

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 675**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C07K 14/235 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2013** **E 18194351 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 3459966**

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

30 Prioridad:

17.10.2012 EP 12306279

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

06.07.2020

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:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 771 675 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 recombinantes de *Bordetella*

Campo de la invención:

5 La invención se refiere a nuevas cepas de *Bordetella pertussis* genéticamente atenuadas que expresan una proteína heteróloga y a su uso como vacunas, concretamente para la inmunización de la mucosa.

La invención además se refiere a un procedimiento para aumentar la inmunogenicidad de una cepa de *Bordetella*.

Antecedentes

10 Las inmunizaciones de la mucosa, tales como la administración nasal de vacunas, tienen varias ventajas sobre las vacunas parenterales clásicas. No requieren del uso de agujas, son menos propensas a la contaminación, dependen menos de personal médico o paramédico capacitado, pueden inducir inmunidad tanto sistémica como en la mucosa y probablemente sean más adecuadas para proteger contra las infecciones de la mucosa.

15 Sin embargo, la mayoría de los antígenos son inmunógenos pobres cuando se administran por vía nasal y requieren la adición de potentes adyuvantes de la mucosa. Uno de los adyuvantes más potentes de la mucosa es la toxina del cólera o la cercanamente relacionada toxina de *Escherichia coli* inestable al calor y sus derivados destoxificados. 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 usar en humanos.

20 Los autores de la presente invención han desarrollado recientemente un candidato de vacuna nasal viva atenuada contra la tosferina (Mielcarek et al., 2006), que ahora ha completado con éxito una primera prueba de seguridad de fase I (Thorstensson et al., en preparación). El concepto de esta vacuna candidata se basó en el hallazgo de que la infección natural con *Bordetella pertussis* a través de la exposición a aerosoles puede inducir respuestas sistémicas fuertes de células B y T, incluso en bebés muy pequeños (Mascart et al., 2003), así como en la inmunidad de la mucosa. Además, estudios previos en primates no humanos han llevado a la conclusión de que "la máxima protección contra la tosferina probablemente sigue mejor a una inoculación viva de *B. pertussis*" (Huang et al., 1962).

25 La cepa de *B. pertussis* fue atenuada basándose en el conocimiento del mecanismo molecular de la virulencia de *B. pertussis* (Locht et al., 2001) y se construyó desactivando genéticamente la toxina pertussis, eliminando el gen de la toxina dermonecrótica e intercambiando el gen *ampG* de *B. pertussis* por *ampG* de *Escherichia coli*, aboliendo así la producción de la citotoxina de la tráquea. En modelos preclínicos, este candidato a vacuna, llamado BPZE1, mostró una excelente seguridad (Mielcarek et al., 2006, 2010; Skerry et al., 2009; Kavanagh et al., 2010; Li et al., 2010) e indujo inmunidad rápida, fuerte y duradera con una sola administración nasal (Feunou et al., 2010).

30 Además, 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, concretamente asma y, además, contra alergias tóxicas.

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

Coppens et al. describen una cepa de *Bordetella* genéticamente atenuada deficiente en la producción de toxinas y que expresa una proteína híbrida que comprende el fragmento N-terminal de hemaglutinina filamentosa (FHA) y TbpB de *N. meningitidis*, cepa que no produce FHA madura.

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

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

Sin embargo, el gen *phaB* no se eliminó con el fin de aumentar la inmunogenicidad, pero la supresión fue solo una coincidencia y una característica intrínseca de la cepa utilizada como vehículo para la producción del antígeno heterólogo.

50 LA BPZE1 se ha considerado posteriormente como un vector para la expresión de antígenos protectores heterólogos, con el fin de desarrollar vacunas nasales multivalentes capaces de proteger simultáneamente contra varios patógenos diferentes. El péptido neutralizador SP70 del enterovirus 71 ha sido expuesto en superficie y secretado por BPZE1 como una proteína híbrida con hemaglutinina filamentosa (FHA), y utilizando la maquinaria de secreción de FHA (Ho et al., 2008). Del mismo modo, la maquinaria de la FHA también se usó para secretar y exponer el ectodominio de la

proteína matriz 2 del virus de la influenza A por BPZE1 (Li et al., 2011). Si bien las respuestas sistémicas y locales de IgG e IgA podrían generarse a los antígenos heterólogos tras la administración de los derivados recombinantes de BPZE1, las respuestas inmunes a los antígenos pasajeros fueron, en el mejor de los casos, modestas.

5 Al intentar resolver el problema de la pobre inmunogenicidad obtenida con los constructos BPZE1, los inventores descubrieron sorprendentemente que la inmunogenicidad podría aumentar considerablemente cuando el gen *fhaB* nativo que codifica la proteína FHA natural se eliminó o fue inactivado a partir de otra manera.

Además, las cepas así obtenidas mostraron una inmunogenicidad sustancialmente aumentada a pesar de las propiedades antiinflamatorias de la cepa nativa atenuada de *Bordetella pertussis*, como lo demuestra su actividad contra el asma y las enfermedades alérgicas. En consecuencia, la presente invención resuelve el problema de una vacuna para la aplicación en la mucosa, que es segura y capaz de provocar una respuesta inmune potente contra un antígeno presente en un patógeno responsable de las infecciones sistémicas o de la mucosa, incluidos los patógenos responsables de las infecciones del tracto respiratorio superior o inferior.

Sumario de la invención

15 La invención proporciona una cepa de *Bordetella pertussis* recombinante genéticamente atenuada que comprende un gen de toxina pertussis mutada (*ptx*) y un gen *ampG* heterólogo y que expresa una proteína híbrida que comprende el fragmento N-terminal de hemaglutinina filamentosa (FHA) y un epítipo heterólogo o proteína antigénica o fragmento de proteína, diferente de FHA, en la que el gen que codifica la proteína FHA nativa está inactivado.

20 La invención proporciona además una vacuna atenuada de por vida para el tratamiento de una enfermedad infecciosa de la mucosa que comprende una cepa de *Bordetella pertussis* como se definió anteriormente destinada a provocar una respuesta inmune contra un patógeno responsable de infecciones de la mucosa, concretamente del tracto respiratorio superior o inferior.

25 La presente invención también se refiere a un procedimiento 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 de *Bordetella pertussis* recombinante genéticamente atenuada que comprende una toxina pertussis mutada (*ptx*), y un gen *ampG* heterólogo y que expresa una proteína de fusión que comprende el fragmento N-terminal de hemaglutinina filamentosa (FHA) y un epítipo heterólogo o un fragmento de proteína o proteína antigénica, diferente de FHA, en donde el gen que codifica la proteína FHA nativa está desactivado

30 En otro aspecto, la invención proporciona además procedimientos para proteger a un mamífero contra una infección por un patógeno que infecta una mucosa, a saber, el tracto respiratorio inferior o superior y/o provocar una respuesta inmune contra dicho patógeno en un mamífero usando la composición o vacuna de la invención.

35 En aun otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmune contra un patógeno con tropismo mucoso 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 de la toxina pertussis mutada (*ptx*), y un gen *ampG* heterólogo y 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 fragmento de proteína, diferente del FHA, del patógeno contra el cual se busca la respuesta inmune, en el que en dicha cepa recombinante, el gen que codifica la proteína FHA nativa está inactivado.

40 En otro aspecto, la cepa recombinante comprende además del gen de la toxina pertussis mutada (*ptx*) y el gen *ampG* heterólogo, un gen de toxina dermonecrótica (*dnt*) eliminado o mutado. En algunos de estos aspectos, el gen *ampG* de la cepa *Bordetella* de tipo salvaje se reemplaza por un gen *ampG* de otras bacterias Gram negativas, como el gen *ampG* de *E. coli*.

45 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 estos aspectos, la sustitución del aminoácido involucrado en la unión del sustrato comprende K9R y la sustitución del aminoácido involucrado en la catálisis comprende E129G. En algunos aspectos, la cepa *Bordetella pertussis* comprende una cepa mutante triple. En algunos de estos aspectos, la cepa *Bordetella* es la cepa BPZE1 identificada por el número de acceso CNCM 1-3585.

50 En otros aspectos, los procedimientos 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 estos aspectos, la cepa de *Bordetella pertussis* se administra aproximadamente 6 semanas o más antes de la infección de la mucosa. En otros aspectos, la cepa de *Bordetella pertussis* se administra aproximadamente 12 semanas o más antes de la infección de la mucosa. En algunos aspectos, el patógeno responsable de la infección de la mucosa es el virus de la *influenza*, el virus sincicial respiratorio o *Streptococcus pneumoniae*.

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

En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para mejorar la respuesta inmune hacia un patógeno, en un mamífero, que comprende administrar una vacuna basada en un vector recombinante de *Bordetella*, en el que dicha *Bordetella* expresa una proteína de fusión que comprende el fragmento N-terminal de hemaglutinina filamentosa (FHA) y un epítipo heterólogo o un fragmento de proteína o proteína antigénica de dicho patógeno contra el cual se busca la respuesta inmune y en el que en dicha cepa recombinante, el gen que codifica la proteína FHA nativa está inactivado.

La cepa de *Bordetella* es preferiblemente una cepa de *Bordetella pertussis*, pero también puede ser otra especie de *Bordetella*, como *Bordetella bronchiseptica* o *Bordetella parapertussis*.

La cepa de *Bordetella* comprende ventajosamente las características descritas anteriormente para BPZE1 y puede administrarse como una vacuna farmacéutica o veterinaria contra un patógeno como está descrito anteriormente.

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

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

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PTX" se refiere a la toxina pertussis, que es una toxina secretada por ribosilación de ADP. La PTX se compone de cinco subunidades diferentes (llamadas S1-S5) con cada complejo que contenía 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 de unión al receptor y está formado por las subunidades S2-S5.

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

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "TCT" se refiere a citotoxina de la tráquea, que es un factor de virulencia sintetizado por *Bordetellae*. La TCT es un fragmento de peptidoglucano y tiene la capacidad de inducir la producción de interleucina-1 y óxido nítrico sintasa. Tiene la capacidad de causar estasis de cilios y tiene efectos letales sobre las células epiteliales respiratorias.

Como se usa en el presente documento, el término "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 unida a la misma en la que la segunda proteína comprende una proteína de *Bordetella* diferente de FHA o preferiblemente una proteína de una especie diferente, a saber, un virus, hongo y bacteria responsable de una infección de la mucosa o sistémica o un fragmento de dicha proteína capaz de provocar una respuesta inmune contra *Bordetella* o la especie responsable de la infección de la mucosa o sistémica.

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

"Tratar" o "tratamiento" usando los procedimientos de la invención incluye prevenir la aparición de síntomas en un sujeto que puede tener un mayor riesgo de una enfermedad o trastorno asociado con una enfermedad, afección o trastorno como está descrito en el presente documento, pero aún no experimenta o exhibe síntomas, inhibe los síntomas de una enfermedad o trastorno (ralentiza o detiene su desarrollo), brinda alivio de los síntomas o efectos secundarios de una enfermedad (incluido el tratamiento paliativo) y alivia los síntomas de una enfermedad (provocando regresión) El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o la supresión terapéutica o el alivio de los síntomas después de la manifestación de la enfermedad o afección.

Los términos "protección" y "prevención" se usan aquí de manera intercambiable y significan que se impide una infección por un patógeno virulento.

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

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad" tiene el significado generalmente conocido y entendido en la técnica y comprende cualquier condición anormal en la función o el bienestar de un individuo huésped. El diagnóstico de una enfermedad en particular por parte de un profesional de la salud puede hacerse mediante un examen directo y/o la consideración de los resultados de una o más pruebas de diagnóstico.

El término "administración nasal" se refiere a cualquier forma de administración mediante la cual un ingrediente activo se impulsa o se introduce de otra manera en los conductos nasales de un sujeto para que entre en contacto con el

epitelio respiratorio de la cavidad nasal. La administración nasal también puede implicar el contacto del epitelio olfativo, 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 inmediatamente al epitelio olfativo está libre de flujo de aire. Por lo tanto, los procedimientos especializados deben emplearse típicamente para lograr una absorción significativa a través del epitelio olfativo.

El término "aerosol" se usa en su sentido convencional para referirse a gotas líquidas muy finas o partículas sólidas transportadas por un gas propulsor bajo presión a un sitio de aplicación terapéutica. Un aerosol farmacéutico de la invención contiene un compuesto terapéuticamente activo, que puede disolverse, suspenderse o emulsionarse en una mezcla de un vehículo fluido y un propelente. El aerosol puede estar en forma de solución, suspensión, emulsión, polvo o preparación semisólida. Los aerosoles de la invención están destinados a la administración como partículas finas, sólidas o como nieblas líquidas a través del tracto respiratorio de un sujeto. Se pueden utilizar diversos tipos de propulsores, pero sin limitarse a hidrocarburos u otros gases adecuados. Los aerosoles de la invención también pueden administrarse con un nebulizador, que genera partículas líquidas muy finas de tamaño sustancialmente uniforme dentro de un gas. Preferiblemente, un líquido que contenía el compuesto activo se dispersa en forma de gotas, que pueden ser transportadas por una corriente de aire fuera del nebulizador y dentro del tracto respiratorio del paciente.

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

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

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 proceso, procedimiento, artículo o aparato que comprende una lista de elementos no se limita necesariamente solo a esos elementos sino que puede incluir otros elementos que no están expresamente listados o son inherentes a dicho procedimiento o procedimiento. Además, a menos que se indique expresamente lo contrario, "o" se refiere a un o inclusivo y no a un o exclusivo. Por ejemplo, una condición A o B es satisfecha por cualquiera de los siguientes: A es verdadero (o presente) y B es falso (o no presente), A es falso (o no presente) y B es verdadero (o presente), y tanto A como B son verdaderos (o presentes).

"Aproximadamente", como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar 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 realizar los procedimientos descritos.

Por "sujeto" se entiende un humano. Por lo general, el sujeto es un recién nacido, un bebé o un adulto. Debe entenderse que esta invención no se limita a procedimientos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir aspectos particulares solamente, y no pretende ser limitante.

Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique 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 heterólogo optimizado 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 influenza A, virus sincicial respiratorio y *Streptococcus pneumoniae*), la invención proporciona la demostración de una fuerte mejora en la inmunogenicidad sobre los sistemas anteriores.

La invención proporciona una cepa de *Bordetella pertussis* atenuada recombinante que puede usarse como una composición inmunogénica o una vacuna para provocar una respuesta inmune en un mamífero.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona una cepa de *Bordetella pertussis* genéticamente atenuada que comprende un gen de toxina pertussis mutada (*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 epitopo heterólogo o proteína antigénica o fragmento de proteína, diferente de FHA, en el que el gen que codifica la proteína FHA nativa está inactivado.

Preferiblemente, el gen que codifica la proteína FHA nativa se inactiva por supresión parcial o total.

Preferiblemente, el fragmento N-terminal de la proteína FHA comprende los aminoácidos de las posiciones 1 a 862, más preferiblemente de las posiciones 1 a 330, comenzando con el primer aminoácido de la preproteína *FhaB* como lo define Lambert-Busine et al. (1998)

Se han descrito vacunas vivas atenuadas de *B. pertussis* que son deficientes para citotoxina de la tráquea (TCT), toxina pertussis activa (PTX) y toxina dermonecrótica (DNT) en WO2007/104451 y en Mielcarek et al. (2006)

5 El gen *ampG* de *B. pertussis* puede reemplazarse por *ampG* de *E. coli*. La cepa resultante expresó menos del 1 % de actividad residual de TCT. En la presente invención puede usarse cualquier gen *ampG* heterólogo de bacterias gramnegativas que liberan cantidades muy pequeñas de fragmentos de peptidoglicano en el medio. Ejemplos de genes *ampG* heterólogos adecuados incluyen, pero no se limitan a genes *ampG* de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Legionella*.

10 El PTX es un factor de virulencia principal responsable de los efectos sistémicos de las infecciones por *B. pertussis* y está compuesto por una unidad estructural enzimáticamente activa, llamada S1, y una unidad estructural responsable de la unión a los receptores de células diana. También es uno de los principales antígenos protectores. Los genes *ptx* naturales pueden reemplazarse por una versión mutada que codifica una toxina enzimáticamente inactiva. Esto se puede lograr reemplazando Arg-9 por Lys, y Glu-129 por Gly en S1, dos residuos clave involucrados en la unión del sustrato y la catálisis, respectivamente. El intercambio alélico se puede utilizar para eliminar primero el operón *ptx*, y luego para insertar la versión mutada.

15 La presencia de la toxina relevante en los sobrenadantes de cultivo de *B. pertussis* se puede detectar mediante análisis de inmunotransferencia.

Se pueden hacer otras mutaciones, como las descritas en la Patente de los Estados Unidos 6,713,072, así como también cualquier mutación conocida u otra capaz de reducir la actividad de la toxina a niveles indetectables.

20 También se puede utilizar el intercambio alélico para eliminar el gen *dnt*. Aunque el papel del *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 tras la inyección de cantidades mínimas.

25 La TCT es responsable de la destrucción de las células ciliadas en la tráquea de los huéspedes infectados y, por lo tanto, puede estar involucrado en el síndrome de la tos. La TCT es un producto de descomposición del peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas, que generalmente lo internaliza en el citosol por la proteína transportadora *AmpG* para ser reutilizado durante la biosíntesis de la pared celular. El *AmpG* de *B. pertussis* es ineficiente en la internalización de productos de degradación de peptidoglicano.

En una realización preferente, la vacuna de *B. pertussis* atenuada de por vida es la cepa BPZE1 depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, FRANCIA) en 9 de marzo de 2006 con el número CNCM 1-3585.

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

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

40 Ventajosamente, la cepa de *Bordetella* se ha vuelto deficiente en la producción de toxinas por eliminación o supresión, al menos parcialmente, o por mutación, del gen que codifica la toxina para producir una toxina inactiva o ninguna toxina. Tal gen puede ser particularmente el gen que codifica la toxina de *B. pertussis* o cualquier proteína que tenga una estructura o función similar con dicha toxina. También puede ser el gen que codifica la toxina hemolisina/adenilato ciclasa o la toxina dermonecrótica expresada por las cepas de *Bordetella* o para proteínas que tienen similitudes de estructura o función. La cepa de *Bordetella* puede ser deficiente en la producción de una o más de estas toxinas.

45 La proteína híbrida comprende parte de la proteína FHA y al menos parte de la proteína de interés. Esta proteína particular puede ser expresada por una cepa de la especie *B. pertussis*, como la cepa BPNX depositada bajo el número 1-1770 el 8 de octubre de 1996, en la National Collection of Microorganism Cultures del Institut Pasteur, 28, Rue du Docteur Roux, F-75724, París, Cedex 15, Francia o la cepa de *B. pertussis* se identifica con el número de acceso CNCM 1-3585 o la cepa de *B. pertussis* se identifica con el número de acceso V09/009169.

Dicha proteína híbrida puede expresarse en particular por la cepa mutada BPZE1 depositada en la National Collection of Microorganism Cultures (CNCM) en París, Francia bajo el Tratado de Budapest el 9 de marzo de 2006 y se le asignó el número CNCM 1-3585.

55 Se puede obtener una cepa de acuerdo con la presente invención mediante la eliminación del gen de la toxina del genoma de una cepa virulenta que expresa dicha proteína híbrida, o por supresión parcial o por mutación para producir

una toxina inactiva. La eliminación puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia y particularmente cruzando la cepa virulenta con una cepa movilizadora, luego seleccionando, a través de marcadores adaptados según las cepas, las células que han perdido el gen de la toxina. Tal pérdida de capacidad de la cepa virulenta para expresar la toxina resulta de un evento doble de una recombinación homóloga entre la cepa virulenta y un plásmido de la cepa movilizadora. Un experto en la materia puede referirse para la obtención de cepas atenuadas al procedimiento descrito por Antoine y Loch (1990).

Las características de las cepas deficientes en la producción de toxinas, así seleccionadas, pueden verificarse con diversas técnicas, en particular mediante transferencia Western.

Las cepas avirulentas que expresan la proteína híbrida pueden obtenerse con las técnicas conocidas por los expertos en la materia y, en particular, pueden obtenerse como está descrito en la solicitud de patente francesa FR-94 04 661 mencionada anteriormente cuyo contenido está incluido en la presente invención como referencia. Los ADN recombinantes que comprenden, por un lado, una secuencia que codifica un péptido heterólogo y, por otro lado, una secuencia que codifica una parte de FHA se obtienen a través de los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, en particular como está descrito en el Ejemplo V de la Solicitud de patente francesa FR-94 04 661. Este ejemplo da como resultado la fusión de la región 190-211 de 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 verifica de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, y luego se transfiere a las células de *Bordetella*.

La persona experta en la técnica puede referirse para la implementación 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 N.Y., Estados Unidos, o una de sus recientes reediciones.

La proteína heteróloga, cuya secuencia se incluye en la proteína híbrida, puede ser cualquier secuencia de proteína antigénica, especialmente *Bordetella*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Borrellia*, antígenos de *Mycobacterium*, difteria, toxinas o toxoides del tétanos o el cólera, antígenos virales que incluyen *influenza*, VSR, hepatitis B, hepatitis C, poliovirus, rinovirus o VIH, o antígenos parásitos como los de *Plasmodium*, *Schistosoma* o *Toxoplasma*. También puede incluir un epítipo de una proteína capaz de ser expresada por patógenos en infecciones de la mucosa o infecciones sistémicas.

Ventajosamente, la proteína heteróloga es todo o parte de la proteína de la matriz M2 del virus de la *influenza A*.

En una realización preferente 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 del RSV, es decir, la porción que se extiende desde los residuos de aminoácidos 170 a 197, que contenía epítipos de células B y T (Yusibov et al., 2005; Varga et al., 2000).

En aún otra realización, la proteína heteróloga es toda o parte de la proteína PcsB, un antígeno de vacuna ampliamente reactivo cruzado de *S. pneumonia* (Giefing et al., 2008).

La construcción de una cepa de *Bordetella* mutada de la invención puede comenzar reemplazando el gen *ampG* de *Bordetella* en la cepa con un gen *ampG* heterólogo. Cualquier gen *ampG* heterólogo conocido en la técnica puede usarse en la invención. Ejemplos de estos pueden incluir todas las bacterias gramnegativas que liberan cantidades muy pequeñas de fragmentos de peptidoglucano en el medio por generación. Ejemplos de bacterias gramnegativas incluyen, entre otros: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Legionella* y similares. Típicamente, al reemplazar el gen *ampG* de *Bordetella* con un gen *ampG* heterólogo, la cantidad de citoxina de la tráquea (TCT) producida en la cepa resultante expresa menos del 1 % de actividad TCT residual. En otro aspecto, la cantidad de toxina TCT expresada por la cepa resultante está entre aproximadamente 0,6 % a 1 % de actividad TCT residual o aproximadamente 0,4 % a 3 % de actividad TCT residual o aproximadamente 0,3 % a 5 % de actividad TCT residual.

El *PTX* es un factor de virulencia principal responsable de los efectos sistémicos de las infecciones por *B. pertussis*, así como uno de los principales antígenos protectores. Debido a sus propiedades, el gen *ptx* natural puede ser reemplazado por una versión mutada para que la unidad estructural enzimáticamente activa S1 sea reemplazada por una subunidad enzimáticamente inactiva, pero las propiedades inmunogénicas de la toxina pertussis no se ven afectadas. Esto se puede lograr reemplazando 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 reemplazar con una glicina (Gly) (E129G). Estas posiciones de aminoácidos están involucradas en la unión del sustrato y la catálisis, respectivamente. En otros aspectos, también se pueden hacer otras mutaciones como las descritas en la Patente de los Estados Unidos 6,713,072, así como cualquier mutación conocida u otra capaz de reducir la actividad de la toxina. En un aspecto, el intercambio alélico se puede usar primero para eliminar el operón *ptx* y luego para insertar una versión mutada.

En otro aspecto de la invención, el gen *dnt* puede eliminarse de la cepa de *Bordetella* usando intercambio alélico. Además de la eliminación total, la actividad enzimática también puede ser inhibida por una mutación puntual. Dado

que DNT está constituido por un dominio de unión 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 a Ala-1305 inhibe la actividad enzimática de DNT (Kashimoto et al., 1999).

5 El transgén que codifica la proteína híbrida puede insertarse en la cepa mutada definida anteriormente mediante la inserción de una secuencia genética o un plásmido utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Ventajosamente, el gen que codifica la proteína heteróloga o su fragmento epitópico se fusiona como copias simples o múltiples a la secuencia codificadora de la parte N-terminal de la FHA.

10 El transgén se inserta ventajosamente en el locus *dnt* de *B. pertussis*, mediante intercambio alélico usando plásmidos que contenían regiones ascendentes y descendentes del gen *dnt* como lo describe Mielcarek et al. (2006) para la supresión del gen *dnt*.

15 Las cepas de *Bordetella* recombinantes de la invención pueden usarse en composiciones inmunogénicas para el tratamiento o prevención de infecciones de la mucosa. Dichas composiciones inmunogénicas son útiles para aumentar una respuesta inmune, ya sea una respuesta de anticuerpos y/o una respuesta de células T en mamíferos. Por ejemplo, la respuesta de células T o anticuerpos puede ser tal que proteja a un mamífero contra la *influenza*, el VSR, *S. pneumoniae* u otras infecciones o contra sus consecuencias/enfermedades/síntomas.

Las cepas de *Bordetella* mutadas de la invención pueden usarse en vacunas o composiciones inmunogénicas. En un aspecto, las cepas se usan para administración nasal.

Las composiciones de la invención pueden administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores, incluidos adyuvantes, aunque no se prefiere la adición de un adyuvante.

20 En otro aspecto, la invención proporciona además procedimientos para proteger a un mamífero contra una infección por un patógeno que infecta una mucosa, a saber, el tracto respiratorio inferior o superior y/o provocar una respuesta inmune contra dicho patógeno en un mamífero usando la composición o vacuna de la invención.

25 En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmune contra un patógeno con un tropismo de la mucosa en un mamífero, que comprende: administrar una cepa recombinante de *Bordetella pertussis* que comprende un gen de toxina pertussis mutada (*ptx*) y un gen heterólogo *ampG* y que expresa una proteína híbrida que comprende el fragmento N-terminal de la hemaglutinina filamentosa (FHA) y un epítipo heterólogo o un fragmento de proteína o proteína antigénica, diferente de FHA, en el que el gen que codifica la proteína FHA nativa está inactivado.

30 En un aspecto, la cepa recombinante comprende un gen de toxina pertussis mutada (*ptx*), un gen dermonecrótico (*dnt*) eliminado o mutado, y un gen *ampG* heterólogo. En algunos de estos aspectos, se reemplaza el gen *ampG* de la cepa *Bordetella* de tipo salvaje. por un gen *ampG* de otras bacterias Gram negativas, como un gen *ampG* de *E. coli*.

35 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 estos aspectos, la sustitución del aminoácido involucrado en la unión del sustrato comprende K9R y la sustitución del aminoácido involucrado en la catálisis comprende E129G. En algunos aspectos, la cepa *Bordetella* comprende una cepa mutante triple. En algunos de estos aspectos, la cepa *Bordetella* es la cepa BPZE1 identificada por el número de acceso CNCM I-3585.

40 En otros aspectos, los procedimientos 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 estos aspectos, la cepa de *Bordetella* se administra aproximadamente 6 semanas o más antes de la infección de la mucosa. En otros aspectos, la cepa de *Bordetella* se administra aproximadamente 12 semanas o más antes de la infección de la mucosa. En algunos aspectos, el patógeno responsable de la infección de la mucosa es el virus de la *influenza*, el virus sincicial respiratorio o *Streptococcus pneumoniae*.

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

45 Los procedimientos para el tratamiento o prevención de enfermedades relacionadas con infecciones de las mucosas o sistémicas incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de la invención. La composición de la invención puede formularse en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de una o más de las cepas, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales normalmente no deberían ser tóxicos y no deberían interferir típicamente con la eficacia del ingrediente activo.

50 La composición puede usarse típicamente para provocar inmunidad de la mucosa. En otros aspectos, el número de bacterias en cada dosis se ajusta para lograr una respuesta inmune efectiva en un mamífero. El número de bacterias o ufc en cada dosis puede ser de aproximadamente 1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, 5×10^6 , 10^7 , 10^8 o más o cualquier dosis entre cada dosis.

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

Normalmente, las vacunas pueden administrarse por administración nasal o por inhalación. Este tipo de administración es de bajo coste y permite la colonización por la vacuna de la invención de *B. pertussis* del tracto respiratorio atenuada de por vida. La administración nasal se puede lograr con una vacuna de *B. pertussis* atenuada 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 fina neblina de una botella de pulverización nasal o de un inhalador nasal. Los geles se dispensan en pequeñas jeringas que contenían la dosis requerida para una aplicación. La inhalación se puede lograr con una vacuna *B. pertussis* atenuada de por vida bajo la forma de soluciones, suspensiones y polvos; estas formulaciones se administran a través de un aerosol, gotas o un inhalador de polvo seco. Los polvos pueden administrarse con insufladores o inhaladores.

De las diversas opciones de administración de la mucosa disponibles, la ruta intranasal es la más práctica, ya que ofrece un fácil acceso con dispositivos relativamente simples que ya se han producido masivamente. Por lo tanto, la composición de la invención está adaptada y/o es envasada preferiblemente para administración intranasal, tal como por pulverización nasal, gotas nasales, gel o polvo.

Independientemente de la ruta de administración, las composiciones de la invención se envasan preferiblemente en forma de dosis unitaria. Las dosis efectivas se pueden establecer de forma rutinaria. Una dosis humana típica de la composición para inyección o para uso intranasal tiene un volumen entre 0,1-1,0 ml por ejemplo, dos aerosoles de 500 µl, uno por cada fosa nasal.

Las composiciones de la invención están preferiblemente tamponadas por ejemplo, entre pH 6 y pH 8, generalmente alrededor de pH 7.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras:

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

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

Ejemplos

Material y procedimientos

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

Construcción de plásmidos y cepas recombinantes de BPZE1. Los diferentes derivados de BPZE1 descritos aquí todos contenían el transgén en el locus *dnt* de BPZE1 insertado por intercambio alélico, usando plásmidos derivados de pJQmp200rpsL12 (Quandt & Hynes, 1993) y que contenían regiones ascendentes y descendentes del gen *dnt*, según lo descrito por (Mielcarek et al. 2006) para la supresión del gen *dnt* en BPZE1.

Construcción de pXR1.

Primero, el sitio XbaI del esqueleto de este plásmido (Mielcarek et al., 2006), llamado pJQdntUPLO, se cambió de TCTAGA (SEQ ID NO: 1) a TCCAGA (SEQ ID NO: 2) usando los cebadores SP Xba mut 5'-GCATGCCTGCAGGTCGACTCCAGAGGATCCCCGGGTACCG-3' (SEQ ID NO: 3) y ASP Xba mut 5'-CGGTACCCGGGGATCCDNTGGAGTCGACCTGCAGGCATGC-3' (SEQ ID NO: 4) y QuickChange[®] XL (Stratagen) según las especificaciones del fabricante. Se secuenciaron las regiones *dnt* corriente arriba y *dnt* corriente abajo del plásmido resultante, denominado pXR1. Se observó una mutación G → A en la región corriente abajo *dnt* (correspondiente a la posición 3,651,839 del genoma de *B. pertussis*, GenBank NC-002929.2).

Construcción de pXR1-Fha44

Se adquirió un gen sintético que codifica la parte 5' del gen *fhaB* de Eurogentec (Lieja, Bélgica). Este gen, llamado *fha44c*, contiene 2.583 pb que codifican los aminoácidos 1 a 861 de *FhaB*, el precursor de FHA (desde la posición de nucleótidos 253 a 2.835, GenBank M60351.1), excepto por cuatro cambios silenciosos (G354C, C864G, G2,331C y A2,556G), un sitio de clonación múltiple de 27 bp con la secuencia 5'-CTTAAGACGCGTCATATGGGCGGCCGC-3' (SEQ ID NO: 5) y dos codones de terminación TGA. Esta secuencia se proporcionó en un plásmido llamado pUC57-*Fha44c*. Este plásmido se digirió con XhoI y XbaI, y el fragmento correspondiente a *fha44c* se insertó en pXR1 digerido con XhoI/XbaI. El plásmido resultante, pXR1-Fha44, contiene así la región de 813 pb corriente 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 proteína transportadora Fha44 fusionada al sitio de clonación múltiple de 27 pb, seguido de dos codones de terminación de TGA en la región de 83 pb corriente abajo del codón de terminación de 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 XbaI y la región corriente abajo 712-pb *dnt* 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, a excepción de 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 codifica 3 copias del péptido M2e se amplificó por PCR a partir de pGA4-3M2e (de Geneart AG), que contenía la información de codificación 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 fueron reemplazados por serina. Los oligonucleótidos 5'-ACGCGTGTGGAACTCCTATCCG-3' (SEQ ID NO: 6) y 5'-CATATGGCCGCCAGAGCCGCTATCAGAGCTATCGTT-3' (SEQ ID NO: 7) se usaron como cebadores. El fragmento de ADN amplificado se insertó luego en pCRII-TOPO (Invitrogen) y se verificó por secuenciación de ADN. Un fragmento de 273 pb obtenido después de la digestión con *MluI/NdeI* se clonó en los sitios *MluI/NdeI* 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) por transformación, y las bacterias *E. coli* SM10 recombinantes resultantes se conjugaron con BPZE1. Se seleccionaron dos sucesivos eventos de recombinación homóloga como está descrito (Stibitz, 1994). Las cepas recombinantes se analizaron luego por PCR para identificar clones en los que el gen híbrido se insertó correctamente en el locus *dnt*. La cepa recombinante BPZE1 se denominó BPZM2e.

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

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

El oligonucleótido que codifica los aminoácidos 170 a 197 de la glicoproteína de la cepa RSV A2 (GenBank AAC55969.1) se sintetizó de acuerdo con el uso del codón *B. pertussis* y tuvo la siguiente secuencia:

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

Se produjo por PCR usando 100 nM de oligonucleótidos superpuestos.

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

5'-AGGATCCCTDNTTGCCCGGCTDNTTGTTCGGGATGCGCTTGCAGATG GCCAGCAGGTGGGTTGTTTCG-3' (SEQ ID NO: 10) como plantilla y oligonucleótidos 400 nM

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

50 5'-AGGATCCCTDNTTGCCCGGCTDNTT-3' (SEQ ID NO: 12) como cebadores.

El fragmento de 96 pb resultante se insertó luego en pCRII-TOPO (Invitrogen), produciendo pCRII-TOPO-GR_{RSV}BamHI, y se secuenció para confirmar la ausencia de mutaciones inesperadas. La secuencia de RSV G se amplificó luego por PCR, utilizando pCRII-TOPO-GR_{RSV}BamHI como molde y oligonucleótidos. 5'-AACGCGTTTCGTGCCGTGCTCGATC-3' (SEQ ID NO: 13) y 5'-ACGCGDNTDNTTGCCCGGCTDNTT-3' (SEQ ID NO: 14) como cebadores. El fragmento de 96 pb resultante se insertó luego en pCRII-TOPO, produciendo pCRII-TOPO-GR_{RSV}MluI y se secuenció para confirmar la ausencia de mutaciones inesperadas. El pCRII-TOPO-GR_{RSV}MluI se digirió con MluI, y la secuencia RSV G se insertó en pXR1-Fha44 digerido con MluI para producir pXR1-Fha44/GR_{RSV}. Este plásmido se secuenció para verificar la orientación adecuada del inserto y la ausencia de alteraciones no deseadas, y luego se introdujo en *E. coli* SM10 (Simon et al., 1983) por transformación, y las bacterias *E. coli* SM10 recombinantes resultantes se conjugaron con BPZE1. Se seleccionaron dos sucesivos eventos de recombinación homóloga como está descrito (Stibitz, 1994). Las cepas recombinantes se analizaron luego por PCR para identificar clones en los que el gen híbrido se insertó correctamente en el locus *dnt*. La cepa recombinante BPZE1 se denominó BPZGR_{RSV}.

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

15 **Construcción de derivados de BPZE1 que expresan Fha44-PcsB**

La secuencia codificadora de la forma madura de PcsB (del residuo de aminoácido 28 al residuo 278) se amplificó por PCR usando el ADN cromosómico del serotipo 1 de *S. pneumoniae* (aislado clínico E1586) como plantilla y oligonucleótidos sintéticos SP-PcsB 5'-CATATGTGGACGAACCTTTTGCACGGACA-3' (SEQ ID NO: 15) y ASP-PcsB 5'-ACGCGTGAAACGACTGATGACAAAATTCG-3' (SEQ ID NO: 16) como cebadores. El *S. pneumoniae* se llevó a ebullición y se añadieron 10 μM de oligonucleótidos en la mezcla de PCR. El fragmento de 750 pb resultante se insertó en pCRII-TOPO, produciendo pCRII-TOPO-PcsB, y luego se secuenciaron. El pCRII-TOPO-PcsB se digirió con MluI y NdeI, y el fragmento correspondiente a la secuencia 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 *E. coli* SM10 recombinantes resultantes se conjugaron con BPZE1. Se seleccionaron dos sucesivos eventos de recombinación homóloga como está descrito (Stibitz, 1994). Las cepas recombinantes se analizaron luego por PCR para identificar clones en los que el gen híbrido se insertó correctamente en el locus *dnt*. La cepa recombinante BPZE1 se denominó BPZPcsB.

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

30 **Análisis de proteínas e inmunodetección de las proteínas quiméricas recombinantes.** Para la detección de las proteínas quiméricas Fha44-3M2e, Fha44-GR_{RSV} y Fha44-PcsB, las cepas recombinantes se cultivaron durante 48 horas en 10 ml de medio Stainer-Scholte suplementado con 100 μg/ml de estreptomina. Las células se centrifugaron luego durante 15 minutos a 4.000 x g. Se recogieron 400 μl de sobrenadante y las células se resuspendieron en 400 μl de PBS. Se añadieron 200 μl de tampón de carga 3x Laemmli (1970) a los sobrenadantes y a las suspensiones celulares. Las mezclas se calentaron luego a 95 °C durante 10 min. El ADN cromosómico fue cortado al pasar la suspensión bacteriana 10 veces a través de una aguja de calibre 27. Esto fue seguido por calentamiento a 95 °C durante 15 min. Se cargaron 10 μl de cada muestra en un gel de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10 % (SDS-PAGE) para análisis de inmunotransferencia o tinción con azul de Coomassie. Se usó un sobrenadante de BPZE1 no recombinante y/o lisado de células completas como controles negativos.

40 Después de la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas en membranas de nitrocelulosa e incubadas con el anti-M2e de ratón (Neiryck et al., 1999) o anti-GR_{RSV} (Mekseepralard et al., 2006) anticuerpos en PBS que contenía 0,1 % de Tween 20 y 1 % de albúmina de suero bovino. Los anticuerpos monoclonales anti-ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (Promega) diluidos 1:4.000 se usaron para la detección cromogénica de las proteínas mediante la adición del sustrato de fosfatasa alcalina (tetrazolio nitroazul y reactivos de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato; Promega). Los tamaños de las bandas reactivas se determinaron a partir de la distancia de migración del marcador de proteína All Blue (Biorad).

50 **Colonización e inmunogenicidad en ratones.** Se obtuvieron ratones BALB/c de Charles River (l'Abresle, Francia) y se mantuvieron bajo condiciones específicas libres de patógenos en las instalaciones de animales del Institut Pasteur de Lille. Para la colonización pulmonar, los ratones BALB/c de 6 semanas de edad se sedaron ligeramente mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de un cóctel anestésico (ketamina+atropina+valium) e inmunizados intranasalmente (i.n.) con 20 μl de PBS que contenía 10⁶ o 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC) de BPZE1 o cepas recombinantes como se describió previamente (Mielcarek et al., 2006). Los ratones fueron sacrificados en los puntos de tiempo indicados después de administración i.n., y se recolectaron sus pulmones, se homogeneizaron en PBS y se colocaron en placas en diluciones en serie en agar BG-sangre para contar las UFC después de la incubación a 37 °C durante tres o cuatro días, como está descrito (Mielcarek et al., 2006).

55 Para los estudios de inmunización, se inmunizaron grupos de ratones BALB/c de 6 semanas de edad por vía i.n. con 20 μl de PBS que contenía 10⁷ UFC de BPZE1 o cepas recombinantes, y luego se reforzó a intervalos de 4 semanas con la misma cantidad de bacterias.

Detección de anticuerpos. Se revistieron placas de 96 pozos con 2 µg/ml del péptido M2e sintético (Ac-GGSLLETVETPIRNEWGSRSDSSDGG-NH₂, SEQ ID NO: 17), con 2 µg/ml del péptido G_{RSV} sintético (Ac-GGFVPCISCSNPTCWAICKRIPNKKPGKKG-NHP2KQGG-NH₂, SEQ ID NO: 18) o 2 µg/ml de PcsB recombinante, se incubaron durante la noche a 4 °C y se lavaron con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 % (PBST). Posteriormente, las placas se bloquearon con 100 µl/pozo de tampón de bloqueo (2 % de BSA en PBST) durante 1 hora a 37 °C. Después de tres lavados, se agregaron 100 µl de suero diluido en serie a los pozos 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 (Southern Biotech) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluido 1:4000 en PBST. Después de cinco lavados, las placas se incubaron con 100 µl de solución TMB de sustrato HRP (Interchim) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de H₃PO₄ 1M. La densidad óptica (DO) se midió con un lector Biokinetic EL/340 microplaca a 450 nm. El título final se determinó como la dilución de suero más alta que tenía una densidad óptica que leía más del doble que la del suero de control negativo.

Producción de PcsB recombinante. El fragmento PcsB se amplificó por PCR utilizando el ADN cromosómico de *S. pneumoniae* serotipo 1 (aislado clínico E1586) como plantilla y 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 este 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 caldo LB líquido suplementado con kanamicina (25 µg/ml). Cuando el OD₆₀₀ alcanzó 0,8, la expresión se indujo mediante la adición de 1 mM de isopropil-d-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 4 h a 37 °C. Las células inducidas se recolectaron luego por centrifugación a 8.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C y se suspendieron en tampón de lisis A (PBS, pH 7,0; NaCl 350 mM; glicerol al 10 %) suplementado con 1 tableta/25 ml de inhibidores de proteasa [completa TM, libre de EDTA (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, Francia)].

Las células fueron rotas mediante dos pasos a través de una celda de presión French. Después de recolectar las fracciones de membrana por centrifugación (15.000 rpm durante 20 min), el sobrenadante del lisado celular se pasó a través de la agarosa níquel-NTA (Qiagen) (Sepharose quelante, Flujo rápido, con metal Ni²⁺ acoplado, Amersham-Pharmacia) en una rata de flujo 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 marcada con histidina unida se llevó a cabo usando un gradiente gradual con 15 ml de tampón A que contenía imidazol 50 mM, 100 mM o 200 mM. Los eluidos se recogieron como fracciones de 2 ml. Luego, las muestras obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE usando un gel de poliacrilamida al 12 % y tinción con azul de Coomassie, y las fracciones que contenían proteína PcsB se agruparon y se dializaron durante la noche contra PBS a 4°C. Las concentraciones de proteínas se estimaron usando la prueba BCA (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

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

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

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

Se fusionaron tres copias de la secuencia que codifica M2e con la secuencia que codifica Fha44. El constructo se insertó en el cromosoma BPZE1 en el locus *dnt* mediante intercambio alélico, colocando el transgén bajo el control del promotor *dnt* en la cepa recombinante denominada BPZM2e. El sobrenadante de cultivo no concentrado y los extractos de células enteras de BPZE1 y BPZM2e se examinaron mediante análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal anti-M2e. Se detectó una banda de 94 kDa, correspondiente al tamaño esperado de la proteína quimérica Fha44-3M2e, en el sobrenadante de cultivo de la cepa recombinante. También se detectó una proteína de tamaño similar que también era reactiva con el anticuerpo anti-M2e en los extractos de células completas. Esta observación indica que la proteína quimérica se secretó de la cepa recombinante y también se asoció con la célula bacteriana de BPZM2e.

Colonización pulmonar e inmunogenicidad de BPZM2e

Primero se comparó la cinética de crecimiento de BPZM2e in vitro en medio Stainer Scholte con la de la cepa original BPZE1. No hubo diferencia estadística entre las dos cepas, lo que indica que la adaptación bacteriana general no fue afectada por la expresión de Fha44-3M2e.

Para estudiar la capacidad de la cepa recombinante BPZM2e para colonizar el tracto respiratorio murino, se infectaron ratones BALB/c i.n. con 10⁶ UFC de BPZM2e o con BPZE1 no recombinante, y se compararon sus perfiles de colonización. El perfil de colonización de la cepa recombinante BPZM2e era indistinguible 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.

- 5 Las respuestas de anticuerpos 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 momento. La dosis de BPZM2e se aumentó diez veces, y los ratones BALB/c fueron inmunizados por vía i.n. dos veces en un intervalo de 4 semanas con 10^7 UFC de BPZE1 o BPZM2e recombinante. Se recolectaron sueros a las 2 semanas y 4 semanas después de la primera inmunización, y 2 semanas después de la última inmunización para evaluar la IgG anti-M2e sistémica. Nuevamente, no se detectó una respuesta de anticuerpos significativa a M2e en suero.

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

- 10 El gen cromosómico que codifica FHA (*fhaB*) fue inactivado a partir de BPZM2e mediante la introducción de un derivado de pFus2 que contenía un fragmento interno de *fhaB* (Antoine et al., 2000). Como pFus2 no puede replicarse en *B. pertussis*, la integración del plásmido en el gen *fhaB* se ve forzada por recombinación homóloga, interrumpiendo así este gen. Los integrantes se seleccionaron en agar sangre BG que contenía estreptomycin 100 µg/ml y gentamicina 10 µg/ml. La cepa resultante se denominó BPZM2e-ΔFHA.
- 15 La ausencia de FHA en BPZM2e-ΔFHA se verificó por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, y la presencia de Fha44-3M2e en el sobrenadante del cultivo se determinó por análisis de inmunotransferencia. La SDS-PAGE y la tinción con azul de Coomassie mostró la ausencia de la proteína de 220 kDa, correspondiente a FHA en el sobrenadante de cultivo de la cepa mutante, así como en la de BPGR4, una cepa conocida deficiente en FHA, utilizada como control. El análisis de inmunotransferencia de sobrenadantes de cultivo no concentrados indicó que el mutante deficiente en FHA produjo al menos tanta Fha44-3M2e como la cepa parental BPZM2e. Como se esperaba, no se detectó ninguna banda inmunorreactiva en el sobrenadante de cultivo de BPZE1.
- 20

Colonización en pulmones de ratones por BPZM2e-ΔFHA

- 25 Para investigar el perfil de colonización de la nueva cepa recombinante después de la supresión de FHA, se infectaron ratones BALB/c i.n. con 10^7 UFC de BPZM2e-ΔFHA, y se siguió la carga bacteriana en los pulmones durante hasta 28 días. Tanto BPZE1 como BPZM2e-ΔFHA colonizaron los pulmones y persistieron en los pulmones de los ratones a niveles similares, aunque en el día 3 después de la inoculación se detectó significativamente menos BPZM2e-ΔFHA que BPZE1 en los pulmones de los ratones.

Inmunogenicidad de BPZM2e-ΔFHA

- 30 La inmunogenicidad de BPZM2e-ΔFHA se evaluó después de dos administraciones i.n. a intervalos de 4 semanas. Los sueros se recogieron 2 semanas después de la última inmunización y se analizó la respuesta sistémica de anticuerpos anti-M2e. Se descubrió que BPZM2e-ΔFHA induce altos niveles de IgG sistémica contra M2e, mientras que dos administraciones de BPZM2e que producen FHA o BPZE1 no dieron como resultado una respuesta significativa de IgG anti-M2e (Figura 1), como se esperaba. Estas observaciones indican que la ausencia de FHA aumenta fuertemente las respuestas inmunes a M2e después de inmunización i.n. con BPZE1 recombinante.

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

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

- 40 Se ha demostrado que un fragmento peptídico de la proteína G de RSV que abarca los residuos de aminoácidos 170 a 197 contiene un epítipo neutralizante de células B (Power et al., 2001; Yusibov et al., 2005) y un epítipo de células T (Varga et al., 2000). Esta región de la proteína también está bien conservada entre diferentes aislados de RSV. En cuanto al epítipo M2e del virus de la *influenza* anterior, se ha utilizado Fha44 como portador para expresar el epítipo G en BPZE 1.

Una única copia de la secuencia de codificación del epítipo G se fusionó con la secuencia de codificación de Fha44. El constructo se insertó en el cromosoma BPZE1 en el locus *dnt* mediante intercambio alélico, colocando el transgén bajo el control del promotor *dnt* en la cepa recombinante denominada BPZG_{RSV}.

- 45 Los sobrenadantes de cultivo no concentrados de BPZG_{RSV} se examinaron mediante análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal anti-G. Se detectó una banda de aproximadamente 90 kDa, correspondiente al tamaño esperado de la proteína quimérica Fha44-G_{RSV}, en el sobrenadante de cultivo de la cepa recombinante, lo que indica que la proteína quimérica se secretó de la cepa recombinante.

Colonización pulmonar e inmunogenicidad de BPZG_{RSV}

- 50 Para estudiar la capacidad de la cepa recombinante BPZG_{RSV} de colonizar el tracto respiratorio murino, se infectaron ratones BALB/c 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} era indistinguible del de la cepa parental BPZE1 correspondiente, lo que indica que la inserción de Fha44-G_{RSV} no altera la capacidad de colonizar los pulmones de los ratones.

Las respuestas de anticuerpos 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 incrementó diez veces, y los ratones BALB/c fueron inmunizados por vía i.n. dos veces en un intervalo de 4 semanas con 10⁷ UFC de BPZE1 o BPZG_{RSV} recombinante. Se recolectaron sueros 2 semanas después de la última inmunización para evaluar las respuestas sistémicas anti-G IgG. Nuevamente, no se detectó una respuesta de anticuerpos significativa al péptido G en el suero.

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

El gen cromosómico que codifica FHA (*fhaB*) fue inactivado a partir de BPZG_{RSV} introduciendo el derivado de pFus2 como se describió anteriormente, y la ausencia de FHA en BPZG_{RSV}-ΔFHA se verificó por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, y la presencia de Fha44-G_{RSV} en el sobrenadante de cultivo se determinó por análisis de inmunotransferencia. SDS-PAGE y la tinción con azul de Coomassie mostró la ausencia de la proteína de 220 kDa, correspondiente a FHA en el sobrenadante de cultivo de la cepa mutante. El análisis de inmunotransferencia de sobrenadantes de cultivo no concentrados indicó que la cepa mutante deficiente en FHA produjo tanto Fha44-G_{RSV} como la cepa parental BPZG_{RSV}.

15 Inmunogenicidad de BPZG_{RSV}-ΔFHA

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

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

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

PcsB es un antígeno proteico de *S. pneumoniae* que es altamente conservado entre varios aislados clínicos e induce protección contra la sepsis letal. Se ha demostrado que es de protección cruzada contra cuatro serotipos diferentes en modelos de sepsis y neumonía (Giefing et al., 2008).

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

30 Los sobrenadantes de cultivo no concentrados de BPZPcsB se examinaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Una banda de 112 kDa, correspondiente a la proteína quimérica Fha44-PcsB, fue fácilmente detectable en el sobrenadante de cultivo no concentrado de la cepa recombinante, lo que indica que la proteína quimérica fue secretada por la cepa recombinante.

Inmunogenicidad de BPZPcsB

35 Los ratones BALB/C fueron inmunizados por vía nasal tres veces a intervalos de 4 semanas con 10⁷ ufc BPZPcsB o recibieron BPZE1 como control. Se recogieron sueros dos semanas después de cada inmunización, y las respuestas de anticuerpos a PcsB se examinaron mediante ELISA. Las dosis crecientes de BPZPcsB dieron como resultado un aumento de los títulos de anticuerpos contra PcsB, aunque los títulos de anticuerpos permanecieron bastante bajos, especialmente después de la primera y segunda inmunización.

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

El gen cromosómico que codifica FHA (*fhaB*) fue inactivado a partir de BPZPcsB introduciendo el derivado de pFus2 como se describió anteriormente, y la ausencia de FHA en BPZPcsB-ΔFHA, pero la presencia de Fha44-PcsB se verificó por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. SDS-PAGE y la tinción con azul de Coomassie mostró 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 sobrenadante de cultivo de la cepa mutante.

Inmunogenicidad de BPZPcsB-ΔFHA

La inmunogenicidad de BPZPcsB-ΔFHA se evaluó después de dos administraciones i.n. a intervalos de 4 semanas. Los sueros se recogieron 2 semanas después de la última inmunización y se analizaron las respuestas sistémicas de anticuerpos anti-PcsB. Se descubrió que BPZPcsB-ΔFHA induce altos niveles de IgG sistémica contra PcsB que fueron significativamente más altos que los inducidos por BPZPcsB que produce FHA (Figura 3). Estas observaciones indican que, en cuanto a M2e y G_{RSV}, la ausencia de FHA aumenta significativamente las respuestas inmunes a PcsB después de inmunización i.n. con BPZE1 recombinante.

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la cual es pertinente esta invención.

Referencias

- Alonso S, Willery R, Renauld-Mongénie G, Locht C. 2005. Production of Non typeable Haemophilus influenzae HtrA by Recombinant *Bordetella pertussis* with the Use of Filamentous Hemagglutinin as a Carrier. *Infect. Immun.*, 73, 4295-4301
- 5 - Antoine R, and Locht C. 1990. Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect, Immun.*, 58, 1518-1526.
- Antoine R, Alonso S, Raze D, Coutte L, Lesjean S, Willery E, et al. 2000. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 182, 5902-5905.
- 10 - Coppens I, Alonso S, Antoine R, Jacob-Dubuisson F, Renauld-Mongénie G, Jacobs E, Locht C. 2001. Production of Neisseria meningitidis transferrin-binding protein B by recombinant *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 69, 5440-5446,
- De Filette M, Fiers W, Martens W, Birkett A, Ramne A, Lowenadler B, et al. 2006. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine* 24, 6597-6601.
- Feunou PF, Kammoun H, Debie AS, Mielcarek N, Locht C. 2010. Long-term immunity against pertussis induced by a single nasal administration of live attenuated *B. pertussis* BPZE1. *Vaccine* 28, 7047-7053.
- 15 - Giefing C., Meinke, AL, Hanner M, Henics T, Minh DB, Gelbmann D, Lundberg U, Senn BM, Schunn M, Habel, A, Henriques-Normark B, Ortqvist A, Kalin M, von Gabain A, and Nagy E. 2008. Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med* 205, 117-131.
- 20 - Ho, S. Y., Chua, S. Q., Foo, D. G. W., Locht, C., Chow, V. T., Poh, C. L., and Alonso, S. 2008. Highly attenuated *Bordetella pertussis* strain BPZE1 as a potential live vehicle for delivery of heterologous vaccine candidates. *Infect Immun* 76, 111-119.
- Huang CC, Chen PM, Kuo JK, Chui WH, Lin ST et al. 1962. Experimental whooping cough. *N Engl J Med* 266, 105-111.
- 25 - Kashimoto T., Katahira J, Cornejo W R, Masuda M, Fukuoh A, Matsuzawa T, Ohnishi T, Horiguchi Y. (1999) Identification of functional domains of *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *Infect. Immun.* 67: 3727-32.
- Kavanagh H, Noone C, Cahill E, English K, Locht C, Mahon BP. 2010. Attenuated *Bordetella pertussis* vaccine strain BPZE1 modulates allergen-induced immunity and prevents allergic pulmonary pathology in a murine model. *Clin Exp Allergy* 40, 933-941.
- 30 - Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambert-Buisine, C., E. Willery, C. Locht, and F. Jacob-Dubuisson. 1998. N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol. Microbiol.* 28, 1283-1293.
- 35 - Li, R., Lim, A., Ow, S. T., Phoon, M. C., Locht, C., Chow, V. T., and Alonso, S. 2011. Development of live attenuated *Bordetella pertussis* strains expressing the universal influenza vaccine candidate M2e. *Vaccine* 29, 5502-5511.
- Li R, Lim A, Phoon MC, Narasaraju T, Ng JK, Poh WP, Sim MK, Chow VT, Locht C, Alonso S. 2010. Attenuated *Bordetella pertussis* protects against highly pathogenic influenza A viruses by dampening the cytokine storm. *J Virol* 84, 7105-7113.
- 40 - Locht C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F. 2001. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Cur Opin Microbiol* 4, 82-89.
- Locht C, Geoffroy MC, Renauld G. 1992. Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families. *EMBO J* 11, 3175-3183.
- 45 - Mascart F, Verscheure V, Malfroot A, Hainaut M, Piérard D, Temerman S, Peltier A, Debie AS, Levy J, Del Giudice G, Locht C. 2003. *Bordetella pertussis* infection in 2-months-old infants promotes Type 1 T cell responses. *J Immunol* 170, 1504-1509.
- Mekseepralard C, Toms GL, Routledge EG. 2006. Protection of mice against human respiratory syncytial virus by wild-type and aglycosyl mouse-human chimaeric IgG antibodies to subgroup-conserved epitopes on the G glycoprotein. *J Gen Virol* 87, 1267-1273.

- Menozzi FD, Gantiez C, Loch C. 1991. Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 59, 3982-3988.
- Mielcarek N, Debie AS, Mahieux S, Loch C. 2010. Dose-response of attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1-induced protection in mice. *Clin Vaccine Immunol* 17, 317-324.
- 5 - Mielcarek N, Debie AS, Raze D, Bertout J, Rouanet C, Ben Younes A, Creuzi C, Engle J, Goldman WE, Loch C. 2006. Live attenuated *B. pertussis* as a single single-dose nasal vaccine against whooping-cough. *PLoS Pathog* 2, 662-670.
- Mutsch, M., Zhou, W., Rhodes, P., Bopp, M., Chen, R. T., Linder, T., Spyr, C., Steffen, R. 2004. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 350, 896-903.
- 10 - Neiryck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. 1999. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* 5, 1157-1163.
- Quandt J, Hynes MF. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 127, 15-21.
- Power UF, Plotnicky-Gilquin H, Goetsch L, Champion T, Beck A, Haeuw JF, Nguyen TN, Bonnefoy JY, Corvaia N. 2001. Identification and characterization of multiple linear B cell protectopes in the respiratory syncytial virus G protein. *Vaccine* 19, 2345-2351.
- 15 - Renault-Mongenie G, Cornette J, Mielcarek N, Menozzi FD, Loch C. 1996. Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Bacteriol* 178, 1053-1060.
- 20 - Reveneau N, Alonso S, Jacob-Dubuisson F, Mercenier A, Loch C. 2001. Tetanus toxin fragment C-specific priming by intranasal infection with recombinant *Bordetella pertussis*. *Vaccine* 20, 926-933.
- Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/technology* 1, 784-791.
- 25 - Skerry CM, Cassidy JP, English K, Feunou-Feunou P, Loch C, Mahon BP. 2009. A live attenuated *Bordetella pertussis* candidate vaccine does *not* cause disseminating infection in gamma interferon receptor knockout mice. *Clin Vaccine Immunol* 16, 1344-1351.
- Stainer DW, Scholte MJ. 1970. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* 63, 211-220.
- 30 - Stibitz R. 1994. Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Methods Enzymol* 235, 458-465.
- Varga SM, Wissinger EL, Braciale TJ. 2000. The attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus contains a single immunodominant epitope that elicits both Th1 and Th2 CD4+ T cell responses. *J Immunol* 165, 6487-6495.
- Yusibov, V., V. Mett, V. Mett, C. Davidson, K. Musiychuk, S. Gilliam, A. Farese, T. MacVittie, and D. Mann. 2005. Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus. *Vaccine* 23:2261-2265;

35

Tabla 1. Cepas bacterianas

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

Cepas	Descripción (referencia)
BPZG _{RSV} -ΔFha	BPZE1 cepa recombinante que expresa Fha44-G _{RSV} y deficiente en FHA (este trabajo)
BPZPcsB	BPZE1 cepa recombinante que expresa Fha44-PcsB (este trabajo)
BPZPcsB-ΔFha	BPZE1 cepa recombinante que expresa Fha44-PcsB y deficiente en FHA (este trabajo)

Listado de secuencias

<110> INSERM
 <120><120> Nuevas cepas recombinantes de *Bordetella*
 5 <130> BIO12225 LOCHT-MIELCAREK
 <160> 20
 <170> PatentIn version 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
cggtagcccg ggatcctctg gagtcgacct gcagcatgc 40
<210> 5
10 <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 atcggt 36
<210> 8
<211> 84
35 <212> ADN
<213> Artificial
<220>

ES 2 771 675 T3

<223> Cebador
 <400> 8
 ttcgtgccgt gctcgatctg ctggaacaac ccgacctgct gggccatctg caagcgcac 60
 ccgaacaaga agccgggcaa gaag 84
 <210> 9
 5 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 9
 aggatccttc gtgccgtgct cgatctgctc gaacaaccg acctgctggg ccatctgcaa 60
 gcgcat 66
 <210> 10
 <211> 69
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 10
 aggatccctt cttgcccggc ttcttgctcg ggatgcgctt gcagatggcc cagcaggtcg 60
 ggttgctcg 69
 20 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador
 <400> 11
 aggatccttc gtgccgtgct cgatc 25
 <210> 12
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador

ES 2 771 675 T3

<400> 12
aggatccctt ctgcccggc ttctt 25
<210> 13
<211> 25
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 13
10 aacgcgttcc gtgccgtgct cgatc 25
<210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Cebador
<400> 14
acgcgtcttc ttgcccggct tctt 24
<210> 15
20 <211> 28
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
25 <400> 15
catatgtgga cgaactttg cacggaca 28
<210> 16
<211> 29
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 16
acgcgtgaaa cgactgatga caaaattcg 29
35 <210> 17
<211> 27
<212> PRT

ES 2 771 675 T3

<213> Artificial

<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

5 Gly Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Gly Gly <210>
 18 20 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Péptido

<400> 18

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

15 Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Gly Gly <210>
 19 20 25 30

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

20 <400> 19

ccatgggtga aacgactgat gacaaaattg 30

<210> 20

<211> 42

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 20

gcgccgcac gaactttgc acggacaggt gctgctgcat ca 42

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa de *Bordetella pertussis* genéticamente atenuada que expresa una proteína híbrida que comprende una parte de la proteína de hemaglutinina filamentosa (FHA) en forma de un fragmento N-terminal de FHA que permite la expresión superficial y la secreción de un epítipo heterólogo o una proteína antigénica o fragmento de proteína unido a dicho fragmento N-terminal de FHA, siendo dicho epítipo heterólogo o proteína antigénica o fragmento de proteína diferente de FHA, en la que el gen que codifica la proteína FHA nativa está inactivado y el ácido nucleico que codifica la proteína híbrida está en el locus del gen *dnt* suprimido.
2. La cepa de *Bordetella pertussis* de la reivindicación 1, en la que el gen que codifica la proteína FHA nativa se suprime parcial o totalmente.
- 10 3. La cepa de *Bordetella pertussis* de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el fragmento N-terminal de la proteína FHA comprende los aminoácidos de las posiciones 1 a 330, comenzando con el primer aminoácido de la preproteína *FhaB*.
4. La cepa *Bordetella pertussis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína heteróloga de dicha proteína híbrida comprende al menos un epítipo de una proteína que se expresa por los patógenos responsables de las infecciones del tracto respiratorio superior o inferior.
- 15 5. La cepa de *Bordetella pertussis* de la reivindicación 4, en la que el patógeno es un virus de la *influenza*.
6. La cepa de *Bordetella pertussis* de la reivindicación 4, en la que el patógeno es un virus sincicial respiratorio (VSR).
7. La cepa de *Bordetella pertussis* de la reivindicación 4, en la que el patógeno es *Streptococcus pneumoniae*.
- 20 8. La cepa *Bordetella pertussis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína híbrida comprende el fragmento N-terminal de FHA fusionado al dominio extracelular de la proteína de la matriz (Me2) del virus de la *influenza A*.
9. La cepa *Bordetella pertussis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína híbrida comprende el fragmento N-terminal de la proteína FHA fusionada a al menos un fragmento antigénico de la proteína G del virus respiratorio sincicial (RSV).
- 25 10. La cepa *Bordetella pertussis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína híbrida comprende el fragmento N-terminal de la proteína FHA fusionada a un fragmento antigénico de la proteína PcsB de *S. pneumoniae*.
11. Una composición inmunogénica que comprende la cepa de *Bordetella pertussis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa de la mucosa o sistémica.
- 30 12. Una vacuna viva atenuada que comprende la cepa de *Bordetella pertussis* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa de la mucosa o sistémica.

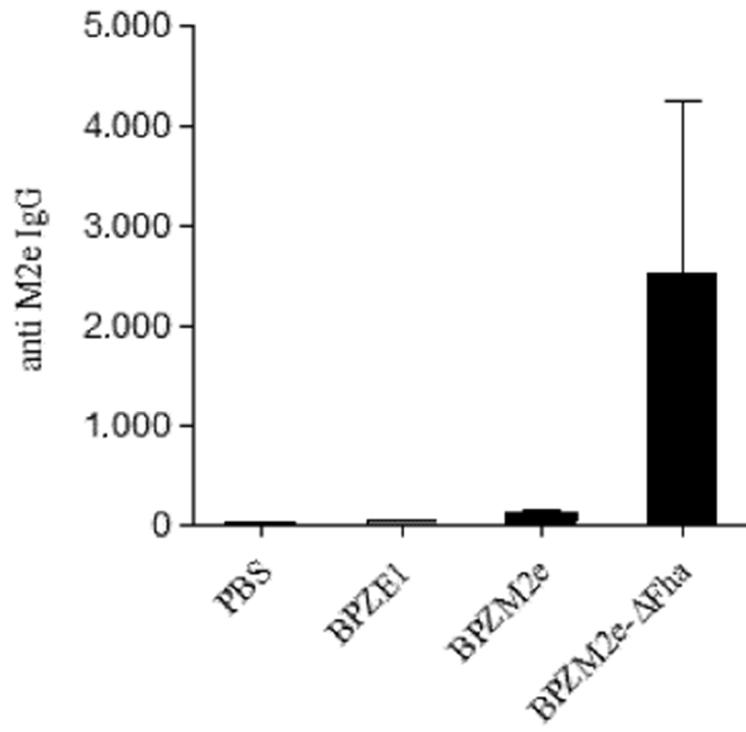


Figura 1

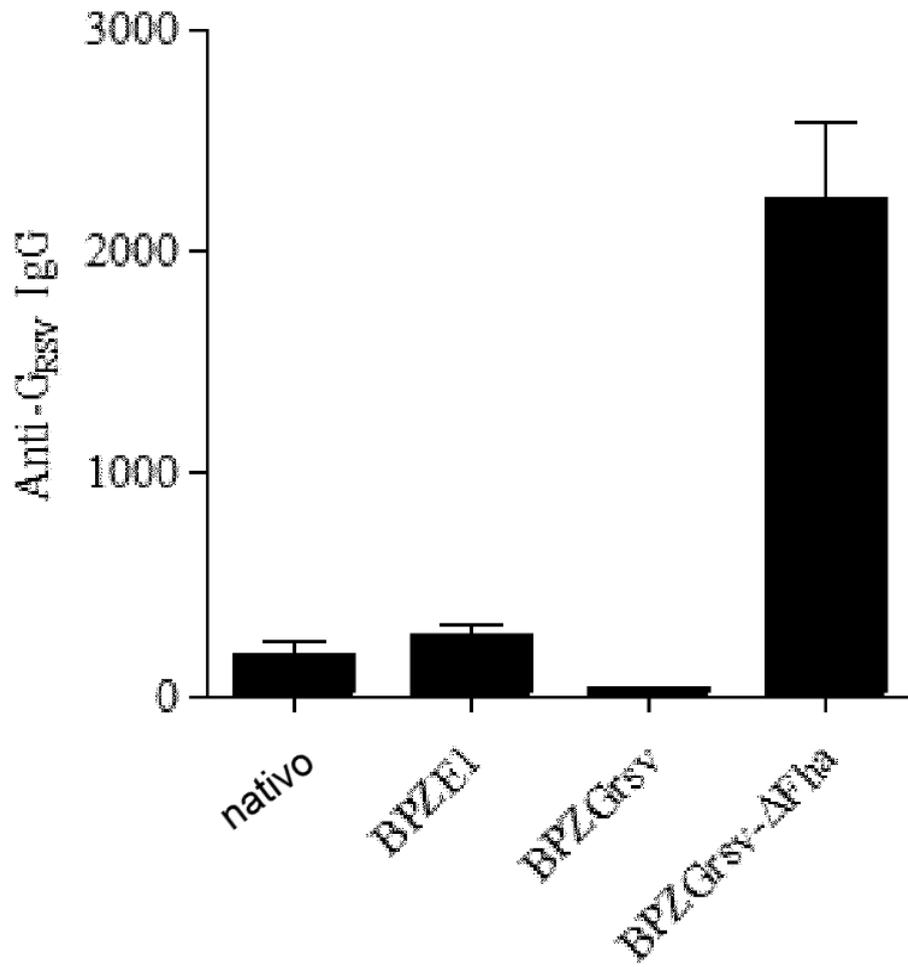


Figura 2

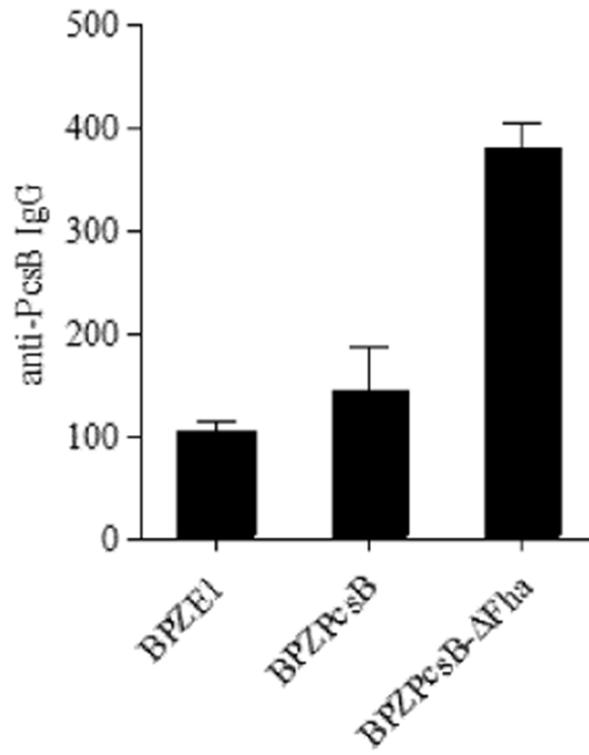


Figura 3