

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 830**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/36** (2006.01)

**A61K 39/10** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2007 E 16155296 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3045529**

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

30 Prioridad:

**10.03.2006 US 780827 P**

**30.06.2006 US 817430 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.04.2021**

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR DE LILLE (50.0%)**

**1, rue du Professeur Calmette**

**59000 Lille, FR y**

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA**

**RECHERCHE MEDICALE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LOCHT, CAMILLE;**

**MIELCAREK, NATHALIE;**

**DEBRIE, ANNE-SOPHIE;**

**RAZE, DOMINIQUE y**

**BERTOUT, JULIE**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 821 830 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

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

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una cepa mutada de *Bordetella* que comprende al menos una mutación del gen *ptx*, una delección o mutación del gen *dnt* y un gen *ampG* heterólogo. La cepa mutada atenuada de *Bordetella* se puede utilizar en una composición inmunogénica o en una vacuna para el tratamiento o la prevención de una infección por *Bordetella*. Forma parte de la invención el uso de la cepa atenuada de *Bordetella* para la fabricación de una vacuna o composiciones inmunogénicas, así como los procedimientos para proteger a los mamíferos contra la infección por *Bordetella*.

**10 Antecedentes de la invención y técnica anterior relacionada**

*La tos ferina* sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo y su incidencia está aumentando incluso en países con una alta cobertura de vacunación. Aunque todos los grupos de edad son susceptibles, es más grave en niños muy pequeños estar protegidos por las vacunas disponibles actualmente.

15 La tos ferina o *pertussis* es una enfermedad infantil grave responsable de altas tasas de mortalidad antes de la introducción de vacunas eficaces en la segunda mitad del siglo 20. El éxito de estas vacunas ha llevado a la opinión de que la enfermedad está esencialmente bajo control, aunque en todo el mundo aún se registran anualmente de 200.000 a 400.000 muertes relacionadas con la *tos ferina*, y la enfermedad sigue ocupando el sexto lugar entre las causas de mortalidad debido a agentes infecciosos [1]. Aunque prevalece principalmente en los países en desarrollo, la enfermedad también está resurgiendo en el mundo desarrollado [2, 3], incluido EE. UU., donde la  
20 incidencia se ha multiplicado por cinco en los últimos veinte años [4]. Inesperadamente, la epidemiología de la *tos ferina* ha cambiado en países con alta cobertura de vacunas, donde los casos de *tos ferina* en adolescentes y adultos son cada vez más frecuentes [5]. Esto probablemente se deba a la disminución progresiva de la inmunidad mediada por vacunas durante la adolescencia. A menudo atípicas y, por tanto, difíciles de diagnosticar, la *tos ferina* en general, no pone en peligro la vida de los adultos y, en muchos casos, pasa desapercibido. Sin embargo, los  
25 adultos infectados constituyen un reservorio importante para la transmisión de la enfermedad a niños muy pequeños, o demasiado pequeños para estar completamente vacunados y, por lo tanto, corren el riesgo de desarrollar una enfermedad grave asociada con altas tasas de mortalidad.

30 *La vacunación de la tos ferina* suele comenzar a los dos meses de edad, y la protección completa requiere al menos tres inmunizaciones en intervalos de uno a dos meses. Por lo tanto, los bebés no están completamente protegidos antes de los 6 meses de edad con las vacunas disponibles actualmente. Para reducir la incidencia de la *tos ferina* en los grupos de edad muy jóvenes y más vulnerables, la inmunización temprana, posiblemente al nacer, sería por tanto muy deseable. Sin embargo, numerosos estudios en humanos y en modelos animales han sugerido que el sistema inmunológico neonatal es demasiado inmaduro para inducir eficazmente la inmunidad protectora mediada por vacunas [6, 7]. Especialmente la producción de IFN- $\gamma$ , indicativa de una respuesta Th1 que es esencial para el desarrollo de inmunidad protectora contra la *tos ferina* [8], parece reducirse significativamente en los recién nacidos humanos, en comparación con los niños mayores o los adultos [9]. Esto también se refleja en el hecho de que solo se producen cantidades significativas de IFN- $\gamma$  específico de antígeno después de varios meses ( $\geq 6$  meses) en niños vacunados con vacunas de *tos ferina*, especialmente con vacunas acelulares (aPV) [10].

40 La infección natural con *Bordetella pertussis* durante mucho tiempo se ha considerado que induce una inmunidad fuerte y duradera, que decae mucho más tarde que la inmunidad inducida por la vacuna [5, 11]. Además, la infección con *B. pertussis* induce respuestas inmunitarias de tipo Th1 específicas de antígeno que se miden incluso en niños muy pequeños (de tan solo un mes de edad) [12]. Estas observaciones sugieren que las vacunas vivas aplicadas por vía nasal para imitar lo más cerca posible la infección natural, pueden ser alternativas atractivas a las vacunas disponibles actualmente.

45 Hay muchas composiciones de vacunación para tratar las infecciones por *Bordetella* conocidas en la técnica. Sin embargo, estas composiciones inmunogénicas no se usan para tratar a niños recién nacidos o en casos en los que se requiere una inmunidad protectora rápida y epidémica.

50 Así, la patente francesa FR 0206666 divulga cepas vivas de *Bordetella* que se han vuelto deficientes en al menos dos toxinas elegidas entre PTX, DNT, AC y TCT. Esta patente divulga la sobreexpresión de un gen endógeno *ampG* por la adición de un promotor fuerte, y la adición de 11 aminoácidos terminales del gen *ampG* de *E. coli*.

55 Mielcarek y otros, Vaccine (2006; 24S2: S2/54-S2-55) divulgan una cepa de *Bordetella pertussis* atenuada de PTX<sup>-</sup>, DTN<sup>-</sup> y TCT<sup>-</sup> para su uso en la inmunización de ratones. Esta referencia divulga que, para reducir la producción de citotoxina traqueal, el gen *ampG* debe estar sobreexpresado. Sin embargo, tras una evaluación adicional, los autores se dieron cuenta de que al sobreexpresar el gen *ampG*, hay un aumento en la citotoxina traqueal y no una disminución como se pensó originalmente.

Mielcarek y otros en *Advance Drug Delivery Review* 51 (2001) páginas. 55-69 divulgan que las vacunas vivas pueden inducir respuestas sistémicas y de las mucosas cuando se administran por vía oral o nasal.

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

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

Por tanto, la técnica anterior, aunque divulga varios tipos de composiciones de vacunación, no resuelve el problema de proporcionar una vacuna o composición inmunogénica que pueda proporcionar protección a un recién nacido antes de los seis meses. Además, la técnica anterior no divulga un inmunógeno o una vacuna que proporcione  
 10 inmunidad protectora rápida contra una infección por *Bordetella*. La técnica anterior tampoco divulga una composición inmunogénica o vacuna que proporcione una inmunidad protectora rápida contra una infección por *Bordetella*, dicha inmunidad protectora aumenta durante al menos los dos meses siguientes a la vacunación.

Por tanto, un objeto de la presente invención es superar las deficiencias de la técnica anterior.

- 15 Otro objeto de la presente invención es producir una composición inmunogénica o candidato vacunal vivo atenuado mediante la atenuación genética de una cepa de *Bordetella* como son *B. pertussis* o *B. parapertussis* para disminuir la patogenicidad, mientras se mantiene la capacidad de colonizar e inducir inmunidad protectora.

Otro objeto de la presente invención es producir una vacuna o composición inmunogénica que induzca protección en recién nacidos después de una única administración intranasal que sea superior a la protección proporcionada por el aPV actual.

- 20 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar protección contra la infección por *Bordetella parapertussis*, así como *Bordetella pertussis* que no se observó después de la vacunación con aPV.

Otro objeto de la presente invención es inducir una fuerte inmunidad protectora en los recién nacidos contra la infección por *Bordetella*.

- 25 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una vacuna o composición inmunogénica que induzca inmunidad de la mucosa y sistémica.

Es otro objeto de la presente invención producir una cepa viva atenuada de *Bordetella pertussis* que se administrará como una vacuna nasal de dosis única en los primeros años de vida, llamada BPZE1.

- 30 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una vacuna que no solo se pueda usar para vacunar a los recién nacidos, sino que se pueda usar en todos los mamíferos de cualquier edad en el caso de una epidemia de tos ferina.

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

- 35 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar prevención o tratamiento contra la infección por *Bordetella* que tiene costos de producción relativamente bajos.

Estos y otros objetos se logran mediante la presente invención, como lo demuestra el sumario de la invención, la descripción de las realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

### Sumario de la invención

- 40 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto o realizaciones que se exponga en la presente memoria es solo para información.

La presente invención proporciona una cepa mutada de *Bordetella* que comprende al menos una mutación del gen (*ptx*) de la toxina de *pertussis*, una delección o mutación del gen (*dnt*) de la toxina dermonecrótica y un gen *ampG* heterólogo.

- 45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos una mutación del gen (*ptx*) de la toxina de *pertussis*, una mutación o delección del gen (*dnt*) de la toxina dermonecrótica de *pertussis*, y un gen *ampG* heterólogo.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una vacuna que comprende la cepa atenuada de *Bordetella* que comprende al menos una mutación del gen (*ptx*) de la toxina de *pertussis* mutado, una mutación o delección del gen (*dnt*) de la toxina dermonecrótica de *pertussis*, y un gen *ampG* heterólogo.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de una cepa atenuada de *Bordetella* que comprende al menos una mutación del gen *ptx* mutado, una delección o mutación del gen *dnt*, y un gen *ampG* heterólogo para la fabricación de una vacuna para la prevención de una infección por *Bordetella*.

5 En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de una cepa atenuada de *Bordetella* que comprende al menos una mutación del gen *ptx* mutado, una delección o mutación del gen *dnt*, y un gen *ampG* heterólogo para la fabricación de una vacuna para la inducción de una respuesta inmune dirigida preferentemente hacia la vía Th1 contra dicha *Bordetella atenuada*.

10 También se proporciona un procedimiento para proteger a un mamífero contra una enfermedad causada por una infección por *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* que comprende administrar a dicho mamífero que necesita tal tratamiento una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos una mutación del gen *ptx*, una delección o mutación del gen *dnt*, y un gen *ampG* heterólogo.

15 Un procedimiento para proporcionar una inmunidad protectora rápida contra una infección por *Bordetella* que comprende administrar a dicho mamífero que necesita tal tratamiento una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos una mutación del gen *ptx*, una delección o mutación del gen *dnt*, y un gen *ampG* heterólogo también es parte de la presente invención.

20 Un procedimiento para proporcionar una inmunidad protectora rápida contra una infección por *Bordetella* que comprende administrar a un mamífero que necesite dicho tratamiento una cepa de *Bordetella* mutada que comprende al menos una mutación del gen *ptx* mutado, una delección o mutación del gen *dnt*, y un gen *ampG* heterólogo o una vacuna que comprende dicha cepa mutada de *Bordetella*, en la que dicho procedimiento proporciona además un aumento en dicha inmunidad protectora durante al menos dos meses después de la vacunación es otro aspecto más de la presente invención.

25 Otro aspecto más de la presente invención es el uso de la cepa de *Bordetella* que comprende al menos una mutación del gen *ptx* mutado, una delección o mutación del gen *dnt* y un gen *ampG* heterólogo para la preparación de una vacuna multivalente (es decir, una vacuna para prevenir o tratar infecciones causadas por diferentes patógenos) para tratar enfermedades respiratorias.

También forma parte de la presente invención el uso de una cepa atenuada de *Bordetella* de la invención, para administrar a mamíferos que necesitan una inmunidad protectora rápida contra una infección por *Bordetella*, en la que dicha inmunidad protectora aumenta durante al menos dos meses después de la administración.

30 Un procedimiento para proporcionar una respuesta de la mucosa y una respuesta sistémica para tratar o proteger contra las infecciones por *Bordetella* en mamíferos es otro aspecto más de la presente invención.

### Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es un gráfico de barras que ilustra la TCT presente en los sobrenadantes del cultivo de BPSM y BPZE1 expresada como media de nM/DO<sub>540 nm</sub> ( $\pm$  error estándar) de 3 cultivos separados para cada cepa.

35 La **Figura 2** es un análisis de inmunotransferencia de la producción de PTX en los sobrenadantes del cultivo de BPSM (carril 1) y BPZE1 (carril 2). Los tamaños de los marcadores Mr se expresan en kDa y se dan en el margen izquierdo.

La **Figura 3** es un análisis de transferencia Southern del locus *dnt* en BPSM (carril 1) y BPZE1 (carril 2). Las longitudes de los marcadores de peso se indican en pares de bases (pb) y se muestran en el margen izquierdo.

40 La **Figura 4** es un gráfico que ilustra las tasas de crecimiento de BPSM (línea negra) y BPZE1 (línea de puntos) en cultivo líquido.

La **Figura 5** son micrografías electrónicas representativas de BPSM (izquierda) y BPZE1 (derecha) cultivados en medio líquido durante 24 h.

45 La **Figura 6** es un gráfico que ilustra *in vitro* la adherencia de BPSM (columnas negras) y BPZE1 (columnas blancas) a células A549 del epitelio pulmonar humano (izquierda) y células J774 de tipo macrófago murino (derecha). Los resultados se expresan como medias de los porcentos de bacterias unidas con respecto a las bacterias presentes en el inóculo de tres experimentos diferentes.

50 La **Figura 7** es un gráfico que ilustra la colonización pulmonar por BPSM (líneas negras) y BPZE1 (líneas de puntos) de ratones adultos infectados intranasalmente con 10<sup>6</sup> UFC de BPZE1 o BPSM. Los resultados se expresan como UFC medias ( $\pm$  error estándar) de tres a cuatro ratones por grupo y son representativos de dos experimentos separados. \*, *P* = 0,004.

La **Figura 8** son fotografías de un análisis histológico de pulmones de ratones adultos BPZE1 (panel superior) o infectados con BPSM (panel central) en comparación con controles que recibieron PBS (panel inferior). Una

semana después de la infección, los pulmones se extrajeron asépticamente y se fijaron en formaldehído. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron mediante microscopía óptica.

La **Figura 9** son gráficos que ilustran la protección contra *B. pertussis* en (a) ratones adultos y (b) ratones lactantes o *B. parapertussis* en ratones lactantes (d). Los ratones inmunizados con BPZE1, aPV o PBS (sin tratamiento previo) se retaron con BPSM (a y b) o *B. parapertussis* (d), y los recuentos de UFC de pulmón se determinaron 3 h (barras blancas) o 7 días (barras negras) después. Los resultados se expresan como UFC medias ( $\pm$  error estándar) de 3-4 ratones por grupo y son representativos de dos experimentos separados. (b, \*,  $P = 0,009$ ; d, \*,  $P = 0,007$ ) (c) Recuentos de UFC 3 h después del reto con BPSM en ratones adultos vacunados con BPZE1 o aPV, en comparación con los controles. Los resultados obtenidos de 3 experimentos separados se expresan como porcentos de UFC de cada ratón en relación con el promedio de UFC en el grupo no inmunizado del mismo experimento.

La **Figura 10** son gráficos de barras que ilustran las respuestas inmunes inducidas por la inmunización con BPZE1 o aPV. (a) Títulos de anti-FHA IgG (H + L) y (b) relaciones de IgG1/IgG2a antes (barras blancas) o 1 semana después del reto con BPSM (barras negras) en ratones inmunizados con BPZE1 o aPV, en comparación con los controles. (c) Relaciones de IFN- $\gamma$  y IL-5 producidas por esplenocitos estimulados con FHA, PTX o ConA de ratones vacunados 2 meses antes con BPZE1 (barras negras) o aPV (barras blancas), en comparación con los controles (barras grises). Los anticuerpos y las citoquinas se midieron en ratones individuales y los resultados se expresaron como valores medios ( $\pm$  error estándar) para 4 ratones por grupo analizados por triplicado.

La **Figura 11** es la secuencia de aminoácidos de la toxina de *pertussis* (SEQ ID NO: 1) (proteína S1 de activación de islotes). Los primeros 34 aminoácidos son la secuencia señal, mientras que los aminoácidos 35 a 269 son la cadena madura.

La **Figura 12** es la secuencia de aminoácidos de la toxina dermonecrótica (SEQ ID NO: 2).

La **Figura 13** es la secuencia de aminoácidos de AmpG de *Bordetella pertussis* (SEQ ID NO: 3).

La **Figura 14** es la secuencia de aminoácidos de AmpG de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 4).

## Descripción de las realizaciones preferidas de la presente invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto o realizaciones que se exponga en la presente memoria es solo para información.

Como se usa en la presente memoria, la abreviatura "PTX" se refiere a la toxina de *pertussis*, que sintetiza y secreta una toxina ribosilante de ADP. PTX se compone de seis polipéptidos S1 a S5, el resto enzimáticamente activo se llama S1. PTX tiene una secuencia señal de 34 aminoácidos, mientras que la cadena madura consta de los aminoácidos 35 a 269. PTX es el principal factor de virulencia expresado por *B. pertussis*. El resto A de estas toxinas exhibe actividad ADP-ribosiltransferasa y la porción B media la unión de la toxina a los receptores de la célula huésped y la translocación de A a su sitio de acción (57).

Como se usa en la presente memoria, la abreviatura "DNT" se refiere a la toxina dermonecrótica de *pertussis*, que es una toxina termolábil que induce lesiones localizadas en ratones y otros animales de laboratorio cuando se inyecta por vía intradérmica. Es letal para los ratones cuando se inyecta en dosis bajas por vía intravenosa (58 a 61). La DNT se considera un factor de virulencia para la producción de atrofia de cornetes en la rinitis atrófica porcina (62, 63).

Como se usa en la presente memoria, la abreviatura "TCT" se refiere a la citotoxina traqueal, que es un factor de virulencia sintetizado por *Bordetellae*. TCT es un fragmento de peptidoglicano y tiene la capacidad de inducir la producción de interleuquina-1 y óxido nítrico sintasa. Tiene la capacidad de provocar estasis de los cilios y tiene efectos letales sobre las células epiteliales respiratorias.

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

El término "atenuado" significa un debilitamiento, una cepa menos virulenta de *Bordetella* que es capaz de estimular una respuesta inmune y crear inmunidad protectora, pero que no causa ninguna enfermedad.

La terminología "inmunidad protectora rápida" significa que la inmunidad contra *Bordetella* se confiere poco tiempo después de la administración de una cepa mutada de *Bordetella* de la presente invención. Por "corto tiempo" se entiende vacunado y retado una semana después. Más específicamente, hay una expansión rápida de linfocitos periféricos específicos de patógenos existentes, efectores citotóxicos (CTL) CD8<sup>+</sup> y células auxiliares CD4<sup>+</sup>. Las células auxiliares CD4<sup>+</sup> inducen la maduración de las células B y la producción de anticuerpos. Por tanto, los linfocitos con la reserva de memoria están preparados para proliferar rápidamente en el momento de la infección posterior.

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

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

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

El término "recién nacido" se refiere a una persona o un mamífero que tiene entre 1 día y 24 semanas de edad.

El término "tratamiento", como se usa en la presente memoria, no se limita a curar una enfermedad y eliminar sus causas, sino que se cubren particularmente los medios para curar, aliviar, eliminar o disminuir los síntomas asociados con la enfermedad de interés, o prevenir o reducir la posibilidad de contraer cualquier trastorno o mal funcionamiento del cuerpo del hospedero.

10 Los términos "protección" y "prevención" se usan en la presente memoria indistintamente y significan que se impide una infección por *Bordetella*.

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

Por "preferentemente hacia la vía Th1" se entiende que la vía Th1 se favorece sobre la vía Th2.

15 El término "composición inmunogénica" significa que la composición puede inducir una respuesta inmunitaria y, por tanto, es antigénica. Por "respuesta inmune" se entiende cualquier reacción del sistema inmune. Estas reacciones incluyen la alteración de la actividad del sistema inmunológico de un organismo en respuesta a un antígeno y pueden implicar, por ejemplo, producción de anticuerpos, inducción de inmunidad mediada por células, activación del complemento o desarrollo de tolerancia inmunológica.

20 Más específicamente, la presente invención proporciona al menos una cepa de *Bordetella* con una triple mutación que se puede utilizar como composición inmunogénica o vacuna. Se apreciará que al menos la cepa de *Bordetella* con la triple mutación contiene una mutación del gen *ptx* mutado, una delección o mutación del gen *dnt* y un gen *ampG* heterólogo. El producto del gen heterólogo *ampG* reduce en grandes cantidades la cantidad de citotoxina traqueal que se produce.

25 La presente invención no se limita únicamente a los triples mutantes descritos anteriormente. Se pueden hacer otras mutaciones adicionales, como mutantes deficientes en adenilato ciclasa (AC) (64), mutantes deficientes en lipopolisacáridos (LPS) (65), hemaglutinina filamentosa (FHA) (66) y cualquiera de los componentes regulados por *bvg* (67).

30 La cepa de partida que está mutada puede ser cualquier cepa de *Bordetella* incluyendo *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*.

35 La construcción de una cepa de *Bordetella* mutada comienza con la sustitución del gen *ampG* de *Bordetella* en la cepa con un gen *ampG* heterólogo. Cualquier gen *ampG* heterólogo se puede usar en la presente invención. Estos incluyen todas aquellas bacterias gramnegativas que liberan cantidades muy pequeñas de fragmentos de peptidoglicano en el medio de generación. Los ejemplos de bacterias gramnegativas incluyen, pero no están limitados a *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Legionella* y similares.

40 Reemplazando el gen *ampG* de *Bordetella* con un gen *ampG* heterólogo, la cantidad de citotoxina traqueal (TCT) que se produce en la cepa resultante expresa menos del 1 % de actividad TCT residual. En otra realización, la cantidad de toxina TCT que se expresa por la cepa resultante está entre el 0,6 % y el 1 % de actividad TCT residual o entre el 0,4 % y el 3 % de actividad TCT residual o entre el 0,3 % y el 5 % de actividad TCT residual.

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

50 También se pueden realizar otras mutaciones como las descritas en Patente de Estados Unidos 6.713.072 así como cualquier mutación conocida u otra capaz de reducir la actividad de la toxina a niveles indetectables. El intercambio alélico se utiliza primero para eliminar el operón de *ptx* y luego insertar la versión mutada.

Finalmente, el gen *dnt* luego se elimina de la cepa de *Bordetella* mediante intercambio alélico. Además de la eliminación total, la actividad enzimática también se puede inhibir mediante una mutación puntual. Dado que la DNT está constituida por un dominio de unión al receptor en la región N-terminal y un dominio catalítico en la región C-

terminal, una mutación puntual en el gen *dnt* para reemplazar la Cys-1305 por Ala-1305 inhibe la actividad enzimática de DNT (68). DNT se ha identificado como una toxina importante en *Bordetella bronchiseptica* y muestra actividad letal tras la inyección de cantidades diminutas (26).

5 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 se puede interrumpir mediante la inserción de una secuencia genética o plasmídica. Este procedimiento también se contempla en la presente invención.

10 La cepa triple mutada de la presente invención se denomina cepa BPZE1 y ha sido depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) en París, Francia el 9 de marzo de 2006 con el número CNCM I-3585. Las mutaciones introducidas en BPZE1 dan como resultado una atenuación drástica, pero permiten que las bacterias colonicen y persistan. Por tanto, en otra realización, la presente invención proporciona BPZE1, que puede inducir inmunidad de la mucosa e inmunidad sistémica cuando se administra. En otro aspecto, la BPZE1 se administra por vía intranasal.

15 Las cepas de *Bordetella* mutadas de la presente invención se pueden usar en composiciones inmunogénicas. Tales composiciones inmunogénicas son útiles para generar una respuesta inmune, ya sea una respuesta de anticuerpos y o preferentemente una respuesta de células T en mamíferos. Ventajosamente, la respuesta de las células T es tal que protege a un mamífero contra la infección por *Bordetella* o contra sus consecuencias.

20 Las cepas de *Bordetella* mutadas de la presente invención se pueden usar como cepas vivas o cepas muertas químicamente o por calor en las vacunas o composiciones inmunogénicas. En un aspecto, las cepas vivas se usan para administración nasal, mientras que las cepas muertas químicamente o por calor se pueden usar para administración sistémica o de la mucosa.

La composición inmunogénica puede comprender además un excipiente o portador y/o vehículo farmacéuticamente adecuado, cuando se usa para administración sistémica o local. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua destilada, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles y similares.

25 La composición inmunogénica de la invención también puede comprender adyuvantes, *es decir*, cualquier sustancia o compuesto capaz de promover o aumentar una respuesta mediada por células T, y particularmente una respuesta inmune mediada por CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> contra el principio activo de la invención. Se pueden usar adyuvantes tales como péptidos de muramilo tales como MDP, IL-12, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre y/o Montanide® en las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

30 Los expertos en la técnica apreciarán que se usan adyuvantes y emulsiones en las composiciones inmunogénicas cuando las cepas de *Bordetella* mutadas tratadas químicamente o térmicamente se utilizan en las vacunas o composiciones inmunogénicas.

35 Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden además al menos una molécula que tiene un efecto profiláctico contra una infección por *Bordetella* o los efectos perjudiciales de la infección por *Bordetella*, como un ácido nucleico, una proteína, un polipéptido, un vector o un fármaco.

La composición inmunogénica de la invención se usa para provocar una respuesta inmune de células T en un huésped en el que se administra la composición. Todas las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente se pueden inyectar en un huésped a través de diferentes vías: inyección subcutánea (sc), intradérmica (id), intramuscular (im) o intravenosa (iv), administración oral y administración intranasal o inhalación.

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

45 Cuando se formula para administración intranasal, la cepa de *Bordetella* se administra a una dosis de aproximadamente  $1 \times 10^3$  hasta  $1 \times 10^6$  bacterias, en función del peso y la edad del mamífero que lo recibe. En otro aspecto una dosis de  $1 \times 10^4$  hasta  $5 \times 10^6$  se puede usar.

50 Las cepas de *Bordetella* mutadas de la presente invención se pueden usar como vacuna atenuada para proteger contra una futura infección por *Bordetella*. A este respecto, una ventaja de la presente invención es que se puede administrar una dosis única a mamíferos y la protección puede durar al menos una duración de más de dos meses, particularmente más de seis meses. La vacuna de la presente invención se puede administrar a recién nacidos y protege contra la infección de tos ferina. Esto es especialmente crucial dado que la tasa de mortalidad de las infecciones por *Bordetella pertussis* son aproximadamente 1,3 % para bebés menores de 1 mes.

Además, las vacunas de la presente invención se pueden usar en mamíferos adultos cuando hay una epidemia o en adultos mayores de más de 60 años, ya que su riesgo de complicaciones puede ser mayor que el de niños mayores o adultos sanos.

- Las vacunas se pueden formular con los excipientes fisiológicos indicados anteriormente de la misma manera que en las composiciones inmunogénicas. Por ejemplo, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua destilada, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles y similares. Se pueden usar en las vacunas adyuvantes tales como péptidos de muramilo tales como MDP, IL-12, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre y/o Montanide®.
- Las vacunas de la presente invención pueden inducir altos títulos de IgG sérica contra FHA. El análisis de los patrones de citoquinas específicas de antígeno reveló que la administración con las cepas mutadas atenuadas de *Bordetella* de la presente invención favorecieron una fuerte respuesta TH1.
- Las vacunas de la presente invención proporcionan un alto nivel de protección contra una infección por *Bordetella es decir*, un nivel de protección superior al 90 %, particularmente superior al 95 %, más particularmente superior al 99 % (calculado 7 días después de la infección como se detalla en el ejemplo 9). El nivel de protección de la vacuna que comprende la cepa BPZE1 alcanza más del 99,999 % en comparación con los ratones no vacunados (vírgenes), al menos dos meses después de la vacunación.
- Las vacunas se pueden administrar por inyección subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.), administración oral y administración intranasal o inhalación. La administración de la vacuna suele ser en dosis única. Alternativamente, la administración de la vacuna de la invención se realiza por primera vez (vacunación inicial), seguida de al menos un retiro (administración posterior), con la misma cepa, composición o vacuna, o con vacunas acelulares, o una combinación de ambas.
- En un aspecto, se logra la administración intranasal o inhalación de las vacunas, cuyo tipo de administración es de bajo costo y permite la colonización por las cepas atenuadas de la invención del tracto respiratorio: tracto respiratorio superior (nariz y conductos nasales, senos paranasales y garganta o faringe) y/o las vías respiratorias (glotis o laringe, tráquea, bronquios y bronquiolos) y/o los pulmones (bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares y alvéolos)
- La administración intranasal se realiza con una composición inmunogénica o una vacuna en forma de solución líquida, suspensión, emulsión, liposoma, crema, gel o composición multifásica similar. Las soluciones y suspensiones se administran en forma de gotas. Las soluciones también se pueden administrar como una fina niebla con un atomizador nasal o con un inhalador nasal. Los geles se dispensan en pequeñas jeringas que contienen la dosis necesaria para una aplicación.
- La inhalación se realiza con una composición inmunogénica o una vacuna en forma de soluciones, suspensiones y polvos; estas formulaciones se administran mediante un aerosol o un inhalador de polvo seco. Los polvos compuestos se administran con insufladores o sopladores.
- Otro aspecto más de la presente invención es el uso de cepas mutadas de *Bordetella* que comprenden al menos una mutación del gen *ptx*, una delección o mutación del gen *dnt* y un gen *ampG* heterólogo para la preparación de una vacuna multivalente para tratar enfermedades respiratorias. En este sentido, la cepa atenuada mutada de *Bordetella* descrita anteriormente, se puede utilizar como una plataforma de expresión heteróloga para transportar antígenos heterólogos a la mucosa respiratoria. Por tanto, patógenos respiratorios tales como Neisseria, Pneumophila, yersinia, pseudomonas, micobacterias, influenza y similares pueden prevenir la infección usando el BPZE1 como portador.
- También se incluye en la presente invención el uso de cepas vivas mutadas atenuadas de *Bordetella* descritas en la presente memoria para la fabricación de una vacuna para el tratamiento o prevención de infección por *Bordetella*. En este sentido, la vacuna se puede utilizar para el tratamiento simultáneo o la prevención de una infección por *B. pertussis* y *B. parapertussis*.
- También se incluye en la presente invención el uso de la vacuna para proporcionar inmunidad protectora rápida en caso de epidemia de *tos ferina*.
- La presente invención también abarca el uso de la vacuna para proporcionar una inmunidad protectora rápida, que aumenta durante al menos los dos meses siguientes a la vacunación.
- La vacuna o composición inmunogénica también se proporciona en un kit. El kit comprende la vacuna o composición inmunogénica y un folleto informativo que proporciona instrucciones para la inmunización.
- La presente invención también se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmune mediada por células T y particularmente una respuesta inmune mediada por CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, que comprende la administración de cepas vivas atenuadas de *Bordetella* de la invención en un mamífero no humano o un mamífero humano.
- Otra realización de la presente invención es un procedimiento para proteger a un mamífero contra una enfermedad causada por una infección por *Bordetella* que comprende administrar a dicho mamífero que necesita tal tratamiento una cepa mutada de *Bordetella* que comprende al menos una mutación del gen *ptx*, una eliminación o mutación del

gen *dnt*, y un gen *ampG* heterólogo. Este procedimiento abarca el tratamiento o la prevención de infecciones contra *Bordetella pertussis* y/o *Bordetella parapertussis*. En un aspecto, la cepa BPZE1 se usa en este procedimiento.

También se abarca por la presente invención un procedimiento para proporcionar una inmunidad protectora rápida contra una infección por *Bordetella* que comprende administrar a dicho mamífero que necesita tal tratamiento una cepa mutada de *Bordetella* que comprende al menos una mutación del gen *ptx*, una delección o mutación del gen *dnt*, y un gen *ampG* heterólogo. En un aspecto, la cepa BPZE1 se usa en este procedimiento.

Además, las cepas vivas mutadas atenuadas de *Bordetella* de la presente invención inducen inmunidad de la mucosa, así como inmunidad sistémica. Por tanto, en otro aspecto, la invención también se refiere a un procedimiento para inducir inmunidad de la mucosa y sistémica administrando a un mamífero que necesite dicho tratamiento las cepas vivas atenuadas de *Bordetella* de la presente invención. En un aspecto, la cepa BPZE1 se usa en este procedimiento.

Además de su papel en la prevención y/o tratamiento de infección por *Bordetella*, la cepa mutada de la invención se puede usar como vector, para portar al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga adicional que codifica un ARN (tal como ARN antisentido) o una proteína de interés. Esto significa que la cepa mutada lleva al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga adicional además del gen *ampG* heterólogo. En un aspecto, la proteína codificada por esta al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga adicional es una proteína para la que se desea la expresión en el tracto respiratorio. En otro aspecto, la proteína de interés es un antígeno, tal como un antígeno viral, bacteriano o tumoral, contra el cual se desea una respuesta inmune. Por tanto, la cepa mutada de *Bordetella* también se puede usar como vacuna que lleva al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga adicional. Las definiciones dadas anteriormente para la administración de la vacuna o composición inmunogénica también se aplican a una vacuna que comprende una cepa mutada de *Bordetella* que lleva al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga adicional. Ejemplos de proteínas heterólogas son antígenos de patógenos que causan infecciones o enfermedades asociadas con las vías respiratorias: poliomielitis, influenza (*virus de la gripe* de la familia *Orthomyxoviridae*) o antígenos de neumococo (como *Streptococcus pneumoniae*).

## Ejemplos

### Materiales y procedimientos

#### Ejemplo 1 - Cepas de *Bordetella* y condiciones de crecimiento

Las cepas de *B. pertussis* utilizadas en este estudio se derivaron todas de *B. pertussis* BPSM [13] y *B. parapertussis* es un derivado resistente a la estreptomina de la cepa 12822 (proporcionado amablemente por el Dr. N. Guiso, Instituto Pasteur Paris, Francia). Todas las cepas de *Bordetella* se cultivaron en agar Bordet-Gengou (BG) (Difco, Detroit, Michigan) suplementado con 1 % de glicerol, 20 % de sangre de oveja defibrinada y 100 µg/mL de estreptomina. Para los ensayos de adherencia a la célula, el crecimiento exponencial de *B. pertussis* se inoculó a una densidad óptica de 0,15 a 600 nm en 2,5 mL de medio Stainer-Scholte modificado [14] que contenía 1 g/L de heptakis (2,6-di-o-metil) β-ciclodextrina (Sigma) y complementado con 65 µCi/mL L- [<sup>35</sup>S] metionina más L- [<sup>35</sup>S] cisteína (NEN, Boston, Mass.) y se cultivó durante 24 h a 37 °C. A continuación, las bacterias se recolectaron por centrifugación, se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) a la densidad deseada.

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

Para construir BPZE1 de *B. pertussis*, el gen *ampG* de *B. pertussis* se reemplazó por *ampG* de *Escherichia coli* utilizando intercambio alélico. Un fragmento de PCR que se llama *met* y se ubica en la posición 49.149 a 49.990 del genoma de *B. pertussis* ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/B\\_pertussis/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_pertussis/)), corriente arriba del gen *ampG* de *B. pertussis*, se amplificó utilizando oligonucleótidos A: 5'-TATAAATCGATATTCCTGCTGGTTTCGTTCTC-3' (SEQ ID No:5) y B: 5'-TATAGCTAGCAAGTTGGGAAACGACACCAC-3' (SEQ ID No: 6), y ADN genómico BPSM de *B. pertussis* [13] como plantilla. Este fragmento de 634 pb se insertó en Topo PCR II (Invitrogen Life Technology, Groningen, Países Bajos) y luego se cortó como un fragmento *Clal-NheI* y se insertó en pBP23 digerido con *Clal* y *NheI* [50], un vector suicida que contiene el gen *ampG* de *E. coli* flanqueado por un ADN de 618 pb de *B. pertussis* (desde la posición 50.474 a 51.092 del genoma de *B. pertussis*) y 379 pb (de la posición 52.581 a 52.960 del genoma de *B. pertussis*) en el extremo 5' y 3' del *ampG* de *E. coli*, respectivamente. El plásmido resultante se transfirió a SM10 de *E. coli* [51], que luego se conjugó con BPSM, y dos sucesivos eventos de recombinación homóloga se seleccionaron como se describe [52]. Se criaron diez colonias individuales mediante PCR de la siguiente manera. Las colonias se suspendieron en 100 µL de H<sub>2</sub>O, se calentaron durante 20 min. a 95 °C y se centrifugaron durante 5 min a 15.000 x g. Luego se usó un µL de sobrenadantes como molde para PCR usando los oligonucleótidos A y C: 5'-TAAGAAGCAAATAAGCCAGGCATT-3' (SEQ ID No: 7) para verificar la presencia de *ampG* de *E. coli* y usando oligonucleótidos D: 5'-TATACCATGGCGCCGCTGCTGGTGGTGGGC-3' (SEQ ID No:8) y E: 5'-TATATCTAGACGCTGGCCGTAACCTTAGCA-3' (SEQ ID No: 9) para verificar la ausencia de *ampG* en *B. pertussis*. Una de las cepas que contiene *ampG* de *E. coli* y no contiene *ampG* de *B. pertussis* luego se seleccionó, y se secuenció todo el locus *ampG*. Esta cepa se usó luego para ingeniería adicional.

Los genes *ptx* se delecionaron del cromosoma de esta cepa como se describe [21] y luego se reemplazaron por mutantes *ptx* que codifican una PTX inactiva. El fragmento EcoRI que contiene el locus mutado *ptx* de pPT-RE [16] se insertó en el sitio EcoRI de pJQ200mp18rpsI [53]. El plásmido resultante se integró en el cromosoma de *B. pertussis* en el locus *ptx* por recombinación homóloga después de la conjugación a través de SM10 de *E. coli*. El locus *ptx* en el cromosoma de la cepa resultante de *B. pertussis* se secuenció para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas. La producción de toxina se analizó mediante inmunotransferencia utilizando una mezcla de anticuerpos monoclonales IB7 [54] específicos para la subunidad S1 y 11E6 [55] específicos para las subunidades S2 y S3 de PTX.

Finalmente, el gen *dnt* se delecionó de la cepa resultante de *B. pertussis* así como las regiones flanqueantes *dnt* se amplificaron mediante PCR utilizando ADN genómico de BPSM como molde y oligonucleótidos F: 5'-TATAGAATTCGCTCGGTTTCGCTGGTCAAG G-3' (SEQ ID No:10) y G: 5'-TATATCTAGAGCAATGCCGATTCATCTTTA-3'(SEQ ID No: 11) para la región corriente arriba de *dnt*, y H: 5'-TATATCTAGAGCGGCCTT TATTGCTTTTCC-3'(SEQ ID No: 12) e I: 5'-TATAAAGCTTCTCATGCACGCCG GCTTCTC-3'(SEQ ID No: 13) para la región corriente arriba de *dnt*, como cebadores. Los fragmentos de ADN de 799 pb y 712 pb resultantes se digirieron con *EcoRI/XbaI* y *XbaI/HindIII*, respectivamente, y se unieron entre sí utilizando el kit Fast Link (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI). El fragmento ligado se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos F e I, y luego el fragmento de PCR de 1.505 pb se insertó en pCR2.1-Topo (Invitrogen), se volvió a aislar del plásmido resultante como un fragmento *EcoRI* y se insertó en el único sitio *EcoRI* de pJQmp200rpsL18. El plásmido resultante se introdujo en *B. pertussis* mediante conjugación vía SM10 de *E. coli*. La eliminación exitosa del gen *dnt* mediante intercambio alélico se verificó mediante análisis de transferencia Southern en el ADN genómico de *B. pertussis* digerido con PvuII utilizando el fragmento de PCR correspondiente a la región corriente arriba de *dnt* como sonda. La sonda se marcó con digoxigenina (DIG) utilizando el kit de marcaje DIG Easy Hyb (Roche, Meylan, Francia). Los tamaños de las bandas de hibridación se determinaron a partir de la distancia de migración del marcador molecular III de ADN marcado con Dig (Roche). El locus *dnt* de esta cepa final, denominado BPZE1 se secuenció.

### Ejemplo 3 - Análisis de la producción de TCT.

Para la cuantificación sensible de la producción de TCT, los sobrenadantes del cultivo de *B. pertussis* cultivados a fase logarítmica se recogieron, se sometieron a extracción en fase sólida [15] y se derivatizaron con fenilisotiocianato (PITC, Pierce). Los derivados de feniltiocarbamilo (PTC) resultantes se separaron mediante HPLC de fase inversa usando una columna C8 (Perkin Elmer) y se detectaron a 254 nm. La cantidad de PTC-TCT de *B. pertussis* en cada muestra se determinó comparando el área del pico y el tiempo de elución con un estándar TCT procesado de manera idéntica.

### Ejemplo 4 - Ensayo de adherencia celular.

Para analizar las propiedades de adherencia de la cepa de *B. pertussis*, sus tasas de unión a la línea de la célula epitelial pulmonar humana A549 (ATCC n° CCL-185) y la línea de las células de macrófagos murinos J774 (ATCC n° TIB-67) se midieron como se describió anteriormente [16].

### Ejemplo 5 - Microscopía Electrónica de Transmisión.

El procedimiento de tinción de gota única negativa se utilizó como se describió anteriormente [17] con las siguientes modificaciones. 20 µL de una suspensión de aproximadamente 10<sup>9</sup> bacterias/mL se absorbieron durante 2 minutos sobre formas de rejillas de níquel recubiertas de carbón de formvard (malla 400; Electron Microscopy Sciences EMS, Washington, PA). Después de 30 segundos de secado al aire, las rejillas se tiñeron durante 2 minutos con 20 µL de ácido fosfotúngstico al 2 % (pH 7; EMS) y se examinaron después de secar al aire bajo un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi 7500, Japón) a 60 kvoltios y alta resolución.

### Ejemplo 6 - Infección intranasal y vacunación.

Las hembras Balb/C de 3 y 8 semanas de edad se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos, y todos los experimentos se llevaron a cabo según las directrices de la junta de estudios en animales del Instituto Pasteur de Lille. Los ratones se infectaron intranasalmente con aproximadamente 4x10<sup>6</sup> bacterias en 20 µL de PBS, y la cinética de UFC en los pulmones se midieron como se describió anteriormente [18]. Para la vacunación con aPV (Tetravac; Aventis-Pasteur, Francia), los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal (i.p.) con el 20 % de la dosis humana y se reforzaron un mes después con la misma dosis.

### Ejemplo 7 - Determinación de anticuerpos.

Se recogieron sueros y se estimaron los títulos de anticuerpos mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) como se describió anteriormente [18].

### Ejemplo 8 - Ensayos de citoquinas.

Se probaron células del bazo de ratones individuales en diferentes puntos de tiempo después de la inmunización para la producción de citoquinas *in vitro* en respuesta a la muerte por calor de BPSM de *B. pertussis* ( $10^6$  células/mL), 5,0 µg/mL de PTX (BPGR4 purificada de *B. pertussis* [19] como se describió previamente [20] y se inactivó por calor a 80 °C durante 20 minutos), 5,0 µg de hemaglutinina filamentosa (FHA, BPRA purificada de *B. pertussis* [21] como se describió previamente [22]), 5 µg/mL de concanavalina A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) o medio solo como control. Los sobrenadantes se eliminaron de los cultivos por triplicado después de 72 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> y las concentraciones de IFN-γ e IL-5 se determinaron mediante inmunoensayos (conjunto BD OptEIA, Pharmingen).

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

Se utilizó un modelo de ratón infantil (3 semanas de edad) [29] para comparar la eficacia de la vacunación con BPZE1 con la de la vacunación con la vacuna acelular de *pertussis* (aPv). Se infectaron intranasalmente ratones Balb/C hembras con aproximadamente  $1 \times 10^6$  de la cepa BPZE1 en 20 µL de PBS. Para la vacunación con aPv (Tetravac; Aventis-Pasteur, Francia), los ratones se inmunizaron intraperitonealmente con un 20 % de la dosis humana. Una, dos, tres o cuatro semanas después de la vacunación con BPZE1 o aPv, los ratones se desafiaron intranasalmente con la cepa virulenta BPSM/bctA-lacZ de *B. pertussis* [53]. Esta cepa es un derivado de BPSM resistente a la gentamicina que permite la discriminación con BPZE1 (sensible a gentamicina) en placas de agar Bordet-Gengou que contienen 10 µg/mL de gentamicina y 100 µg/mL de estreptomina (BGgs). El grupo de control corresponde a ratones sin tratamiento previo desafiados con BPSM/bctA-lacZ. Una semana después del desafío con la infección, los pulmones se extrajeron asépticamente, se homogenizaron y se colocaron en placas de BGgs para la determinación de las UFC como se describió anteriormente [18].

Los ratones se vacunaron con BPZE1 o aPv y se desafiaron con *B. pertussis* virulenta una, dos, tres o cuatro semanas después de la vacunación. Los recuentos de UFC del pulmón se determinaron 3 horas o 7 días después. Los resultados se expresan como UFC medias ( $\pm$  error estándar) de tres a cinco ratones por grupo. Los niveles de protección se calcularon para cada desafío con la infección como porcentajes medios de UFC de cada grupo en relación con la media de UFC en el grupo no inmunizado, 7 días después del desafío con la infección (Tablas 2 a 5).

#### Ejemplo 10 - Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron utilizando la prueba t de Student para datos no apareados y la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba posterior de Dunn (programa GraphPad Prism) cuando fue apropiado. Las diferencias se consideraron significativas en  $P \leq 0,05$ .

### 30 Resultados

#### Construcción de *B. pertussis* BPZE1

Se seleccionaron genéticamente tres factores de virulencia: citotoxina traqueal (TCT), toxina de pertussis (PTX) y toxina dermonecrótica (DNT).

La TCT es responsable de la destrucción de las células ciliadas en la tráquea de los huéspedes infectados [24, 25] y, por tanto, puede estar implicada en el síndrome de tos. TCT es un producto de degradación del peptidoglicano en la pared de la célula de las bacterias Gram-negativas, que generalmente lo internaliza en el citosol la proteína transportadora AmpG para reutilizado durante la biosíntesis de la pared de la célula. *AmpG* de *B. pertussis* es ineficaz en la internalización de productos de degradación de peptidoglicanos. Por lo tanto, se reemplazó el gen *ampG* de *B. pertussis* por el *ampG* de *E. coli*. La cepa resultante expresó menos del 1 % de actividad residual TCT (Figura 1).

PTX es un factor de virulencia importante responsable de los efectos sistémicos de infecciones por *B. pertussis* y está compuesto por un resto enzimáticamente activo, llamado S1, y un resto responsable de unirse a los receptores de las células diana (para una revisión, véase 26). Sin embargo, también es uno de los principales antígenos protectores, lo que nos ha llevado a reemplazar los genes naturales *ptx* mediante una versión mutada que codifica una toxina enzimáticamente inactiva. Esto se logró reemplazando la Arg-9 por Lys y Glu-129 mediante Gly en S1, dos residuos clave involucrados en la unión al sustrato y la catálisis, respectivamente. El intercambio alélico se utilizó para eliminar primero el operón de *ptx*, y luego insertar la versión mutada. La presencia de los análogos de toxinas relevantes en el sobrenadante del cultivo de *B. pertussis* se evaluaron mediante análisis de inmunotransferencia (Figura 2).

Finalmente, el intercambio alélico se utilizó para eliminar el gen *dnt* (Fig. 3). Aunque el papel de DNT en la virulencia de *B. pertussis* no está confirmado, se ha identificado como una toxina importante en las especies estrechamente relacionadas *Bordetella bronchiseptica* y muestra actividad letal tras la inyección de cantidades diminutas (para una revisión, véase 26).

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

Dado que algunas de las alteraciones genéticas en BPZE1 pueden afectar potencialmente la síntesis de la pared de la célula bacteriana, el tamaño y la forma, así como la tasa de crecimiento de BPZE1 *in vitro* se comparó con la de la cepa parental BPSM. La tasa de crecimiento de BPZE1 no difirió de la de BPSM (**Figura 4**), y no se detectaron diferencias en la forma o tamaño bacteriano entre BPZE1 y BPSM, como lo demuestra el análisis de microscopía electrónica (**Figura 5**). Sin embargo, la pared de la célula de BPZE1 parecía ser consistentemente algo más delgada que la de BPSM.

Para determinar si la ausencia o alteraciones de cualquiera de las toxinas objetivo en BPZE1 afecta las propiedades de adherencia de *B. pertussis*, las tasas de unión de BPZE1 se compararon con las de BPSM, utilizando la línea de la célula epitelial pulmonar humana A549 y la línea de las células de macrófagos murinos J774, como dos modelos de células que se utilizan a menudo para estudiar la adherencia de *B. pertussis*. No se observaron diferencias significativas en las capacidades de adherencia a ninguna línea de células entre las dos cepas (**Figura 6**).

#### **Atenuación de *B. pertussis* BPZE1**

Para determinar si las mutaciones introducidas en *B. pertussis* BPZE1 ha dado como resultado una atenuación, pero permite que el organismo colonice el tracto respiratorio, los ratones Balb/C se infectaron intranasalmente con BPZE1 o BPSM, y la colonización se siguió a lo largo del tiempo. BPZE1 fue capaz de colonizar y persistir en los pulmones de los ratones tanto tiempo como BPSM (**Figura 7**). Sin embargo, el pico de multiplicación observado 7 días después de la infección con BPSM estuvo ausente de manera constante en los ratones infectados con BPZE1. Los estudios realizados con cepas mutadas en genes de toxinas individuales indicaron que esto se debe a las mutaciones en el locus *ptx* (datos no mostrados). Cuando se examinaron los pulmones en busca de cambios histopatológicos e infiltración inflamatoria, se encontró que la infección con BPSM induce fuertes infiltrados peribronquiovasculares y un reclutamiento de células inflamatorias 7 días después de la infección, asociado con una fuerte hipertrofia de las células epiteliales bronquiolares (**Figura 8**). Por el contrario, no se observaron tales cambios en los animales infectados con BPZE1, y la histología de los ratones infectados con BPZE1 fue similar a la de los ratones de control que habían recibido PBS en lugar de las bacterias. La inflamación inducida por la infección por BPSM duró al menos dos meses (datos no mostrados). Estos resultados indican que las mutaciones introducidas en BPZE1 han dado como resultado una atenuación drástica, pero permiten que las bacterias colonicen y persistan en los pulmones.

#### **Desafío de protección contra *B. pertussis* después de la vacunación intranasal de ratones adultos con BPZE1**

Para evaluar la protección ofrecida por BPZE1, se comparó el efecto de una única administración intranasal de esta cepa en ratones Balb/C de 8 semanas de edad sobre la colonización posterior por la cepa de desafío de tipo salvaje BPSM con el de dos inmunizaciones i.p. con 1/5 de una dosis humana de aPV. Este protocolo de inmunización aPV se ha descrito como el mejor para correlacionar con la eficacia de la vacuna contra la tos ferina en ensayos clínicos en humanos [27, 28]. Como lo demuestra el aclaramiento total de los recuentos de colonias bacterianas en los pulmones siete días después del desafío con la infección, una única administración intranasal de BPZE1 y dos inmunizaciones ip con aPV proporcionaron niveles similares de protección (**Figura 9a**). Se encontraron altas cargas bacterianas en los ratones de control que habían recibido dos inyecciones de PBS en lugar de la vacuna.

#### **Protección contra el desafío con *B. pertussis* después de la vacunación intranasal de ratones lactantes con BPZE1**

Dado que los principales objetivos de las nuevas vacunas contra la *tos ferina* son lactantes pequeños, que no están protegidos con las vacunas disponibles actualmente, se desarrolló un modelo de ratón infantil (3 semanas) [29] y se utilizó para comparar la eficacia de la vacunación con BPZE1 con la de la vacunación con aPV. Una sola administración nasal de BPZE1 protegió completamente a ratones lactantes contra la infección por desafío (**Figura 9b**), ya que se observó un aclaramiento bacteriano completo en los pulmones una semana después de la exposición. Por el contrario, permanecieron cantidades sustanciales de bacterias en los animales vacunados con aPV una semana después de la infección por desafío. La diferencia en la carga bacteriana entre los ratones vacunados con BPZE1 y los ratones vacunados con aPV fue estadísticamente significativa, lo que indica que en el modelo de ratón infantil una sola administración intranasal con BPZE1 proporciona una mejor protección que dos administraciones sistémicas de aPV.

Además, se observó constantemente una fuerte reducción en la carga bacteriana de la cepa de desafío 3 horas después de la administración cuando los ratones habían sido inmunizados con BPZE1 en comparación con los animales inmunizados con aPV (**Figura 9c**), lo que indica que la vacunación con BPZE1 reduce la susceptibilidad a la infección mediante la cepa de desafío. Este efecto se observó tanto en ratones de 8 semanas como en lactantes. Por el contrario, aPV no tuvo ningún efecto sobre los recuentos bacterianos 3 horas después de la infección, en comparación con los ratones de control.

#### **Protección contra el desafío con *B. parapertussis* después de la vacunación intranasal con BPZE1**

Existe una creciente preocupación acerca de la infección por *B. parapertussis* en niños, especialmente en poblaciones inmunizadas [30, 31]. *B. parapertussis* causa un síndrome similar más leve de *tos ferina*, cuya

frecuencia probablemente se subestima en gran medida. Además, la incidencia de las infecciones por *B. parapertussis* han ido aumentando en las últimas décadas, posiblemente debido al hecho de que las vacunas contra la *tos ferina* se sabe que tienen una eficacia protectora muy baja o nula contra *B. parapertussis* [32, 33]. Por el contrario, la infección por *B. pertussis* recientemente se ha informado que protege contra la infección por *B. parapertussis* [34]. BPZE1 también se evaluó para la protección contra *B. parapertussis* utilizando el modelo de ratón infantil. Considerando que dos administraciones de aPV no proporcionaron ninguna protección contra *B. parapertussis*, como se informó anteriormente, una sola administración intranasal de BPZE1 proporcionó una fuerte protección, medida por el bajo número de recuentos de *B. parapertussis* en los pulmones de los ratones vacunados 1 semana después de la exposición (**Figura 9d**).

#### 10 Respuestas inmunes inducidas por la vacunación de BPZE1

Aunque los mecanismos de inmunidad protectora contra la infección por *B. pertussis* aún no se comprenden completamente, se ha demostrado una clara evidencia del papel de las células B y del IFN- $\gamma$  en ratones [28]. La vacunación con una dosis nasal de BPZE1 o dos administraciones ip de aPV indujo altos títulos de IgG sérica contra FHA, un antígeno de superficie principal de *B. pertussis* [35], también presente en aPV (**Figura 10a**). Siguiendo el desafío con *B. pertussis*, se midieron las respuestas anamnésicas positivas en animales vacunados con BPZE1 y aPV, como lo indica un aumento en los títulos de IgG anti-FHA, en comparación con las respuestas primarias antes de la infección por *B. pertussis*. El examen de las relaciones anti-FHA IgG1/IgG2a mostró que estas relaciones eran más altas después de la administración de aPV, característica de una respuesta de tipo Th2, que después de la vacunación con BPZE1. (**Figura 10b**). Aunque el anti-FHA-IgG1/IgG2a disminuyó después del desafío en los ratones vacunados con aPV, siguió siendo sustancialmente más alto que en los animales vacunados con BPZE1 después del desafío con *B. pertussis*.

El análisis de los patrones de citoquinas específicos del antígeno de *B. pertussis* inducidos por la vacunación con BPZE1 o aPV confirmaron que la administración de BPZE1 favorece una respuesta de tipo Th1 más fuerte que la vacunación con aPV. Esto se reveló por el hecho de que las proporciones de IFN- $\gamma$  sobre IL-5 producidas por esplenocitos estimulados con FHA o PT, o con el activador policlonal ConA, fueron significativamente mayores en ratones vacunados con BPZE1 que en ratones vacunados con aPV. (**Figura 10c**).

#### Inmunidad protectora de BPZE1 a lo largo del tiempo (de 1 semana a 4 semanas)

Como se muestra en las Tablas 1 a 5 a continuación, mientras que la administración de aPV proporcionó una protección limitada (reducción del 75 % de la carga bacteriana en comparación con ratones no vacunados a 1 semana) contra *B. pertussis*, una sola administración intranasal de BPZE1 ya proporcionaba un alto nivel de protección (reducción del 97,64 % de la carga bacteriana) contra una infección por desafío con *B. pertussis* realizada una semana después de la vacunación. Si la infección por desafío se produjo dos semanas después de la vacunación, el nivel de protección que se indujo por BPZE1 alcanzó más del 99,999 % en comparación con los ratones no vacunados y es significativamente superior a la protección inducida por la vacuna aPv (aproximadamente el 92 % en comparación con los ratones no vacunados). Por lo tanto, la eficacia de la vacuna de BPZE1 contra el desafío con *B. pertussis* ya es significativo una semana después de la vacunación y aumentará durante al menos los próximos dos meses.

**Tabla 1 : Cinética de la eficacia de las vacunas contra el desafío con *B. pertussis* en ratones lactantes.**

Tiempo entre la vacunación y el desafío	Tiempo entre la recuperación de los pulmones y el desafío	Log10 ufc / pulmones de ratones		
		Sin tratamiento	vacunado aPv	vacunado BPZE1
1 semana	3 horas	5,71 $\pm$ 0,03	5,8 $\pm$ 0,07	5,74 $\pm$ 0,01
	7 días	6,71 $\pm$ 0,06	5,97 $\pm$ 0,20	4,86 $\pm$ 0,35
2 semanas	3 horas	5,77 $\pm$ 0,10	5,60 $\pm$ 0,02	5,49 $\pm$ 0,05
	7 días	6,49 $\pm$ 0,08	5,31 $\pm$ 0,16	3,22 $\pm$ 0,33
3 semanas	3 horas	6,03 $\pm$ 0,11	5,88 $\pm$ 0,04	5,33 $\pm$ 0,08

	<b>7 días</b>	6,58 ± 0,09	5,62 ± 0,11	3,14 ± 0,38
<b>4 semanas</b>	<b>3 horas</b>	6,31 ± 0,01	6,15 ± 0,02	5,83 ± 0,05
	<b>7 días</b>	6,36 ± 0,04	5,21 ± 0,11	1,83 ± 0,46

**Tabla 2: Nivel de protección de ratones vacunados con aPv y vacunados con BPZE1 en comparación con ratones no vacunados en la semana 1.**

<b>Ratones no vacunados</b>	<b>Número de bacterias en los pulmones</b>	<b>Número medio de bacterias</b>		
No vacunado 1	4,7 x 10 <sup>6</sup>	5,36.10 <sup>6</sup>		
No vacunado 2	3,8 x 10 <sup>6</sup>			
No vacunado 3	8,2 x 10 <sup>6</sup>			
No vacunado 4	4,1 x 10 <sup>6</sup>			
No vacunado 5	6 x 10 <sup>6</sup>			
	<b>Número de bacterias en los pulmones</b>	<b>Porciento de bacterias restantes <sup>(1)</sup></b>	<b>Porciento medio de bacterias restantes</b>	<b>Nivel de protección</b>
<b>Ratones vacunados con aPv</b>				
aPv1	1,95 x 10 <sup>6</sup>	36,38	5 %	75 %
aPv2	2,9 x 10 <sup>6</sup>	54,1		
aPv3	2,9 x 10 <sup>5</sup>	5,41		
aPv4	3,6 x 10 <sup>5</sup>	6,72		
aPv5	1,2 x 10 <sup>6</sup>	22,39		
<b>Ratones vacunados con BPZE1</b>				
BPZE1-1	3,2 x 10 <sup>5</sup>	5,97	2,36 %	97,64 %
BPZE1-2	2 x 10 <sup>4</sup>	0,004		
BPZE1-3	6 x 10 <sup>4</sup>	1,12		
<sup>(1)</sup> Porciento de bacterias restantes = número de bacterias para cada ratón en particular/número medio de bacterias de todos los ratones no vacunados				

**Tabla 3: Nivel de protección de los ratones vacunados con aPv y con BPZE1 en comparación con los ratones no vacunados en la semana 2.**

Ratones no vacunados	Número de bacterias en los pulmones	Número medio de bacterias		
No vacunado 1	$5 \times 10^6$	3,34 x 10 <sup>6</sup>		
No vacunado 2	$3,6 \times 10^6$			
No vacunado 3	$1,7 \times 10^6$			
No vacunado 4	$2,4 \times 10^6$			
No vacunado 5	$4 \times 10^6$			
	Número de bacterias en los pulmones	Porcentaje de bacterias restantes <sup>(1)</sup>	Porcentaje medio de bacterias restantes	Nivel de protección
<b>Ratones vacunados con aPv</b>				
aPv1	$9,5 \times 10^4$	2,84	8,11 %	91,89 %
aPv2	$2,9 \times 10^5$	8,68		
aPv3	$1 \times 10^5$	2,99		
aPv4	$6,8 \times 10^5$	20,36		
aPv5	$1,9 \times 10^5$	5,69		
<b>Ratones vacunados con BPZE1</b>				
BPZE1-1	$9,5 \times 10^3$	$2,8 \times 10^{-3}$	1,03 x10 <sup>-3</sup> %	99,999 %
BPZE1-2	450	$1,35 \times 10^{-4}$		
BPZE1-3	3500	$1,05 \times 10^{-3}$		
BPZE1-4	500	$1,5 \times 10^{-4}$		
<sup>(1)</sup> Porcentaje de bacterias restantes = número de bacterias para cada ratón en particular/número medio de bacterias de todos los ratones no vacunados				

**Tabla 4: Nivel de protección de los ratones vacunados con aPv y con BPZE1 en comparación con los ratones no vacunados en la semana 3.**

Ratones no vacunados	Número de bacterias en los pulmones	Número medio de bacterias		
No vacunado 1	$1,8 \times 10^6$	4,04 x 10 <sup>6</sup>		
No vacunado 2	$5,75 \times 10^6$			
No vacunado 3	$4,7 \times 10^6$			
No vacunado 4	$3,2 \times 10^6$			
No vacunado 5	$4,75 \times 10^6$			

ES 2 821 830 T3

	Número de bacterias en los pulmones	Por ciento de bacterias restantes <sup>(1)</sup>	Por ciento medio de bacterias restantes	Nivel de protección
<b>Ratones vacunados con aPv</b>				
aPv1	1,99 x 10 <sup>5</sup>	4,94	11,26 %	88,74 %
aPv2	6 x 10 <sup>5</sup>	14,85		
aPv3	6 x 10 <sup>5</sup>	14,85		
aPv4	4,2 x 10 <sup>5</sup>	10,40		
<b>Ratones vacunados con BPZE1</b>				
BPZE1-1	3640	9,01 x 10 <sup>-4</sup>	8,65 x 10 <sup>-4</sup> %	99,999 %
BPZE1-2	9720	2,4 x 10 <sup>-3</sup>		
BPZE1-3	300	7,43 x 10 <sup>-5</sup>		
BPZE1-4	340	8,42 x 10 <sup>-5</sup>		
<sup>(1)</sup> Por ciento de bacterias restantes = número de bacterias para cada ratón en particular/número medio de bacterias de todos los ratones no vacunados				

**Tabla 5: Nivel de protección de los ratones vacunados con aPv y con BPZE1 en comparación con los ratones no vacunados en la semana 4.**

Ratones no vacunados	Número de bacterias en los pulmones	Número medio de bacterias		
No vacunado 1	2,1 x 10 <sup>6</sup>	2,36 x 10 <sup>6</sup>		
No vacunado 2	2,2 x 10 <sup>6</sup>			
No vacunado 3	3,1 x 10 <sup>6</sup>			
No vacunado 4	2,6 x 10 <sup>6</sup>			
No vacunado 5	1,8 x 10 <sup>6</sup>			
	Número de bacterias en los pulmones	Por ciento de bacterias restantes <sup>(1)</sup>	Por ciento medio de bacterias restantes	Nivel de protección
<b>Ratones vacunados con aPv</b>				
aPv1	2,52 x 10 <sup>5</sup>	10,68	7,76 %	92,24 %
aPv2	3,28 x 10 <sup>5</sup>	13,90		
aPv3	1,04 x 10 <sup>5</sup>	4,41		
aPv4	8,4 x 10 <sup>5</sup>	3,56		
aPv5	1,48 x 10 <sup>5</sup>	6,27		
<b>Ratones vacunados con BPZE1</b>				
BPZE1-1	190	8,05 x 10 <sup>-5</sup>	7,13 x 10 <sup>-5</sup> %	99,999 %
BPZE1-2	0	0		
BPZE1-3	110	4,66 x 10 <sup>-5</sup>		
BPZE1-4	320	1,36 x 10 <sup>-4</sup>		

BPZE1-5	220	9,32 x 10 <sup>-5</sup>		
(1) Por ciento de bacterias restantes = número de bacterias para cada ratón en particular/número medio de bacterias de todos los ratones no vacunados				

## Discusión

La *tos ferina* es la primera enfermedad infecciosa cuya incidencia está aumentando en países con alta cobertura vacunal. Esta situación paradójica probablemente esté relacionada con los cambios epidemiológicos observados desde la introducción masiva de vacunas de alta eficacia. A diferencia de la era previa a la vacunación, los casos de adolescentes y adultos con *tos ferina* ahora son cada vez más frecuentes. Aunque generalmente no pone en peligro la vida en ese grupo de edad, los adultos infectados con *B. pertussis* son un reservorio importante de infección de los niños muy pequeños, demasiado pequeños para protegerlos con la vacunación. La vacunación temprana, posiblemente al nacer, sería por tanto muy deseable, pero se ve obstaculizada por la inmadurez del sistema inmunológico de los recién nacidos y los lactantes. Sin embargo, el hecho de que una infección por *B. pertussis*, incluso muy temprano en la vida, es capaz de inducir una fuerte respuesta Th1 en los bebés [12] nos impulsó a desarrollar una vacuna de la cepa viva atenuada de *B. pertussis* que se administrará por vía nasal como alternativa a las vacunas disponibles actualmente.

En base a las infecciones experimentales de primates, Huang y otros ya en 1962 había llegado a la conclusión de que la máxima protección contra la tos ferina probablemente es mejor seguida de una inoculación con *B. pertussis* [36]. En medicina veterinaria, cepas atenuadas de *Bordetella* se han utilizado para vacunar contra la bordetelosis en perros y lechones. Una cepa viva atenuada de *Bordetella bronchiseptica* se ha demostrado que proporciona una fuerte protección contra la tos de las perreras en perros [37] después de la administración nasal. Esta protección se observó tan pronto como 48 h después de la vacunación. La vacunación intranasal *B. bronchiseptica* viva atenuada también se ha demostrado que protege contra la rinitis atrófica en lechones de dos días de edad [38], lo que indica que en una forma viva atenuada las vacunas con *Bordetella* pueden ser muy activas en animales recién nacidos.

Intentos previos de atenuar genéticamente a *B. pertussis* como candidata a vacuna viva han tenido un éxito bastante limitado. En base a una estrategia utilizada para la atenuación exitosa de cepas de vacunas de *Salmonella* [39], Roberts y otros han deletado el gen *aroA* de *B. pertussis* [40]. El mutante *aroA* de hecho estaba muy atenuado, pero también había perdido su capacidad de colonizar el tracto respiratorio de los animales vacunados por vía intranasal e indujo inmunidad protectora sólo después de administraciones repetidas de dosis altas. Se aprovechó el conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la virulencia de *B. pertussis* y se desarrolló la cepa BPZE1 altamente atenuada. Esta cepa contiene alteraciones genéticas que conducen a la ausencia o inactivación de tres toxinas principales, PTX, TCT y DNT. Por el contrario al mutante *aroA*, esta cepa fue capaz de colonizar el tracto respiratorio del ratón y proporcionar protección completa después de una sola administración intranasal. La protección en ratones adultos fue indistinguible de la inducida por dos administraciones de 1/5 de una dosis humana de aPV. Sin embargo, se observó una diferencia importante en ratones lactantes, en los que una sola administración de BPZE1 protegió completamente, mientras que aPV solo ofreció protección parcial. En el contexto de las dificultades para inducir la protección en los lactantes con las vacunas disponibles en la actualidad en una etapa temprana de la vida, estos resultados brindan esperanzas para el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación que se puedan usar en los niños muy pequeños, posiblemente al nacer. Además, BPZE1 protegió contra *B. parapertussis*, mientras que aPV no lo hizo. Por lo tanto, el uso de BPZE1 también debería tener un impacto en la incidencia de tos ferina causada por *B. parapertussis* en bebés.

Aunque el reciente reemplazo de las vacunas de células enteras de primera generación por nuevos aPV en muchos países han reducido significativamente las reacciones adversas sistémicas observadas con las vacunas de células enteras, no ha eliminado la necesidad de vacunas repetidas para lograr protección. Esto hace que sea poco probable obtener protección en niños muy pequeños (<6 meses) que presentan el mayor riesgo de desarrollar una enfermedad grave. Además, el uso generalizado de aPV ha revelado nuevos problemas imprevistos. La administración repetida de aPV puede provocar una gran inflamación en el lugar de la inyección [41], lo que no se observó con las vacunas de células enteras. En aproximadamente el 5 % de los casos, esta inflamación afecta a casi toda la extremidad y dura más de una semana. Aunque todavía no se ha caracterizado el mecanismo de esta inflamación, se ha propuesto que se debe a una reacción de hipersensibilidad de Arthus provocada por niveles elevados de anticuerpos inducidos por la inmunización primaria [42]. Sin embargo, también podría estar relacionado con el sesgo Th2 de la respuesta inmune, ya que, en comparación con las vacunas de células enteras, la administración de aPV induce más citoquinas de tipo Th2 en niños vacunados [10] y provoca un retraso en el desarrollo de Th1 (Mascart y otros, en preparación). El retraso en la maduración de la función Th1 se ha asociado con un riesgo de atopia en individuos predispuestos genéticamente [33]. Los dos mecanismos no se excluyen mutuamente. En comparación con aPV, la respuesta inmune a la administración de BPZE1 está menos sesgada hacia el brazo Th2, y dado que BPZE1 se administra por vía de la mucosa, no puede ocurrir ninguna reacción de inflamación.

El uso de bacterias vivas atenuadas como vacunas plantea el problema de su bioseguridad. Como tales, se rigen por las directivas y directrices para organismos modificados genéticamente susceptibles de ser liberados al medio

ambiente. Estas directrices y directivas describen varios objetivos que se deben cumplir, incluida la identificación de peligros y la evaluación de riesgos ambientales [44]. Es necesario considerar cuidadosamente la patogenicidad potencial, especialmente en individuos inmunodeprimidos, como los infectados por el VIH. La biología natural de *B. pertussis* es particularmente interesante en ese sentido. Aunque la tos ferina en sujetos infectados por el VIH se ha descrito ocasionalmente, es bastante rara en pacientes con SIDA [45]. En su forma genéticamente atenuada, *B. pertussis* por lo tanto, no se esperaría que causara problemas importantes en los niños infectados por el VIH, especialmente si el SIDA grave es un criterio de exclusión, como lo es para muchas vacunas. La colonización de *B. pertussis* se limita estrictamente al epitelio respiratorio, sin diseminación extrapulmonar de la bacteria, lo que naturalmente excluye la bacteriemia sistémica de la vacuna de la cepa BPZE1. Si, no obstante, se produjeran problemas de seguridad imprevisibles, la vacuna de la cepa se puede eliminar fácilmente mediante el uso de antibióticos macrólidos, como la eritromicina, a la que esencialmente todos los aislados de *B. pertussis* son muy sensibles.

Otra preocupación, como para cualquier vacuna viva, es la posible liberación de la vacuna de la cepa en el medio ambiente y las consecuencias de tal liberación. *B. pertussis* es un patógeno estrictamente humano y no existe un vector o reservorio animal. Además, a diferencia de *B. bronchiseptica*, la supervivencia del tipo salvaje de *B. pertussis* en el medio ambiente es extremadamente limitado [46]. La tos ferina sólo se transmite al toser y no parece haber un portador asintomático [47]. La tos no se puede evaluar en los modelos de ratón utilizados en este estudio. Sin embargo, debido a la naturaleza de las alteraciones genéticas en BPZE1, en particular la fuerte reducción de TCT y la inactivación genética de PTX, no se esperaría que esta cepa indujera tos. Se ha demostrado que la PTX activa es necesaria para la inducción de la tos en un modelo de rata con tos, aunque se desconoce el mecanismo [48]. No obstante, si la vacuna de la cepa se transmitiera a personas no vacunadas, en el peor de los casos esto daría lugar a una mayor cobertura de la vacuna. Por lo tanto, las consecuencias de cada uno de estos peligros potenciales se pueden calificar como insignificantes y se pueden controlar fácil y rápidamente mediante un tratamiento con antibióticos si es necesario.

Las ventajas del uso de BPZE1 incluyen los costos de producción relativamente bajos, lo que lo hace especialmente atractivo para los países en desarrollo, su modo de administración fácil y seguro sin agujas y su potencial para inducir inmunidad de la mucosa además de inmunidad sistémica. Aunque el papel de la inmunidad de la mucosa contra *pertussis* sorprendentemente no se ha abordado mucho, el hecho de que *B. pertussis* es un patógeno estrictamente de las mucosas, es por lo que sea probable que las respuestas inmunitarias de las mucosas contribuyan significativamente a la protección. Ninguna de las vacunas disponibles actualmente induce una respuesta de la mucosa significativa.

Otras ventajas del uso de BPZE1 en vacunación son:

- la rápida respuesta inmune protectora obtenida después de una sola dosis intranasal de BPZE1, ya que la inducción de la inmunidad se puede detectar 1 semana después de la vacunación,
- un aumento de la inmunidad protectora durante al menos los dos meses siguientes a la vacunación, y
- la inmunidad protectora completa, ya que 2 semanas después de la vacunación se obtiene un nivel de protección superior al 99,999 %.

El uso de *B. pertussis* viva atenuada para la vacunación de las mucosas ofrece otra ventaja. *B. pertussis* se puede utilizar para la presentación de antígenos heterólogos a la mucosa respiratoria (para una revisión, véase 49). Por tanto, el uso de BPZE1 como plataforma de expresión heteróloga puede ser útil para la generación de vacunas multivalentes contra una variedad de patógenos respiratorios. Sin embargo, dado que la administración intranasal de BPZE1 también induce fuertes respuestas inmunes sistémicas, como se muestra aquí por los altos niveles de anticuerpos anti-FHA y de la producción de IFN- $\gamma$  específico de antígeno, también se puede usar para la producción de antígenos para los que se desean respuestas inmunes.

## Referencias

1. WHO (2004) The world health report 2004-changing history, Geneva, WHO.
2. Das P (2002) Whooping cough makes global comeback. Lancet ii: 322.
3. Tan T, Trindade E, Skowronski D (2005) Epidemiology of Pertussis. Pediatr Infect Dis J 24: S10-S18.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis. Disponible: <http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/pert.pdf> a través de Internet.
5. Wirsing von König CH, Halperin S, Riffelmann M, Guiso N (2002) Pertussis of adults and infants. Lancet Infect Dis 2: 744-750.
6. Lewis DB, Yu CC, Meyer J, English BK, Kahn SJ, y otros (1991) Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin-4 and interferon- $\gamma$  production by neonatal T cells. J Clin Invest 87: 194-202.

7. Siegrist CA (2001) Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine*. 19: 3331-3346.
8. Mills KHG (2001) Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect* 3: 655-677.
9. Lewis DB, Larsen A, Wilson CB (1986) Reduced interferon- $\gamma$  mRNA levels in human neonates. *J Exp Med* 163: 1018-1023.
- 5 10. Ausiello CM, Urbani F, La Sala A, Lande R, Cassone A (1997) Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination in infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infect Immun* 65: 2168-2174.
11. Wirsing von Konig CH, Postels-Multani S, Bock HL, Schmitt HJ (1995) Pertussis in adults: frequency of transmission after household exposure. *Lancet* 346: 1326-1329.
- 10 12. Mascart F, Verscheure V, Malfroot A, Hainaut M, Piérard D, y otros (2003) *Bordetella pertussis* infection in 2-months-old infants promotes Type 1 T cell responses. *J Immunol* 170: 1504-1509.
13. Menozzi FD, Mutombo R, Renaud G, Gantiez C, Hannah JH, y otros (1994) Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 62: 769-778.
- 15 14. Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y (1983) Effect of heptakis (2,6-O-dimethyl)-beta-cyclodextrin on the production of pertussis toxin by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 41: 1138-1143.
15. Cookson BT, Cho H-L, Herwaldt LA, Goldman WE (1989) Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 57: 2223-2229.
16. Alonso S, Pethe K, Mielcarek N, Raze D, Loch C (2001) Role of ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun* 69: 6038-6043.
- 20 17. Collyn F, Lety MA, Nair S, Escuyer V, Ben Younes A, y otros (2002) *Yersinia pseudotuberculosis* harbors a type IV pilus gene cluster that contributes to pathogenicity. *Infect Immun* 70: 619-620.
18. Mielcarek N, Cornette J, Schacht AM, Pierce RJ, Loch C, y otros (1997) Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen. *Infect Immun* 65: 544-550.
- 25 19. Loch C, Geoffroy MC, Renaud G (1992) Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families. *EMBO J* 11: 3175-3183.
20. Sekura RD, Fish F, Manclark CR, Meade B, Zhang YL (1983) Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 258: 14647-14651.
- 30 21. Antoine R, Loch C (1990) Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect Immun* 58: 1518-1526.
22. Menozzi FD, Gantiez C, Loch C (1991) Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* 62: 59-64.
- 35 23. Loch C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F (2001) *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* 4: 82-89.
24. Heiss LN, Flak TA, Lancaster JR, McDaniel ML, Goldman WE (1993) Nitric oxide mediates *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin damage to the respiratory epithelium. *Infect Agents Dis* 2: 173-177.
- 40 25. Goldman WE, Cookson BT (1988) Structure and functions of the *Bordetella* tracheal cytotoxin. *Tokai J Exp Clin Med* 13 Supl: 187-191.
26. Loch C, Antoine R (1999) *Bordetella pertussis* protein toxins. In: Alouf JE, Freer JH, editors. *Comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. Academic Press, páginas 130-146.
27. Guiso N, Capiou C, Carletti G, Poolman J, Hauser P (1999) Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine* 17: 2366-2376.
- 45 28. Mills KH, Ryan M, Ryan E, Mahon BP (1998) A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 66: 594-602.

29. Roduit C, Bozzotti P, Mielcarek N, Lambert PH, Del Giudice G, y otros (2002) Immunogenicity and protective efficacy of neonatal immunization against *Bordetella pertussis* in a murine model: Evidence for early control of Pertussis. *Infect Immun* 70: 3521-3528.
- 5 30. He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, Mertsola J (1998) Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA* 280: 635-637.
31. Watanabe M, Nagai M (2004) Whooping cough due to *Bordetella parapertussis*: an unresolved problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2: 447-454.
- 10 32. Mastrantonio P, Stefanelli P, Giuliano M, Herrera Rojas Y, Ciofi degli Atti M, y otros (1998) *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. *J Clin Microbiol* 36: 999-1002.
33. Liese JG, Renner C, Stojanov S, Belohradsky BH, Munich Vaccine Study Group. (2003) Clinical and epidemiological picture of *B. pertussis* and *B. parapertussis* infections after introduction of acellular pertussis vaccines. *Arch Dis Child* 88: 684-687.
- 15 34. Watanabe M, Nagai M (2001) Reciprocal protective immunity against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a murine model of respiratory infection. *Infect Immun* 69: 6981-6986.
35. Loch C, Bertin P, Menozzi FD, Renaud G (1993) The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* 9: 653-660.
36. Huang CC, Chen PM, Kuo JK, Chui WH, Lin ST, y otros (1962) Experimental whooping cough. *N Engl J Med* 266: 105-111.
- 20 37. Bey RF, Shade FJ, Goodnow RA, Johnson RC (1981) Intranasal vaccination of dogs with live avirulent *Bordetella bronchiseptica*: correlation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis. *Am J Vet Res* 42: 1130-1132.
38. De Jong MF (1987) Prevention of atrophic rhinitis in piglets by means of intranasal administration of a live non-AR-pathogenic *Bordetella bronchiseptica* vaccine. *Vet Q* 9: 123-133.
- 25 39. Hoiseth SK, Stocker BAD (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238 - 239.
40. Roberts M, Maskell D, Novotny P, Dougan G (1990) Construction and characterization in vivo of *Bordetella pertussis* *aroA* mutants. *Infect Immun* 58: 732-739.
- 30 41. Rennels MB (2003) Extensive swelling reactions occurring after booster doses of diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccines. *Semin Pediatr Infect Dis* 14: 196-198.
42. Robbins JB, Schneerson R, Trollfors B, Sato H, Sato Y, y otros (2005) The diphtheria and pertussis components of diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine should be genetically inactivated mutant toxins. *J Infect Dis* 191: 81-88.
- 35 43. Holt PG, Clough JB, Holt BJ, Baron-Hay MJU, Rose AH, y otros (1992) Genetic "risk" for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence. *Clin Exp Allergy* 22: 1093-1099.
44. Favre D, Viret JF (2006) Biosafety evaluation of recombinant live oral bacterial vaccines in the context of European regulation. *Vaccine*. 1 de Mayo;24(18):3856-64.
45. Cohn SE, Knorr KL, Gilligan PH, Smiley ML, Weber DJ (1993) Pertussis is rare in human immunodeficiency virus disease. *Am Rev Respir Dis* 147: 411-413.
- 40 46. Porter JF, Wardlaw AC (1993) Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients. *FEMS Microbiol Lett* 110: 33-36.
47. Linnemann CCJr, Bass JW, Smith MHD (1968) The carrier state in pertussis. *Am J Epidemiol* 88: 422-427.
48. Parton R, Hall E, Wardlaw AC (1994) Responses to *Bordetella pertussis* mutant strains and to vaccination in the coughing rat model of pertussis. *J Med Microbiol* 40: 307-312.
- 45 49. Mielcarek N, Alonso S, Loch C (2001) Nasal vaccination using live bacterial vectors. *Adv Drug Del Rev* 51: 55-69.
50. Lyon RS, Engle JT, Goldman WE. Manuscript in preparation

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

## REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende una cepa viva, atenuada y mutada de *Bordetella pertussis* que comprende al menos una mutación del gen (*ptx*) de la toxina de *pertussis* que codifica una toxina de *pertussis* enzimáticamente inactiva (PTX), una delección del gen (*dnt*) de la toxina dermonecrótica o una mutación del gen *dnt* que codifica una toxina dermonecrótica enzimáticamente inactiva (DNT), y un gen *ampG* heterólogo que reemplaza al gen *ampG* de *Bordetella*, y un excipiente, vehículo y/o portador farmacéuticamente adecuado, en la que la cepa es capaz de colonizar e inducir inmunidad protectora en un sujeto, en la que el reemplazo del gen *ampG* de *Bordetella* con el gen *ampG* heterólogo origina que la cepa de *Bordetella pertussis* exprese menos del 5 % de la actividad de la citotoxina traqueal (TCT) que la expresada por una cepa de *Bordetella pertussis* que no tiene su gen *ampG* nativo reemplazado por el gen *ampG* heterólogo.
2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el gen *ampG* de *Bordetella* es reemplazado por un gen *ampG* de *Escherichia coli*, un gen *ampG* de *Salmonella*, un gen *ampG* de *Enterobacteriaceae*, un gen *ampG* de *Pseudomonas*, un gen *ampG* de *Moraxella*, un gen *ampG* de *Helicobacter*, un gen *ampG* de *Stenotrophomonas* o un gen *ampG* de *Legionella*.
3. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la sustitución del gen *ampG* de *Bordetella* con el gen *ampG* heterólogo origina que la cepa de *Bordetella pertussis* exprese menos del 1 % de la actividad de citotoxina traqueal (TCT) que la expresada por una cepa de *Bordetella pertussis* que no tiene su gen *ampG* nativo reemplazado por el gen *ampG* heterólogo.
4. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha cepa mutada de *Bordetella pertussis* comprende una delección del gen *dnt*.
5. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha cepa mutada de *Bordetella pertussis* comprende un gen *dnt* mutado que codifica una proteína inhibida enzimáticamente, y en la que dicho gen *dnt* mutado está mutado por mutación puntual o por inserción de una secuencia genética o plásmido que interrumpe el marco de lectura abierto del gen *dnt*.
6. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es para administración intranasal o inhalación.
7. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es una vacuna contra infecciones provocadas por especies de *Bordetella*.
8. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, que es una vacuna profiláctica contra infecciones provocadas por especies de *Bordetella*.
9. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que la especie de *Bordetella* es *B. pertussis* o *B. parapertussis*.
10. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que es para administración a mamíferos que necesitan una inmunidad protectora rápida contra una infección por *Bordetella*.
11. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que es para administración a recién nacidos o adultos mayores de 60 años.

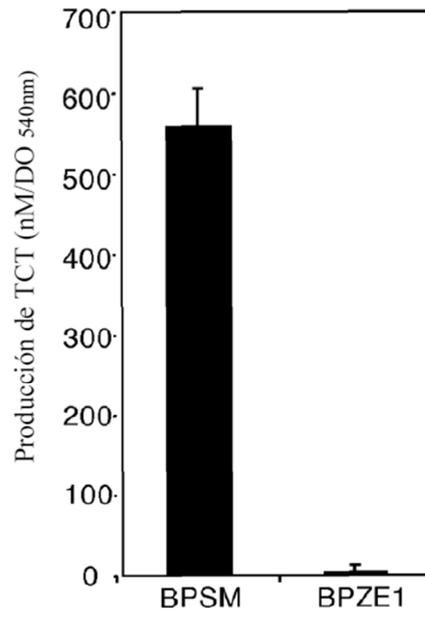


Figura 1

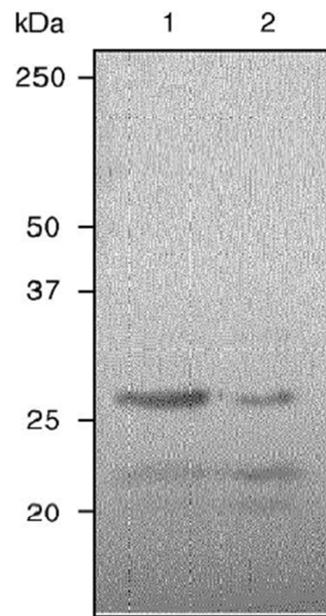


Figura 2

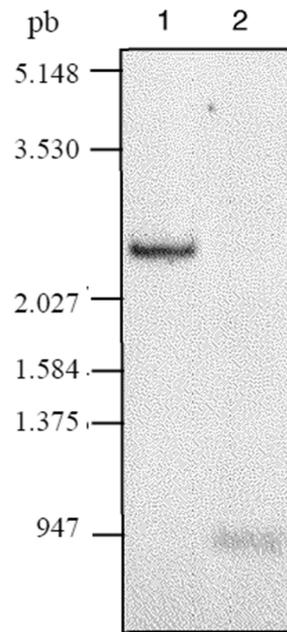


Figura 3

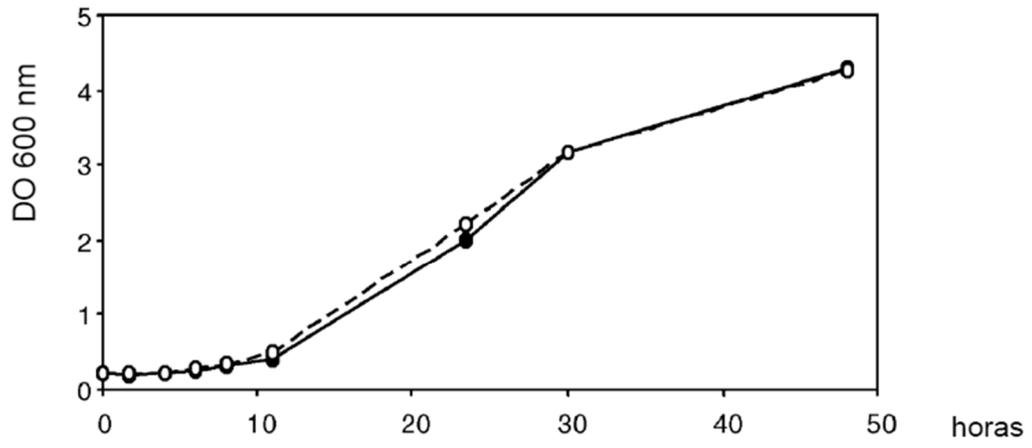


Figura 4

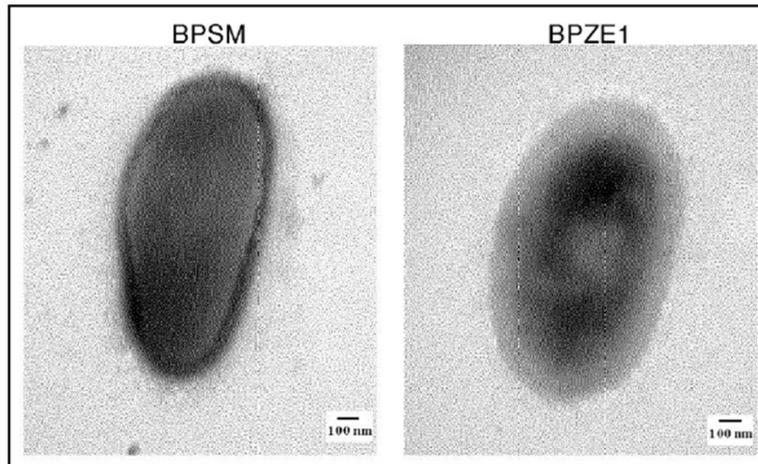


Figura 5

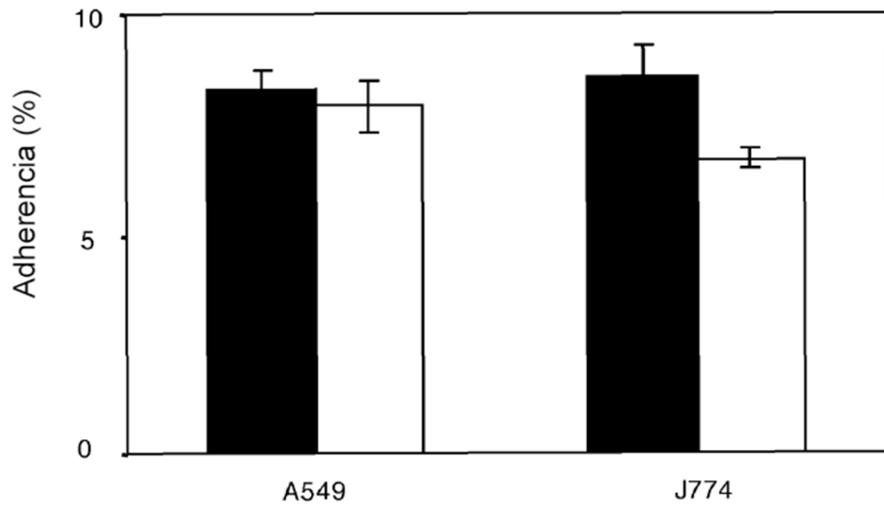


Figura 6

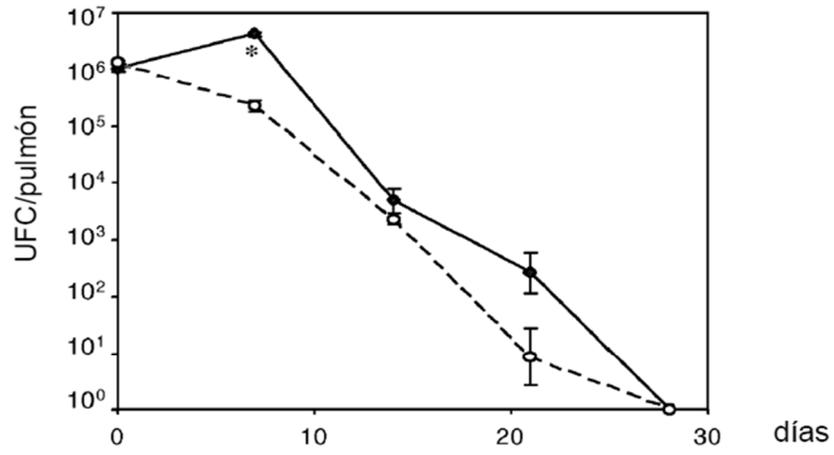


Figura 7

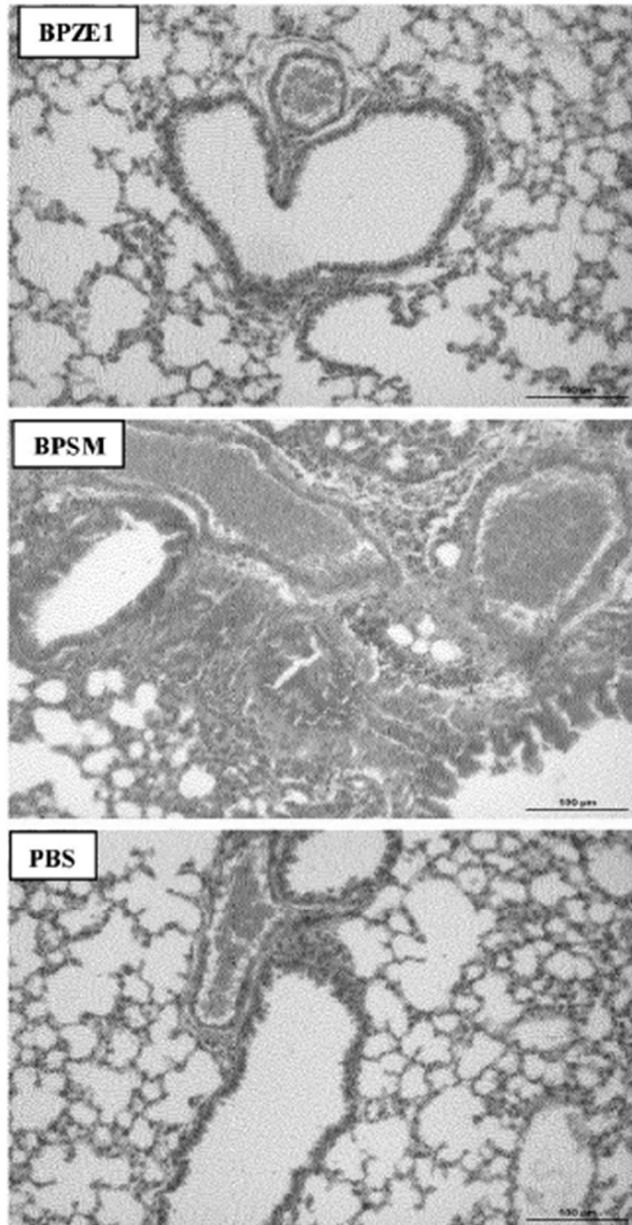


Figura 8

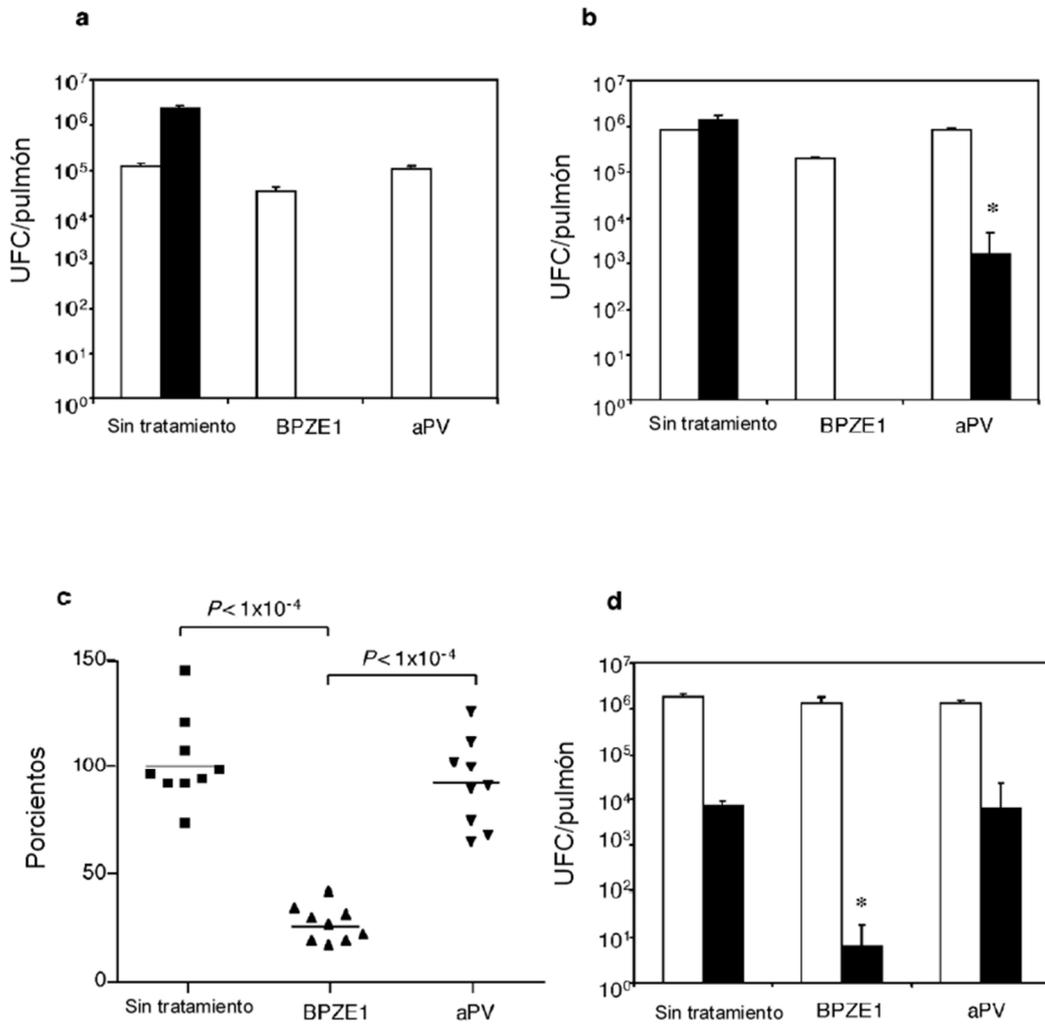


Figura 9

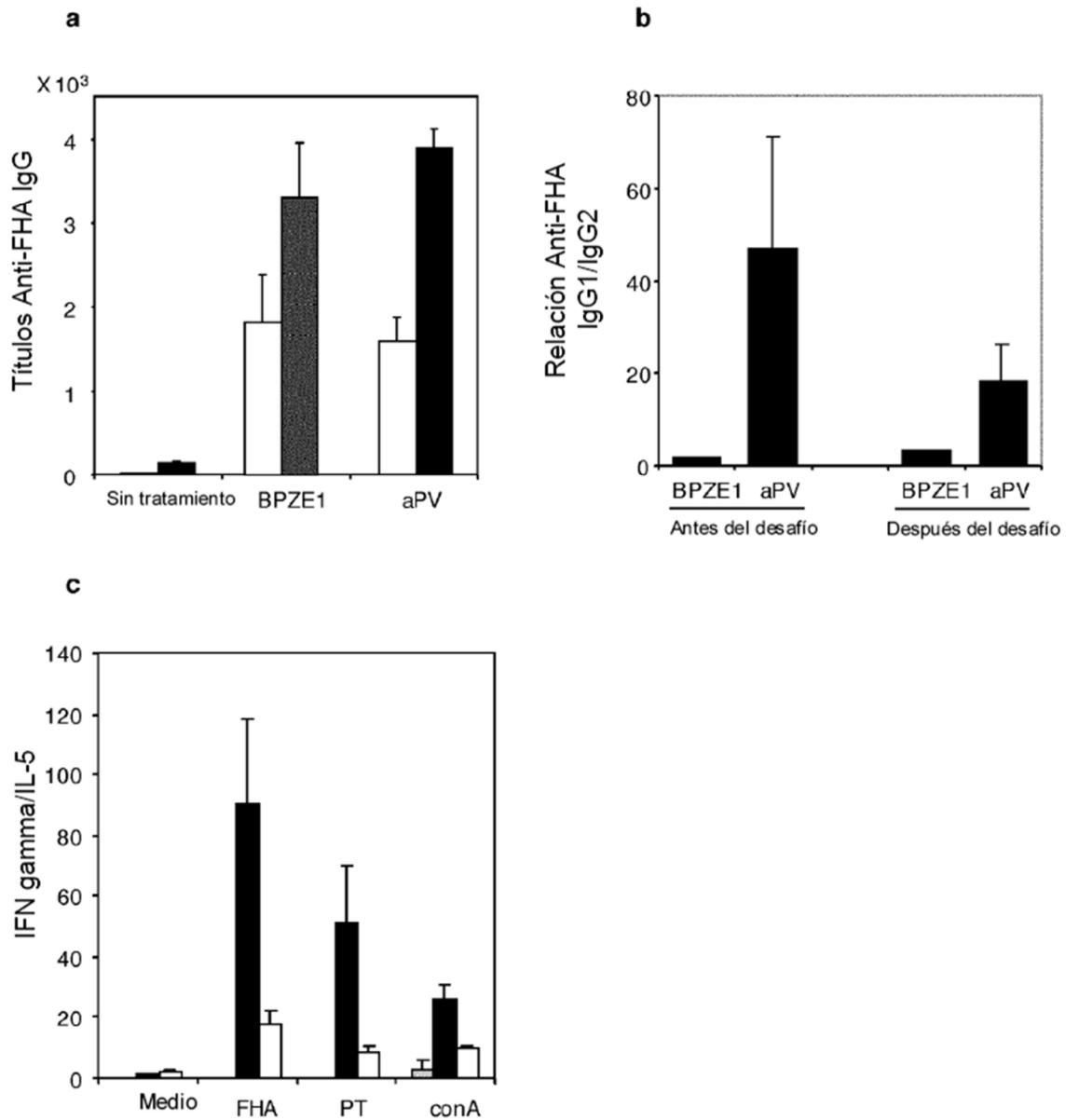


Figura 10

**Proteína S1 de activación de islotes (NP\_882282)**

MRCTRAIRQTARTGWLTWLAILAVTAPVTSPAWADDPPATVYRYDSRPPEDVF  
QNGFTAWGNNDNVLDHLTGRSCQVGSSNSAFVSTSSSRRYTEVYLEHRMQEAV  
EAERAGRGTGHFIGYIYEVRADNNFYGAASSYFEYVDITYGDNAGRILAGALAT  
YQSEYLAHRRI PPENIRRVTRVYHNGITGETTTTEYSNARYVSQQTRANPNPY  
TSRRSVASIVGTLVRMAPVIGACMARQAESSEAMAASERAGEAMVLVYYESI  
AYSF

Figura 11

**Toxina demonecrótica (NP\_881965)**

MDKDESALRQLVDMALVGYDGVVEELLALPSEESGDLAGGRAKREKAEFALFS  
 EAPNGDEPIGQDARTWFYFPKYRPVAVSNLKKMQVAIRARLEPESLILQWLIA  
 LDVYLGVLIAALSRTVISDLVFEYVKARYEIIYLLNRVPHPLATAYLKRRRQR  
 PVDRSGRLGSVFEHPLWFAYDELAGTVDLADADIYEQALAESIERRMDGEPDDG  
 SLDTAEHDVWRLCRDGINRGEQAI FQASGPYGVVADAGYMRTVADLAYADALA  
 DCLHAQLRIRAQGSVDS SPGDEM PRKLD AWEI AKFH LAATQQARVDLLEAAFAL  
 DYAAALRDVRVYGDYRNALALRFIKREALRLLGARRGNASTMPAVAAGEYDEIV  
 ASGAANDAAYVSMAAALIAGVLCDESAQRTL PVVLARFRPLGVLARFRRELEQ  
 ETAGMLLDGQEP EPRGFISFTDFRDS DAFASYAEYAAQFN DYIDQYSILEAQR  
 LARILALGSRMTVDQWCLPLQKVRHYKVLTSQPGLIARGIENHNRGIEYCLGR  
 PPLTDLPGLFTMFQLHDSSWLLVSNINGELWSDVLANA EVMQNPTLAALAE PQ  
 GRFRTGRRTGGWFLGGPATEGPSLRDNYLLKLRQSNPGLDVKKCWYFGYRQEY  
 RLPAGALGVPLFAVSVALRHS LDDLA AHAKSALYKPSEWQKFAFWIVPFYREI  
 FFSTQDRSYRVDVGSIVFDSISLLASVFSIGGKLG SFTRTQYGNLRFVVRQR  
 IAGLSGQRLWRSVLKELPALIGASGLRLSRLLVDLYEIFEPVPIRRLVAGFV  
 SATTVGGRNQAF LRQAFSAASSSAGRTGGQLASEWRMAGVDATGLVESTSGGR  
 FEGIYTRGLGPLSECTEHFIVESGNAYRVIW DAYTHGWRVVNGRLPPRLTYTV  
 PVRLNGQGHWETHLDVPGRGGAPEIFGRIRTRNLVALAAEQAAPMRLLNQAR  
 RVALRHIDTCRSRLALPRAESDMDAAIRIFFGEPDAGLRQRIGRRLQEVRAYI  
 GDLSPVNDVLYRAGYDLDDVATL FNAVDRNTSLGRQARMELYLDAIVDLHARL  
 GYENARFVDLMAFHLLSLGHAATASEVVEAVSPRLLGNVFDISNVAQLERGIG  
 NPASTGLFVMLGAYSESSPAIFQS FVNDIFPAWRQASGGGPLVWNFGPAAISP  
 TRLDYANTDIGLLNHGDISPLRAR PPLGGRRDIDLPPGLDISFVRYDRPVRMS  
 APRALDASVFRPVDGPPVHG YIQSWTGAEIEYAYGAPAAAREVMLTDNVRIISI  
 ENGDEGAIGVRVRLDTVPVATPLILTGGSLSGCTTMVGVKEGYLAFYHTGKST  
 ELGDWATAREGVQALYQAHLAMGYAPISIPAPMRNDDLVSIAATYDRAVIAYL  
 GKDVPGGGSTRITRHDEGAGSVVSFDYNAAVQASAVPRLGQVYVLI SNDGQGA  
 RAVLLAEDLAWAGSGSALDVLNERLVTLFPAPV

Figura 12

**Proteína AmpG (NP\_878961.1)**

MAPLLVLGFASGLPLALSSGTLQAWATVENVSLQSIGFLTLAGTAYTLKFLWA  
PLIDRYVPPFLGRRRGWMLLTQVLLAAAIMVMGMLSPGSALLPLALVAVLVAF  
LSASQDIAFDAYSTDVLRQEERGAGAAMRVMGYRLAMIVSGGLALIVADRWLG  
WGNTYVLMGGLMLACALGTLWAPEPERPANPPRDLGAAVVEPFREFFSRRGAI  
DMLLLIVLYKLGDAFAGALSTTFLLRGAGFSATEVGTVNKVLGLAATIVGALA  
GGSIMTRWGLYRSLMAFGLLQAVSNLGYWLI AVSPKNLYLMGLAVGVENLCGG  
LGTASFVALLMAMCRQQFSATQFALLSALA AVGRTYLAGPLTPVLVEWLDWPG  
FFIVTVLIALPGLWLLRRLRNVIDELDAQ TAR

Figura 13

**Proteína AmpG (NP\_752478.1)**

MSSQYLRI FQQPRSA ILLI LGFASGLPLALTS GTLQAWMTVENIDLKTIGFFS  
LVGQAYVFKFLWSPLMDRYTPPFFGRRRGWLLATQI LLLVAIAAMGFLEPGTQ  
LRWMAALAVVIAFCSASQDIVFDAWKTDVLP AEERGAGAAISVLGYRLGMLVS  
GGLALWLADKWLGWQGMWLM AALLIPCI IATLLAPEPTDTIPVPKTLEQAVV  
APLRDFFGRNNAWL ILLLIVLYKLGDAFAMSLTTTFLIRGVGFDAGEVGVVNK  
TLG LLATIVGALYGGILMQRLSLFRALLIFGILQGASNAGYWLLSITDKHLYS  
MGA AVFFENLCGGMGTSAFVALLMTLCNKSF SATQFALLSALS AVGRVYVGPV  
AGWFVEAHGWSTFYLF SVAAAVPGL ILLLVC RQTLEYTRVNDNFISRTEYPAG  
YAFAMWTLAAGISLLAVWLLLLTMDALDLTHFSFLPALLEVGVLVALS GVVLG  
GLLDYLALRKTHLM

Figura 14