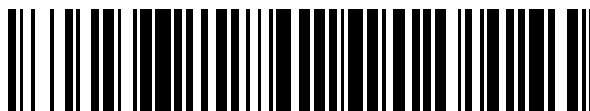


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 481**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/10 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2012 PCT/SG2012/000417**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13066272**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012 E 12846339 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2773371**

54 Título: **Efecto de una cepa de Bordetella atenuada contra enfermedades alérgicas**

30 Prioridad:

02.11.2011 US 201161554798 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2020

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE (33.3%)
21 Lower Kent Ridge Road
Singapore 119077, SG;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%) y
INSTITUT PASTEUR DE LILLE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ALONSO, SYLVIE CLAUDETTE;
LI, RUI y
LOCHT, CAMILLE**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 781 481 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

Efecto de una cepa de *Bordetella* atenuada contra enfermedades alérgicas

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/554,798, presentada el 2 de noviembre de 2011.

Campo

Los diversos aspectos descritos en este documento se refieren a los campos de microbiología, inmunología y virología.

Antecedentes

Se ha informado anteriormente que la administración nasal previa de la cepa altamente atenuada de *Bordetella pertussis*, BPZE1, proporciona protección efectiva y sostenida contra la exposición letal con virus de la gripe A al menos suprimiendo la producción de mediadores proinflamatorios importantes [1 y PCT/US2009/047399]. El documento WO2010/125014 se refiere a vacunas para la profilaxis o el tratamiento de una patología de las vías respiratorias impulsada por alérgenos, ejemplificando, en este contexto, la cepa BPZE1 como una cepa de *Bordetella pertussis* que tiene los siguientes tres factores de virulencia dirigidos a la atenuación: toxina *pertussis*, citotoxina traqueal y toxina dermonecrótica.

El asma es una enfermedad pulmonar inflamatoria crónica caracterizada por obstrucción intermitente del flujo de aire, hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR), hipersecreción de moco, respuestas a IgE potenciadas e infiltración de células inflamatorias, principalmente eosinófilos, en las vías respiratorias (2). En los últimos años, la incidencia de asma ha aumentado dramáticamente, observándose la mayor prevalencia en los países desarrollados (3). Aunque se ha demostrado que el equilibrio alterado de Th2/Th1 con una respuesta inmune dominante en Th2 es importante en el desarrollo del asma, el mecanismo subyacente a la patogénesis del asma aún no se ha descifrado por completo (4).

La dermatitis por contacto alérgica (ACD) causada por haptenos reactivos y iones metálicos es una forma de hipersensibilidad de tipo retardado, y es una de las enfermedades cutáneas más comunes en todo el mundo (5). La hipersensibilidad por contacto (CHS) es un modelo de ratón reconocido para estudiar ACD humana y es una respuesta inflamatoria epidérmica mediada por células T a haptenos de bajo peso molecular (6,7).

Según la hipótesis de higiene, la exposición frecuente a patógenos desencadena un cierto grado de inmunidad protectora contra enfermedades atópicas (8). Sin embargo, se han reportado observaciones contradictorias con respecto al papel protector versus el perjudicial de la preexposición a microorganismos virales o bacterianos contra enfermedades alérgicas (9-13), lo que subraya que el efecto del encuentro con bacterias patógenas y no patógenas en la formación de la respuesta inmune del huésped es complejo y sigue siendo poco entendido. Además, a pesar de los intensos estudios sobre los mecanismos y el manejo médico óptimo, los enfoques terapéuticos actuales que abordan estos trastornos inflamatorios son en gran medida mejoradores en lugar de curativos y pueden causar efectos secundarios inesperados (14). Además, muchos pacientes asmáticos desarrollan resistencia al tratamiento y/o disfunción pulmonar progresiva (14). Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad continua de mejores terapias para tratar enfermedades alérgicas, como las descritas en este documento.

Sumario

En este documento se describe un procedimiento para provocar una respuesta inmune capaz de reducir la gravedad de una enfermedad alérgica en un mamífero que lo necesita, que comprende: administrar una cepa de *Bordetella* mutada al mamífero, en el que la cepa comprende un gen de toxina *pertussis* mutada (ptx), un gen dermonecrótico (dnt) eliminado o mutado, y un gen *ampG* heterólogo, y en el que la administración provoca la respuesta inmune.

En algunos aspectos, la cepa *Bordetella* es una cepa *Bordetella pertussis*. En algunos aspectos, el gen *ampG* de la cepa *Bordetella* de tipo salvaje se reemplaza por un gen *ampG* de *E. coli*. En algunos 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 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* es una cepa mutante triple. En algunos aspectos, la cepa *Bordetella* es una cepa BPZE1. En algunos aspectos, la cepa de *Bordetella* se atenúa. En algunos aspectos, la cepa *Bordetella* es una cepa viva. En algunos aspectos, el gen *ampG* heterólogo es el único gen heterólogo en la cepa. En algunos aspectos, la cepa de *Bordetella* no comprende una plataforma de expresión heteróloga para transportar antígenos heterólogos a la mucosa respiratoria del mamífero.

En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa mutada de *Bordetella pertussis* para su uso en la obtención de inmunidad protectora contra una enfermedad alérgica de la piel, en la que la cepa está atenuada y en el que el gen de la toxina *pertussis* (ptx) está mutado, el gen dermonecrótico (dnt) se elimina o muta, y el gen *ampG* de *Bordetella* se reemplaza por un *ampG* heterólogo. En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para el uso anterior, en la que el gen *ampG* de la cepa de *Bordetella* de tipo salvaje se reemplaza por un gen *ampG* de *E.*

- coli*. En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para el uso anterior, en el que 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 algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para el uso anterior, en la que la cepa de *Bordetella pertussis* es una cepa triple mutante. En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para el uso anterior, en la que la cepa de *Bordetella pertussis* es una cepa viva. En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para el uso anterior, en el que la cepa de *Bordetella* no comprende un gen heterólogo distinto del gen *ampG* heterólogo. En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para el uso anterior, en la que la cepa de *Bordetella pertussis* no comprende una plataforma de expresión heteróloga para transportar antígenos heterólogos a la mucosa respiratoria del mamífero.
- En algunos aspectos, el procedimiento incluye además prevenir o tratar la enfermedad alérgica. En algunos aspectos, la cepa de *Bordetella* se administra antes del inicio de la enfermedad alérgica en el mamífero. La *Bordetella* se puede administrar aproximadamente 6 semanas o más antes del inicio de la enfermedad alérgica en el mamífero. En algunos aspectos, la cepa de *Bordetella* se administra aproximadamente 2 semanas o más antes del inicio de la enfermedad alérgica en el mamífero. En algunos aspectos, la enfermedad alérgica es el asma. En algunos aspectos, la enfermedad alérgica es la inflamación de la piel. En algunos aspectos, la enfermedad alérgica es la dermatitis por contacto alérgica (ACD). En algunos aspectos, la respuesta inmune comprende una respuesta inmune Th2. En algunos aspectos, la respuesta inmune comprende una respuesta inmune Th1. En algunos aspectos, la cepa se administra al mamífero mediante administración subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), oral o intranasal (i.n.); o por inyección o por inhalación. En algunos aspectos, la cepa se administra por vía intranasal. En algunos aspectos, la cepa se administra a un mamífero que necesita inmunidad protectora contra la enfermedad alérgica.
- En algunos aspectos, el mamífero está en riesgo de desarrollar la enfermedad alérgica.
- En algunos aspectos, la cepa se administra en una dosis única. En algunos aspectos, la cepa se administra en más de una dosis. En algunos aspectos, la cepa se administra en dos dosis. En algunos aspectos, las dos dosis se administran con una separación de aproximadamente 3 semanas. En algunos aspectos, el nivel de protección contra la enfermedad alérgica es superior al 60 % aproximadamente. En algunos aspectos, un nivel de protección contra la enfermedad alérgica es mayor de aproximadamente el 50 %.
- En algunos aspectos, el mamífero es un humano. En algunos aspectos, el mamífero es un niño.
- También se describe en el presente documento un procedimiento para provocar una respuesta inmune protectora contra una enfermedad alérgica en un humano en riesgo de desarrollar la enfermedad alérgica, que comprende: administrar intranasalmente una cepa BPZE1 viva y atenuada al humano antes del inicio de la enfermedad alérgica en el ser humano, en el que la administración provoca la respuesta inmune.
- En el presente documento también se describe un procedimiento para provocar una respuesta inmune contra una enfermedad alérgica en un humano que lo necesita, que comprende: administrar una cepa de *Bordetella* mutada viva al humano, en el que la administración provoca la respuesta inmune.
- En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para su uso en la obtención de inmunidad protectora contra una enfermedad alérgica de la piel, en la que la enfermedad alérgica de la piel es la dermatitis por contacto.
- En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para su uso en la obtención de inmunidad protectora contra una enfermedad alérgica de la piel, en la que la cepa se administra en más de una dosis. En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para su uso en la obtención de inmunidad protectora contra una enfermedad alérgica de la piel, en la que la cepa se administra en dos dosis.
- En el presente documento también se describe un procedimiento para proteger a un mamífero contra una enfermedad alérgica, que comprende: administrar al mamífero una cepa de *Bordetella* mutada que comprende un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo, en el que el mamífero está protegido contra la enfermedad alérgica.
- También se describe en el presente documento un procedimiento para proporcionar una forma protectora de inmunidad contra una enfermedad alérgica en un mamífero que lo necesita, que comprende: administrar al mamífero una cepa de *Bordetella* mutada que comprende un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado, y un gen heterólogo *ampG*, en el que el mamífero está provisto de la forma protectora de inmunidad.
- También se describe en el presente documento una composición formulada para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica en un mamífero que la necesita, que comprende: una cepa de *Bordetella* mutada, en la que la cepa comprende un gen de la toxina *pertussis* mutada (*ptx*), un gen eliminado o mutado dermonecrótico (*dnt*), y un gen *ampG* heterólogo.
- En algunos aspectos, la cepa *Bordetella* es una cepa *Bordetella pertussis*. En algunos aspectos, el gen *ampG* de la cepa *Bordetella* de tipo salvaje se reemplaza por un gen *ampG* de *E. coli*. En algunos 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 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 aspectos, la cepa *Bordetella* es una cepa BPZE1. En algunos aspectos, la cepa de *Bordetella* se atenúa. En algunos aspectos, la cepa *Bordetella* es una cepa viva. En algunos aspectos, la cepa de *Bordetella* no comprende un gen heterólogo que no sea el gen *ampG* heterólogo. En algunos aspectos, la cepa de *Bordetella* no comprende una plataforma de expresión heteróloga para transportar antígenos heterólogos a la mucosa respiratoria del mamífero.

En algunos aspectos, la composición incluye además un excipiente, vehículo y/o portador farmacéuticamente adecuado. En algunos aspectos, la composición incluye además un adyuvante. En algunos aspectos, la composición incluye además una pequeña molécula capaz de afectar la enfermedad alérgica.

En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para su uso en la obtención de inmunidad protectora contra una enfermedad alérgica de la piel, que comprende además un excipiente, vehículo y/o vehículo farmacéuticamente adecuado.

También se describe en el presente documento una composición formulada para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica en un mamífero que la necesita que comprende una cepa de *Bordetella* identificada por el número de acceso CNCM I-3585.

También se describe en el presente documento una composición formulada para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica en un mamífero que la necesita que comprende una cepa de *Bordetella* identificada por el número de acceso V09/009169.

También se describe en el presente documento una vacuna que comprende una composición descrita en el presente documento para tratar o prevenir la enfermedad alérgica en el mamífero. En algunos aspectos, la vacuna está formulada para administración intranasal.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características, aspectos y ventajas se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción y los dibujos adjuntos, donde:

Figura 1. Efectos del pretratamiento con BPZE1 sobre la patología de las vías respiratorias inducida por OVA. La inflamación de las vías respiratorias se analizó mediante tinción con hematoxilina y eosina (A) y tinción periódica con fluorescencia ácida de Schiff (PAFS) (B). Cambios morfológicos representativos de secciones pulmonares fijas de OVA/solución salina (a y f), OVA/OVA (b y g), BPZE1 (1 dosis) + OVA/OVA (c y h), BPZE1 (2 dosis) + OVA/OVA (d e i) y BPSM (1 dosis) + OVA/OVA (e y j) se vieron con un aumento de 100× (panel A a e) y 400× (panel A f-j) para la tinción H&E, 200× (panel B a-e) y aumento de 1000× (panel B f-j) para PAFS.

Figura 2. Efectos del pretratamiento con BPZE1 sobre la infiltración celular en los fluidos de lavado broncoalveolar y las respuestas de anticuerpos específicos de OVA en el desafío con OVA. A) Se obtuvieron recuentos de células inflamatorias en los BALF de los diferentes grupos de ratones 24 horas después del último desafío con aerosol de solución salina (n=6) u OVA (n=8). Los recuentos diferenciales de células se realizaron a ciegas en un mínimo de 500 células/portaobjetos para identificar eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos. *P≤0,05, **P≤0,01. (B) Se recogió suero de ratón de los diferentes grupos (n = 5-12 ratones por grupo) 24 horas después del último desafío con solución salina u aerosol OVA. Los niveles de IgE total, IgE específica de OVA, IgG1 e IgG2a se determinaron por ELISA en sueros individuales diluidos 1/5 (A-B), 1/300.000 (C) o 1/10.000 (D). **P≤0,01, ***P≤0,001.

Figura 3. Efectos del pretratamiento con BPZE1 sobre la producción local de citoquinas en el modelo de inflamación de las vías respiratorias inducido por OVA. Los BALF de los grupos OVA/solución salina, OVA/OVA, BPZE1+OVA/OVA (n = 6 ratones por grupo) se recolectaron 24 horas después del último desafío con solución salina u aerosol OVA. Los niveles de citoquinas (como se indica) se determinaron por ensayo multiplex. Los valores mostrados son la media ± SEM. *P≤0,05, **P≤0,01.

Figura 4. Efecto del pretratamiento con BPZE1 sobre el grosor de la oreja (A) y la histología (B) en el modelo de ratón CHS inducido por DNCB. Los ratones se trataron con BPZE1 una o dos veces antes de la sensibilización con DNCB y la exposición como se indica en la Figura 1 (C&D). (A) El grosor de la oreja se midió diariamente usando un calibrador (n = 5 ratones por grupo). Los datos fueron analizados por ANOVA de 2 vías. Se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con BPZE1 (2 dosis) y el grupo tratado con BPZE1 (1 dosis)/grupo no tratado después del desafío con DNCB. Los valores mostrados son la media ± SEM. (B) Tinción H&E de secciones de oreja. Las observaciones se hicieron a 100 aumentos.

Figura 5. Efectos del pretratamiento con BPZE1 sobre la producción local de citoquinas en el modelo CHS inducido por DNCB. Dos días después del DNCB o la exposición al vehículo, se recolectaron y homogeneizaron las orejas de ratones pretratados o no tratados con BPZE1, y se determinó la producción de citoquinas en los

homogeneizados individuales por ensayo multiplex (n=5 ratones por grupo). Los valores mostrados son la media $\pm$ SEM. *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.01, ***P $\leq$ 0.001.

Figura 6. Efecto del pretratamiento con BPZE1 sobre la fase de sensibilización. A) Los ratones se pretrataron nasalmente con BPZE1 (1 dosis) o se dejaron sin tratar y se sensibilizaron con OVA. Se recogió suero de grupos ingenuos (n=3), no tratados (n=4) y tratados con BPZE1 (n=4) 1 semana después de la sensibilización. Los niveles de IgE, IgG1 e IgG2a específicos de OVA se determinaron por ELISA en sueros individuales diluidos 1/5 (A) o 1/100 (B-C). B) Los grupos de ratones (n=5) se pretrataron nasalmente con BPZE1 (2 dosis) o no se trataron y se sometieron a sensibilización con DNCB. Sus LN auriculares se recolectaron 3 días después de la sensibilización para el recuento celular total, la proliferación de células T tras la reestimulación con anticuerpos anti-CD3/CD28 y la producción de IFN γ en los sobrenadantes de cultivo como se indica. Cada muestra individual se analizó por triplicado.

Descripción detallada

Los términos utilizados en las reivindicaciones y especificaciones se definen como se establece a continuación a menos que se especifique lo contrario.

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

El término "inmunidad protectora rápida" significa que la inmunidad contra *Bordetella* se confiere poco tiempo después de la administración de una cepa de *Bordetella* mutada.

El término "cepa de *Bordetella*" incluye cepas de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PTX" se refiere a la toxina *pertussis*, que sintetiza y secreta una toxina ADP-ribosilante. PTX se compone de cinco subunidades diferentes (llamadas S1-S5) con cada complejo que contiene dos copias de S4. Las subunidades están dispuestas en una estructura A-B. El componente A es enzimáticamente activo y se forma a partir de 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 tosferina, que es una toxina inestable 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 traqueal, que es un factor de virulencia sintetizado por *Bordetellae*. 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, la abreviatura "ampG" se refiere a un gen que codifica una permeasa para el transporte de 1,6-GlcNac-anhidro-MurNac.

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.

El término "niño" pretende ser un mamífero (por ejemplo, un humano) entre 0 meses (nacimiento) y menor o igual a 18 años de edad.

"Tratamiento" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora o prevención de la enfermedad, afección o trastorno, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como disminución; remisión; disminución de los síntomas o hacer que la enfermedad sea más tolerable para el paciente; ralentización en la tasa de degeneración o disminución; o hacer que el punto final de degeneración sea menos debilitante. El tratamiento o la mejora de los síntomas pueden basarse en parámetros objetivos o subjetivos; incluidos los resultados de un examen realizado por un médico. Por consiguiente, el término "tratamiento" incluye la administración de los compuestos o agentes para prevenir o retrasar, aliviar o detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o afecciones asociadas con una enfermedad, afección o trastorno como se describe en el presente documento. El término "efecto terapéutico" se refiere a la reducción, eliminación o prevención de la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o los efectos secundarios de la enfermedad en el sujeto. "Tratar" o "tratamiento" usando los procedimientos descritos en este documento 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 se describe en el presente documento, pero que aún no experimenta o exhiben síntomas, inhiben los síntomas de una enfermedad o trastorno (ralentizan o detienen su desarrollo), brindan alivio de los síntomas o efectos secundarios de una enfermedad (incluido el tratamiento paliativo) y alivian los síntomas de una enfermedad (causando 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.

La "administración concomitante" de un fármaco conocido (u otro compuesto) con una composición divulgada en el presente documento significa la administración del fármaco (u otro compuesto) junto con la composición en el momento en que el fármaco conocido (u otro compuesto) tenga un efecto terapéutico o efecto diagnóstico. Dicha administración concomitante puede implicar la administración concurrente (es decir, al mismo tiempo), previa o posterior del fármaco (u otro compuesto) con respecto a la administración de una composición. Una persona de habilidad ordinaria en la técnica no tendría dificultades para determinar el momento, la secuencia y las dosis de administración apropiadas para medicamentos particulares (u otros compuestos) junto con una composición.

Los términos "protección" y "prevención" se usan aquí de manera intercambiable y significan que se impide una enfermedad, afección o trastorno.

"Vacuna profiláctica" significa que esta vacuna previene una enfermedad, afección o trastorno.

El término "composición inmunogénica" o "composición" significa que la composición puede inducir una respuesta inmune y, por lo tanto, es antigénica. Por "respuesta inmune" se entiende 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, la producción de anticuerpos, la inducción de inmunidad mediada por células, la activación del complemento o el desarrollo de tolerancia inmunológica.

Como se usa en este documento, el término "enfermedad" tiene el significado generalmente conocido y entendido en la técnica y comprende cualquier condición anormal en la función o 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 "enfermedad alérgica" se refiere a un trastorno de hipersensibilidad del sistema inmune que se caracteriza por la activación de células inmunes que da como resultado la liberación de sustancias inflamatorias, tales como histamina, y la producción de anticuerpos IgE. En algunos aspectos, una enfermedad alérgica puede ser una condición patológica en la que un sujeto está hipersensibilizado y puede provocar una reacción inmunológica anormal contra una sustancia. Una enfermedad alérgica se puede caracterizar por la activación de los mastocitos por IgE que resulta en una respuesta inflamatoria (por ejemplo, respuesta local, respuesta sistémica) que puede provocar desde síntomas tan benignos como secreción nasal, hasta potencialmente mortales como choque anafiláctico y muerte. Ejemplos de enfermedad alérgica incluyen, entre otros, rinitis alérgica (por ejemplo, fiebre del heno), asma (por ejemplo, asma alérgica), inflamación de la piel, dermatitis alérgica (por ejemplo, eczema), dermatitis por contacto, dermatitis alérgica por contacto (DCA), alergia alimentaria y urticaria (salpullido).

Los términos "composición de vacuna viva", "vacuna viva", "vacuna bacteriana viva" y términos similares se refieren a una composición que comprende una cepa de bacteria *Bordetella* viva que proporciona inmunidad protectora al menos parcial contra una enfermedad, afección, trastorno o enfermedad.

Los términos "oral", "enteral", "enteralmente", "oralmente", "no parenteral", "no parenteralmente" y similares, se refieren a la administración de un compuesto o composición a un individuo por una ruta o modo a lo largo del canal alimentario. Ejemplos de vías de administración "orales" de una composición incluyen, sin limitación, tragar formas líquidas o sólidas de una composición de vacuna por la boca, administración de una composición de vacuna a través de un tubo nasoyeyunal o de gastrostomía, administración intraduodenal de una composición de vacuna y administración rectal, por ejemplo, utilizando supositorios que liberan una cepa de vacuna bacteriana viva descrita en este documento.

El término "administración tópica" se refiere a la aplicación de un agente farmacéutico a la superficie externa de la piel o las membranas mucosas (incluidas las membranas superficiales de la nariz, los pulmones y la boca), de modo que el agente atraviesa la superficie externa de la piel o membrana mucosa y entra en los tejidos subyacentes. La administración tópica puede dar como resultado una distribución limitada del agente a la piel y los tejidos circundantes o, cuando el agente se elimina del área de tratamiento por el torrente sanguíneo, la distribución sistémica del agente.

En una forma, el agente se administra por administración transdérmica, por ejemplo, usando un parche transdérmico. El suministro transdérmico se refiere a la difusión de un agente a través de la piel (estrato córneo y epidermis), que actúa como una barrera que pocos agentes pueden penetrar. Por el contrario, la dermis es permeable a la absorción de muchos solutos y fármacos, y la administración tópica se produce con mayor facilidad a través de la piel que se raspa o despoja de la epidermis para exponer la dermis. La absorción a través de la piel intacta se puede mejorar combinando el agente activo con un vehículo graso (por ejemplo, cremas, emolientes, potenciadores de la penetración y similares, como se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, edición actual, Gennaro et al., eds.) antes de la aplicación en la piel (un proceso conocido como unción).

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, desde el cual se absorbe en la circulación sistémica. 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 partículas líquidas o sólidas muy finas transportadas por un gas propulsor bajo presión a un sitio de aplicación terapéutica. Un aerosol farmacéutico puede contener 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 están destinados a la administración como partículas finas y sólidas o como neblinas líquidas a través del tracto respiratorio de un paciente. Se pueden utilizar varios tipos de propulsores, incluidos, entre otros, hidrocarburos u otros gases adecuados. Los aerosoles también pueden administrarse con un nebulizador, que genera partículas líquidas muy finas de tamaño sustancialmente uniforme dentro de un gas. Un líquido que contiene 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 "mejora" se refiere a cualquier resultado terapéuticamente beneficioso en el tratamiento de un estado de enfermedad, por ejemplo, un estado de enfermedad alérgica, que incluye profilaxis, disminución de la gravedad o progresión, remisión o cura de la misma.

En general, la expresión "bien tolerado" se refiere a la ausencia de cambios adversos en el estado de salud que se producen como resultado del tratamiento y afectarían las decisiones de tratamiento.

La "interacción sinérgica" se refiere a una interacción en la que el efecto combinado de dos o más agentes es mayor que la suma algebraica de sus efectos individuales.

El término "*in vitro*" se refiere a procesos que ocurren en una célula viva que crece separada de un organismo vivo, por ejemplo, que crece en cultivo de tejidos.

El término "*in vivo*" se refiere a procesos que ocurren en un organismo vivo.

El término "cantidad suficiente" significa una cantidad suficiente para producir un efecto deseado, por ejemplo, una cantidad suficiente para causar la agregación de proteínas en una célula.

El término "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.

Composiciones

Cepas de *Bordetella*

En el presente documento se proporciona una cepa de *Bordetella* mutada que se puede usar como una composición inmunogénica o una vacuna para provocar una respuesta inmune en un mamífero. En un aspecto, la cepa de *Bordetella* mutada contiene un gen *ptx* mutado, un gen *dnt* eliminado o mutado y un gen *ampG* heterólogo. El producto del gen heterólogo *ampG* puede reducir en grandes cantidades la cantidad de citotoxina traqueal que se produce. En un aspecto, la cepa es BPZE1. La cepa de partida que está mutada puede ser cualquier cepa de *Bordetella*, incluida *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*. En un aspecto, la cepa de partida utilizada para obtener la cepa de *Bordetella* mutada es *B. pertussis*. 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.

Las cepas que se pueden usar no se limitan 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 filamentosa (FHA) y cualquiera de los componentes regulados por *bvg*.

La construcción de una cepa mutada de *Bordetella* puede comenzar reemplazando el gen *ampG* de *Bordetella* en la cepa con un gen *ampG* heterólogo. Se puede usar cualquier gen *ampG* heterólogo conocido en la técnica. Ejemplos de estos pueden incluir todas las bacterias gram negativas que liberan cantidades muy pequeñas de fragmentos de peptidoglucano en el medio por generación. Ejemplos de bacterias gram negativas 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 citoquina traqueal (TCT) producida en la cepa resultante expresa menos del 1 % de actividad residual de TCT. 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 el resto enzimáticamente activo S1 codifique una toxina

enzimáticamente inactiva, pero las propiedades inmunogénicas de la toxina *pertussis* no se ven afectadas. Esto se puede lograr reemplazando la lisina (Lys) en la posición 9 de la secuencia con una arginina (Arg) (K9R). Además, un ácido glutámico (Glu) en la posición 129 se puede reemplazar con una glicina (Gly) (E129G). Generalmente, estas posiciones de aminoácidos están involucradas en la unión del sustrato y la catálisis, respectivamente. En otros aspectos, también se pueden realizar otras mutaciones, como las descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 6.713.072, así como cualquier otra 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, 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 T., Katahira J, Cornejo WR, Masuda M, Fukuo A, Matsuzawa T, Ohnishi T, Horiguchi Y. (1999) Identificación de dominios funcionales de la toxina dermoinecrotizante de *Bordetella* Infect. Immun. 67: 3727-32.).

Además del intercambio alélico para insertar el gen *ptx* mutado y el gen *dnt* inhibido o eliminado, el marco de lectura abierto de un gen puede interrumpirse mediante la inserción de una secuencia genética o plásmido. Este procedimiento también está contemplado. Otros procedimientos para generar cepas mutantes son generalmente bien conocidos en la técnica.

En un aspecto, la cepa mutada se llama cepa BPZE1 y se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) en París, Francia, bajo el Tratado de Budapest, el 9 de marzo de 2006 y se le asignó el número CNCM 1-3585. Las mutaciones introducidas en BPZE1 generalmente resultan en atenuación, pero también permiten que las bacterias colonicen y persistan. Por lo tanto, en otro aspecto, BPZE1 puede inducir inmunidad de la mucosa e inmunidad sistémica cuando se administra a un mamífero que lo necesita. En otro aspecto, se construyó una cepa recombinante BPZE1 que expresa tres copias del péptido M2e. Esta cepa se depositó en el Instituto National Measurement Institute (anteriormente AGAL) en Port Melbourne, Victoria, Australia 3207 en virtud del Tratado de Budapest, el 27 de abril de 2009, y se le asignó el siguiente número de acceso V09/009169. M2e es la porción extracelular de la proteína M2 del virus de la influenza. Es altamente conservado entre todos los virus de influenza A y se ha demostrado que induce una protección mediada por anticuerpos contra los virus de influenza A. La cepa BPZE1 productora de M2e recombinante puede desencadenar (por ejemplo, tras la administración nasal de bacterias vivas) respuestas sustanciales de anticuerpos anti-M2e (locales y sistémicos), lo que permite una protección significativa contra el desafío con H1N1 y H3N2 comparable a la bacteria BPZE1 sola.

Las cepas de *Bordetella* mutadas se pueden usar en composiciones inmunogénicas para el tratamiento o prevención de enfermedades alérgicas. 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 las células T puede ser tal que proteja a un mamífero contra una enfermedad alérgica o contra sus consecuencias/síntomas.

Las cepas de *Bordetella* mutadas pueden usarse como cepas vivas en vacunas o composiciones inmunogénicas. En un aspecto, las cepas vivas se usan para administración nasal, mientras que las cepas químicamente o matadas por calor se pueden usar para administración sistémica o mucosa. En otros aspectos, las cepas se atenúan. En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para su uso en la obtención de inmunidad protectora contra una enfermedad alérgica de la piel, en la que la cepa de *Bordetella pertussis* es la cepa de *B. pertussis* identificada por el número de acceso CNCM I-3585 depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) en París, Francia bajo el Tratado de Budapest, el 9 de marzo de 2006.

En otros aspectos, las cepas no incluyen ningún gen heterólogo distinto del gen *ampG* heterólogo descrito anteriormente. En otros aspectos, las cepas no incluyen una plataforma de expresión heteróloga (véase, por ejemplo, WO2007104451). Típicamente, las plataformas de expresión heterólogas llevan antígenos heterólogos. En un aspecto, la plataforma de expresión heteróloga se puede usar para administrar los antígenos heterólogos a la mucosa respiratoria de un mamífero.

Formulaciones y portadores

Se contemplan también procedimientos para el tratamiento o prevención de enfermedades alérgicas. Dichos procedimientos pueden incluir administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición descrita en el presente documento. La composición 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 con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, vía oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular o intraperitoneal.

Las composiciones pueden incluir un excipiente, vehículo y/o portador farmacéuticamente adecuado. Las composiciones pueden formularse en una suspensión líquida, un aerosol o un polvo.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de tableta, cápsula, polvo o líquido. Una tableta puede incluir un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se puede incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tenga pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia están en capacidad de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos como inyección en cloruro de sodio, inyección en Ringer, inyección en Ringer lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario. En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para su uso en la obtención de inmunidad protectora contra una enfermedad alérgica de la piel, en la que la composición se formula en una suspensión líquida, un aerosol o un polvo.

La administración puede ser en una "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad profilácticamente efectiva" (según sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), siendo esto suficiente para mostrar un beneficio para el individuo. La cantidad real administrada, y la velocidad y el tiempo de administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., es responsabilidad de los médicos generales y otros médicos, y generalmente tiene en cuenta el trastorno por tratar, la condición del paciente individual, el lugar de administración, el procedimiento de administración y otros factores conocidos por los practicantes. Se pueden encontrar ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en la última edición de Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton, PA ("Remington's").

Normalmente, una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea de forma simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección por tratar.

Adyuvantes

Las composiciones pueden administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores, incluidos adyuvantes. Como se usa en este documento, el término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que potencia una respuesta inmune. En particular, las composiciones pueden incluir un adyuvante. Los adyuvantes pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes establecidos a continuación.

En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para su uso en la obtención de inmunidad protectora contra una enfermedad alérgica de la piel, que comprende además un adyuvante.

Composiciones adyuvantes que contienen minerales

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. Los adyuvantes incluyen sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos y similares (por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de Vaccine Design (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.), o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo, una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso de fosfato), tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, y similares), y con la adsorción a la(s) sal(es) contemplada(s). Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica (WO/0023105).

Las sales de aluminio se pueden incluir en composiciones de modo que la dosis de Al_3^+ esté entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

Adyuvantes de emulsión oleosa

Las composiciones de emulsión oleosa adecuadas para su uso como adyuvantes pueden incluir emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80 y 0,5 % de Span 85, formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador). Véase, por ejemplo, WO90/14837. Véase también, Podda, "The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine", Vaccine 19: 2673-2680, 2001.

En otros aspectos relacionados, los adyuvantes para uso en las composiciones son emulsiones submicrométricas de aceite en agua. Ejemplos de emulsiones de aceite en agua submicrométricas para su uso en la presente invención incluyen emulsiones de escualeno/agua que contienen opcionalmente cantidades variables de MTP-PE, tal como una emulsión de aceite en agua submicrométrica que contiene 4-5 % p/v de escualeno, 0,25-1,0 % p/v de Tween 80 (monooleato de polioxietilenosorbitano) y/o 0,25-1,0 % de Span 85 (trioleato de sorbitán) y, opcionalmente, N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutaminilo-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-s-n-glicero-3-hidroxifosforofilo)-etilamina (MTP-PE), por ejemplo, la emulsión submicrométrica de aceite en agua conocida como "MF59" (Publicación internacional No. WO90/14837; Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,299,884 y 6,451,325, y Ott et al., "MF59-Design and

Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, MF and Newman, M.J. eds.) Plenum Press, Nueva York, 1995, págs. 277-296). MF59 puede contener 4-5 % p/v de escualeno (por ejemplo, 4,3 %), 0,25-0,5 % p/v de Tween 80, y 0,5 % p/v de Span 85 y opcionalmente contiene varias cantidades de MTP-PE, formulado en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador como el microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA). Por ejemplo, el MTP-PE puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0-500 µg/dosis, o 0-250 µg/dosis, o 0-100 µg/dosis.

Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua, los procedimientos de fabricación de los mismos y los agentes inmunoestimulantes, tales como péptidos de muramilo, para su uso en las composiciones, se describen en detalle en la Publicación Internacional No. WO90/14837 y la Patente de los Estados Unidos Nos. 6,299,884 y 6,451,325.

El adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA) también se pueden usar como adyuvantes.

Formulaciones adyuvantes de saponina

Las formulaciones de saponina también se pueden usar como adyuvantes. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esteroides y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies de plantas. La saponina de la corteza del árbol Quillaia saponaria Molina ha sido ampliamente estudiada como adyuvante. La saponina también se puede obtener comercialmente de Smilax ornata (zarzaparrilla), Gypsophylla paniculata (velo de novia) y Saponaria officinalis (raíz de jabón). Las formulaciones adyuvantes de saponina pueden incluir formulaciones purificadas, como QS21, así como formulaciones de lípidos, como complejos inmunoestimulantes (ISCOM; véase más abajo).

Las composiciones de saponina se han purificado usando cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC). Se han identificado fracciones purificadas específicas que utilizan estas técnicas, incluidas QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Un procedimiento de producción de QS21 se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,057,540. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroide, como el colesterol (véase el documento WO96/33739).

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas llamadas ISCOM. Los ISCOM típicamente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida se puede usar en ISCOM. Por ejemplo, un ISCOM puede incluir uno o más de Quil A, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en EP0109942, WO96/11711 y WO96/33739. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar libres de detergente adicional. Véase WO00/07621.

Se puede encontrar una descripción del desarrollo de adyuvantes basados en saponina en Barr, et al., "ISCOMs and other saponin based adjuvants", Advanced Drug Delivery Reviews 32: 247-27, 1998. Véase también Sjölinder, et al., "Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines", Advanced Drug Delivery Reviews 32: 321-338, 1998.

Virosomas y partículas similares a virus (VLP)

Los virosomas y partículas similares a virus (VLP) también se pueden usar como adyuvantes. Estas estructuras generalmente contienen una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Generalmente no son patógenos, no se replican y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse de forma recombinante o aislarse de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la influenza (como HA o NA), el virus de la hepatitis B (como las proteínas centrales o de la cápsida), el virus de la hepatitis E, el virus del sarampión, el virus Sindbis, el rotavirus, el virus del pie, el virus de enfermedad bucal, retrovirus, virus Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fagos QB (como las proteínas de cubierta), fagos GA, fagos fr, fagos AP205 y Ty (como la proteína Ty de retrotransposición pl).

Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes pueden incluir derivados bacterianos o microbianos tales como:

(1) Derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS)

Dichos derivados incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3 dMPL). La 3 dMPL es una mezcla de 3 monofosforil lípido A des-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En el documento EP 0 689 454, se describe un ejemplo de una forma de "partícula pequeña" de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado. Tales "partículas pequeñas" de 3 dMPL son lo suficientemente pequeñas como para ser esterilizadas por filtración a través de una membrana de 0,22 micras (ver EP 0 689 454). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen imitadores de monofosforil lípido A, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida, por ejemplo, RC-529. Véase Johnson et al., Bioorg Med Chem Lett 9: 2273-2278, 1999.

(2) Derivados de lípidos A

Los derivados de lípidos A pueden incluir derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. El OM-174 está descrito, por ejemplo, en Meraldi et al., "OM-174, a New Adjuvant with a Potential for Human Use, Induces a Protective Response with Administered with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei*", *Vaccine* 21: 2485-2491, 2003; y Pajak, et al., "The Adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells *in vivo*", *Vaccine* 21: 836-842, 2003.

(3) oligonucleótidos inmunoestimuladores

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para su uso como adyuvantes pueden incluir secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia que contiene una citosina no metilada seguida de guanósina y unida por un enlace fosfato). También se ha demostrado que el ARN bicatenario bacteriano u oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimulantes.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Opcionalmente, la guanósina se puede reemplazar con un análogo como 2'-desoxi-7-desazaguanósina. Véase Kandimalla, et al., "Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with distinct cytokine induction profiles", *Nucleic Acids Research* 31: 2393-2400, 2003; WO02/26757 y WO99/62923 para ejemplos de sustituciones analógicas. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se discute más a fondo en Krieg, "CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?", *Nature Medicine* (2003) 9(7): 831-835; McCluskie, et al., "Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2002) 32: 179-185; WO98/40100; Pat. No. 6,207,646; Pat. 6,239,116 y la Patente de los Estados Unidos No. 6,429,199.

La secuencia de CpG se puede dirigir al receptor tipo Toll (TLR9), tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT. Véase Kandimalla, et al., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3): 654-658. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, como un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se discuten en Blackwell, et al., "CpG-A-Induced Monocyte IFN-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated by Plasmacytoid Dendritic Cell Derived IFN-alpha", *J. Immunol.* 170: 4061-4068, 2003; Krieg, "From A to Z on CpG", *TRENDS in Immunology* 23: 64-65, 2002 y WOO1/95935.

En algunos aspectos, el oligonucleótido CpG puede construirse de modo que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, se pueden unir dos secuencias de oligonucleótidos CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, Kandimalla, et al., "Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity", *BBRC* 306: 948-95, 2003; Kandimalla, et al., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* 31: 664-658, 2003; Bhagat et al., "CpG penta- and hexadeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents" *BBRC* 300: 853-861, 2003, y WO03/035836.

(4) toxinas ADP-ribosilantes y derivados destoxificados de las mismas.

Las toxinas de ribosilación ADP bacterianas y sus derivados destoxificados se pueden usar como adyuvantes. Por ejemplo, la toxina puede derivarse de *E. coli* (es decir, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (LT)), cólera (CT) o tosferina (PTX). El uso de toxinas de ADP-ribosilación destoxificadas como adyuvantes de la mucosa se describe en el documento WO95/17211 y como adyuvantes parenterales en el documento WO98/42375. En algunos aspectos, el adyuvante puede ser un mutante LT destoxificado, como LT-K63, LT-R72 y LTR192G. El uso de toxinas ADP-ribosilantes y sus derivados destoxificados, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes se puede encontrar en las siguientes referencias: Beignon, et al., "The LTR72 Mutant of Heat-Labile Enterotoxin of *Escherichia coli* Enhances the Ability of Peptide Antigens to Elicit CD4+T Cells and Secrete Gamma Interferon after Coapplication onto Bare Skin", *Infection and Immunity* 70: 3012-3019, 2002; Pizza, et al., "Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants", *Vaccine* 19: 2534-2541, 2001; Pizza, et al., "LTK63 and LTR72, two mucosal adjuvants ready for clinical trials " *Int. J. Med. Microbiol* 290: 455-461, 2003; Scharton-Kersten et al., "Transcutaneous Immunization with Bacterial ADP-Ribosylating Exotoxins, Subunits and Unrelated Adjuvants", *Infection and Immunity* 68: 5306-5313, 2000; Ryan et al., "Mutants of *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin Act as Effective Mucosal Adjuvants for Nasal Delivery of an Acellular *Pertussis* Vaccine: Differential Effects of the Nontoxic AB Complex and Enzyme Activity on Th1 and Th2 Cells" *Infection and Immunity* 67: 6270 -6280, 2003; Partidos et al., "Heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* and its site-directed mutant LTK63 enhance the proliferative and cytotoxic T-cell responses to intranasally co-immunized synthetic peptides", *Immunol. Lett.* 67: 09-216, 1999; Peppoloni et al., "Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines", *Vaccines* 2: 285-293, 2003; y Pine et al., (2002) "Intranasal immunization with influenza vaccine and a detoxified mutant of heat labile enterotoxin from *Escherichia coli* (LTK63)" *J. Control Release* 85: 263-270, 2002. Se puede hacer referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos con base en las alineaciones de las subunidades A y B de las toxinas ADP-ribosilantes establecidas en Domenighini et al., *Mol. Microbiol* 15: 1165-1167, 1995.

Bioadhesivos y Mucoadhesivos

También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes. Los bioadhesivos adecuados pueden incluir microesferas de ácido hialurónico esterificado (Singh et al., J. Cont. Rele. 70: 267-276, 2001) o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosano y sus derivados también pueden usarse como adyuvantes. Véase, por ejemplo, el documento WO99/27960.

Micropartículas Adyuvantes

También se pueden usar micropartículas como adyuvantes. Se prevén micropartículas (es decir, una partícula de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 150 µm de diámetro, o 200 nm a aproximadamente 30 µm de diámetro, o aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y/o no tóxicos (por ejemplo, un poli(alfa-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona y similares), con poli(lactida-coglicólido), opcionalmente tratados para que tengan una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, como CTAB).

Liposomas Adyuvantes

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 6.090.406, la Patente de los Estados Unidos No. 5.916.588, y EP 0 626 169.

I. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Los adyuvantes también pueden incluir éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno. WO99/52549. Dichas formulaciones pueden incluir además tensioactivos de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol (WO01/21207), así como tensioactivos de polioxietileno alquil éteres o ésteres en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (WO01/21152).

En algunos aspectos, los éteres de polioxietileno pueden incluir: polioxietileno-9-lauril éter (laureth 9), polioxietileno-9-estearil éter, polioxietileno-8-estearil éter, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-lauril éter o polioxietileno-23-lauril éter.

Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones de PCPP para uso como adyuvantes se describen, por ejemplo, en Andrianov et al., "Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions", Biomaterials 19: 109-115, 1998, y Payne et al. Protein Release from Polyphosphazene Matrices", Adv. Drug Delivery Review 31: 185-196, 1998.

Péptidos de Muramil

Ejemplos de péptidos de muramil adecuados para su uso como adyuvantes pueden incluir N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-1-alanil-d-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-1-alanil-d-isoglutaminil-1-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-s-n-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina MTP-PE).

Compuestos de imidazoquinolona

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes pueden incluir Imiquimod y sus homólogos, descritos más adelante en Stanley, "Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential" Clin Exp Dermatol 27: 571-577, 2002 y Jones, "Resiquimod 3M", Curr Opin Investig Drugs 4: 214-218, 2003.

Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes pueden incluir citoquinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 y similares), interferones (por ejemplo interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

Combinaciones de adyuvantes

Los adyuvantes también pueden comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las composiciones adyuvantes pueden incluir:

- (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (WO99/11241);
- (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3 dMPL) (véase el documento WO94/00153);
- (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3 dMPL) + un colesterol;
- (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3 dMPL+IL-12 (opcionalmente + un esteroide) (WO98/57659);

(5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (véanse las solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231);

(6) SAF, que contiene 10 % de escualano, 0,4 % de Tween 80, 5 % de polímero de bloque plurónico L121 y thr-MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula.

(7) Sistema adyuvante Ribi (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), por ejemplo, MPL + CWS (Detox); y

(8) una o más sales minerales (como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (como 3 dPML).

Las sales de aluminio y MF59 son ejemplos de adyuvantes para usar con vacunas inyectables. Las toxinas bacterianas y los bioadhesivos son ejemplos de adyuvantes para su uso con vacunas administradas por vía mucosa, como las vacunas nasales. Todos los adyuvantes mencionados anteriormente y otros conocidos en general en la técnica para un experto en la materia pueden formularse para administración intranasal usando técnicas bien conocidas en el arte.

Procedimientos

Rutas de administración

Las composiciones generalmente se administrarán directamente a un mamífero. El suministro directo se puede lograr mediante inyección parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intravenosa, intramuscular o al espacio intersticial de un tejido) o mucosa, como por vía rectal, oral (por ejemplo, tableta, aerosol), vaginal, tópico, transdérmico (véase, por ejemplo, WO99/27961) o transcutánea (véase, por ejemplo, WO02/074244 y WO02/064162), inhalación, intranasal (véase, por ejemplo, WO03/028760), administración ocular, aural, pulmonar u otra mucosa. Las composiciones también se pueden administrar tópicamente por transferencia directa a la superficie de la piel. La administración tópica se puede lograr sin utilizar ningún dispositivo, o poniendo en contacto la piel desnuda con la composición utilizando un vendaje o un dispositivo similar a un vendaje (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6.348.450). En algunos aspectos, una composición puede administrarse por la nariz del sujeto, por ejemplo, por vía intranasal o por inhalación.

En algunos aspectos, el modo de administración es parenteral, por la mucosa o una combinación de inmunizaciones por mucosas y parenterales. En otros aspectos, el modo de administración es parenteral, por mucosa o una combinación de inmunizaciones por mucosas y parenterales en un total de 1-2 vacunas con 1-3 semanas de diferencia. En aspectos relacionados, la ruta de administración incluye, pero no se limita a, administración intranasal.

Procedimientos de administración y dosificaciones

La administración puede incluir la administración de una cepa de *Bordetella* mutada a un mamífero para provocar una respuesta inmune (por ejemplo, una respuesta inmune TH1) capaz de impactar una enfermedad alérgica, por ejemplo, asma o inflamación de la piel. Ejemplos de cepas de *Bordetella* mutadas se describen anteriormente. Típicamente, la administración de la cepa de *Bordetella* mutada se usa para tratar o prevenir una enfermedad alérgica en un mamífero, por ejemplo, un ser humano, mediante inmunidad protectora contra la alergia. En algunos aspectos, la administración de la cepa de *Bordetella* mutada se usa para prevenir la enfermedad alérgica mediante la administración antes del diagnóstico de enfermedad alérgica o el desarrollo de síntomas de enfermedad alérgica o el desarrollo de enfermedad alérgica. Típicamente, la cepa de *Bordetella* mutada se administra a un mamífero aproximadamente menos de 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más semanas antes del desarrollo de la enfermedad alérgica.

En algún aspecto, la invención se refiere a una cepa de *Bordetella pertussis* para su uso en la obtención de inmunidad protectora contra una enfermedad alérgica de la piel, en la que la cepa se administra por vía mucosa.

En un aspecto, el procedimiento para tratar o prevenir la enfermedad alérgica incluye administrar a un sujeto que lo necesita una dosis única de una composición, por ejemplo, BPZE1. En aspectos relacionados, la etapa de administración se realiza por vía mucosa, por ejemplo, por vía intranasal.

En algunos aspectos, una composición se administra en una dosis a un sujeto. En otros aspectos, una composición se administra en más de una dosis, por ejemplo, dos dosis. En algunos aspectos, una composición se administra en 1, 2, 3, 4 o más de 4 dosis. El número de dosis puede variar según sea necesario, por ejemplo, el número de dosis administradas a un mamífero puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis. En un aspecto, el procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad alérgica incluye administrar a un sujeto que lo necesite una primera composición inmunogénica (que comprende, por ejemplo, BPZE1) seguida de una segunda administración de composición inmunogénica (que comprende, por ejemplo, BPZE1). Típicamente, el intervalo de tiempo entre cada dosis de la composición puede ser de aproximadamente 1-6 días, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más semanas. En aspectos relacionados, el intervalo de tiempo entre cada dosis es de aproximadamente 3 semanas. En otros aspectos, se pueden emplear procedimientos de estilo de refuerzo

principal donde una composición se puede administrar en un paso de "cebado" y, posteriormente, una composición se administra en un paso de "refuerzo".

La composición puede usarse típicamente para provocar inmunidad sistémica y/o mucosa, por ejemplo para provocar una inmunidad sistémica y/o mucosa mejorada. Por ejemplo, la respuesta inmune puede caracterizarse por la inducción de una respuesta inmune de IgG sérica y/o IgA intestinal. Típicamente, el nivel de protección contra enfermedades alérgicas puede ser más del 50 %, por ejemplo, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más. En un aspecto, el nivel de protección puede ser del 100 %. En otros aspectos, el nivel de protección es inferior al 50 %, por ejemplo, 20 %. 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 o más o cualquier dosis entre cada dosis. En algunos aspectos, el número de UFC en una dosificación o conjunto de dosis puede ser menor que 10^6 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , mayor que 10^{10} , o de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC).

En otros aspectos, la administración de una composición también puede incluir la administración conjunta de la composición con otro agente o agentes. Típicamente, las diversas composiciones/agentes pueden administrarse en cualquier orden. Por lo tanto, en aspectos que incluyen el suministro de múltiples composiciones o agentes diferentes, la cepa de *Bordetella* mutada no necesita administrarse antes que el agente, por ejemplo, un fármaco, un ARNip, un miARN, un péptido inmunogénico o una molécula pequeña capaz de afectar una enfermedad alérgica. Otros ejemplos de agentes incluyen inhibidores de neuraminidasa e inhibidores de M2 (adamantanos). Por ejemplo, la etapa de cebado puede incluir el suministro de uno o más agentes y el refuerzo puede incluir el suministro de una o más cepas de *Bordetella* mutadas. En otros aspectos, múltiples administraciones de cepas de *Bordetella* mutadas pueden ser seguidas por múltiples administraciones de agentes. Las administraciones se pueden realizar en cualquier orden. Por lo tanto, una o más de las cepas de *Bordetella* mutadas descritas en este documento y uno o más agentes pueden administrarse conjuntamente en cualquier orden y a través de cualquier ruta de administración conocida en la técnica, por ejemplo, para provocar una reacción inmune.

El tratamiento de dosificación puede ser de acuerdo con un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. Por ejemplo, se pueden usar dosis múltiples en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de dosis múltiples, las diversas dosis pueden administrarse por la misma o por diferentes rutas, por ejemplo, un refuerzo parenteral y por mucosa, un refuerzo por mucosa y parenteral, y similares. En otros aspectos, el régimen de dosificación puede mejorar la avidez de la respuesta de anticuerpos que conduce a anticuerpos con una característica neutralizante. Se puede usar un ensayo de neutralización *in vitro* para analizar anticuerpos neutralizantes (véase, por ejemplo, Asanaka et al, J Virology 102: 10327, 2005; Wobus et al., PLOS Biology 2; e432; y Dubekti et al., J Medical Virology 66: 400).

Pruebas para determinar la eficacia o presencia de una respuesta inmune

Una forma de evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico implica controlar la infección después de la administración de una composición. Una forma de evaluar la eficacia del tratamiento profiláctico implica controlar las respuestas inmunes contra los antígenos en las composiciones después de la administración de la composición. Otra forma de evaluar la inmunogenicidad de las composiciones es aislar las proteínas o mezclas de proteínas y seleccionar sueros de pacientes o secreciones mucosas por inmunotransferencia. Una reacción positiva entre la proteína y el suero del paciente indica que el paciente ha montado previamente una respuesta inmune a la composición.

Otra forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica controlar la infección después de la administración de las composiciones. Una forma de verificar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar las respuestas inmunes tanto sistémicamente (como monitorizar el nivel de producción de IgG1 e IgG2a) como por mucosa (como monitorizar el nivel de producción de IgA) contra los antígenos en las composiciones después de la administración de la composición. Típicamente, las respuestas de anticuerpos específicos de suero se determinan después de la inmunización pero antes del desafío, mientras que las respuestas de anticuerpos específicos de la mucosa se determinan después de la inmunización y después del desafío. Las composiciones inmunogénicas pueden evaluarse en modelos animales *in vitro* e *in vivo* antes de la administración al huésped, por ejemplo, humano.

La eficacia de las composiciones también se puede determinar *in vivo* desafiando modelos animales de infección, por ejemplo, ratones, con las composiciones. Las composiciones pueden o no derivarse de las mismas cepas que las cepas de desafío. Los modelos de eficacia *in vivo* pueden incluir, entre otros: (i) Un modelo de infección murina que utiliza cepas humanas; (ii) un modelo de enfermedad murina que es un modelo murino que usa una cepa adaptada a ratón, tal como cepas que son particularmente virulentas en ratones; y (iii) un modelo de primates que usa aislados humanos.

La respuesta inmune puede ser una o ambas de una respuesta inmune TH1 y una respuesta TH2. La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune mejorada o potenciada. La respuesta inmune puede ser una o ambas de una respuesta inmune sistémica y por mucosa. Por ejemplo, la respuesta inmune puede ser una respuesta sistémica y/o por mucosa mejorada. Una inmunidad sistémica y/o por mucosa mejorada se refleja en una respuesta inmune mejorada de TH1 y/o TH2. Por ejemplo, la respuesta inmune mejorada puede incluir un aumento en la producción de

IgG1 y/o IgG2a y/o IgA. En otro aspecto, la respuesta inmune por mucosa puede ser una respuesta inmune TH2. Por ejemplo, la respuesta inmune por mucosa puede incluir un aumento en la producción de IgA.

5 Típicamente, las células TH2 activadas aumentan la producción de anticuerpos y, por lo tanto, son valiosas para responder a infecciones extracelulares. Las células TH2 activadas típicamente pueden secretar uno o más de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Una respuesta inmune TH2 también puede dar como resultado la producción de células B IgG1, IgE, IgA y/o memoria B para protección futura. En general, una respuesta inmune TH2 puede incluir uno o más de un aumento en una o más de las citoquinas asociadas con una respuesta inmune TH2 (como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), o un aumento en la producción de IgG1, IgE, IgA y células B de memoria. Por ejemplo, una respuesta inmune TH2 mejorada puede incluir un aumento en la producción de IgG1.

10 Una respuesta inmune TH1 puede incluir uno o más de un aumento en CTL, un aumento en una o más de las citoquinas asociadas con una respuesta inmune TH1 (tal como IL-2, IFN-gamma y TNF-alfa), un aumento en los macrófagos activados, un aumento en la actividad de NK o un aumento en la producción de IgG2a. Por ejemplo, la respuesta inmune mejorada de TH1 puede incluir un aumento en la producción de IgG2a.

15 Las composiciones, en particular, una composición inmunogénica que comprende una o más cepas descritas en el presente documento pueden usarse solas o en combinación con otros agentes opcionalmente con un agente inmunorregulador capaz de provocar una respuesta Th1 y/o Th2.

Las composiciones pueden provocar tanto una respuesta inmune mediada por células como una respuesta inmune humoral para tratar eficazmente una enfermedad alérgica. Esta respuesta inmune puede inducir anticuerpos duraderos (por ejemplo, neutralizantes) y una inmunidad celular que puede responder rápidamente en el futuro.

20 **Sujetos y Mamíferos**

Las composiciones son típicamente para prevenir o tratar enfermedades alérgicas en un sujeto, por ejemplo, un mamífero o un humano. En algunos aspectos, los sujetos pueden incluir ancianos (por ejemplo, > 65 años), niños (por ejemplo, < 5 años), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, personal militar y del servicio armado, manipuladores de alimentos, mujeres embarazadas, enfermos crónicos, y personas que viajan al extranjero. Las composiciones son generalmente adecuadas para estos grupos, así como para la población general o según lo considere necesario un médico.

En algunos aspectos, se identifica que un sujeto necesita administración de la composición. En algunos aspectos, se identifica que un sujeto necesita administración de la composición mediante un ensayo. En algunos aspectos, el ensayo puede ser una prueba farmacogenética, un índice predictivo del asma basado en sibiliencias y una prueba de control del asma (TCA). En algunos aspectos, una prueba o ensayo que es útil para identificar a un sujeto que necesita administración de la composición se describe en: Wu et al., Development of a Pharmacogenetic Predictive Test in asthma: proof of concept., Pharmacogenet Genomics. 2010 Feb;20(2):86-93.; Castro-Rodriguez JA; The Asthma Predictive Index: a very useful tool for predicting asthma in young children; J Allergy Clin Immunol. 2010 Aug; 126(2):212-6.; the Asthma Control Test (ACT) available at the website of QualityMetric on October 24, 2012; Marzulli FN et al., Contact allergy: predictive testing in man, Contact Dermatitis. 1976 Feb;2(1):1-17; y Tupker et al., Prediction of Skin Irritation by Noninvasive Bioengineering Methods, Abstract.

Kits

También se proporcionan kits que incluyen uno o más recipientes de composiciones. Las composiciones pueden estar en forma líquida o pueden liofilizarse. Los recipientes adecuados para las composiciones incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los contenedores se pueden formar a partir de una variedad de materiales, incluido vidrio o plástico. Un contenedor puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica).

El kit puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer o solución de dextrosa. También puede contener otros materiales útiles para el usuario final, incluidas otras soluciones de formulación farmacéuticamente aceptables, como tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas u otros dispositivos de suministro. El kit puede incluir además un tercer componente que comprende un adyuvante.

El kit también puede comprender un prospecto que contiene instrucciones escritas para los procedimientos de inducción de inmunidad, prevención de infecciones o tratamiento de infecciones. Las instrucciones pueden ser instrucciones para realizar uno o más procedimientos descritos aquí. El inserto del paquete puede ser un borrador del paquete no aprobado o puede ser un inserto del paquete aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) u otro organismo regulador.

También se proporciona un dispositivo de administración precargado con las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas generalmente se formulan como estériles, sustancialmente isotónicas y en total conformidad con todas las regulaciones de Good Manufacturing Practice (GMP) regulations de la U.S. Food and Drug Administration.

5 Cada rango citado incluye todas las combinaciones y subcombinaciones de rangos, así como los números específicos contenidos en ellos.

Los aspectos anteriores de la invención se han descrito en detalle a modo de ejemplo con fines de claridad de comprensión.

Aspectos ejemplares

10 A continuación se muestran ejemplos de aspectos específicos para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Los ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas y similares), pero, por supuesto, se deben permitir algunos errores y desviaciones experimentales.

15 La práctica de los diversos aspectos de la invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., adición actual); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's; Carey y Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed. (Plenum Press) Volúmenes A y B, 1992).

20 Materiales y procedimientos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

La *B. pertussis* atenuada BPZE1 es un derivado de *B. pertussis* Tohama I resistente a la estreptomicina, que carece de toxina dermonecrótica, que produce toxina *pertussis* inactivada y niveles de fondo de citotoxina traqueal (15). Se cultivaron *B. pertussis* BPSM (16) y BPZE1 virulentos como se describe anteriormente (1).

25 Experimentos con animales

Se adquirieron ratones BALB/c hembra (6-8 semanas de edad) en CARE Centre (Singapur). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones específicas libres de patógenos en jaulas ventiladas individuales. Todos los experimentos con animales fueron aprobados y llevados a cabo de acuerdo con las pautas institucionales establecidas por el Animal Care and Use Committee of National University of Singapore.

30 En resumen, los ratones ligeramente anestesiados recibieron administración intranasal (in.) una o dos veces en un intervalo de cuatro semanas con 5×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias vivas atenuadas BPZE1 o BPSM como se describió previamente (1). Seis semanas después de una dosis de BPZE1 o BPSM, o 2 semanas después de la segunda dosis (día 42), después de la eliminación bacteriana completa de los pulmones (datos no mostrados), la sensibilización y la estimulación se realizaron de la siguiente manera: para el modelo de inflamación alérgica de las vías respiratorias, la sensibilización ovoalbúmina (OVA) consistió en dos inyecciones intraperitoneales (ip.) de 0,1 ml de 200 µg/ml de OVA con hidróxido de aluminio en un intervalo de 2 semanas. El desafío con aerosol OVA se realizó 1 semana después de la última inyección ip de OVA, durante 3 días consecutivos como se describió anteriormente (17). Los ratones de control positivo recibieron solución salina tamponada con fosfato (PBS) en lugar de bacterias, seguida de sensibilización y desafío con OVA. Los ratones de control negativo fueron sensibilizados con OVA pero desafiados con PBS.

40 En el modelo CHS inducido por dinitroclorobenceno (DNCB), los ratones se sensibilizaron aplicando 50 µl de DNCB al 1 % p/v (Sigma) disuelto en acetona y aceite de oliva (4:1; v/v) en su parte posterior afeitada. Cinco días después de la sensibilización (día 47), se aplicaron 25 µl/lado de DNCB al 1 % en ambos lados de ambas orejas. Los ratones de control negativo fueron sensibilizados y desafiados con acetona y aceite de oliva (4:1; v/v) sin DNCB. El grosor de la oreja se controló diariamente después del desafío utilizando un calibrador.

Infiltrados celulares en fluidos de lavado broncoalveolar

50 Los ratones se sacrificaron 24 horas después del último desafío con OVA en aerosol (día 66), y los líquidos de lavado broncoalveolar (BALF) se recolectaron como se describió previamente (17). Los BALF se centrifugaron y los sobrenadantes se almacenaron a -80°C para la detección de citoquinas. Los sedimentos celulares se resuspendieron, se colocaron en un portaobjetos de vidrio usando un dispositivo Cytospin (Thermo Shandon) y se tiñeron usando un procedimiento de tinción Wright modificado como se describió anteriormente (17). Se examinó un total de 500 células para cada portaobjetos. Los recuentos se realizaron en muestras cegadas. Ocho ratones por grupo fueron evaluados individualmente.

Detección de anticuerpos y citoquinas.

Los niveles séricos de IgE total y de IgE, IgG1 e IgG2a específicas de OVA se determinaron por ELISA como se describió anteriormente (18). Los niveles de citoquinas se midieron en los sobrenadantes de BALF (modelo de inflamación de las vías respiratorias alérgicas) u homogeneizados de oreja (modelo CHS) utilizando un ensayo de detección de citoquinas multiplex personalizado (Bioplex, Biorad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se prepararon homogeneizados de oreja en hielo tras la adición de 200 µl de tampón RIPA (Sigma) con inhibidor de proteasa y homogeneización mecánica usando homogeneizador de alto cizallamiento (Omni International). Después de la centrifugación a 10.000 rpm y 4°C para eliminar los restos celulares, los sobrenadantes se analizaron utilizando un instrumento Bio-Plex (Bio-Rad).

Experimento de reestimulación *in vitro*

Se prepararon suspensiones de células individuales de ganglios linfáticos auriculares y se sembraron 2×10^6 células/pozo en placas de fondo redondo de 96 pozos (Nunc) en 100 µl de medio completo RPMI (RPMI 640 suplementado con FCS al 10 %, 5×10^{-5} M-β-mercaptoetanol, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, penicilina 200 U/ml, estreptomicina 200 µg/ml). Las células se reestimularon con 1 µg/ml de anti-CD3 unido a placa (cat #553057) y 1 µg/ml de anti-CD28 soluble (cat #553294) (BD). Después de 24 h de incubación, los sobrenadantes se recolectaron para interferón (Medición de IFN-γ usando el kit de detección de ratón IFN-γ ELISA Ready-SET-Go!® (eBioscience, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron pulsadas con 0,4 µCi [3H]timidina en 20 µl de medio RPMI completo. Después de 18 h de incubación, las células se recolectaron, se lavaron y se midió la radiactividad incorporada en un contador de centelleo y luminiscencia de microplacas TopCount NXT (PerkinElmer). Cada muestra se analizó por triplicado.

Análisis histológicos

Se recolectaron los pulmones u orejas de ratones sacrificados, se fijaron en formalina al 4 % en PBS, se embebieron en parafina, se seccionaron, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron bajo un microscopio de luz invertido con aumentos de $\times 100$ y $\times 400$. Alternativamente, las secciones de pulmón se tiñeron con tinción de Schiff con ácido peryódico-fluorescencia (PAFS) y se examinaron para la producción de moco como se describió anteriormente (19).

Análisis histológico

A menos que se indique lo contrario, las barras representan la media $\pm$ SEM, y los promedios se compararon usando una prueba t de Student bidireccional no emparejada con un nivel de significancia del 5 % en $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ y $***p \leq 0,001$. Para el modelo CHS inducido por DNCB, los datos de grosor de la oreja se analizaron mediante ANOVA de 2 vías. Los valores mostrados son la media $\pm$ SEM.

Ejemplo 1: El pretratamiento intranasal con BPZE1 proporciona protección a largo plazo contra el asma alérgico inducida por OVA

Ratones BALB/c adultos vivos recibieron administración intranasal (in.) una o dos veces con BPZE1 o PBS. Después de la eliminación de bacterias completa de los pulmones (datos no mostrados), se realizó la sensibilización con OVA y la exposición. En contraste con los animales sensibilizados pero no desafiados (OVA/solución salina), se observó inflamación típica de las paredes de las vías respiratorias con infiltración marcada de células inflamatorias en los tejidos conectivos peribronquiolar y perivascular con los animales sensibilizados y desafiados (OVA/OVA) (Fig. 1A). El pretratamiento nasal con BPZE1 (una o dos dosis) redujo visiblemente la inflamación peribronquial (Figura 1A, c, d, h, i), mientras que se observó una mejor patología en ratones pretratados con BPSM de *B. pertussis* virulenta (Figura 1A, e&f). La tinción con PAFS reveló que la hipersecreción de moco inducida por OVA y la hiperplasia de células caliciformes se redujeron notablemente en los ratones pretratados con BPZE1, mientras que la exposición previa a BPSM virulento no resultó en una reducción en comparación con los animales desafiados no tratados (OVA/OVA) (Figura 1B) Juntos, estos datos indican que el pretratamiento nasal con BPZE1 reduce las manifestaciones patológicas de la inflamación alérgica de las vías respiratorias inducida por OVA, mientras que la preinfección con su contraparte virulenta (BPSM) no lo hace.

Ejemplo 2: El pretratamiento con BPZE1 suprime el reclutamiento de células inflamatorias inducidas por OVA en los pulmones

El examen de la entrada de células inflamatorias en los BALF recogidos 24 horas después del desafío con OVA mostró un aumento marcado en el recuento total de células, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos en los animales de control sensibilizados y desafiados (OVA/OVA) en comparación con los animales del grupo no desafiado (OVA/solución salina) (Figura 2A). Los animales pretratados con BPSM mostraron recuentos de células comparables a los medidos en el grupo de control OVA/OVA. En contraste, el recuento total de células, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos en los BALF de ratones tratados con BPZE1 disminuyó significativamente (Figura 2A), lo que demuestra que una dosis nasal única de BPZE1 suprimió significativamente el reclutamiento de células inflamatorias inducidas por OVA en los pulmones.

Ejemplo 3: El pretratamiento con BPZE1 reduce la producción de suero IgE

Los datos de ELISA indicaron una elevación marcada en los niveles de IgE sérica total, IgE específica de OVA e IgG1 específica de OVA, pero no en el nivel de IgG2a específica de OVA en los ratones OVA/OVA en comparación con el grupo OVA/solución salina (Figura 2B). El pretratamiento con BPSM proporcionó niveles de anticuerpos comparables a los medidos en el grupo OVA/OVA. Por el contrario, los niveles séricos totales e IgE específicos de OVA se redujeron fuertemente en los ratones tratados con BPZE1, mientras que el pretratamiento con BPZE1 no tuvo efecto sobre los niveles séricos de IgG2a e IgG1 específicos de OVA (Figura 2B). Por lo tanto, el pretratamiento con BPZE1 no moduló las respuestas de IgG específicas de OVA en suero, pero suprimió la producción de IgE total y específica de antígeno.

Ejemplo 4: El pretratamiento con BPZE1 reduce la producción de citoquina inflamatoria inducida por OVA en los BALF

Los niveles de citoquinas Th1 (IL-1 β , IL-2 e IFN- γ) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), así como IL-10 se determinaron en los BALF. Como se esperaba y como se informó anteriormente (9,12,20,21), la sensibilización y la exposición a OVA desencadenaron un aumento significativo en los niveles de IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-1 β e IL-2 en los BALF en comparación con los controles de aerosol salino (Figura 3A y B, D-G), mientras que el nivel de IFN- γ se mantuvo sin cambios (Figura 3C). El pretratamiento con BPZE1 redujo significativamente la producción de todas las citoquinas analizadas, excepto IFN- γ , lo que sugiere que el pretratamiento con BPZE1 afecta la producción de citoquinas proinflamatorias Th2 y Th1 principales involucradas en la patogénesis de la inflamación alérgica de las vías respiratorias.

Ejemplo 5: El pretratamiento con BPZE1 I.N. previo inhibe la progresión de CHS inducidos por DNCB

El efecto antiinflamatorio de BPZE1 se investigó adicionalmente en el modelo de ratón con inflamación de la oreja inducido por DNCB de CHS, una dermatitis por contacto alérgica dominada por Th1. Los ratones fueron pretratados i.n. con BPZE1 una o dos veces, y después de la eliminación de bacterias completa de los pulmones, fueron sensibilizados y desafiados con DNCB. La eficacia protectora del pretratamiento BPZE1 contra la inflamación de la oreja se evaluó midiendo el grosor de la oreja diariamente después de la exposición a DNCB. La exposición a DNCB resultó en un marcado aumento en el grosor de la piel 24 horas después del desafío, que se mantuvo durante hasta 4 días (Figura 4). Dos dosis de BPZE1 inhibieron significativamente la inflamación de la oreja en los ratones con DNCB desafiado (Figura 4A).

Los análisis histológicos de la piel de la oreja recogida 48 horas después del desafío con DNCB mostraron congestión vascular e hinchazón significativa con edema tisular característico e infiltrado inflamatorio pronunciado en los ratones expuestos a DNCB (Figura 4B a y b). Se hicieron observaciones similares con ratones pretratados una vez con BPZE1 (Figura 4B c). Sin embargo, dos dosis de BPZE1 redujeron notablemente la hinchazón e inflamación de la oreja, con edema reducido e infiltración celular en comparación con los animales no tratados con BPZE1 (Figura 4B d).

Ejemplo 6: El pretratamiento con BPZE1 subregula la producción de citoquinas proinflamatorias inducidas por DNCB

El examen del perfil de citoquinas en los homogeneizados de la oreja de los diferentes grupos de ratones mostró que el desafío con DNCB desencadenó un aumento marcado en las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-2, IL-17, IL-6, TNF- α , e IL-4 (Figura 5). De acuerdo con la reducción de la inflamación y el edema observados por la histología (Figura 4B), 2 dosis de BPZE1 resultaron en niveles significativamente reducidos de todas las citoquinas proinflamatorias medidas (Figura 5). En contraste, los niveles de IL-10 permanecieron sin cambios para todos los grupos (Figura 5).

Ejemplo 7: El pretratamiento con BPZE1 no afecta la fase de sensibilización

Para probar si el pretratamiento con BPZE1 afecta la fase de sensibilización en ambos modelos de inflamación, los ratones pretratados o no tratados con BPZE1 fueron sometidos a sensibilización con OVA o DNCB. Una semana después de la sensibilización con OVA, se midieron las respuestas de anticuerpos específicos de OVA y se observaron niveles comparables de IgE e IgG específicos de OVA tanto en animales pretratados como no tratados con BPZE1 (Figura 6). Del mismo modo, 3 días después de la sensibilización con DNCB, se recolectaron los ganglios linfáticos auriculares y los recuentos celulares totales, la proliferación de células T y la producción de IFN γ tras la reestimulación *in vitro* fueron comparables en los grupos de animales tratados y no tratados con BPZE1 (Figura 6). Por lo tanto, estos resultados respaldan firmemente que el pretratamiento con BPZE1 no afecta la fase de sensibilización, sino que impacta en las células efectoras que se reclutan en el momento del desafío.

Por lo tanto, el tratamiento nasal previo con BPZE1 suprimió la inflamación pulmonar inducida por OVA y el reclutamiento de células inflamatorias, y redujo significativamente los niveles de IgE y la producción de citoquinas. De manera similar, el pretratamiento nasal BPZE1 inhibió notablemente la hinchazón de la oreja, la inflamación de la piel y la producción de citoquinas proinflamatorias en el modelo CHS inducido por DNCB. Para ambos modelos, se demostró que el pretratamiento con BPZE1 no afecta la fase de sensibilización. Ante el desafío, el pretratamiento con BPZE1 redujo selectivamente el nivel de citoquinas cuya producción aumenta, y no afectó el nivel basal de otras citoquinas. En conjunto, estas observaciones sugieren que el pretratamiento con BPZE1 se dirige específicamente a las células efectoras productoras de citoquinas que son reclutadas y participan en la reacción inflamatoria.

Este estudio demuestra las amplias propiedades antiinflamatorias de la cepa atenuada de *B. pertussis* BPZE1 en el contexto de enfermedades alérgicas.

Referencias

- 5 1. Li R, Lim A, Phoon MC, Narasaraaju T, Ng JK, Poh WP, et al. Attenuated *Bordetella pertussis* protects against highly pathogenic influenza A viruses by dampening the cytokine storm. *J Virol* 2010;84(14):7105-13.
2. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008;454(7203):445-54.
3. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004;59(5):469-78.
- 10 4. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2010;11(7):577-84.
5. Novak N, Simon D. Atopic dermatitis - from new pathophysiologic insights to individualized therapy. *Allergy* 2011;66:830-9.
6. Watanabe H, Unger M, Tuvel B, Wang B, Sauder DN. Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22(4):407-12.
- 15 7. Saint-Mezard P, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF. The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2004; 14(3):131-8.
8. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000;55 Suppl 1:S2-10.
- 20 9. Ennis DP, Cassidy JP, Mahon BP. Prior *Bordetella pertussis* infection modulates allergen priming and the severity of airway pathology in a murine model of allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 2004;34(9):1488-97.
10. Papadopoulos NG, Christodoulou I, Rohde G, Agache I, Almqvist C, Bruno A, et al. Viruses and bacteria in acute asthma exacerbations - A GA2LEN-DARE systematic review. *Allergy* 2011;66:458-68.
- 25 11. Lukacs NW, Tekkanat KK, Berlin A, Hogaboam CM, Miller A, Evanoff H, et al. Respiratory syncytial virus predisposes mice to augmented allergic airway responses via IL-13-mediated mechanisms. *J Immunol* 2001;167(2):1060-5.
12. Kavanagh H, Noone C, Cahill E, English K, Locht C, Mahon BP. Attenuated *Bordetella pertussis* vaccine strain BPZE1 modulates allergen-induced immunity and prevents allergic pulmonary pathology in a murine model. *Clin Exp Allergy* 2010.
- 30 13. Fischer K, Stein K, Ulmer AJ, Lindner B, Heine H, Holst O. Cytokine-inducing lipoteichoic acids of the allergy-protective bacterium *Lactococcus lactis* G121 do not activate via Toll-like receptor 2. *Glycobiology* 2011.
14. Bieber T, Simon H-U. Allergen-specific immunotherapy: current concepts and future directions. *Allergy* 2011;66:709-12.
- 35 15. Mielcarek N, Debie AS, Raze D, Bertout J, Rouanet C, Younes AB, et al. Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog* 2006;2(7):e65.
16. Menozzi FD, Mutombo R, Renauld G, Gantiez C, Hannah JH, Leininger E, et al. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1994;62(3):769-78.
17. Bao Z, Lim S, Liao W, Lin Y, Thiemermann C, Leung BP, et al. Glycogen synthase kinase-3 β inhibition attenuates asthma in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176(5):431-8.
- 40 18. Duan W, Chan JH, Wong CH, Leung BP, Wong WS. Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model. *J Immunol* 2004;172(11):7053-9.
19. Evans CM, Williams OW, Tuvim MJ, Nigam R, Mixides GP, Blackburn MR, et al. Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31(4):382-94.
- 45 20. Ennis DP, Cassidy JP, Mahon BP. Whole-cell *pertussis* vaccine protects against *Bordetella pertussis* exacerbation of allergic asthma. *Immunol Lett* 2005;97(1):91-100.
21. Ennis DP, Cassidy JP, Mahon BP. Acellular *pertussis* vaccine protects against exacerbation of allergic asthma due to *Bordetella pertussis* in a murine model. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12(3):409-17.

22. Feunou PF, Ismaili J, Debie AS, Huot L, Hot D, Raze D, et al. Genetic stability of the live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine candidate BPZE1. *Vaccine* 2008;26(45):5722-7.
23. Skerry CM, Cassidy JP, English K, Feunou-Feunou P, Loch C, Mahon BP. A live attenuated *Bordetella pertussis* candidate vaccine does not cause disseminating infection in gamma interferon receptor knockout mice. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(9):1344-51.
24. Bao Z, Guan S, Cheng C, Wu S, Wong SH, Kemeny DM, et al. A novel antiinflammatory role for andrographolide in asthma via inhibition of the nuclear factor-kappaB pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179(8):657-65.
25. Guan SP, Kong LR, Cheng C, Lim JC, Wong WS. Protective role of 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, a noncytotoxic analogue of andrographolide, in allergic airway inflammation. *J Nat Prod* 2011;74(6):1484-90.
26. Nahori MA, Lagranderie M, Lefort J, Thouron F, Joseph D, Winter N, et al. Effects of *Mycobacterium bovis* BCG on the development of allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness in hyper-IgE BP2 mice vaccinated as newborns. *Vaccine* 2001;19(11-12):1484-95.
27. Page KR, Scott AL, Manabe YC. The expanding realm of heterologous immunity: friend or foe? *Cell Microbiol* 2006;8(2):185-96.
28. Walzl G, Tafuro S, Moss P, Openshaw PJ, Hussell T. Influenza virus lung infection protects from respiratory syncytial virus-induced immunopathology. *J Exp Med* 2000;192(9):1317-26.
29. Tsitoura DC, Kim S, Dabbagh K, Berry G, Lewis DB, Umetsu DT. Respiratory infection with influenza A virus interferes with the induction of tolerance to aeroallergens. *J Immunol* 2000;165(6):3484-91.
30. Hogan RJ, Zhong W, Usherwood EJ, Cookenham T, Roberts AD, Woodland DL. Protection from respiratory virus infections can be mediated by antigen-specific CD4(+) T cells that persist in the lungs. *J Exp Med* 2001;193(8):981-6.
31. de Bree GJ, van Leeuwen EM, Out TA, Jansen HM, Jonkers RE, van Lier RA. Selective accumulation of differentiated CD8+ T cells specific for respiratory viruses in the human lung. *J Exp Med* 2005;202(10):1433-42.
32. Dahl ME, Dabbagh K, Liggitt D, Kim S, Lewis DB. Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. *Nat Immunol* 2004;5(3):337-43.
33. Beyer M, Bartz H, Horner K, Doths S, Koerner-Rettberg C, Schwarze J. Sustained increases in numbers of pulmonary dendritic cells after respiratory syncytial virus infection. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(1):127-33.
34. Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebien M, et al. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med* 2008;205(2):323-9.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa mutada de *Bordetella pertussis* para su uso en la obtención de inmunidad protectora contra una enfermedad alérgica de la piel, en la que la cepa está atenuada y en la que el gen de toxina *pertussis* (ptx) está mutado, el gen dermonecrótico (dnt) se elimina o muta, y el gen *ampG* de *Bordetella* es reemplazado por un *ampG* heterólogo.
2. La cepa *Bordetella pertussis* para el uso de la reivindicación 1, en la que el gen *ampG* de la cepa *Bordetella* de tipo salvaje es reemplazada por un gen *ampG* de *E. coli*.
3. La cepa de *Bordetella pertussis* para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que 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.
4. La cepa de *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la cepa de *Bordetella pertussis* es una cepa triple mutante.
5. La cepa de *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la cepa de *Bordetella pertussis* es la cepa de *B. pertussis* identificada por el número de acceso CNCM 1-3585 depositada con la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) en París, Francia, a tenor del Tratado de Budapest, el 9 de marzo de 2006.
6. La cepa de *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la cepa de *Bordetella pertussis* es una cepa viva.
7. La cepa de *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la cepa de *Bordetella* no comprende un gen heterólogo distinto del gen *ampG* heterólogo.
8. La cepa de *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la cepa de *Bordetella pertussis* no comprende una plataforma de expresión heteróloga para transportar antígenos heterólogos a la mucosa respiratoria del mamífero.
9. La cepa *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además un excipiente, vehículo y/o portador farmacéuticamente adecuado.
10. La cepa de *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha cepa es formulada en una suspensión líquida, un aerosol o un polvo.
11. La cepa *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que además comprende un adyuvante.
12. La cepa de *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la enfermedad alérgica de la piel es la dermatitis por contacto.
13. La cepa de *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la cepa es administrada por vía mucosa.
14. La cepa de *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que la cepa es administrada en más de una dosis.
15. La cepa de *Bordetella pertussis* para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que la cepa es administrada en dos dosis.

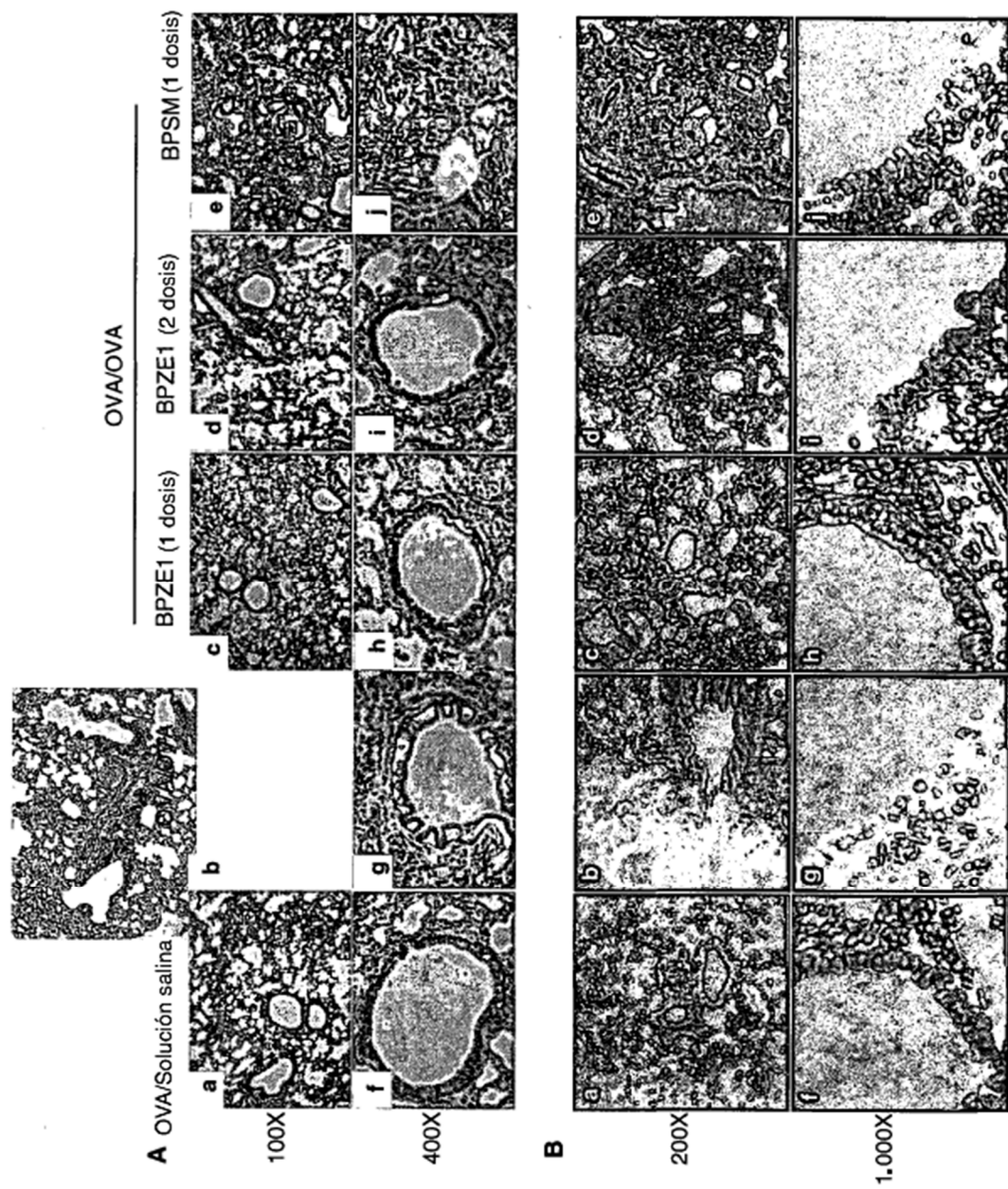


Figura 1

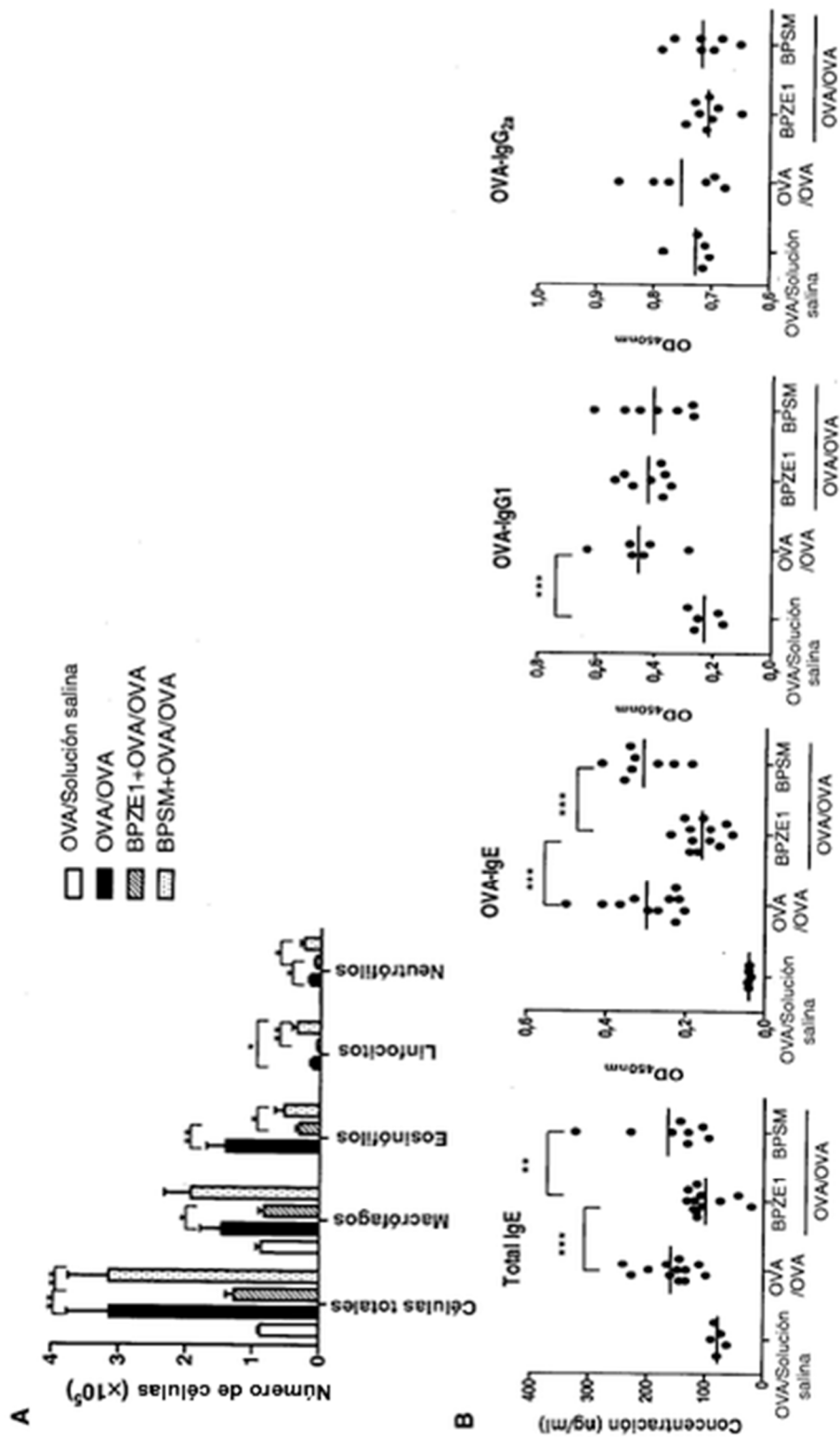


Figura 2

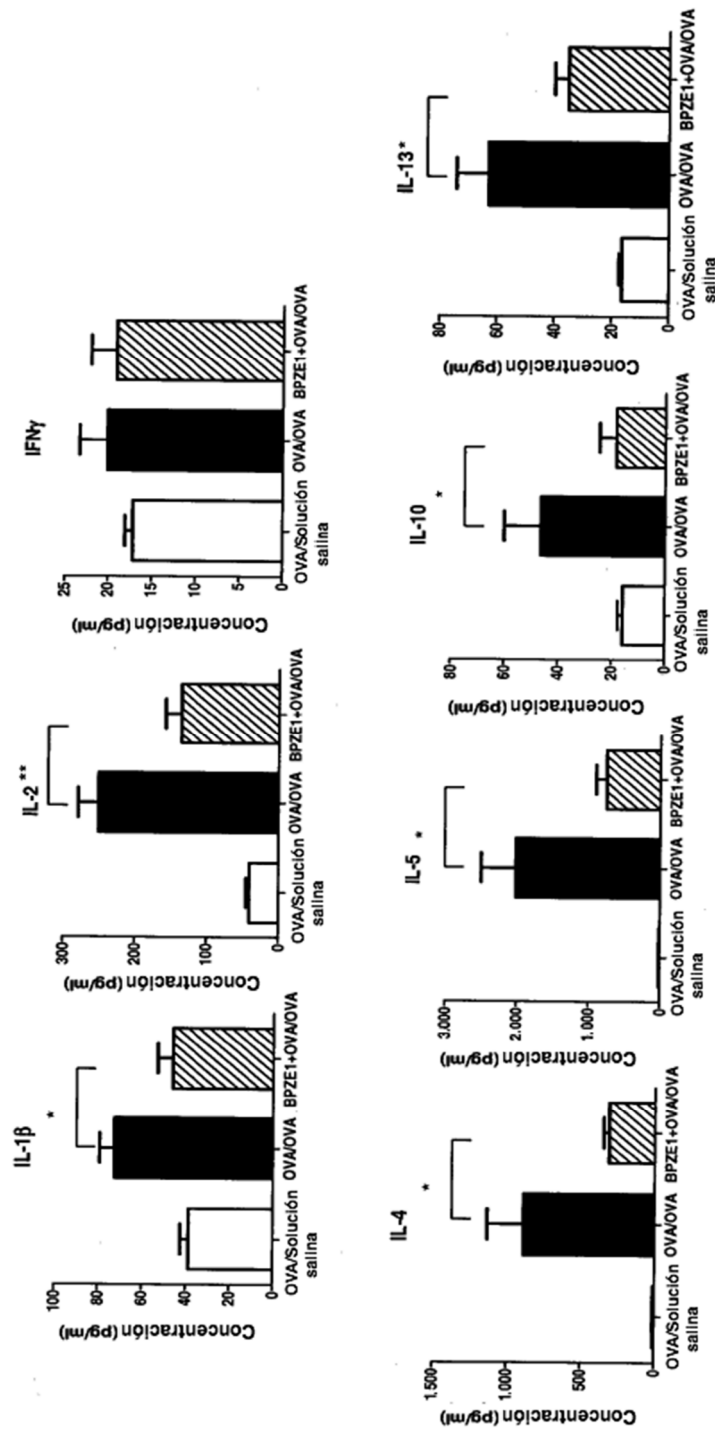


Figura 3

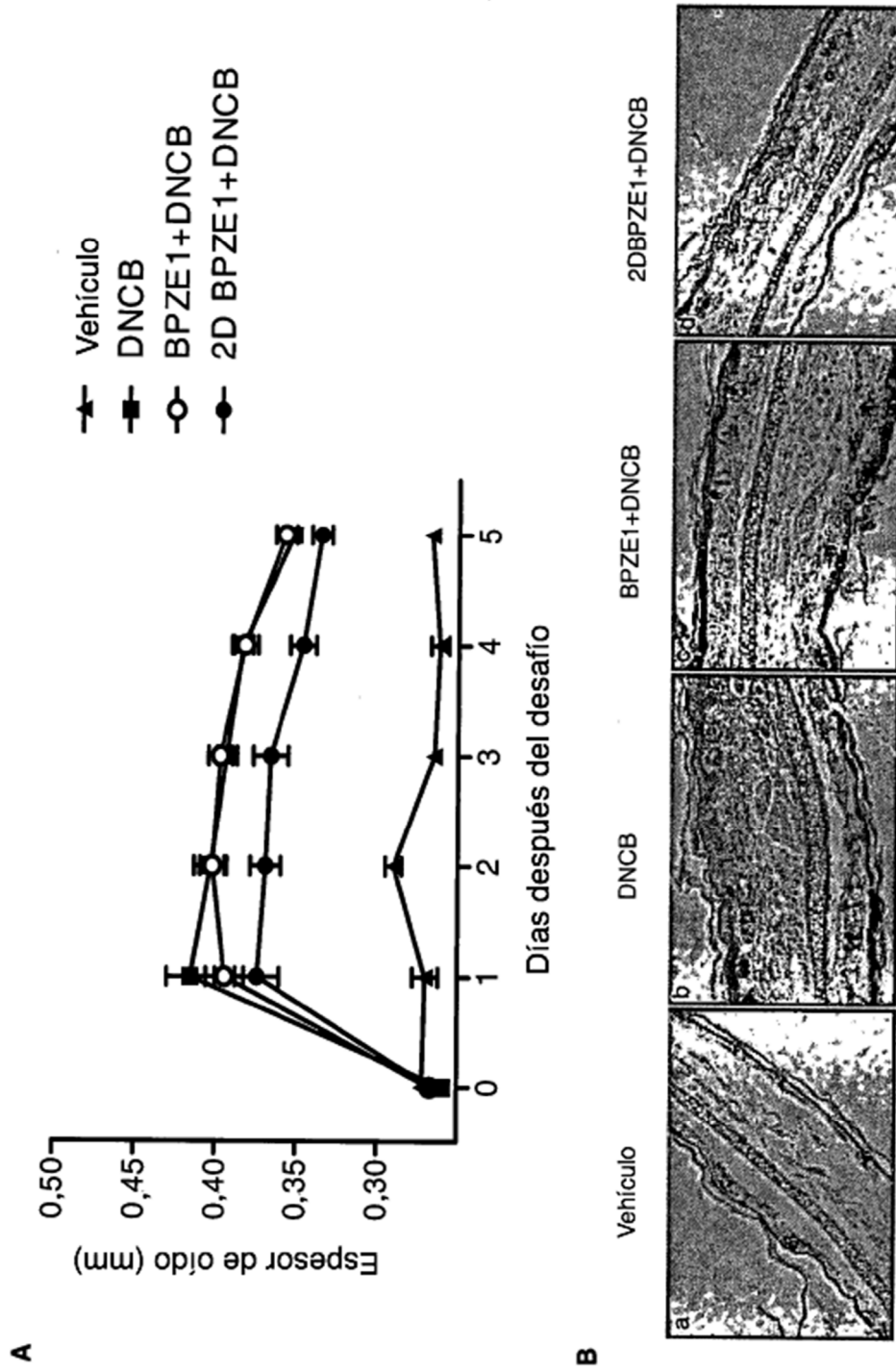


Figura 4

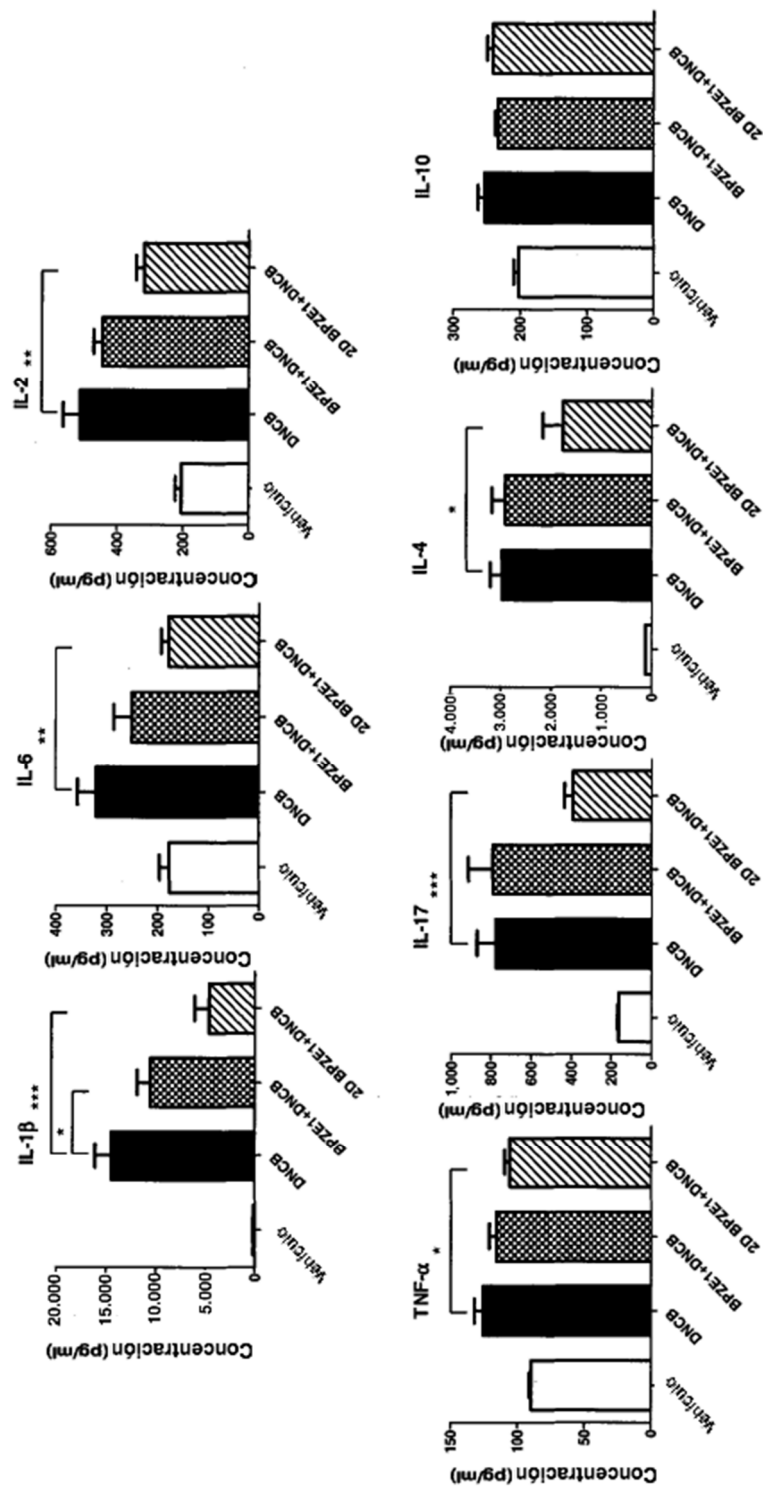


Figura 5

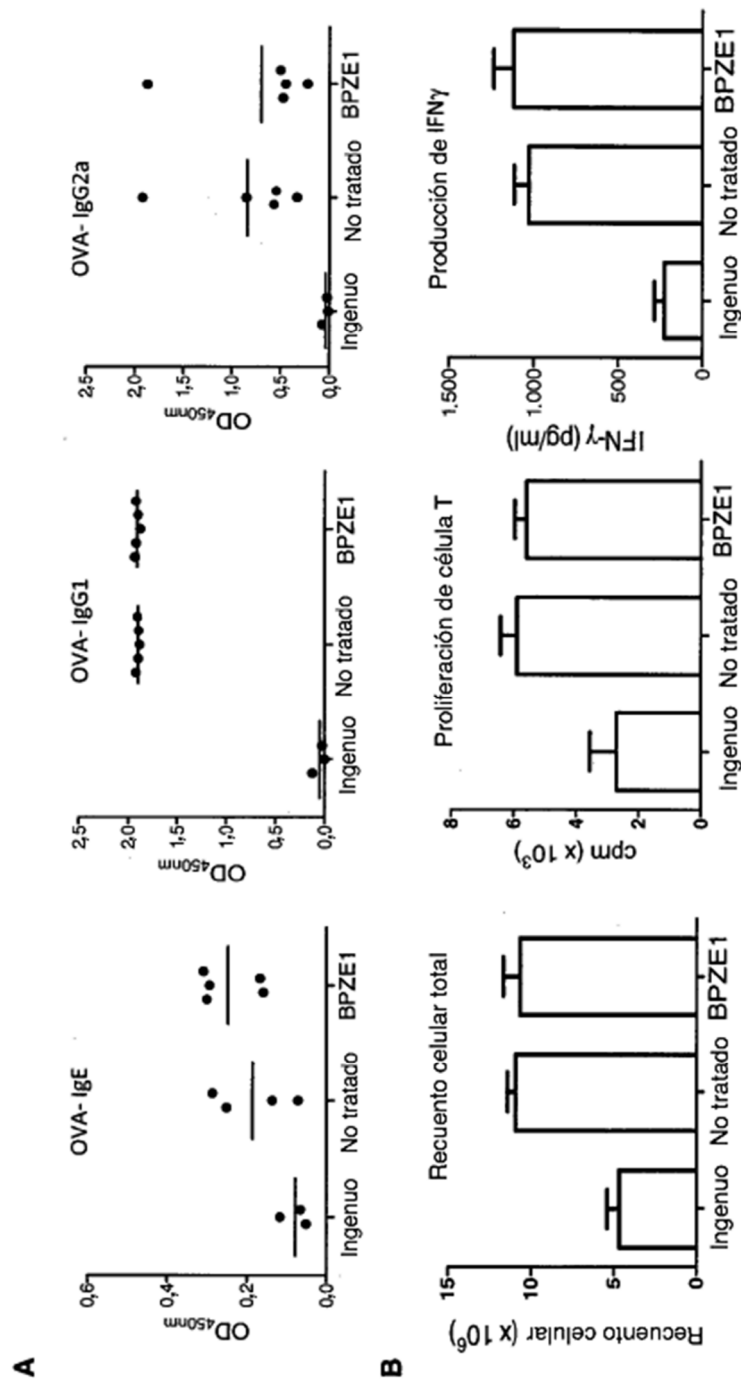


Figura 6