry JD: Clin Microbiol Rev 2005, 18:326-382.
2. Aristegui J, Usonis V, Coovadia H, Riedemann S, Win KM, Gatchalian S, Bock HL: Facilitating the WHO expanded program of immunization: the clinical profile of a combined diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and Haemophilus influenzae type b vaccine. Int J Infect Dis 2003, 7:143-151.
3. Miller DL, Ross EM, Alderslade R, Bellman MH, Rawson NS: Pertussis immunisation and serious acute neurological illness in children. Br Med J (Clin Res Ed) 1981, 282:1595-1599.
4. Stuart-Harris C: Benefits and risks of immunization against pertussis. Dev Biol Stand 1979, 43:75-83.
5. Sato Y, Sato H: Development of acellular pertussis vaccines. Biologicals 1999, 27:61-69.
6. Brown B, Greco D, Mastrantonio P, Salmaso S, Wassilak S: Pertussis vaccine trials. Trial synopses. Dev Biol Stand 1997, 89:37-47.
7. Monack D, Munoz JJ, Peacock MG, Black WJ, Falkow S: Expression of pertussis toxin correlates with pathogenesis in Bordetella species. J Infect Dis 1989, 159:205-210.
8. Weiss AA, Hewlett EL: Virulence factors of Bordetella pertussis. Ann Rev Microbiol 1986, 40:661-686.
9. Munoz JJ, Arai H, Cole RL: Mouse-protecting and histamine-sensitizing activities of pertussigen and fimbrial hemagglutinin from Bordetella pertussis. Infect Immun 1981, 32:243-250.
10. Loosmore SM, Zealey GR, Boux HA, Cockle SA, Radika K, Fahim RE, Zobrist GJ, Yacoob RK, Chong PC, Yao FL, *et al.*: Engineering of genetically detoxified pertussis toxin analogs for development of a recombinant whooping cough vaccine. Infect Immun 1990, 58:3653-3662.
11. Nencioni L, Pizza M, Bugnoli M, De Magistris T, Di Tommaso A, Giovannoni F, Manetti R, Marsili I, Matteucci G, Nucci D, *et al.*: Characterization of genetically inactivated pertussis toxin mutants: candidates for a new vaccine against whooping cough. Infect Immun 1990, 58:1308-1315.
12. Pizza M, Covacci A, Bartoloni A, Perugini M, Nencioni L, De Magistris MT, Villa L, Nucci D, Manetti R, Bugnoli M, *et al.*: Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. Science 1989, 246:497-500.
13. Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi AE, Anemona A, Ciofi degli Atti ML, Giammanco A, Panei P, Blackwelder WC, *et al.*: A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. N Engl J Med 1996, 334:341-348.
14. Makoff AJ, Oxe MD, Ballantine SP, Fairweather NF, Charles IG: Protective surface antigen P69 of Bordetella pertussis: its characterization and very high level expression in Escherichia coli. Biotechnology (N Y) 1990, 8:1030-1033.
15. Romanos MA, Clare JJ, Beesley KM, Rayment FB, Ballantine SP, Makoff AJ, Dougan G, Fairweather NF, Charles IG: Recombinant Bordetella pertussis pertactin (P69) from the yeast Pichia pastoris: high-level production and immunological properties. Vaccine 1991, 9:901-906.
16. Nicosia A, Bartoloni A, Perugini M, Rappuoli R: Expression and immunological properties of the five subunits of

pertussis toxin. *Inf Immu.* 1987, 55:963-967.

17. Kotob SI, Hausman SZ, Burns DL: Localization of the promoter of the *ptl* genes of *Bordetella pertussis*, which encode proteins essential for secretion of pertussis toxin. *Infect Immun* 1995, 63:3227-3230.

18. Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA: High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology (N Y)* 1991, 9:455-460.

19. Rappuoli R: Isolation and characterization of *Corynebacterium diphtheriae* nontandem double lysogens hyperproducing CRM197. *Appl Environ Microbiol* 1983, 46:560-564.

20. Zealey GR, Loosmore SM, Yacoob RK, Cockle SA, Herbert AB, Miller LD, Mackay NJ, Klein MH: Construction of *Bordetella pertussis* strains that overproduce genetically inactivated pertussis toxin. *Appl Environ Microbiol* 1992, 58:208-214.

21. Loosmore SM, Yaacoob RK, Zealey GR, Jackson GED, Yang Y-P, Chong PS-C, Shortreed JM, Coleman DC, Cunningham JD, Gisonni L, Klein MH: Hybrid genes over-express pertactin from *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 1995, 13:571-580.

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

23. Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y: Heptakis(2,6-O-dimethyl)b-cyclodextrin: a novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase I. *J. Clin. Microbiol.* 1983, 17:781-786.

24. Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y: Effects of heptakis(2,6-O-dimethyl)b-cyclodextrin on the production of pertussis toxin by *Bordetella pertussis*. *Inf. Immun.* 1983, 41:1138-1143.

25. Capiou C, Carr SA, Hemling ME, Plainchamp D, Conrath K, Hauser P, Simoen E, Comberbach M, Roelants P, Desmons P, Permanne P, Petre JO: Purification, characterization, and immunological evaluation of the 69-kDa outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. In: *Proceedings of the sixth international symposium on pertussis*, Manclark CR (ed., 1990. Publicación DHHS n.º (FDA) 90-1164, págs. 7586.

26. Ozcengiz E, Kilinc K, Buyuktanir O, Gunalp A: Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation-exchange chromatography. *Vaccine* 2004, 22:1570-1575.

27. Chong P, Jackson G, Cwyk W, Klein M: Simultaneous determination of *Bordetella pertussis* toxin and filamentous haemagglutinin concentrations by hydroxyapatite high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1990, 512:227-236.

28. Capiou C, Desmons P: Method for isolating and purifying *Bordetella pertussis* antigenic factors. US pat. 5, 391, 715.

29. Hewlett EL, Sauer KT, Myers GA, Cowell JL, Guerrant RL: Induction of a novel morphological response in Chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. *Infect Immun* 1983, 40:1198-1203.

30. Sauer B: Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1987, 7:2087-2096.

31. Charles I, Fairweather N, Pickard D, Beesley J, Anderson R, Dougan G, Roberts M: Expression of the *Bordetella pertussis* P.69 pertactin adhesin in *Escherichia coli*: fate of the carboxy-terminal domain. *Microbiology* 1994, 140 (Pt 12):3301-3308.

32. Frohlich BT, De Bernardes Cmark ER, Siber GR, Swartz RW: Improved pertussis toxin production by *Bordetella pertussis* through adjusting the growth medium's ionic composition. *J Biotechnol* 1995, 39:205-219.

33. O'Neill EA, Kiely GM, Bender RA: Transposon Tn5 encodes estreptomycin resistance in nonenteric bacteria. *J Bacteriol* 1984, 159:388-389. 34. Posfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z, Blattner FR: Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res* 1999, 27:4409-4415. 35. Nicosia *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83,4631.

36. Loosmore *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17, 8365.

37. Relman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 2637.

38. Charles *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 3554.

39. Glaser *et al.*, Molec. Microbiol. 2, 19.

5 40. Lee *et al.*, 1989, Infect. Immun. 57: 1413-1418.

41. Inatsuka CS, *et al.*, Pertactin is required for Bordetella to resist neutrophil-mediated clearance Infect. Immun. 2010, doi:10.1128/IAI.00188-10.

10 42. Parkhill *et al.*, Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. Nature Genetics (2003) 35 32-40.

Lista de secuencias

15 <110> BioNet-Asia, Co. Ltd

<120> Cepas de *Bordetella pertussis* modificadas

<130> Pertussis

20 <150> ZA 2011/09417
<151> 21-12-2011

<160> 40

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 30

30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 5'F-PT-Sall

35 <400> 1
gcggtcgacg gcgcgcaatg cggcgcggac

30

<210> 2

40 <211> 57

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> 5'R-PT-MCS

<400> 2

gggggcggcc gcgagatctc tctagacggt accatcgcg cactttgcgc cgaagga

57

50 <210> 3

<211> 30

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3'F-PT-XbaI

<400> 3

60 cgttctagac ctggcccagc cccgccaac

30

<210> 4

<211> 30

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> 3'R-PT-BglII		
	<400> 4		
5	ggcagatctg cagttcgagc agatcgccgg	30	
	<210> 5		
	<211> 30		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> CmF-KpnI		
	<400> 5		
15	cgcggtacct gatgtccggc ggtgcttttg	30	
	<210> 6		
	<211> 30		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> CmR-XbaI		
25	<400> 6		
	aatctagata tcgtcaatta ttacctccac	30	
	<210> 7		
30	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> S1F-PT-KpnI		
	<400> 7		
	gatggtaccg gtcaccgtcc ggaccgtgct	30	
40	<210> 8		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> S1R-PT-XbaI		
	<400> 8		
50	caggtctaga acgaatacgc gatgctttcg	30	
	<210> 9		
	<211> 31		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> R-R9K		
60	<400> 9		
	gggcgggagt catacttgta tacggtggcg g	31	
	<210> 10		
	<211> 31		
65	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

<220>
 <223> F-R9K
 5 <400> 10 ccgccaccgt atacaagtat gactcccgcc c 131
 <210> 11
 <211> 32
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F-E129G
 15 <400> 11
 ccacctacca gagcgggtat ctggcacacc gg 32
 <210> 12
 <211> 32
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> R-E129G
 25 <400> 12
 ccggtgtgcc agataccgc tctggtaggt gg 32
 <210> 13
 30 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> 5'F-PD-Apal
 <400> 13
 ggagggccca tgaactcgt catgccatc atcaagccc 39
 40 <210> 14
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> 5'R-PD-MCS
 <400> 14
 50 tacggtaccg gatcccgcat cgcaacaacg gggtcatcgc gaccc 45
 <210> 15
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> 3'F-PD-MCS
 <400> 15
 60 cgttctagaa ctagtccgct accaggtgta gcgatagccc aggtg 45
 <210> 16
 <211> 39
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 3'R-PD-BglII

 5 <400> 16
 tgtagatctc ggcgagatac ttgcgtttcg gcgttgtcg 39

 <210> 17
 <211> 35
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> PtxF-BamHI

 15 <400> 17
 ttgggatccc agcgagagccc tccaacgcgc catcc 35

 <210> 18
 <211> 47
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> PtxR-MCS
 25 <400> 18 tctactagta agaattctcg cggtatccgt caaggaaaaa catggac 47

 <210> 19
 <211> 29
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> TerF-EcoRI
 35 <400> 19 gcggaattcc gcctgccgcc tgcacgcat 29

 <210> 20
 <211> 29
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> TerR-SpeI
 45 <400> 20 tccactagtc aagggcatcg ggcgccggc 29

 <210> 21
 <211> 35
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 5'F-PD2-SpeI
 55 <400> 21
 cgcactagtc tattccagcg gcgggtcgaa atggc 35

 <210> 22
 <211> 56
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> 5'R-PD2-MCS

	<400> 22 ccccaggcgg ccgctgtcta gaggatcc caggccgatg cgtccgccgt gcaggc	56
5	<210> 23 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> 3'F-PD2-XbaI	
	<400> 23 atctctagaa tgggcacctc ggccacgctg gcgctg	36
15	<210> 24 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> 3'R-PD2-NotI	
25	<400> 24 aagtatcgcg gccgatgagc gaaacctgt tgaaagtatc	40
30	<210> 25 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> CmF-BamHI	
35	<400> 25 cgcggtatcct gatgtccggc ggtgcttttg	30
40	<210> 26 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> FHAProF-BamHI	
45	<400> 26 tctggatccc tgcgctggca cccgcggcgg gccg	34
50	<210> 27 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> FHAR-MCS	
55	<400> 27 gcctctagat tcatatgatt ccgaccagcg aagtgaagta at	42
60	<210> 28 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> PRNF-NdeI	

	<400> 28 ctggctggca tatgaacatg tctctgtcac gcattg	36
5	<210> 29 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> PRNR-XbaI	
	<400> 29 gcctctagag cctggagact ggcaccggcc aagc	34
15	<210> 30 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> PrnProF-BamHI	
25	<400> 30 cggggatccg caccctggcc tgcggggcgg gacc	34
30	<210> 31 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> PRNProR-NdeI	
35	<400> 31 agacatgttc atatgatgc caggtggaga gcaga	35
40	<210> 32 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> 5'F-int	
45	<400> 32 ctagcgttcg cataccaaat ccttgc	26
50	<210> 33 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> 5'RCM-int	
55	<400> 33 ccgtaatatc cagctgaacg gtctgg	26
60	<210> 34 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> 3'FCM-int	

	<400> 34 tctgtgatgg cttccatgtc ggcag	25
5	<210> 35 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> 3'R-int	
	<400> 35 agcatgttgc ggtgttcccg gaatg	25
15	<210> 36 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> 5'FPD-int	
25	<400> 36 atgacggaaa gccgcatggg cattgggtcc	30
30	<210> 37 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> 3'RPD-int	
	<400> 37 ttcgtacgtg ttcaggtgcc gattgccgg	29
40	<210> 38 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> 5'FPD2-int	
	<400> 38 tgggctggct gttctggcac gaaacg	26
50	<210> 39 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> 3'RPD2-int	
	<400> 39 ttcatcgaat cggcgctgat cctggc	26
60	<210> 40 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> PRNF-int	

ES 2 642 138 T3

<400> 40

aggtgcagcc atacatcaag gccagc

26

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Bordetella pertussis* genéticamente modificada, en la que el gen *S1* de la toxina pertussis tiene las mutaciones Arg9→Lys9 y Glu129→Gly129, no incluye ningún gen de resistencia a antibióticos y puede expresar toxina pertussis detoxificada (rPT).
2. Cepa modificada según la reivindicación 1, en la que se usó el vector pSS4245 para introducir las mutaciones de *S1* sin integración de un gen de resistencia a antibióticos.
3. Cepa modificada según la reivindicación 1 ó 2, que es una cepa Tohama.
4. Cepa modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se ha modificado adicionalmente mediante:
 - (a) integración de al menos una copia del operón *ptx* en una región no funcional del cromosoma de la cepa modificada, en la que el operón *ptx* integrado comprende un conjunto de genes *S2* - *S5* y un gen *S1* que se ha modificado para incluir las mutaciones Arg9→Lys9 y Glu129→Gly129, teniendo así la cepa modificada dos operones *ptx* que se ubican separados en el cromosoma y pudiendo expresar niveles potenciados de toxina pertussis detoxificada en relación con una cepa con sólo un operón *ptx*; y/o
 - (b) integración de al menos una copia de un gen *prn* que codifica para pertactina en una región no funcional del cromosoma de la cepa modificada, teniendo así la cepa modificada al menos dos genes *prn* que se ubican separados en el cromosoma y pudiendo expresar niveles potenciados de pertactina en relación con una cepa con sólo un gen *prn*;
 en la que la cepa modificada no incluye ningún gen de resistencia a antibióticos integrado.
5. Cepa modificada según la reivindicación 4, en la que se usó el vector pSS4245 para introducir la copia del operón *ptx* y/o gen *prn* sin integración de un gen de resistencia a antibióticos.
6. Cepa modificada según la reivindicación 4 ó 5, en la que la copia del operón *ptx* y/o gen *prn* se integra dentro de o entre pseudogenes no funcionales.
7. Cepa modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende al menos dos operones *ptx* modificados y/o al menos dos genes *prn*.
8. Método de producción de una cepa de *Bordetella pertussis* modificada, comprendiendo el método la etapa de introducir las mutaciones Arg9→Lys9 y Glu129→Gly129 en el gen *S1* de una cepa de *B. pertussis*, dando como resultado de este modo que se produzca una cepa modificada que puede expresar toxina pertussis detoxificada (rPT) y que no incluye ningún gen de resistencia a antibióticos.
9. Método según la reivindicación 8, en el que se usa el vector pSS4245 para introducir las mutaciones de *S1* sin integración de un gen de resistencia a antibióticos.
10. Método según la reivindicación 8 ó 9, en el que la cepa de *B. pertussis* es una cepa Tohama.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende además la etapa de:
 - (a) integrar al menos una copia del operón *ptx* en una región no funcional del cromosoma de la cepa modificada, en el que el operón *ptx* integrado comprende un conjunto de genes *S2* - *S5* y un gen *S1* que se ha modificado para incluir las mutaciones Arg9→Lys9 y Glu129→Gly129, produciendo así una cepa modificada que tiene al menos dos operones *ptx* que se ubican separados en el cromosoma y pudiendo expresar niveles potenciados de toxina pertussis detoxificada en relación con una cepa con sólo un operón *ptx*; y/o
 - (b) integrar al menos una copia de un gen *prn* que codifica para pertactina en una región no funcional del cromosoma de la cepa modificada, produciendo así una cepa modificada que tiene al menos dos genes *prn* que se ubican separados en el cromosoma y pudiendo expresar niveles potenciados de pertactina en relación con una cepa con sólo un gen *prn*;
 en el que el operón *ptx* y/o gen *prn* se integra sin integración de ningún gen de resistencia a antibióticos.
12. Método según la reivindicación 11, en el que se usa el vector pSS4245 para introducir la copia del operón *ptx* y/o gen *prn* sin integración de un gen de resistencia a antibióticos.
13. Método según la reivindicación 11 ó 12, en el que el operón *ptx* y/o el gen *prn* se integran en o entre

pseudogenes no funcionales.

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que se inserta una copia del operón *ptx* modificado y una copia del gen *prn* en el cromosoma de la cepa.

5

15. Método de producción de antígenos de *Bordetella pertussis* que comprende las etapas de:

(i) cultivar una cepa de *B. pertussis* genéticamente modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o producida según el método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 en un medio de cultivo para efectuar la expresión de los antígenos, en el que los antígenos incluyen toxina pertussis detoxificada (rPT), pertactina y hemaglutinina filamentosa (FHA) codificados por genes presentes en la cepa; y

10

(ii) recuperar los antígenos del medio de cultivo o extracto celular para su uso como vacuna.

15

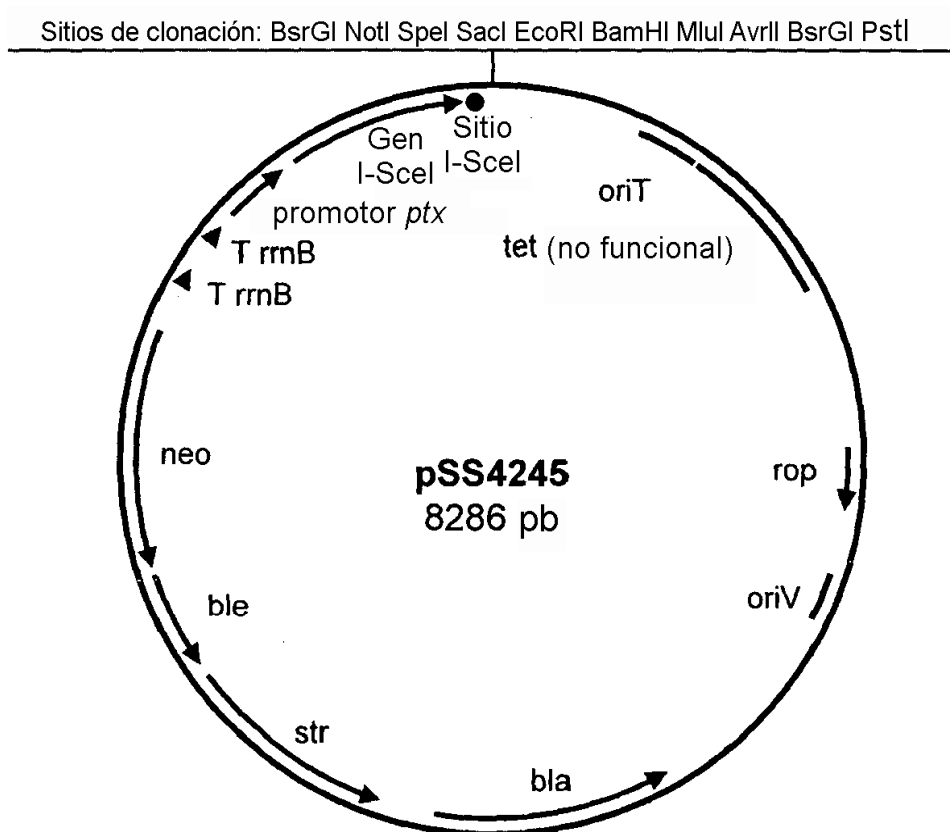
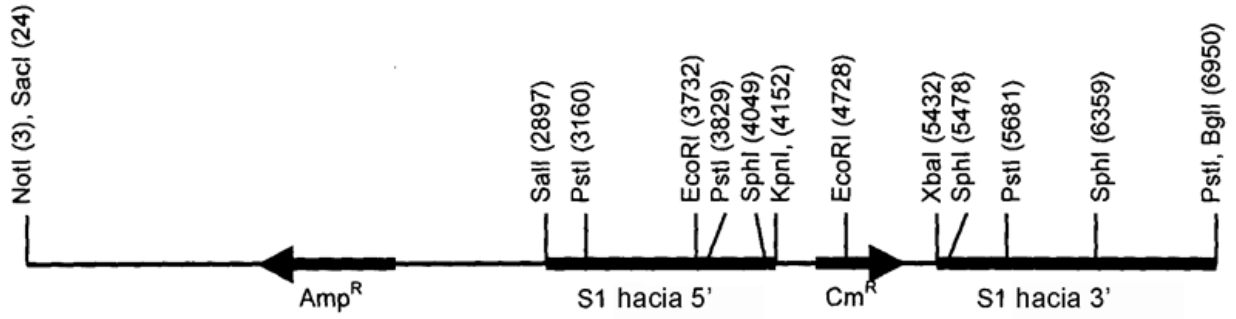


Fig. 1

A. pSK5Cm3



B. pSK5S13-9K-129G

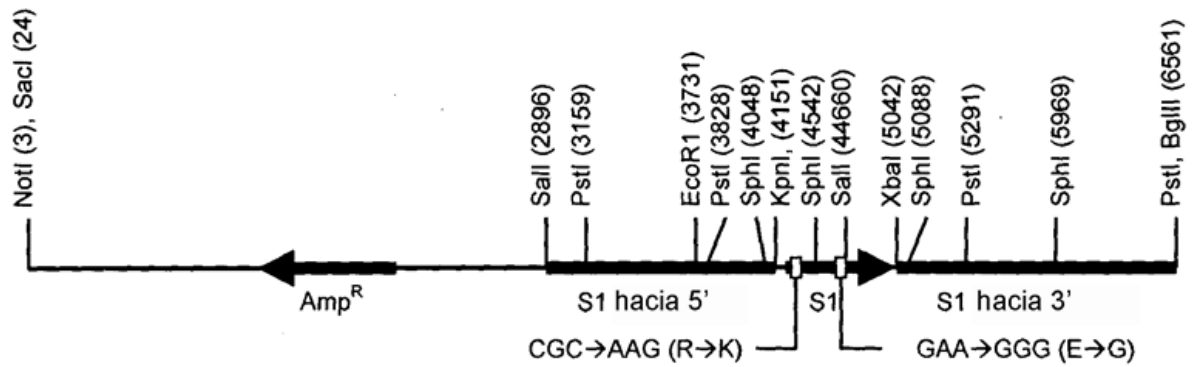
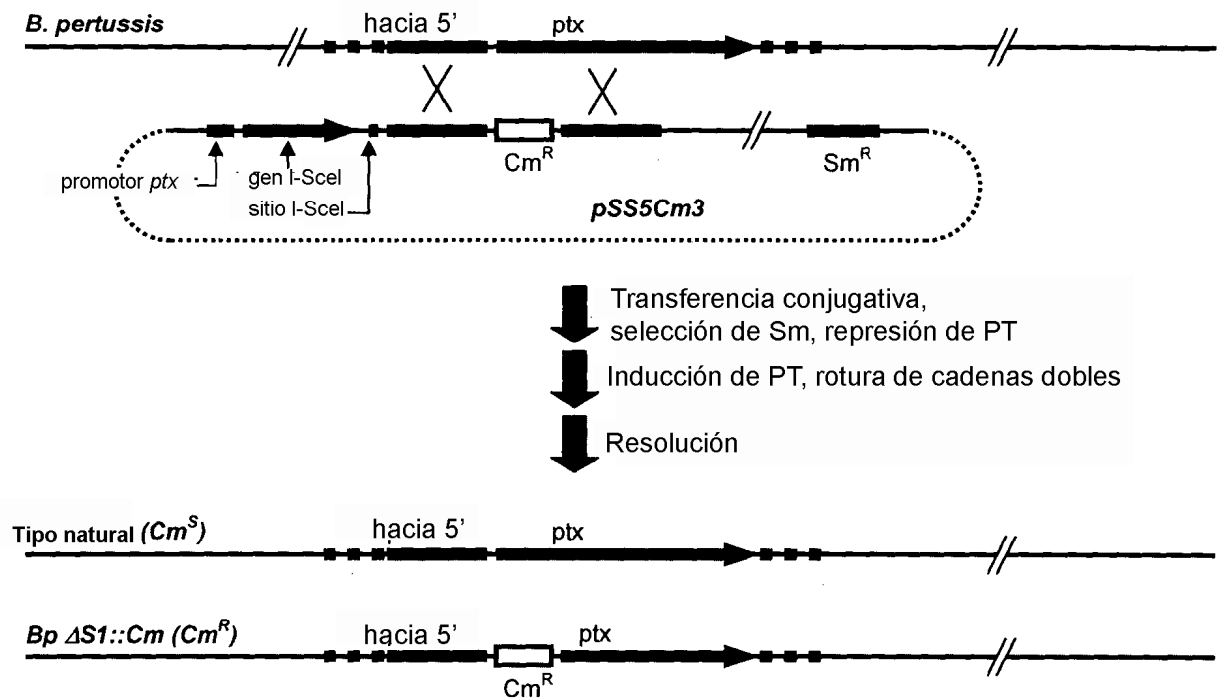


Fig. 2

A. Fase I: reemplazo del gen S1 por un gen Cm^R



B. Fase II: reemplazo del gen Cm^R por el gen S1 mutado

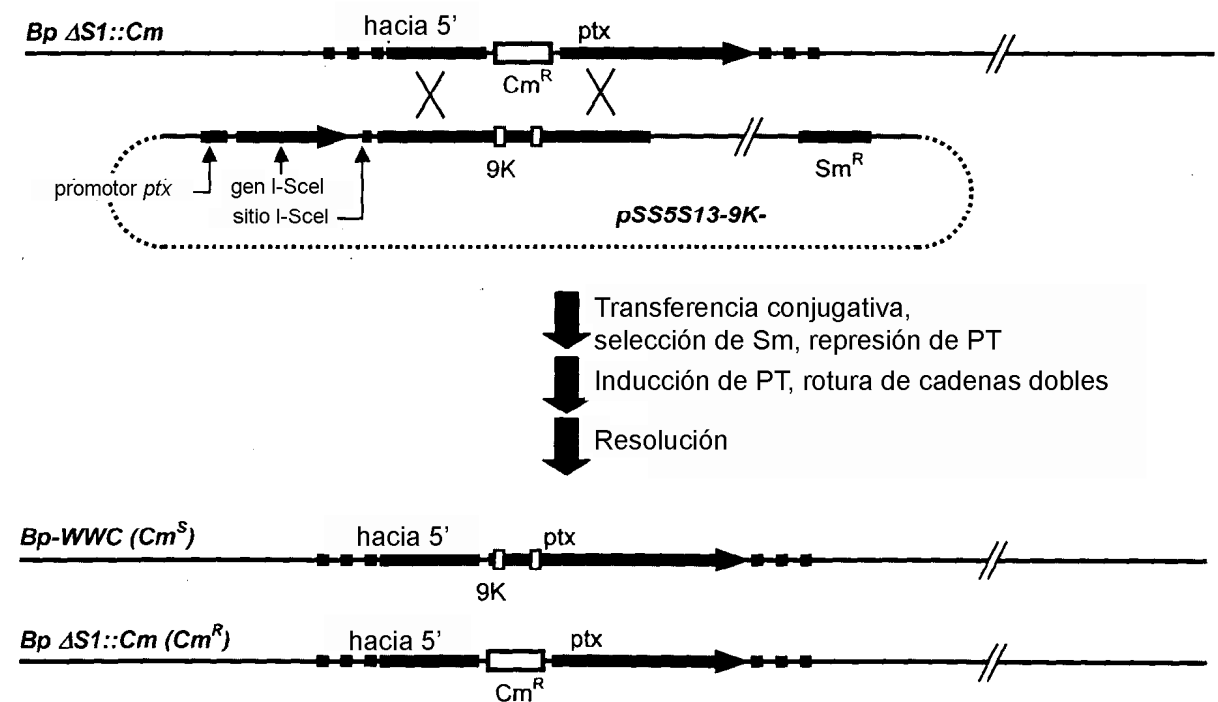
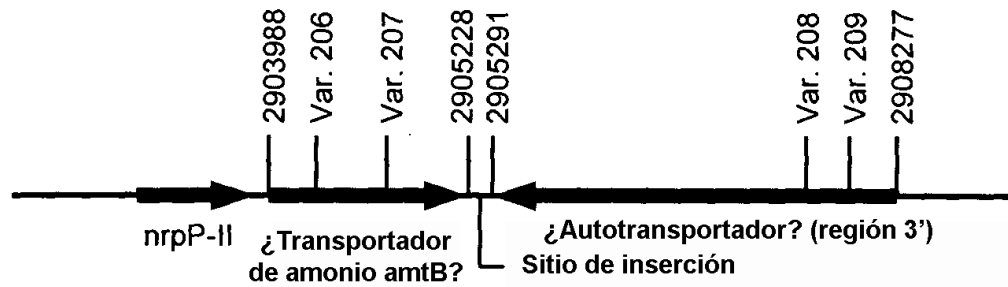
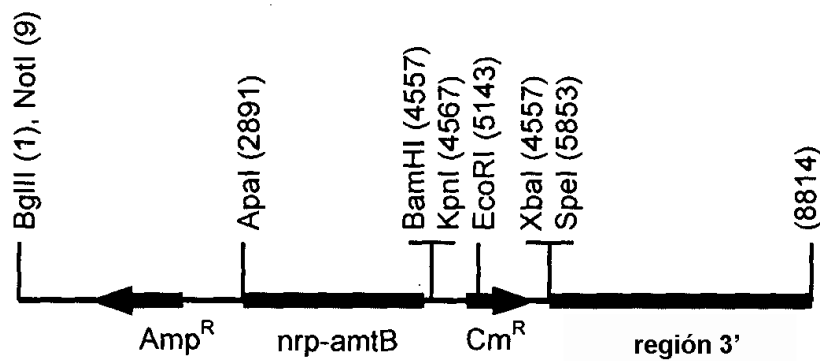


Fig. 3

A. Sitio de inserción seleccionado



B. pSKPD5Cm3



C. pSKptxter con S1* (9K-129G)

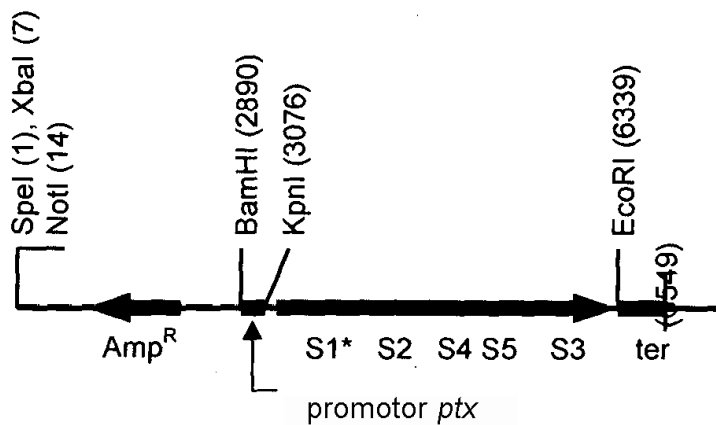


Fig. 4

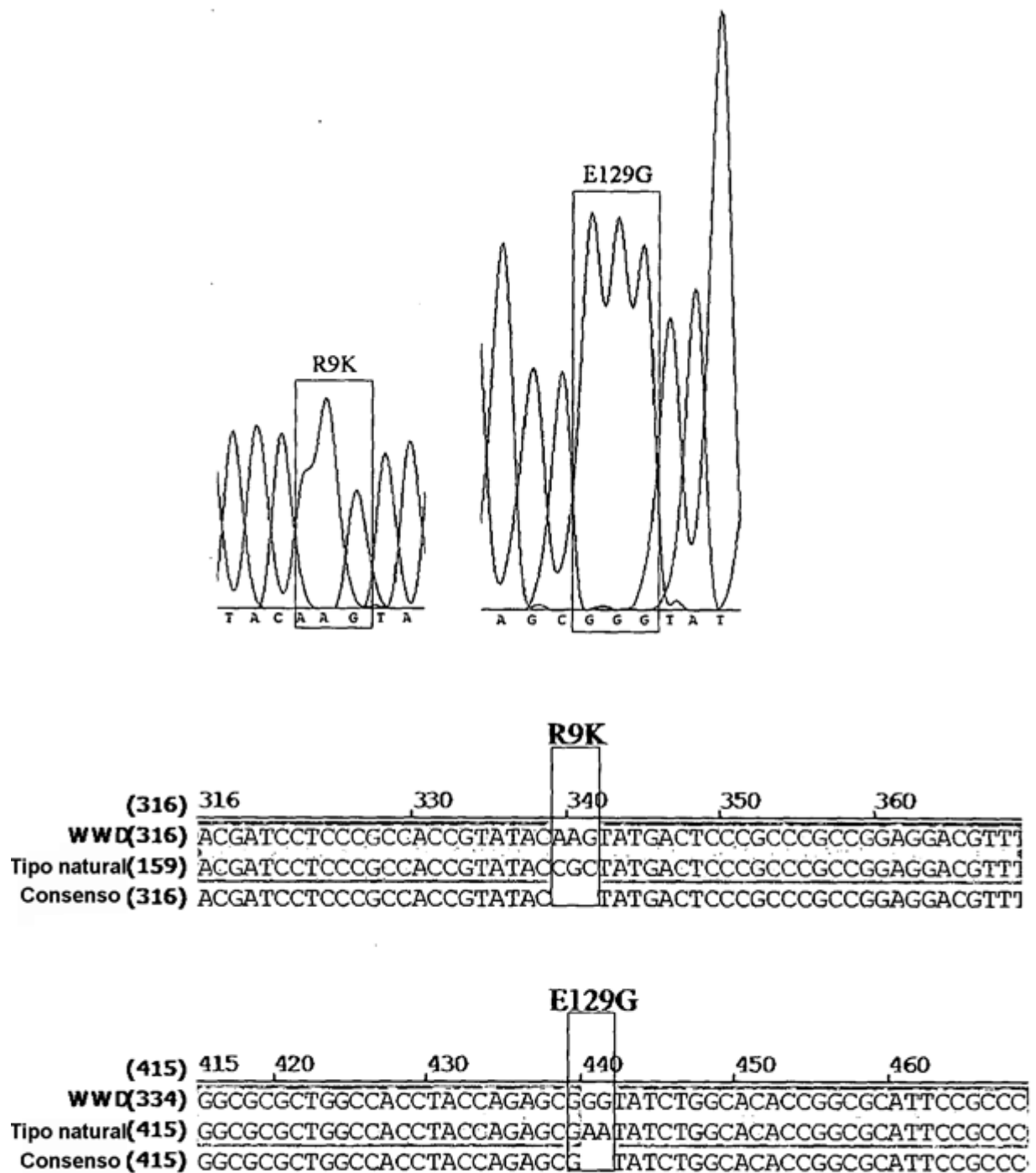
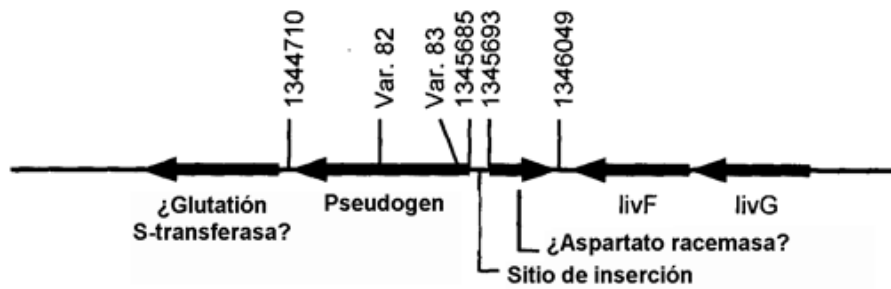
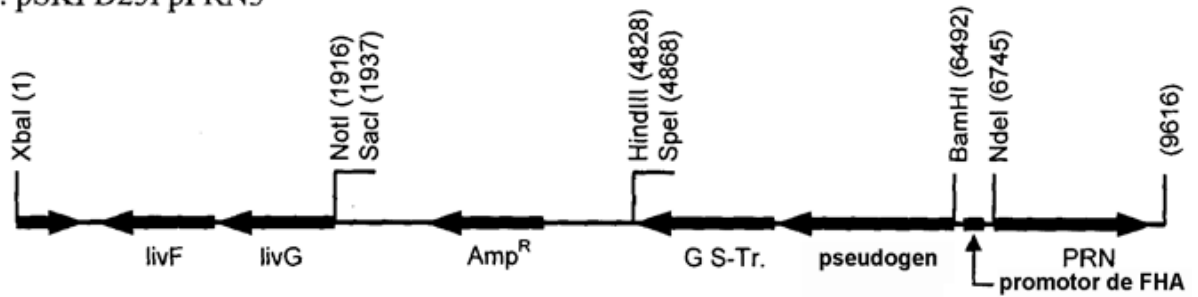


Fig. 5

A. Sitio de inserción seleccionado



B. pSKPD25FpPRN3



C. pSKPD25PRN3

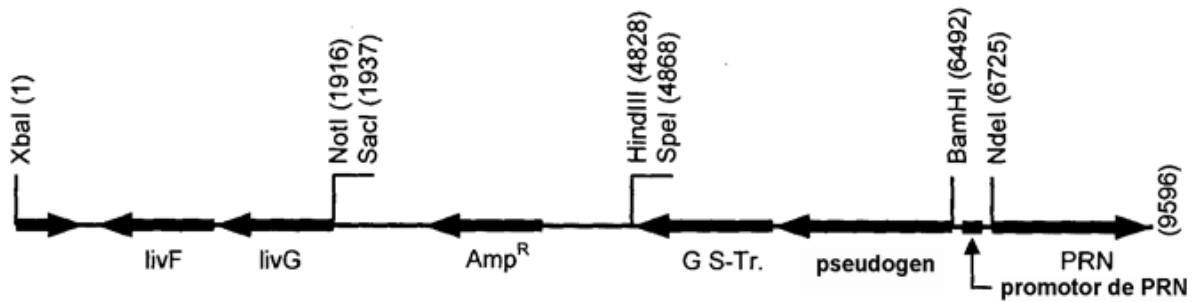


Fig. 6

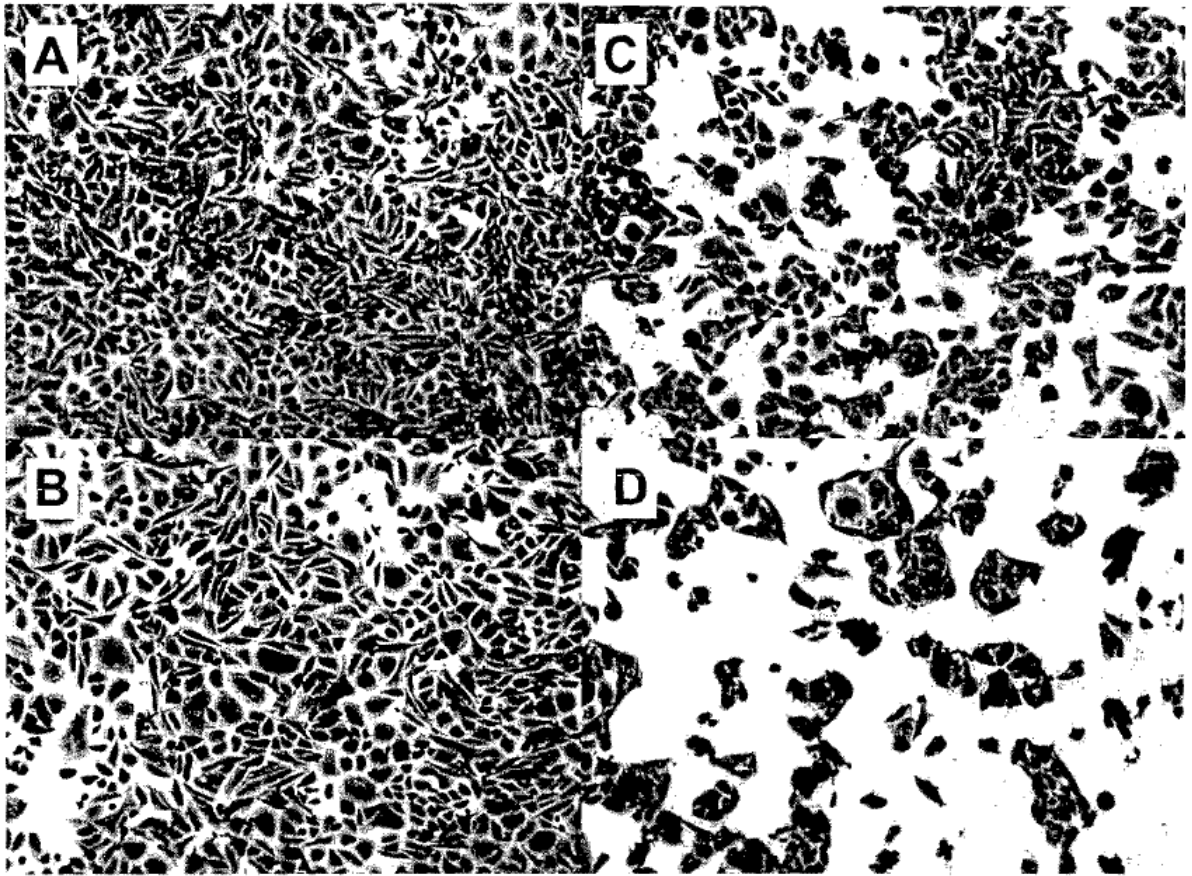


Fig. 7