

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 651**

51 Int. Cl.:

C07K 14/235 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2013** **PCT/EP2013/071724**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014** **WO14060514**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2013** **E 13777082 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018** **EP 2909229**

54 Título: **Nuevas cepas de Bordetella recombinantes**

30 Prioridad:

17.10.2012 EP 12306279

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LOCHT, CAMILLE;
MIELCAREK, NATHALIE y
KAMMOUN, HANA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 715 651 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

Nuevas cepas de *Bordetella* recombinantes

CAMPO DE LA INVENCION:

- 5 La descripción se refiere a nuevas cepas de *Bordetella pertussis* genéticamente atenuadas que expresan una proteína heteróloga y a su uso como vacunas, a saber, para la inmunización de la mucosa. La invención está dirigida a una cepa de *Bordetella pertussis* genéticamente atenuada, tal y como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, y a sus usos terapéuticos, tal y como se definen en la reivindicación 16 o 17. También se describe un método para incrementar la inmunogenicidad de una cepa de *Bordetella*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

- 10 Las inmunizaciones de la mucosa, tales como la administración nasal de vacunas, tienen una serie de ventajas sobre las vacunaciones parenterales clásicas. No se necesita una aguja, son menos propensas a una contaminación, dependen menos de un personal médico o paramédico entrenado, pueden inducir tanto una inmunidad sistémica como de la mucosa y son probablemente más adecuadas para proteger contra infecciones de la mucosa.

- 15 Sin embargo, la mayoría de los antígenos son poco inmunógenos cuando se administran por la vía nasal y requieren la adición de adyuvantes potentes de la mucosa. Uno de los adyuvantes de la mucosa más potente es la toxina del cólera o la toxina termolábil de *Escherichia coli* estrechamente relacionada y sus derivados no tóxicos. Desafortunadamente, la adición de este adyuvante a las formulaciones de vacunas nasales se ha asociado con la parálisis de Bell (Mutsch et al., 2004) y, por lo tanto, no se puede utilizar en los seres humanos.

- 20 Los autores de la presente invención han desarrollado recientemente un candidato para una vacuna nasal viva atenuada contra la tos ferina (Mielcarek et al., 2006), que ahora ha completado con éxito un primer ensayo de seguridad de fase I en humanos (Thorstensson et al., en preparación). El concepto de esta vacuna candidata se basa en el hallazgo de que una infección natural con *Bordetella pertussis* a través de una exposición a un aerosol, es capaz de inducir una fuerte respuesta sistémica de linfocitos B y T, incluso en niños muy pequeños (Mascart et al., 2003), así como una inmunidad de la mucosa. Además, estudios previos realizados en primates no humanos han llevado a la
25 conclusión de que "la mejor protección contra la tos ferina, con mayor probabilidad será el resultado de una inoculación de *B. pertussis* viva" (Huang et al., 1962).

- La cepa de *B. pertussis* se atenuó basándose en el conocimiento del mecanismo molecular de la virulencia de *B. pertussis* (Locht et al., 2001) y se construyó mediante una inactivación genética de la toxina pertussis, mediante una
30 delección del gen de la toxina dermonecrótica y mediante el intercambio del gen *ampG* de *B. pertussis* por el gen *ampG* de *Escherichia coli*, suprimiendo de este modo la producción de la citotoxina traqueal. En modelos preclínicos, este candidato a vacuna, llamada BPZE1, mostraba una seguridad excelente (Mielcarek et al., 2006, 2010; Skerry et al., 2009; Kavanagh et al., 2010; Li et al., 2010) e inducía una inmunidad rápida, fuerte y de larga duración después de una sola administración nasal (Feunou et al., 2010).

- 35 Por otra parte, se descubrió sorprendentemente que la cepa BPZE1, cuando se administraba por vía nasal a ratones, era capaz de provocar una respuesta protectora contra afecciones alérgicas e inflamatorias del tracto de las vías respiratorias, a saber, el asma y además contra alergias tóxicas.

Reveneau et al. describen una cepa genéticamente atenuada de *Bordetella* que carece de la producción de toxina y que expresa una proteína híbrida que comprende el fragmento N-terminal de la hemaglutinina filamentosa (FHA) y el fragmento C de la toxina tetánica (TTFC) protector, esa cepa no produce FHA madura.

- 40 Coppens et al. describen una cepa atenuada genéticamente de *Bordetella* que carece de la producción de toxina y que expresa una proteína híbrida que comprende el fragmento N-terminal de la hemaglutinina filamentosa (FHA) y TbpB de *N. meningitis*, esa cepa no produce FHA madura.

- Alonso et al. describen una cepa atenuada genéticamente de *Bordetella* que carece de la producción de toxina y que expresa una proteína híbrida que comprende el fragmento N-terminal de la hemaglutinina filamentosa (FHA) y la
45 proteína HtrA de *Haemophilus influenza* no tipificable, esa cepa no produce FHA madura.

El documento US 6 841 358 describe una cepa atenuada genéticamente de *Bordetella* que carece de la producción de toxina y que expresa una proteína híbrida que comprende el fragmento N-terminal de la hemaglutinina filamentosa (FHA) y un péptido modelo de Sm28 GST de *Schistosoma mansoni*, esa cepa carece de la producción de FHA madura.

- 50 Sin embargo, aunque el gen *fhaB* no se delecionó con el fin de aumentar la inmunogenicidad, la delección fue solo una coincidencia y una característica intrínseca de la cepa utilizada como vehículo para la producción del antígeno heterólogo.

Como se ha expuesto en el presente documento, también se conocen a partir de Rui Li et al., "Development of live attenuated strains expressing the universal influenza vaccine candidate M2e", Vaccine, vol. 29, nº 33, 14 de Mayo

2011, cepas de *B. pertussis* que tienen un gen *dnt* deletado, pero que incluyen ácido nucleico que codifica la proteína FHA de longitud completa de *B. pertussis* fusionada con hasta tres copias de Me2, el ectodominio de una proteína M2 de la gripe A, que se encuentra en el locus de *fhb*.

5 En Reveneau N et al., «Tetanus toxin fragment C-specific priming by intranasal infection with recombinant *Bordetella pertussis*», *Vaccine*, vol. 20, nº 5-6, 12 de Diciembre de 2001, se describe el uso de un fragmento de FHA ("Fha44") como un vehículo del fragmento C de la toxina tetánica (TTFC). Reveneau N et al. indican sin embargo que se ha encontrado que Fha44, cuando es producida por *B. pertussis* en lugar de FHA de longitud completa, carece totalmente de inmunogenicidad después de una infección intranasal con la cepa correspondiente, lo que confirma que las dos moléculas difieren sustancialmente en sus propiedades inmunogénicas.

10 A partir del documento WO 2007/104451 A1, que se analiza adicionalmente en este documento, se conoce una cepa de *B. pertussis* atenuada genéticamente, que carece de la citotoxina traqueal (TCT), la toxina pertussis (PTX) y la toxina dermonecrotica (DNT), pero que no expresa una proteína híbrida.

15 A partir de Mielcarek N et al., "Homologous and heterologous protection after single intranasal administration of live attenuated recombinant *Bordetella pertussis*", *Nature Biotechnology*, vol. 16, nº 5, 1 de mayo 1998, se conocen cepas atenuadas de *B. pertussis* que expresan el antígeno Sm28GST de *Schistosoma mansoni* fusionado con FHA de longitud completa. Por lo menos el gen *dnt* no está deletado, y las cepas no comprenden un *ampG* heterólogo.

20 BPZE1 posteriormente ha sido considerada como un vector para la expresión de antígenos protectores heterólogos, con el fin de desarrollar vacunas nasales multivalentes, capaces de proteger simultáneamente contra varios agentes patógenos diferentes. El péptido neutralizante SP70 procedente de enterovirus 71 se ha expuesto en superficie y ha sido secretado por BPZE1 como una proteína híbrida con hemaglutinina filamentosa (FHA), y empleando la maquinaria para la secreción de FHA (Ho et al., 2008). Del mismo modo, la maquinaria de FHA también se ha utilizado para secretar y exponer el ectodominio de la proteína 2 de la matriz del virus de la gripe A a través de BPZE1 (Li et al., 2011). Aunque las respuestas de IgG e IgA sistémicas y locales podrían estar provocadas por los antígenos heterólogos después de la administración de los derivados de BPZE1 recombinantes, las respuestas inmunes frente a los antígenos pasajeros eran generalmente, en el mejor de los casos, moderadas.

Al tratar de resolver el problema de la mala inmunogenicidad obtenida con las estructuras artificiales de BPZE1, los inventores descubrieron sorprendentemente que la inmunogenicidad se podía incrementar considerablemente cuando el gen *fhb* natural que codificaba la proteína de FHA de origen natural, se deletaba o se inactivaba de otra forma.

30 Además, las cepas obtenidas de este modo mostraban un aumento sustancial de la inmunogenicidad a pesar de las propiedades antiinflamatorias de la cepa natural atenuada de *Bordetella pertussis*, como se evidenciaba por su actividad contra el asma y enfermedades alérgicas. En consecuencia, la presente invención resuelve el problema de una vacuna para aplicar en la mucosa, que es segura y capaz de provocar una potente respuesta inmune contra un antígeno presente en un agente patógeno responsable de infecciones sistémicas o de la mucosa, incluyendo agentes patógenos responsables de infecciones del tracto respiratorio superior o inferior.

COMPENDIO DE LA INVENCION:

40 En este documento se describe una cepa de *Bordetella pertussis* recombinante, atenuada genéticamente que comprende un gen mutado de la toxina pertussis (*ptx*) y un gen *ampG* heterólogo y que expresa una proteína híbrida que comprende el fragmento N-terminal de la hemaglutinina filamentosa (FHA) y un epítipo heterólogo o una proteína antigénica o un fragmento de proteína, diferente de FHA, en donde el gen que codifica la proteína FHA natural está inactivado. La invención se refiere a una cepa tal y como se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

45 Se describe además una vacuna viva atenuada para el tratamiento de una enfermedad infecciosa de la mucosa que comprende una cepa de *Bordetella pertussis* tal y como se ha definido anteriormente, destinada a provocar una respuesta inmune contra un agente patógeno responsable de infecciones de la mucosa, es decir, del tracto respiratorio superior o inferior. La invención se refiere además a usos terapéuticos tal y como se definen en las reivindicaciones 16 y 17.

50 Todavía otro aspecto de la presente descripción se refiere a un método para la profilaxis de una enfermedad infecciosa en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de una vacuna que comprende en un vehículo adecuado una cepa recombinante atenuada genéticamente de *Bordetella pertussis* que comprende un gen mutado de la toxina pertussis (*ptx*) y un gen *ampG* heterólogo y que expresa una proteína de fusión que comprende el fragmento N-terminal de la hemaglutinina filamentosa (FHA) y un epítipo heterólogo o una proteína antigénica o un fragmento de proteína, diferente de FHA, en donde el gen que codifica la proteína FHA natural está inactivado. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento o de prevención se refiere a productos de la presente invención para uso en métodos terapéuticos tal y como se reivindica.

En otro aspecto, se describen métodos para proteger a un mamífero contra una infección con un agente patógeno

que infecta una mucosa, es decir, el tracto respiratorio inferior o superior y/o que provoca una respuesta inmune contra un agente patógeno de ese tipo en un mamífero, usando la composición o la vacuna tal y como se describe en este documento.

En todavía otro aspecto, se describe un método para provocar una respuesta inmune contra un agente patógeno con tropismo hacia la mucosa en un mamífero, que comprende: administrar una cepa recombinante atenuada de *Bordetella pertussis* al mamífero, en donde la cepa mutada de *Bordetella pertussis* comprende un gen mutado de la toxina pertussis (*ptx*) y un gen *ampG* heterólogo y expresa una proteína de fusión que comprende el fragmento N-terminal de la hemaglutinina filamentososa (FHA) y un epítipo heterólogo o una proteína antigénica o un fragmento de proteína, diferente de FHA, del agente patógeno contra el cual se busca la respuesta inmune, en donde en dicha cepa recombinante, el gen que codifica la proteína FHA natural está inactivado.

En otro aspecto, la cepa recombinante comprende adicionalmente además del gen mutado de la toxina pertussis (*ptx*) y el gen *ampG* heterólogo, un gen de la toxina dermonecrótica (*dnt*) delecionado o mutado. En algunos de tales aspectos, el gen *ampG* de la cepa de *Bordetella* de tipo silvestre se sustituye por un gen *ampG* de otras bacterias Gram negativas, tales como un gen *ampG* de *E. coli*.

En otros aspectos, la mutación del gen *ptx* comprende la sustitución de un aminoácido implicado en la unión del sustrato y/o un aminoácido implicado en la catálisis. En algunos de tales aspectos, la sustitución del aminoácido implicado en la unión del sustrato comprende K9R y la sustitución del aminoácido implicado en la catálisis comprende E129G. En algunos aspectos, la cepa de *Bordetella pertussis* comprende una cepa mutante triple. En algunos de tales aspectos, la cepa de *Bordetella* es la cepa BPZE1 identificada por el número de orden CNCM 1-3585.

En otros aspectos, los métodos comprenden además la prevención o el tratamiento de la infección de la mucosa en el mamífero. En algunos aspectos, la cepa de *Bordetella pertussis* se administra antes de la infección de la mucosa. En algunos de tales aspectos, la cepa de *Bordetella pertussis* se administra aproximadamente durante 6 semanas o más antes de la infección de la mucosa. En otros de esos aspectos, la cepa de *Bordetella pertussis* se administra aproximadamente durante 12 semanas o más antes de la infección de la mucosa. En algunos aspectos, el agente patógeno responsable de la infección de la mucosa es el virus de la gripe, el virus respiratorio sincitial o *Streptococcus pneumoniae*.

En algunos otros aspectos, la cepa se administra a un mamífero que requiere una inmunidad protectora contra una infección de la mucosa. En algunos aspectos, el mamífero es un ser humano.

En todavía otro aspecto, la descripción se refiere a un método para mejorar la respuesta inmune frente a un agente patógeno en un mamífero, que comprende administrar una vacuna basada en un vector recombinante de *Bordetella*, en donde dicha *Bordetella* expresa una proteína de fusión que comprende el fragmento N-terminal de la hemaglutinina filamentososa (FHA) y un epítipo heterólogo o una proteína antigénica o un fragmento de proteína de dicho agente patógeno contra el que se busca la respuesta inmune y en donde en dicha cepa recombinante, el gen que codifica la proteína FHA natural está inactivado.

De acuerdo con la invención, la cepa de *Bordetella* es una cepa de *Bordetella pertussis*. También se describen además en el presente documento, de acuerdo con aspectos adicionales, otras especies de *Bordetella*, tales como *Bordetella bronchiseptica* o *Bordetella parapertussis*.

La cepa de *Bordetella* comprende de forma ventajosa las características descritas anteriormente para BPZE1 y se puede administrar como una vacuna farmacéutica o veterinaria contra un agente patógeno tal y como se ha descrito anteriormente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

Definiciones:

En toda la memoria descriptiva se emplean diversos términos y se definen en los párrafos siguientes.

Tal y como se usa en el presente documento, la abreviatura "PTX" se refiere a la toxina pertussis, que es una toxina de ribosilación de ADP secretada. PTX está compuesta por cinco subunidades diferentes (denominadas S1-S5) en donde cada complejo contiene dos copias de S4 y una copia de las otras subunidades. Las subunidades están dispuestas en una estructura A-B. El componente A es enzimáticamente activo y está formado por la subunidad S1, mientras que el componente B es la porción que se une al receptor y se compone de las subunidades S2-S5.

Tal y como se usa en el presente documento, la abreviatura "DNT" se refiere a la toxina dermonecrótica de *B. pertussis*, que es una toxina termolábil que puede inducir lesiones localizadas en ratones y otros animales de laboratorio cuando se inyecta por vía intradérmica.

Tal y como se usa en el presente 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 de sintasa de óxido nítrico. Tiene la capacidad de causar la estasis de los cilios y

tiene efectos letales sobre las células epiteliales respiratorias.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de fusión" o "proteína híbrida" se refiere a una proteína que comprende una primera proteína que consiste en la parte N-terminal de FHA y una segunda proteína ligada a la misma, en donde la segunda proteína comprende una proteína de *Bordetella* diferente de FHA o preferiblemente una proteína de una especie diferente, a saber, un virus, un hongo y una bacteria responsable de una infección de la mucosa o sistémica, o un fragmento de una proteína de ese tipo capaz de provocar una respuesta inmune contra *Bordetella* o la especie responsable de la infección de la mucosa o sistémica.

El término "atenuada" se refiere a una cepa debilitada, menos virulenta de *Bordetella pertussis* que es capaz de estimular una respuesta inmune y crear una inmunidad protectora, pero que en general no causa enfermedad.

"Tratar" o "tratamiento" usando los métodos de la presente descripción o invención incluye la prevención de la aparición de síntomas en un sujeto que puede tener un riesgo incrementado de una enfermedad o trastorno asociado con una enfermedad, una afección o un trastorno, tal y como se describe en el presente documento, pero que todavía no experimenta o muestra los síntomas, la inhibición de los síntomas de una enfermedad o trastorno (frenando o deteniendo su desarrollo), proporcionar un alivio de los síntomas o efectos secundarios de una enfermedad (incluyendo un tratamiento paliativo) y el alivio de los síntomas de una enfermedad (provocando una regresión). El tratamiento puede ser profiláctico (para evitar o retrasar la aparición de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o una supresión terapéutica o un alivio de los síntomas después de la manifestación de la enfermedad o la afección.

Los términos "protección" y "prevención" se usan en este documento de forma intercambiable y significan que se impide una infección con un agente patógeno virulento.

La expresión "composición inmunogénica" o "composición" significa que la composición puede inducir una respuesta inmune y por lo tanto es inmunogénica. La expresión "respuesta inmune" significa cualquier reacción del sistema inmune. Estas reacciones incluyen la alteración de la actividad del sistema inmune de un organismo como respuesta a un antígeno y pueden implicar, por ejemplo, la producción de anticuerpos, la inducción de una inmunidad mediada por células, la activación del complemento, el desarrollo de una tolerancia inmunológica, el desarrollo de una memoria inmunológica o la activación inmune innata.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "enfermedad" tiene el significado generalmente conocido y entendido en la técnica y comprende cualquier afección anormal de la función o el bienestar de un individuo hospedador. Un diagnóstico de una enfermedad en particular realizado por un profesional de la salud, se puede hacer mediante un examen directo y/o mediante la consideración de resultados de una o varias pruebas de diagnóstico.

La expresión "administración nasal" se refiere a cualquier forma de administración mediante la cual un ingrediente activo es propulsado o introducido de otra manera en los conductos nasales de un sujeto, de modo que entra en contacto con el epitelio respiratorio de la cavidad nasal. La administración nasal también puede implicar poner en contacto el epitelio olfatorio, que se encuentra en la parte superior de la cavidad nasal entre el tabique nasal central y la pared lateral de cada conducto nasal principal. La región de la cavidad nasal que rodea estrechamente el epitelio olfatorio está exenta de flujo de aire. Por tanto, se deben emplear normalmente métodos especializados para lograr una absorción significativa a través del epitelio olfatorio.

El término "aerosol" se utiliza en su sentido convencional que se refiere a gotitas de líquido muy finas o a partículas sólidas transportadas por un gas propulsor a presión hasta un sitio de aplicación terapéutica. Un aerosol farmacéutico de la descripción o utilizado dentro de la invención contiene un compuesto terapéuticamente activo que se puede disolver, puede estar suspendido o emulsionado en una mezcla de un vehículo fluido y un propelente. El aerosol puede estar en forma de una solución, suspensión, emulsión, polvo o preparación semisólida. Los aerosoles de la presente descripción o que se utilizan dentro de la presente invención están destinados a una administración en forma de partículas finas, sólidas o como nieblas líquidas a través del tracto respiratorio de un sujeto. Se pueden utilizar diversos tipos de propelentes incluyendo, pero no limitados a, hidrocarburos u otros gases adecuados. Los aerosoles de la presente descripción o utilizados dentro de la presente invención también se pueden administrar con un nebulizador, que genera partículas líquidas muy finas de tamaño sustancialmente uniforme dentro de un gas. Preferiblemente, un líquido que contiene el compuesto activo se dispersa en forma de gotitas, que pueden ser transportadas por una corriente de aire fuera del nebulizador y en el tracto respiratorio del paciente.

El término "mamífero" tal y como se usa en el presente documento, incluye tanto seres humanos como no humanos, e incluye pero no se limita a seres humanos, primates no humanos, animales caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos y porcinos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que es eficaz para mejorar un síntoma de una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una "cantidad profilácticamente eficaz" ya que la profilaxis se puede considerar una terapia.

Tal y como se usa en el presente documento, los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "tiene", "que tiene" o cualquier otra variación de los mismos, están destinados a cubrir una inclusión no exclusiva.

Por ejemplo, un procedimiento, un método, un artículo o un aparato que comprende una lista de elementos no está necesariamente limitado solo a esos elementos, sino que puede incluir otros elementos que no se indican expresamente o son inherentes a tal procedimiento o método. Además, a menos que se indique expresamente lo contrario, "o" se refiere a un o inclusivo y no a un o exclusivo. Por ejemplo, se cumple un requisito A o B a través de cualquiera de los siguientes casos: A es verdadero (o está presente) y B es falso (o no está presente), A es falso (o no está presente) y B es verdadero (o está presente) y tanto A como B son verdaderos (o están presentes).

"Aproximadamente", tal y como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, se entiende que incluye variaciones de +/- 20% o +/- 10%, más preferiblemente +/- 5%, incluso más preferiblemente +/- 1%, y aún más preferiblemente +/- 0,1% del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos descritos.

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

Tal y como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una vacuna" incluye una combinación de dos o más vacunas, y similares.

Los autores de la presente invención han generado un sistema de expresión heteróloga optimizada para *Bordetella pertussis*, mediante el uso del dominio N-terminal de FHA para transportar antígenos heterólogos a la superficie bacteriana y al medio extracelular y eliminando el gen original que codifica FHA. Mediante el uso de tres modelos diferentes (virus de la gripe A, virus respiratorio sincitial (RSV, por sus siglas en inglés) y *Streptococcus pneumoniae*), la invención proporciona la evidencia de una fuerte mejora de la inmunogenicidad sobre los sistemas anteriores.

Todavía otro aspecto de la presente descripción se refiere a una cepa atenuada recombinante de *Bordetella pertussis* que se puede utilizar como una composición inmunogénica o una vacuna para provocar una respuesta inmune en un mamífero.

De acuerdo con un primer aspecto, se describe una cepa atenuada genéticamente de *Bordetella pertussis* que comprende un gen mutado de la toxina pertussis (*ptx*) y un gen *ampG* heterólogo y que expresa una proteína híbrida que comprende el fragmento N-terminal de la hemaglutinina filamentososa (FHA) y un epítipo heterólogo o una proteína antigénica o un fragmento de proteína, diferente de FHA, en donde el gen que codifica la proteína FHA natural está inactivado. El gen que codifica la proteína FHA natural puede estar inactivado mediante una delección parcial o total.

De acuerdo con otro aspecto, el fragmento N-terminal de la proteína FHA comprende los aminoácidos desde las posiciones 1 a 862, más preferiblemente desde las posiciones 1 a 330, comenzando con el primer aminoácido de la preproteína FhaB tal y como se define por Lambert-Busine et al. (1998).

La invención se refiere a una cepa tal como se define en la reivindicación 1.

Las vacunas vivas atenuadas de *B. pertussis* que carecen de la citotoxina traqueal (TCT), la toxina pertussis (PTX) activa y la toxina dermonecrótica (DNT) han sido descritas en el documento WO2007/104451 y en Mielcarek et al. (2006).

El gen *ampG* de *B. pertussis* se puede reemplazar por *ampG* de *E. coli*. La cepa resultante expresaba menos de un 1% de actividad residual de TCT. Se puede emplear en la presente invención cualquier gen *ampG* heterólogo procedente de bacterias gram negativas que liberan cantidades muy pequeñas de fragmentos de peptidoglicano en el medio. Ejemplos del gen *ampG* heterólogo adecuado incluyen, pero no se limitan a genes *ampG* procedente de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Legionella*.

PTX es un importante factor de virulencia responsable de los efectos sistémicos de infecciones de *B. pertussis* y se compone de un resto enzimáticamente activo, denominado S1, y un resto responsable de la unión a receptores de células diana. También es uno de los principales antígenos protectores. Los genes *ptx* naturales se pueden sustituir por una versión mutada que codifica una toxina enzimáticamente inactiva. Esto se puede conseguir mediante la sustitución de Arg-9 por Lys, y Glu-129 por Gly en S1, dos residuos clave implicados en la unión al sustrato y la catálisis, respectivamente. Se puede emplear un intercambio alélico para delecionar primero el operón de *ptx*, y luego insertar la versión mutada.

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

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

El intercambio alélico también se puede utilizar para eliminar el gen *dnt*. Aunque el papel de DNT en la virulencia de

B. pertussis no es seguro, se ha identificado como una toxina importante en la especie estrechamente relacionada *B. bronchiseptica* y muestra actividad letal después de una inyección de cantidades muy pequeñas.

La TCT es responsable de la destrucción de las células ciliadas en la tráquea de los hospedadores infectados y, por lo tanto, puede estar implicada en el síndrome de la tos. La TCT es un producto de degradación del peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas, que generalmente es internalizada en el citosol a través de la proteína transportadora AmpG para ser reutilizada durante la biosíntesis de la pared celular. AmpG de *B. pertussis* es ineficaz en la internalización de los productos de degradación de peptidoglicano.

En una realización preferida, la vacuna viva atenuada de *B. pertussis* es la cepa BPZE1 depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 París Cedex 15, Francia) el 9 de marzo de 2006 con el número CNCM I-3585.

En un aspecto, la cepa recombinante de *Bordetella* contiene un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* deleciónado o mutado y un gen *ampG* heterólogo. El producto del gen *ampG* heterólogo puede reducir fuertemente la cantidad de citotoxina traqueal que se produce. La cepa de partida que está mutada puede ser cualquier cepa de *Bordetella* incluyendo *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. En un aspecto, la cepa de partida empleada para obtener la cepa mutada de *Bordetella* es *B. pertussis*. En otro aspecto, la cepa es una cepa mutante triple de *Bordetella*. En otro aspecto, la cepa de *Bordetella* se identifica por el número de orden CNCM 1-3585. En otro aspecto, la cepa de *Bordetella* se identifica por el número de orden V09/009169.

La invención no se limita solo a los mutantes descritos anteriormente. Se pueden llevar a cabo otras mutaciones adicionales, tal como mutantes carentes de adenilato ciclasa (AC), mutantes carentes de lipopolisacárido (LPS), hemaglutinina filamentos (FHA) y cualquiera de los componentes regulados por *bvg*.

Ventajosamente, la cepa de *Bordetella* se ha producido de forma que carezca de la producción de toxinas mediante eliminación o deleción, al menos parcialmente, o por mutación, del gen que codifica la toxina con el fin de producir una toxina inactiva o ninguna toxina. Un gen de ese tipo puede ser particularmente el gen que codifica la toxina de *B. pertussis* o cualquier proteína que tiene una estructura o una función similar a una toxina de ese tipo. Puede ser también el gen que codifica la toxina de hemolisina/adencilato ciclasa o la toxina dermonecrótica expresada por cepas de *Bordetella* o proteínas que tienen estructura o función similares. La cepa de *Bordetella* puede carecer de la producción de una o varias de esas toxinas.

La proteína híbrida comprende parte de la proteína FHA y al menos parte de la proteína de interés. Esta proteína particular se puede expresar por una cepa de la especie *B. pertussis*, tal como la cepa BPNX depositada con el n° I-1770 el 8 de octubre de 1996 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur, 28, Rue du Docteur Roux, F-75724, París, Cedex 15, Francia, o la cepa de *B. pertussis* se identifica por el número de orden CNCM 1-3585 o la cepa de *B. pertussis* se identifica por el número de orden V09/009169.

Dicha proteína híbrida puede ser expresada en particular por la cepa BPZE1 mutada, depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) en París, Francia, bajo el Tratado de Budapest el 9 de marzo de 2006 y con el número asignado CNCM 1-3585.

Una cepa de acuerdo con la presente descripción o invención se puede obtener mediante la eliminación del gen de la toxina, del genoma de una cepa virulenta que expresa dicha proteína híbrida, o mediante una deleción parcial o por mutación con el fin de producir una toxina inactiva. La eliminación se puede llevar a cabo por cualquier método conocido por los expertos en la técnica y en particular mediante el cruce de la cepa virulenta con una cepa de movilización, después mediante selección a través de marcadores adaptados de acuerdo con las cepas, de las células que han perdido el gen de la toxina. Esa pérdida de capacidad de la cepa virulenta para expresar la toxina da lugar a un evento doble de recombinación homóloga entre la cepa virulenta y un plásmido de la cepa de movilización. Una persona experta en la técnica para la obtención de cepas atenuadas puede hacer referencia al método descrito por Antoine y Loch (1990).

Las características de las cepas que carecen de la producción de toxinas, seleccionadas de este modo, se pueden comprobar con diversas técnicas, en particular por transferencia Western.

Las cepas no virulentas que expresan la proteína híbrida se pueden obtener con los métodos conocidos por los expertos en la técnica y, en particular, se pueden obtener tal y como se describe en el documento de solicitud de patente francesa mencionada anteriormente, FR-94 04 661. Los ADN recombinantes que comprenden por una parte una secuencia que codifica un péptido heterólogo y por otra parte una secuencia que codifica una parte de FHA, se obtienen a través de los métodos conocidos por los expertos en la técnica, en particular, tal y como se describe en el Ejemplo V del documento de solicitud de patente francesa FR-94 04 661. Este ejemplo da como resultado la fusión de la región 190-211 de la glutatión-S-transferasa de 28 kDa (Sm28GST) de *Schistosoma mansoni*, con la proteína FHA truncada. Los ADN recombinantes que codifican las proteínas híbridas se seleccionan, la secuencia de los mismos se comprueba de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, a continuación, se transfieren a células de *Bordetella*.

La persona experta en la técnica puede hacer referencia para la aplicación de la presente invención a manuales

generales relacionados con estas técnicas y en particular al siguiente manual: Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, EE.UU., o una de sus recientes reediciones.

5 La proteína heteróloga, cuya secuencia se incluye en la proteína híbrida, puede ser cualquier secuencia de proteína antigénica, especialmente antígenos de *Bordetella*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Borrellia*, *Mycobacterium*, toxinas o toxoides de la difteria, el tétanos o el cólera, antígenos víricos, incluyendo la gripe, RSV, hepatitis B, hepatitis C, poliovirus, rinovirus o VIH, o antígenos parasitarios tales como los de *Plasmodium*, *Schistosoma* o *Toxoplasma*. También puede incluir un epítipo de una proteína capaz de ser expresada por agentes patógenos después de infecciones de la mucosa o infecciones sistémicas.

10 Ventajosamente, la proteína heteróloga es la totalidad o parte de la proteína de la matriz M2 del virus de la gripe A.

En una realización preferida de la invención, la proteína heteróloga es el dominio extracelular de la proteína M2.

En otra realización, la proteína heteróloga es la totalidad o parte de la proteína G de RSV, a saber, la porción que se extiende desde los residuos de aminoácidos 170 a 197, que contiene ambos epítipos de linfocitos B y T (Yusibov et al., 2005; Varga et al., 2000).

15 En todavía otra realización, la proteína heteróloga es la totalidad o parte de la proteína PcsB, un antígeno de vacuna de amplia reactividad cruzada de *S. pneumonia* (Giefing et al., 2008)

20 La construcción de una cepa mutada de *Bordetella* de la invención puede comenzar con la sustitución del gen *ampG* de *Bordetella* en la cepa con un gen *ampG* heterólogo. Cualquier gen *ampG* heterólogo conocido en la técnica se puede utilizar en la invención. Ejemplos de los mismos pueden incluir todas las bacterias gram negativas que liberan cantidades muy pequeñas de fragmentos de peptidoglicano en el medio en cada generación. Ejemplos de bacterias gram negativas incluyen, pero no se limitan a: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Legionella* y similares. Normalmente, mediante la sustitución del gen *ampG* de *Bordetella* con un gen *ampG* heterólogo, la cantidad de citotoxina traqueal (TCT) producida en la cepa resultante expresa una actividad residual de TCT inferior al 1%. En otro aspecto, la cantidad de toxina TCT expresada por la cepa resultante está entre aproximadamente 0,6% a 1% de la actividad residual de TCT o aproximadamente 0,4% a 3% de la actividad residual de TCT o aproximadamente 0,3% a 5% de actividad residual de TCT.

30 PTX es un importante factor de virulencia, responsable de los efectos sistémicos de la infecciones con *B. pertussis*, así como uno de los principales antígenos protectores. Debido a sus propiedades, el gen *ptx* natural se puede reemplazar por una versión mutada, de manera que el resto S1 enzimáticamente activo se sustituye por una subunidad enzimáticamente inactiva, pero las propiedades inmunogénicas de la toxina pertussis no se ven afectadas. Esto se puede lograr mediante la sustitución de la lisina (Arg) en la posición 9 de la secuencia con una arginina (Lys) (R9K). Además, un ácido glutámico (Glu) en la posición 129 se puede sustituir por una glicina (Gly) (E129G). Estas posiciones de aminoácidos están implicadas en la unión al sustrato y la catálisis, respectivamente. En otros aspectos, otras mutaciones también se pueden realizar, tales como las descritas en el documento de Patente de EE.UU. nº 6.713.072, así como cualquier mutación conocida u otras capaces de reducir la actividad de la toxina. En un aspecto, se puede utilizar primero un intercambio de alelos para eliminar el operón de *ptx* y luego insertar una versión mutada.

40 En otro aspecto, el gen *dnt* se puede retirar de la cepa de *Bordetella* usando intercambio alélico. Además de la retirada total, la actividad enzimática también se puede inhibir con una mutación puntual. Puesto que DNT está constituida por un dominio que se une al receptor 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 por Ala-1305 inhibe la actividad enzimática de DNT (Kashimoto et al., 1999).

45 El transgén que codifica la proteína híbrida se puede insertar en la cepa mutada que se ha definido anteriormente mediante la inserción de una secuencia genética o un plásmido mediante el uso de procedimientos bien conocidos en la técnica.

Ventajosamente, el gen que codifica la proteína heteróloga o un fragmento epitópico de la misma se fusiona como una sola copia o múltiples copias con la secuencia codificadora de la parte N-terminal de FHA.

50 El transgén se inserta ventajosamente en el locus de *dnt* de *B. pertussis* mediante intercambio alélico, usando plásmidos que contienen regiones aguas arriba y aguas abajo del gen *dnt*, tal y como se describe en Mielcarek et al. (2006) para la delección del gen *dnt*.

55 Las cepas recombinantes de *Bordetella* de la invención se pueden usar en composiciones inmunogénicas para el tratamiento o la prevención de infecciones de la mucosa. Tales composiciones inmunogénicas son útiles para incrementar una respuesta inmune, ya sea una respuesta de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T en mamíferos. Por ejemplo, una respuesta de linfocitos T o de anticuerpos puede ser de tal modo que protege a un mamífero contra la gripe, RSV, *S. pneumoniae* u otras infecciones o contra sus consecuencias/enfermedades/síntomas.

Las cepas mutadas de *Bordetella* de la invención se pueden usar en vacunas o composiciones inmunogénicas, tal y como se establece en las reivindicaciones. En un aspecto, las cepas se utilizan para una administración nasal.

Las composiciones descritas en este documento se pueden administrar junto con otros agentes inmunorreguladores, incluyendo adyuvantes aunque no se prefiere la adición de un adyuvante.

- 5 En otro aspecto, se describen métodos para proteger a un mamífero contra una infección con un agente patógeno que infecta una mucosa, es decir, el tracto respiratorio inferior o superior y/o que provoca una respuesta inmune contra un agente patógeno de ese tipo en un mamífero usando la composición o la vacuna de la presente descripción.

- 10 En todavía otro aspecto, se describe un método para provocar una respuesta inmune contra un agente patógeno con tropismo hacia la mucosa en un mamífero, que comprende: administrar una cepa recombinante de *Bordetella pertussis* que comprende un gen mutado de la toxina pertussis (*ptx*) y un gen *ampG* heterólogo y que expresa una proteína híbrida que comprende el fragmento N-terminal de la hemaglutinina filamentosa (FHA) y un epítipo heterólogo o una proteína antigénica o un fragmento de proteína, diferente de FHA, en donde el gen que codifica la proteína FHA natural está inactivado.

- 15 En un aspecto, la cepa recombinante comprende un gen mutado de la toxina pertussis (*ptx*), un gen dermonecrótico (*dnt*) deletado o mutado y un gen *ampG* heterólogo. En algunos de tales aspectos, el gen *ampG* de la cepa de *Bordetella* de tipo silvestre se sustituye por un gen *ampG* de otras bacterias Gram negativas, tal como un gen *ampG* de *E. coli*.

- 20 En otros aspectos, la mutación del gen *ptx* comprende la sustitución de un aminoácido implicado en la unión del sustrato y/o un aminoácido implicado en la catálisis. En algunos de tales aspectos, la sustitución del aminoácido implicado en la unión del sustrato comprende K9R y la sustitución del aminoácido implicado en la catálisis comprende E129G. En algunos aspectos, la cepa de *Bordetella* comprende una cepa mutante triple. En algunos de tales aspectos, la cepa de *Bordetella* es la cepa BPZE1 identificada con el número de orden CNCM 1-3585.

- 25 En otros aspectos, los métodos comprenden además la prevención o el tratamiento de la infección de la mucosa en un mamífero. En algunos aspectos, la cepa de *Bordetella* se administra antes de la infección de la mucosa. En algunos de tales aspectos, la cepa de *Bordetella* se administra aproximadamente durante 6 semanas o más antes de la infección de la mucosa. En otros de tales aspectos, la cepa de *Bordetella* se administra aproximadamente durante 12 semanas o más antes de la infección de la mucosa. En algunos aspectos, el agente patógeno responsable de la infección de la mucosa es el virus de la gripe, el virus respiratorio sincitial o *Streptococcus pneumoniae*.

- 30 En algunos otros aspectos, la cepa se administra a un mamífero que requiere una inmunidad protectora contra una infección de la mucosa o sistémica. En algunos aspectos, el mamífero es un ser humano.

- Los métodos para el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con las infecciones de la mucosa o sistémicas incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición tal y como se describe en el presente documento. Una composición de este tipo se puede formular en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de una o varias de las cepas, un excipiente, un vehículo, un tampón, un estabilizador farmacéuticamente aceptable, u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales normalmente no deben ser tóxicos y normalmente no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo.

- 35 La composición se puede utilizar normalmente para provocar una inmunidad de la mucosa. En otros aspectos, la cantidad de bacterias en cada dosificación se ajusta para lograr una respuesta inmune eficaz en un mamífero. La cantidad de bacterias o ufc's en cada dosificación puede ser de aproximadamente 1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, 5×10^6 , 10^7 , 10^8 o más, o cualquier dosificación entre cada dosificación mencionada.

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

- 45 Normalmente, las vacunas se pueden administrar mediante administración nasal o por inhalación. Este tipo de administración es baja en costes y permite que la vacuna viva atenuada de *B. pertussis* descrita en el presente documento, colonice el tracto respiratorio. La administración nasal puede lograrse con una vacuna viva atenuada de *B. pertussis* en forma de solución líquida, suspensión, emulsión. Las soluciones y suspensiones se administran en forma de gotas. Las soluciones también se pueden administrar como una nebulización fina desde un frasco de atomizador nasal o un inhalador nasal. Los geles se administran en jeringas pequeñas que contienen la dosificación requerida para una aplicación. La inhalación se puede llevar a cabo con una vacuna viva atenuada de *B. pertussis* en forma de soluciones, suspensiones y polvos; estas formulaciones se administran a través de un aerosol, gotitas o

un inhalador de polvo seco. Los polvos se pueden administrar con insufladores o inhaladores.

Entre las diversas opciones de administración en la mucosa disponibles, la vía intranasal es la más práctica, ya que ofrece un fácil acceso con dispositivos relativamente simples que ya han sido producidos en masa. La composición se adapta de este modo preferiblemente y/o se envasa para una administración intranasal, tal como mediante pulverización nasal, gotas nasales, gel o polvos.

Cualquiera que sea la vía de administración, las composiciones se envasan preferiblemente en forma de dosis unitaria. Las dosis eficaces se pueden establecer de forma rutinaria. Una dosis humana normal de la composición para inyección o para uso intranasal tiene un volumen de entre 0,1-1,0 ml, por ejemplo, dos inhalaciones de 500 µl, una en cada orificio nasal.

Las composiciones se almacenan preferentemente, por ejemplo, entre pH 6 y pH 8, generalmente aproximadamente pH 7.

La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

FIGURAS:

Figura 1. Respuestas de IgG anti-M2e en suero después de la administración de los derivados de BPZE1 indicados. Ratones BALB/c fueron inmunizados i.n. dos veces en un intervalo de 4 semanas con 10^7 UFC de las cepas indicadas. Ratones vacunados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) sirvieron como controles negativos. Los sueros se recogieron dos semanas después de la última inmunización, y las respuestas de IgG en suero frente a M2e se midieron por ELISA.

Figura 2. Respuestas de IgG anti-G_{RSV} en suero después de la administración de los derivados de BPZE1 indicados. Ratones BALB/c fueron inmunizados i.n. dos veces en un intervalo de 4 semanas con 10^7 UFC de las cepas indicadas. Los ratones (sin tratar) vacunados con solución salina tamponada con fosfato sirvieron como controles negativos. Los sueros se recogieron dos semanas después de la última inmunización, y las respuestas de IgG en suero frente a G_{RSV} se midieron por ELISA.

Figura 3. Respuestas de IgG anti-PcsB en suero después de la administración de los derivados de BPZE1 indicados. Ratones BALB/c fueron inmunizados i.n. dos veces en un intervalo de 4 semanas con 10^7 UFC de las cepas indicadas. Los sueros se recogieron dos semanas después de la última inmunización, y las respuestas de IgG en suero frente a PcsB se midieron por ELISA.

Ejemplos

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. Las cepas de *B. pertussis* utilizadas para este estudio se enumeran en la Tabla 1. Se cultivaron en agar Bordet-Gengou (Difco, Detroit, Mich.) complementado con 1% de glicerol, 20% de sangre de oveja desfibrinada y 100 µg/ml de estreptomycin (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.) a 37°C durante 72 h. Los cultivos líquidos de *B. pertussis* se incubaron como se ha descrito previamente (Menozi et al., 1991) en medio Stainer-Scholte (Stainer y Scholte, 1970) que contenía 1 g/litro de heptakis (2,6-di-O-metil) β-ciclodextrina (Sigma).

Construcción de plásmidos y cepas de BPZE1 recombinantes. Todos los diferentes derivados de BPZE1 descritos en este documento contenían el transgén en el locus de *dnt* de BPZE1 insertado mediante intercambio alélico, utilizando plásmidos obtenidos a partir de pJQmp200rpsL12 (Quandt y Hynes, 1993) y que contenían las regiones aguas arriba y aguas abajo del gen *dnt*, como se ha descrito (Mielcarek et al. 2006) para la delección del gen *dnt* en BPZE1.

Construcción de pXR1.

En primer lugar, el sitio *Xba*I de la estructura principal de ese plásmido (Mielcarek et al., 2006), denominado pJQdntUPLO, se cambió de TCTAGA (SEQ ID NO: 1) a TCCAGA (SEQ ID NO: 2) utilizando los cebadores SP *Xba* mut 5'-GCATGCCTGCAGGTCGACTCCAGAGGATCCCCGGGTACCG-3' (SEQ ID NO: 3) y ASP *Xba* mut 5'-CGGTACCCGGGGATCC7CTGGAGTCGACCTGCAGGCATGC-3' (SEQ ID NO: 4) y QuickChange[®] XL (Stratagene) de acuerdo con la descripción del fabricante. Las regiones aguas arriba de *dnt* y aguas debajo de *dnt* del plásmido resultante, denominado pXR1, se secuenciaron. Se observó una mutación G → A en la región aguas debajo de *dnt* (correspondiente a la posición 3.651.839 del genoma de *B. pertussis*, GenBank NC-002929.2).

Construcción de pXR1-Fha44

Un gen sintético que codificaba la parte 5' del gen *fhaB* se adquirió en Eurogentec (Lieja, Bélgica). Este gen, denominado *fha44c*, contiene 2.583 pb que codifican los aminoácidos 1 a 861 de FhaB, el precursor de FHA (desde la posición del nucleótido 253 a 2835, GenBank M60351.1), a excepción de cuatro cambios silenciosos (G354C, C864G, G2.331C y A2.556G), un sitio de clonación múltiple de 27 pb con la secuencia 5'-

CTTAAGACGCGTCATATGGGCGGCCGC-3' (SEQ ID NO: 5) y dos codones de terminación TGA. Esta secuencia se proporcionó en un plásmido denominado pUC57-Fha44_c. Este plásmido se digirió con *Xho*I y *Xba*I, y el fragmento correspondiente a *fha44c* se insertó en pXR1 digerido con *Xho*I/*Xba*I. El plásmido resultante, pXR1-Fha44, contiene por tanto la región de 813 pb aguas arriba del codón de inicio ATG del gen *dnt* (desde la posición 3.646.310 a la posición 3.647.122 del genoma de *B. pertussis*, GenBank NC-002929.2), la región que codifica la proteína portadora Fha44 fusionada con el sitio de clonación múltiple de 27 pares de bases, seguida de dos codones de terminación TGA la región de 83 pb aguas abajo del codón de terminación TGA del gen *dnt* (desde la posición 3.651.479 a la posición 3.651.564 del genoma de *B. pertussis*, GenBank NC-002929.2), un sitio de restricción *Xba*I y la región aguas debajo de *dnt* de 712 pb de pXR1 (idéntica a la secuencia desde la posición 3.651.565 a la posición 3.652.276 del genoma de *B. pertussis*, GenBank NC-002929.2, excepto la mutación G → A correspondiente a la posición 3.651.839 del genoma de *B. pertussis*, GenBank NC-002929.2 que estaba presente en pXR1). El plásmido fue secuenciado para confirmar la ausencia de mutaciones inesperadas.

Construcción de derivados de BPZE1 que expresan Fha44-M2e

La secuencia que codificaba 3 copias del péptido M2e se amplificó con PCR a partir de pGA4-3M2e (de Geneart AG), que contenía la información codificante para tres copias en tándem de M2e. Cada copia de M2e en pGA4-3M2e está separada por SGGSGSGS y los codones de cisteína en las posiciones 17 y 19 en M2e se sustituyeron por serina. Los oligonucleótidos 5'-ACGCGTGTGGAACTCCTATCCG-3' (SEQ ID NO: 6) y 5'-CATATGGCCGCCAGAGCCGCTATCAGAGCTATCGTT-3' (SEQ ID NO: 7) se utilizaron como cebadores. A continuación, se insertó el fragmento de ADN amplificado en pCRII-TOPO (Invitrogen) y se verificó mediante una secuenciación del ADN. Un fragmento de 273 pb obtenido después de una digestión con *Mlu*I/*Nde*I se clonó en los sitios *Mlu*I/*Nde*I de pXR1-Fha44 para producir pHKG3. Este plásmido se secuenció para verificar la ausencia de alteraciones no deseadas y se introdujo en *E. coli* SM10 (Simon et al., 1983) mediante transformación, y las bacterias de *E. coli* SM10 recombinantes resultantes se conjugaron con BPZE1. Se seleccionaron dos eventos de recombinación homóloga sucesivos como se ha descrito (Stibitz, 1994). Las cepas recombinantes se analizaron después mediante PCR para identificar los clones en los que el gen híbrido se había insertado correctamente en el locus de *dnt*. La cepa BPZE1 recombinante se denominó BPZM2e.

Para construir BPZEM2e-ΔFha, una cepa recombinante carente de FHA, el gen que codificaba FHA se inactivó en BPZM2e usando el vector de integración pFUS2 como se ha descrito previamente (Antoine et al., 2000).

Construcción de derivados BPZE1 que expresan Fha44-G_{RSV}

El oligonucleótido que codificaba los aminoácidos 170 a 197 de la glicoproteína de la cepa A2 de RSV (GenBank AAC55969.1) fue sintetizado de acuerdo con el uso de codones de *B. pertussis* y tenía la siguiente secuencia:

5'-TTCGTGCCGTGCTCGATCTGCTCGAACAACCCGACCTGCTGGGCCAT
CTGCAAGCGCATCCCGAACAAGAAGCCGGGCAAGAAG-3' (SEQ ID NO: 8).

Fue producido mediante PCR usando 100 nM de oligonucleótidos solapantes

5'-AGGATCCTTCGTGCCGTGCTCGATCTGCTCGAACAACCCGACCTGCT
GGGCCATCTGCAAGCGCAT-3' (SEQ ID NO: 9) y

5'-AGGATCCCTTCTTGCCCGGCTTCTTGTTCGGGATGCGCTTGCAGATG GCCCAGCAGGTGGGTTGTTTCG-3' (SEQ ID NO: 10) como molde y oligonucleótidos 400 nM

5'-AGGATCCTTCGTGCCGTGCTCGATC-3' (SEQ ID NO: 11) y

5'-AGGATCCCTTCTTGCCCGGCTTCTT-3' (SEQ ID NO: 12) como cebadores.

A continuación, se insertó el fragmento de 96 pb resultante en pCRII-TOPO (Invitrogen), produciendo pCRII-TOPO-G_{RSV}*Bam*HI, y se secuenció para confirmar la ausencia de mutaciones inesperadas. A continuación, la secuencia de G de RSV se amplificó con PCR, usando pCRII-TOPO-G_{RSV}*Bam*HI como molde y los oligonucleótidos

5'-AACGCGTTTCGTGCCGTGCTCGATC-3' (SEQ ID NO: 13) y

5'-ACGCGTCTTCTTGCCCGGCTTCTT-3' (SEQ ID NO: 14) como cebadores. A continuación, se insertó el fragmento de 96 pb resultante en pCRII-TOPO, produciendo pCRII-TOPO-G_{RSV}*Mlu*I y se secuenció para confirmar la ausencia de mutaciones inesperadas. pCRII-TOPO-G_{RSV}*Mlu*I se digirió con *Mlu*I, y se insertó la secuencia de G de RSV en pXR1-Fha44 digerido con *Mlu*I para producir pXR1-Fha44/G_{RSV}. Este plásmido se secuenció para verificar la orientación correcta del inserto y la ausencia de alteraciones no deseadas, y luego se introdujo en *E. coli* SM10 (Simon et al., 1983) mediante transformación, y las bacterias de *E. coli* SM10 recombinantes resultantes se conjugaron con BPZE1. Se seleccionaron dos eventos de recombinación homóloga sucesivos como se ha descrito (Stibitz, 1994). Las cepas recombinantes se analizaron después con PCR para identificar los clones en los que el gen híbrido se había insertado correctamente en el locus de *dnt*. La cepa BPZE1 recombinante se denominó BPZG_{RSV}.

Para construir BPZG_{RSV}-ΔFha, una cepa recombinante carente de FHA, el gen que codifica FHA se inactivó en BPZG_{RSV} usando el vector de integración pFUS2 como se ha descrito previamente (Antoine et al., 2000).

Construcción de derivados de BPZE1 que expresan Fha44-PcsB

La secuencia codificadora de la forma madura de PcsB (desde el residuo de aminoácido 28 hasta el residuo 278) se amplificó con PCR utilizando el ADN cromosómico procedente del serotipo 1 de *S. pneumoniae* (cepa aislada clínica E1586) como molde y los oligonucleótidos sintéticos SP-PcsB 5'-CATATGTGGACGAACCTTTTGCACGGACA-3' (SEQ ID NO: 15) y ASP-PcsB 5'-ACGCGTGAAACGACTGATGACAAAATTCG-3' (SEQ ID NO: 16) como cebadores. *S. pneumoniae* se llevó a ebullición y se añadieron 10 μM de los oligonucleótidos en la mezcla de la PCR. El fragmento de 750 pb resultante se insertó en pCRII-TOPO, produciendo pCRII-TOPO-PcsB, y después se secuenció. pCRII-TOPO-PcsB se digirió con *MluI* y *NdeI*, y el fragmento correspondiente a la secuencia de PcsB se insertó en pXR1-Fha44 digerido con *MluI*/*NdeI*, produciendo pXR1-Fha44-PcsB. Después de la secuenciación, este plásmido se introdujo en *E. coli* SM10 (Simon et al., 1983) mediante transformación, y las bacterias de *E. coli* SM10 recombinantes resultantes se conjugaron con BPZE1. Se seleccionaron dos eventos de recombinación homóloga sucesivos como se ha descrito (Stibitz, 1994). Las cepas recombinantes se analizaron después con PCR para identificar los clones en los que el gen híbrido se había insertado correctamente en el locus de *dnt*. La cepa BPZE1 recombinante se denominó BPZPcsB.

Para construir BPZPcsB-ΔFha, una cepa recombinante carente de FHA, el gen que codificaba FHA se inactivó en BPZM2e usando el vector de integración pFUS2 como se ha descrito previamente (Antoine et al., 2000).

Análisis de proteínas e inmunodetección de las proteínas quiméricas recombinantes. Para la detección de las proteínas quiméricas Fha44-3M2e, Fha44-G_{RSV} y Fha44-PcsB, las cepas recombinantes se cultivaron durante 48 horas en 10 ml de medio Stainer-Scholte complementado con 100 μg/ml de estreptomycin. Las células se centrifugaron a continuación durante 15 minutos a 4000 x g. Se recogieron 400 μl de material sobrenadante y las células se resuspendieron en 400 μl de PBS. Se añadieron 200 μl de 3 x tampón de carga de Laemmli (1970) al material sobrenadante y a las suspensiones celulares. Las mezclas se calentaron después a 95°C durante 10 min. El ADN cromosómico se sometió a cizallamiento haciendo pasar la suspensión bacteriana 10 veces a través de una aguja de calibre 27. Esto vino seguido de un calentamiento a 95°C durante 15 min. Se cargaron 10 μl de cada muestra en un gel de electroforesis con dodecil sulfato sódico-poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) para el análisis mediante inmunotransferencia o la tinción con azul de Coomassie. Un material sobrenadante de BPZE1 no recombinante y/o lisado de células enteras se utilizaron como controles negativos.

Después de la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron sobre membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos de ratón anti-M2e (Neirynck et al., 1999) o anti-G_{RSV} (Mekseepalard et al., 2006) en PBS que contenía 0,1% de Tween 20 y 1% de albúmina de suero bovino. Anticuerpos monoclonales de cabra anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Promega) diluidos 1:4000, se utilizaron para una detección cromogénica de las proteínas mediante la adición del sustrato de fosfatasa alcalina (los reactivos tetrazolio nitroazul y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato; Promega). Los tamaños de las bandas reactivas se determinaron a partir de la distancia de migración del marcador proteico All Blue (Biorad).

Colonización e inmunogenicidad de los ratones. Los ratones BALB/c se obtuvieron a partir de Charles River (l'Abresle, Francia) y se mantuvieron en condiciones específicas exentas de agentes patógenos en las instalaciones para animales del Instituto Pasteur de Lille. Para la colonización del pulmón, ratones BALB/c de 6 semanas de edad fueron sedados ligeramente mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de una mezcla anestésica (ketamina+atropina+valium) y fueron inmunizados por vía intranasal (i.n.) con 20 μl de PBS que contenían 10⁶ o 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC) de BPZE1 o cepas recombinantes como se ha descrito previamente (Mielcarek et al., 2006). Los ratones fueron sacrificados en puntos de tiempo indicados después de la administración i.n., y se extrajeron los pulmones, se homogeneizaron en PBS y se extendieron en placas en diluciones en serie sobre agar BG-sangre para hacer un recuento de las UFCs después de la incubación a 37°C durante tres a cuatro días, como se ha descrito (Mielcarek et al., 2006).

Para los estudios de inmunización, grupos de ratones BALB/c de 6 semanas de edad fueron inmunizados i.n. con 20 μl de PBS que contenían 10⁷ UFCs de BPZE1 o cepas recombinantes, y después se reforzaron a intervalos de 4 semanas con la misma cantidad de bacterias.

Detección de anticuerpos. Placas de 96 pocillos se recubrieron con 2 μg/ml del péptido sintético M2e (Ac-GGSLLETVETPIRNEWGSRSDSSDGG-NH₂, SEQ ID NO: 17), con 2 μg/ml del péptido sintético G_{RSV} (Ac-GGFVPCSICSNPTCWAICKRIPNKKPGKKGG-NH₂, SEQ ID NO: 18) o 2 μg/ml de PcsB recombinante, se incubaron durante una noche a 4°C y se lavaron con PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (PBST). Posteriormente, las placas se bloquearon con 100 μl/pocillo de tampón de bloqueo (BSA al 2% en PBST) durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados, se añadieron 100 μl de sueros diluidos en serie a los pocillos y se incubaron durante 2 h a 37°C. Después de tres lavados adicionales, las placas se incubaron durante 1 h a 37°C con 100 μl de IgG anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Southern Biotech) diluidos 1:4000 en PBST. Después de cinco lavados, las placas se incubaron con 100 μl de solución TMB con sustrato HRP (Interchim) durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μl de H₃PO₄ 1 M. La densidad óptica (DO) se

midió con un lector de microplacas de Biokinetic EL/340 a 450 nm. El título final se determinó como la dilución más alta de suero que tenía una lectura de la densidad óptica que era más del doble que la del suero del control negativo.

Producción de PcsB recombinante. El fragmento de PcsB se amplificó con PCR utilizando el ADN cromosómico procedente del serotipo 1 de *S. pneumoniae* (cepa aislada clínica E1586) como molde y los oligonucleótidos sintéticos SP-PcsBexp 5'-CCATGGGTGAAACGACTGATGACAAAATTG-3' (SEQ ID NO: 19) y ASP-PcsBexp 5'-GCGGCCGCACGAACCTTTTGCACGGACAGGTGCTGCTGCATCA-3 (SEQ ID NO: 20). El amplicón se insertó en pCRII-TOPO (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia) y se secuenció, produciendo pCRII-TOPOPcsBexp. El fragmento *NotI/NcoI* de ese vector se insertó en pET24D+, produciendo pET24DPcsB. Este plásmido se introdujo en *E. coli* BL21 para la producción y purificación de PcsB. Las bacterias recombinantes se cultivaron a 37°C en medio LB líquido complementado con kanamicina (25 µg/ml). Cuando la DO600 había llegado a 0,8, se indujo la expresión mediante la adición de isopropil-d-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM durante 4 horas a 37°C. Las células inducidas se recogieron a continuación mediante centrifugación a 8000 rpm durante 20 min a 4°C y se suspendieron en tampón de lisis A (PBS, pH 7,0; NaCl 350 mM; 10% de glicerol) complementado con 1 comprimido/25 ml de inhibidores de proteasa [TM completa, exento de EDTA (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, Francia)].

Las células se rompieron mediante dos pases a través de una celda de presión francesa. Después de recoger las fracciones de membrana mediante centrifugación (15.000 rpm durante 20 min), el material sobrenadante del lisado celular se pasó a través de níquel-agarosa NTA (Qiagen) (Sefarosa quelante, flujo rápido, con metal Ni²⁺ acoplado, Amersham-Pharmacia) con un caudal de 0,5 ml/min. El material no unido se lavó con tampón A hasta que la DO alcanzó la línea base. La elución de la proteína unida marcada con histidina se llevó a cabo utilizando un gradiente por etapas con 15 ml de tampón A que contenía imidazol 50 mM, 100 mM o 200 mM. Los materiales eluidos se recogieron como fracciones de 2 ml. Las muestras obtenidas se analizaron a continuación mediante SDS-PAGE usando un gel de poliácridamida al 12% y tinción con azul de Coomassie, y las fracciones que contenían la proteína PcsB se agruparon y se dializaron durante una noche contra PBS a 4°C.

Resultados

1. Cepa BPZE1 recombinante que produce Fh44-3M2e (BPZM2e)

Construcción de la cepa BPZE1 recombinante que produce Fha44-3M2e (BPZM2e)

El dominio extracelular de la proteína de la matriz M2 (M2e) del virus de la gripe A se ha propuesto como un antígeno protector universal contra la gripe (Neirynck et al., 1999; de Filette et al., 2006). Para expresar M2e en BPZE1, se utilizó Fha44 como vehículo. Fha44 es el fragmento de 80 kDa N-terminal de FHA y es secretado mejor por *B. pertussis* que FHA de longitud completa (Renauld-Mongénie et al., 1996).

Tres copias de la secuencia que codifica M2e se fusionaron con la secuencia que codifica Fha44. La estructura artificial se insertó en el cromosoma BPZE1 en el locus de *dnt* mediante intercambio alélico, colocando el transgén bajo el control del promotor de *dnt* en la cepa recombinante denominada BPZM2e.

Se examinó el material sobrenadante del cultivo sin concentrar y extractos de células completas de BPZE1 y BPZM2e con análisis por inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal anti-M2e. Una banda de 94 kDa, que correspondía al tamaño esperado de la proteína quimérica Fha44-3M2e, se detectó en el material sobrenadante del cultivo de la cepa recombinante. Una proteína de tamaño similar también reactiva con el anticuerpo anti-M2e también se detectó en los extractos celulares completos. Esta observación indica que la proteína quimérica se secreta a partir de la cepa recombinante y también está asociada con células bacterianas de BPZM2e.

Colonización del pulmón e inmunogenicidad de BPZM2e

En primer lugar se comparó la cinética del crecimiento de BPZM2e *in vitro* en medio Stainer Scholte, con la de la cepa parental BPZE1. No había una diferencia estadística entre las dos cepas, lo que indicaba que la aptitud bacteriana en general no estaba afectada por la expresión de Fha44-3M2e.

Para estudiar la capacidad de la cepa recombinante BPZM2e para colonizar el tracto respiratorio murino, ratones BALB/c se infectaron i.n. con 10⁶ UFC de BPZM2e o con BPZE1 no recombinante, y se compararon sus perfiles de colonización. El perfil de la colonización de la cepa recombinante BPZM2e no se distinguía del de la cepa parental BPZE1 correspondiente, lo que indica que la inserción de Fha44-3M2e no altera la capacidad de las bacterias para colonizar los pulmones de los ratones.

Las respuestas de anticuerpos frente al péptido M2e se examinaron mediante ELISA en diferentes puntos de tiempo después de la administración de BPZM2e. Sin embargo, no se detectaron anticuerpos específicos de M2e en ningún punto de tiempo. A continuación, la dosis de BPZM2e se incrementó diez veces, y los ratones BALB/c se inmunizaron i.n. dos veces en un intervalo de 4 semanas con 10⁷ UFC de BPZE1 o BPZM2e recombinante. Los sueros se recogieron después de 2 semanas y de 4 semanas de la primera inmunización y 2 semanas después de la última inmunización para evaluar la IgG sistémica anti-M2e. Una vez más, no se detectó en el suero una respuesta significativa de los anticuerpos frente a M2e.

Mutación de FHA y caracterización de la nueva cepa recombinante (BPZM2e - ΔFHA)

El gen cromosómico que codifica FHA (*fhaB*) se inactivó a continuación a partir de BPZM2e mediante la introducción de un derivado de pFus2 que contiene un fragmento interno de *fhaB* (Antoine et al., 2000). Como pFus2 no es capaz de replicarse en *B. pertussis*, la integración del plásmido en el gen *fhaB* se fuerza mediante recombinación homóloga, interrumpiendo este gen de ese modo. Los integrantes se seleccionaron sobre agar BG con sangre que contenía 100 µg/ml de estreptomycin y 10 µg/ml de gentamicina. La cepa resultante se denominó BPZM2e-ΔFHA.

La ausencia de FHA en BPZM2e-ΔFHA se verificó mediante SDS-PAGE y tiñendo con azul de Coomassie, y la presencia de Fha44-3M2e en el material sobrenadante del cultivo se determinó mediante análisis por inmunotransferencia. El SDS-PAGE y la tinción con azul Coomassie mostraban la ausencia de la proteína de 220 kDa, correspondiente a FHA en el material sobrenadante del cultivo de la cepa mutante, así como en el de BPGR4, una cepa conocida que carece de FHA, utilizada como control. El análisis con inmunotransferencia del material sobrenadante del cultivo sin concentrar indicaba que el mutante carente de FHA producía al menos tanto Fha44-3M2e como la cepa BPZM2e parental. Como se esperaba, no se detectó ninguna banda inmunorreactiva en el material sobrenadante del cultivo de BPZE1.

Colonización del pulmón de ratones mediante BPZM2e-ΔFHA

Para investigar el perfil de colonización de la nueva cepa recombinante después de la delección de FHA, los ratones BALB/c se infectaron i.n. con 10^7 UFC de BPZM2e-ΔFHA, y se realizó un seguimiento de la carga bacteriana en los pulmones hasta 28 días. Tanto BPZE1 como BPZM2e-ΔFHA colonizaban los pulmones y persistían en los pulmones de los ratones con niveles similares, aunque el día 3 después de la inoculación se detectaba significativamente menos BPZM2e-ΔFHA que BPZE1 en los pulmones de los ratones.

Inmunogenicidad de BPZM2e-ΔFHA

La inmunogenicidad de BPZM2e-ΔFHA se evaluó después de dos administraciones i.n. en un intervalo de 4 semanas. Los sueros se recogieron 2 semanas después de la última inmunización, y se analizó la respuesta de los anticuerpos anti-M2e sistémicos. Se encontró que BPZM2e-ΔFHA inducía niveles elevados de IgG sistémica contra M2e, mientras que dos administraciones de BPZM2e que producía FHA o BPZE1 no dieron lugar a una respuesta significativa de IgG anti-M2e (Fig. 1), como se esperaba. Estas observaciones indican que la ausencia de FHA aumenta fuertemente las respuestas inmunes frente a M2e después de una inmunización i.n. con BPZE1 recombinante.

2. Cepa BPZE1 recombinante que produce Fha44-G_{RSV} (BPZG_{RSV})

Construcción de la cepa BPZE1 recombinante que produce Fha44-G_{RSV} (BPZG_{RSV})

Se ha mostrado que un fragmento de péptido de la proteína G de RSV que abarcaba los residuos de aminoácidos 170 a 197 contiene un epítipo de linfocito B neutralizante (Power et al., 2001; Yusibov et al., 2005) y un epítipo de linfocito T (Varga et al., 2000). Esta región de la proteína también está bien conservada entre las diferentes cepas aisladas de RSV. Como para el epítipo de M2e del virus de la gripe anterior, se utilizó Fha44 como vehículo para expresar el epítipo de G en BPZE1.

Una sola copia de la secuencia que codifica el epítipo de G se fusionó con la secuencia codificadora de Fha44. La estructura artificial se insertó en el cromosoma de BPZE1 en el locus de *dnt* mediante intercambio alélico, colocando el transgén bajo el control del promotor de *dnt* en la cepa recombinante denominada BPZG_{RSV}.

El material sobrenadante de cultivos sin concentrar de BPZG_{RSV} se examinó mediante un análisis por inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal anti-G. Una banda de aproximadamente 90 kDa, que se correspondía con el tamaño esperado de la proteína quimérica Fha44-G_{RSV}, se detectó en el material sobrenadante del cultivo de la cepa recombinante, lo que indicaba que la proteína quimérica se secretaba a partir de la cepa recombinante.

Colonización del pulmón e inmunogenicidad de BPZG_{RSV}

Para estudiar la capacidad de la cepa recombinante BPZG_{RSV} para colonizar el tracto respiratorio murino, los ratones BALB/c se infectaron i.n. con 10^6 UFC de BPZG_{RSV} o con BPZE1 no recombinante, y se compararon sus perfiles de colonización. El perfil de colonización de la cepa recombinante BPZG_{RSV} no se distinguía del de la cepa parental BPZE1 correspondiente, lo que indicaba que la inserción de Fha44-G_{RSV} no altera la capacidad de colonizar los pulmones de los ratones.

Las respuestas de anticuerpos frente al péptido G se examinaron mediante ELISA después de la administración de BPZG_{RSV}. Sin embargo, no se detectaron anticuerpos específicos de G. La dosis de BPZG_{RSV} se aumentó después diez veces, y los ratones BALB/c fueron inmunizados i.n. dos veces en un intervalo de 4 semanas con 10^7 UFC de BPZE1 o BPZG_{RSV} recombinante. Los sueros se recogieron 2 semanas después de la última inmunización para evaluar las respuestas de IgG anti-G sistémica. Una vez más, no se detectó ninguna respuesta significativa de los anticuerpos frente al péptido G en el suero.

Mutación de FHA y caracterización de la nueva cepa recombinante (BPZG_{RSV}-ΔFHA)

El gen cromosómico que codificaba FHA (*fhaB*) se inactivó después desde BPZG_{RSV} mediante la introducción del derivado pFus2 como se ha descrito anteriormente, y la ausencia de FHA en BPZG_{RSV}-ΔFHA se verificó mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, y la presencia de Fha44-G_{RSV} en el material sobrenadante del cultivo se determinó mediante análisis por inmunotransferencia. El SDS-PAGE y la tinción con azul Coomassie mostraban la ausencia de la proteína de 220 kDa, correspondiente a FHA en el material sobrenadante del cultivo de la cepa mutante. El análisis por inmunotransferencia del material sobrenadante de cultivo sin concentrar indicaba que la cepa mutante carente de FHA producía tanto Fha44-G_{RSV} como la cepa parental BPZG_{RSV}.

Inmunogenicidad de BPZG_{RSV}-ΔFHA

La inmunogenicidad de BPZG_{RSV}-ΔFHA se evaluó después de dos administraciones i.n. en un intervalo de 4 semanas. Los sueros se recogieron 2 semanas después de la última inmunización, y la respuesta de anticuerpos anti-G sistémicos se analizó mediante ELISA. Se encontró que BPZG_{RSV}-ΔFHA induce niveles elevados de IgG sistémica contra el epítipo de G, mientras que dos administraciones de BPZE1 o BPZG_{RSV} productoras de FHA no dieron lugar a una respuesta significativa de IgG anti-G (Fig. 2). Estas observaciones indican que, como para M2e, la ausencia de FHA aumenta fuertemente las respuestas inmunes frente al epítipo de G después de una inmunización i.n. con BPZE1 recombinante.

3. Cepa BPZE1 recombinante que produce Fha44-PcsB (BPZPcsB)

Construcción de la cepa BPZE1 recombinante que produce Fha44-PcsB (BPZPcsB)

PcsB es un antígeno proteico de *S. pneumoniae* que está altamente conservada entre diferentes cepas aisladas clínicas e induce protección contra la sepsis letal. Se ha mostrado que tiene una protección cruzada contra cuatro serotipos diferentes tanto en modelos de sepsis como de neumonía (Gieffing et al., 2008).

El gen que codifica la porción madura de PcsB (desde el aminoácido 28 al 278) se fusionó como una sola copia con la secuencia que codifica Fha44. La estructura artificial se insertó en el cromosoma de BPZE1 en el locus de *dnt* mediante intercambio alélico, colocando el transgén bajo el control del promotor de *dnt* en la cepa recombinante denominada BPZPcsB.

El material sobrenadante del cultivo sin concentrar de BPZPcsB se examinó mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Una banda de 112 kDa, que se correspondía con la proteína quimérica Fha44-PcsB, era fácilmente detectable en el material sobrenadante del cultivo sin concentrar de la cepa recombinante, lo que indicaba que la proteína quimérica era secretada desde la cepa recombinante.

Inmunogenicidad de BPZPcsB

Los ratones BALB/c se inmunizaron por vía nasal tres veces a intervalos de 4 semanas con 10⁷ ufc de BPZPcsB o recibieron BPZE1 como control. El suero se recogió dos semanas después de cada inmunización, y las respuestas de los anticuerpos frente a PcsB se examinaron mediante ELISA. Dosis crecientes de BPZPcsB daban como resultado el aumento de los títulos de anticuerpo frente a PcsB, aunque los títulos de anticuerpo permanecieron relativamente bajos, especialmente después de la primera y la segunda inmunización.

Mutación de FHA y caracterización de la nueva cepa recombinante (BPZPcsB-ΔFHA)

El gen cromosómico que codifica FHA (*fhaB*) se inactivó después desde BPZPcsB introduciendo el derivado pFus2 como se ha descrito anteriormente, y la ausencia de FHA en BPZPcsB-ΔFHA, pero la presencia de Fha44-PcsB, se verificó mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. El SDS-PAGE y la tinción con azul Coomassie mostraron la ausencia de la proteína de 220 kDa, correspondiente a FHA, y la presencia de una proteína Mr inferior, correspondiente a Fha44-PcsB, en el material sobrenadante del cultivo de la cepa mutante.

Inmunogenicidad de BPZPcsB-ΔFHA

La inmunogenicidad de BPZPcsB-ΔFHA se evaluó después de dos en administraciones i.n. en un intervalo de 4 semanas. El suero se recogió 2 semanas después de la última inmunización, y se analizaron las respuestas de anticuerpos anti-PcsB sistémicos. Se encontró que BPZPcsB-ΔFHA inducía niveles elevados de IgG sistémica contra PcsB que eran significativamente más altos que los inducidos por BPZPcsB que produce FHA (Fig. 3). Estas observaciones indican que, como para M2e y G_{RSV}, la ausencia de FHA aumenta significativamente las respuestas inmunes frente a PcsB después de una inmunización i.n. con BPZE1 recombinante.

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

Tabla 1. Cepas bacterianas

Cepas	Descripción (referencia)
-------	--------------------------

Cepas	Descripción (referencia)
BPSM	<i>B. pertussis</i> Sm ^R virulenta (Menozzi et al., 1991)
BPGR4	Cepa Sm ^R obtenida a partir de BPSM y carente de FHA (Locht et al., 1992)
BPZE1	Cepa Sm ^R atenuada obtenida a partir de BPSM (Mielcarek et al., 2006)
BPZM2e	Cepa BPZE1 recombinante que expresa Fha44-(M2e) ₃ (este trabajo)
BPZM2e-ΔFha	Cepa BPZE1 recombinante que expresa Fha44-(M2e) ₃ y carente de FHA (este trabajo)
BPZG _{RSV}	Cepa BPZE1 recombinante que expresa Fha44-G _{RSV} (este trabajo)
BPZG _{RSV} -ΔFha	Cepa BPZE1 recombinante que expresa Fha44-G _{RSV} y carente de FHA (este trabajo)
BPZPcsB	Cepa BPZE1 recombinante que expresa Fha44-PcsB (este trabajo)
BPZPcsB-ΔFha	Cepa BPZE1 recombinante que expresa Fha44-PcsB y carente de FHA (este trabajo)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSERT

<120> NUEVAS CEPAS RECOMBINANTES DE BORDETELLA

5 <130> BIO12225 LOCHT-MIELCAREK

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 6

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> sitio XbaI

<400> 1

15 tctaga 6

<210> 2

<211> 6

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> sitio XbaI (con mutación)

<400> 2

tccaga 6

<210> 3

25 <211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

30 <400> 3

gcatgcctgc aggtcgactc cagaggatcc ccgggtaccg 40

<210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 4
 cggtacccgg ggatcctctg gagtcgacct gcaggcatgc 40

10 <210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 5
 ctaagacgc gtcatatggg cggccgc 27

<210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 6
 acgcgtgtgg aaactcctat ccg 23

25 <210> 7
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 30 <223> Cebador

<400> 7
 catatggccg ccagagccgc tatcagagct atcgtt 36

<210> 8
 <211> 84
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 8

ttctgtgccgt gctcgatctg ctcgaacaac ccgacctgct gggccatctg caagcgcatac 60

40 ccgaacaaga agccgggcaa gaag 84

<210> 9
 <211> 66

ES 2 715 651 T3

	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
5	<400> 9		
	aggatccttc gtgccgtgct cgatctgctc gaacaacccg acctgctggg ccatctgcaa		60
	gcgcat		66
	<210> 10		
	<211> 69		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 10		
	aggatccctt cttgcccggc ttcttgttcg ggatgcgctt gcagatggcc cagcaggtcg		60
	ggttgttcg		69
15	<210> 11		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
20	<223> Cebador		
	<400> 11		
	aggatccttc gtgccgtgct cgatc	25	
	<210> 12		
	<211> 25		
25	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 12		
30	aggatccctt cttgcccggc ttctt	25	
	<210> 13		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 13		
	aacgcgtttc gtgccgtgct cgatc	25	

ES 2 715 651 T3

<210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 14
 acgcgtcttc ttgcccggt tctt 24

10 <210> 15
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 15
 catatgtgga cgaactttg cacggaca 28

<210> 16
 <211> 29
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 16
 acgcgtgaaa cgactgatga caaaattcg 29

25 <210> 17
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Péptido

<400> 17

Gly Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp
 1 5 10 15

Gly Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Gly Gly
 20 25

35 <210> 18
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido

<400> 18

ES 2 715 651 T3

Gly Gly Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp
1 5 10 15

Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Gly Gly
20 25 30

<210> 19

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 19

ccatgggtga aacgactgat gacaaaattg 30

10 <210> 20

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 20

gcggccgcac gaacttttgc acggacaggt gctgctgcat ca 42

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Bordetella pertussis* atenuada genéticamente:

a. que comprende un gen mutado de la toxina pertussis (*ptx*) que codifica una toxina pertussis inmunogénica pero enzimáticamente inactiva, un gen dermonecrótico deleciónado (*dnt*) y un gen *ampG* heterólogo, y

5 b. que expresa una proteína híbrida que comprende una parte de la proteína hemaglutinina filamentosa (FHA) en forma de un fragmento N-terminal de FHA que permite la expresión en superficie y la secreción de un epítipo heterólogo o una proteína antigénica o un fragmento de proteína ligado a dicho fragmento N-terminal de FHA, siendo dichos epítipo heterólogo o proteína antigénica o fragmento de proteína diferentes de FHA,

10 en donde el gen que codifica la proteína FHA natural está inactivado y el ácido nucleico que codifica la proteína híbrida está en el locus del gen *dnt* deleciónado.

2. La cepa de *Bordetella pertussis* según la reivindicación 1, en donde el gen que codifica la proteína FHA natural está deleciónado parcial o completamente.

3. La cepa de *Bordetella pertussis* según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el fragmento N-terminal de la proteína FHA comprende los aminoácidos desde las posiciones 1 a 330, comenzando con el primer aminoácido de la preproteína FhaB.

4. La cepa de *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el gen *ptx* mutado comprende al menos una mutación que conduce a una proteína enzimáticamente inactiva, pero que conserva todavía propiedades inmunogénicas.

20 5. La cepa de *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el gen *ampG* de *Bordetella pertussis* está reemplazado por un gen *ampG* heterólogo que conduce a una actividad residual de la citotoxina traqueal (TCT) menor del 5%.

6. La cepa de *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el gen *ampG* de *Bordetella pertussis* está reemplazado por un gen *ampG* heterólogo que conduce a una actividad residual de TCT menor del 1%.

25 7. La cepa de *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el gen *ampG* heterólogo procede de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas* o *Legionella*.

8. La cepa de *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde el gen *ampG* heterólogo procede de *Escherichia coli*.

30 9. La cepa de *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la proteína heteróloga de dicha proteína híbrida comprende al menos un epítipo de una proteína que se expresa mediante agentes patógenos responsables de infecciones del tracto respiratorio superior o inferior.

10. La cepa de *Bordetella pertussis* según la reivindicación 9, en donde el agente patógeno es un virus de la gripe.

35 11. La cepa de *Bordetella pertussis* según la reivindicación 9, en donde el agente patógeno es un virus respiratorio sincitial (RSV).

12. La cepa de *Bordetella pertussis* según la reivindicación 9, en donde el agente patógeno es *Streptococcus pneumoniae*.

40 13. La cepa de *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la proteína híbrida comprende el fragmento N-terminal de FHA fusionado con el dominio extracelular de la proteína de la matriz (Me2) del virus de la gripe A.

14. La cepa de *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 11, en donde la proteína híbrida comprende el fragmento N-terminal de la proteína FHA fusionado con al menos un fragmento antigénico de la proteína G del virus respiratorio sincitial (RSV).

45 15. La cepa de *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 12, en donde la proteína híbrida comprende el fragmento N-terminal de la proteína FHA fusionado con un fragmento antigénico de la proteína PcsB de *S. pneumoniae*.

16. Una composición inmunogénica que comprende la cepa de *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad infecciosa de la mucosa o sistémica.

50 17. Una vacuna viva atenuada que comprende la cepa de *Bordetella pertussis* según una cualquiera de las reivindi-

caciones 1 a 15, para uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa de la mucosa o sistémica.

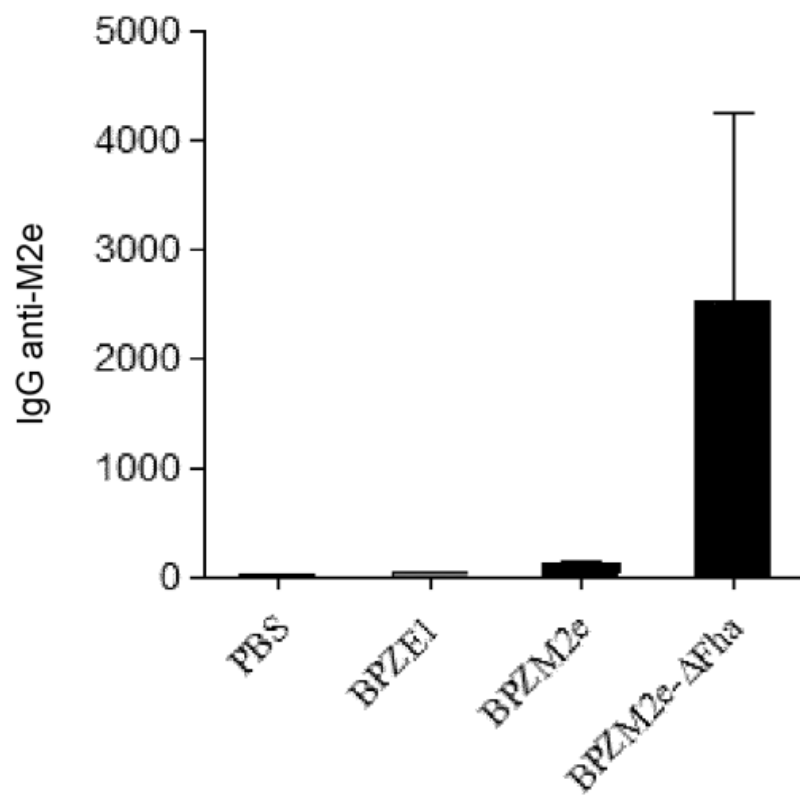


Figura 1

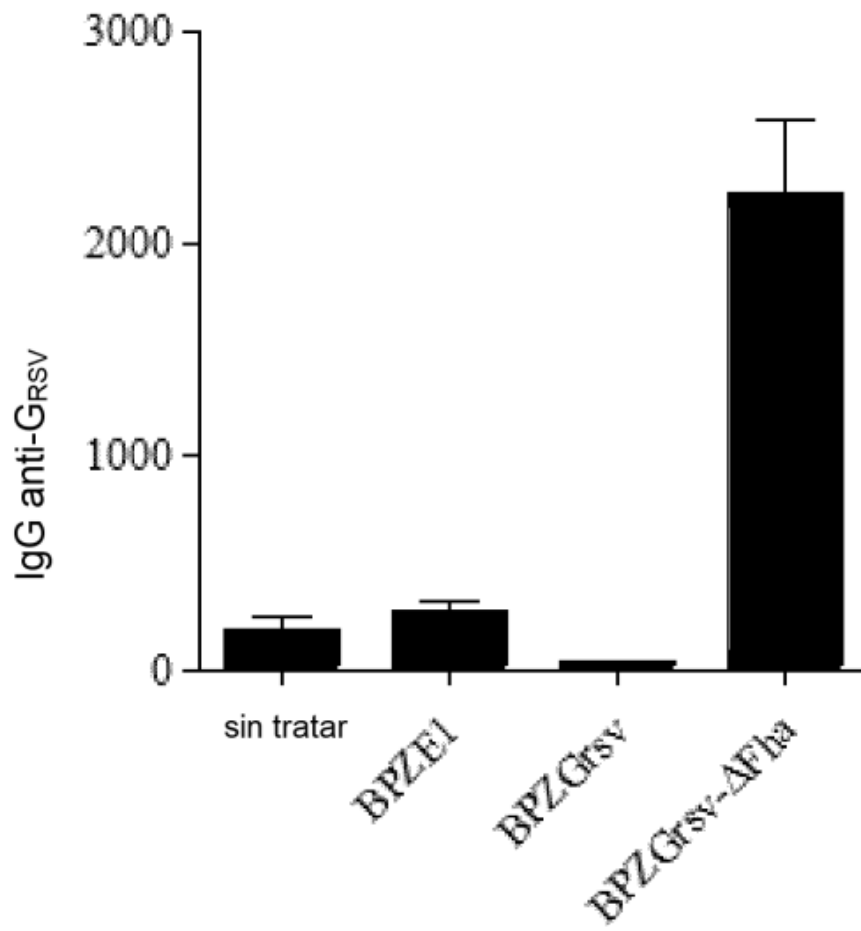


Figura 2

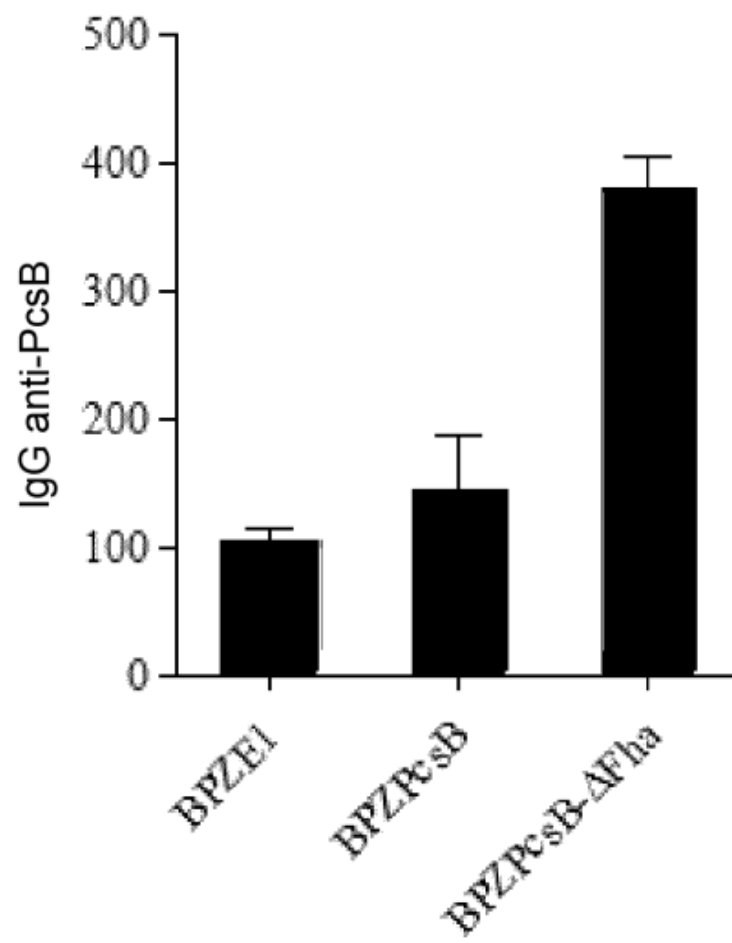


Figura 3