

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 027 194**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/00 (2006.01) **C07K 14/235** (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2017 PCT/EP2017/057468**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.10.2017 WO17167834**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2017 E 17715426 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2025 EP 3436034**

(54) Título: **Cepas mutantes de Bordetella y métodos para su uso**

(30) Prioridad:

29.03.2016 US 201662314843 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2025

(73) Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR DE LILLE (50.00%)
1 rue du Prof. Calmette BP 245
59019 Lille Cedex, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.00%)**

(72) Inventor/es:

**SOLANS, LUIS;
LOCHT, CAMILLE;
TSICOPoulos, ANNE y
AIT YAHIA SENDID, SALIHA**

(74) Agente/Representante:

SUGRAÑES, S.L.P.

ES 3 027 194 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 mutantes de *Bordetella* y métodos para su uso

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. con número de serie 62/314.843 presentada el 29 de marzo de 2016.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia en ASCII, creada el 27 de marzo de 2017, se llama 7056-0073_SL.txt y tiene un tamaño de 2.134 bytes.

15 15 CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0003] La invención se refiere generalmente a los campos de microbiología, inmunología, alergia y medicina. Más particularmente, la invención se refiere a cepas de *Bordetella pertussis* vivas atenuadas deficientes en pertactina y a su uso como agentes profilácticos y terapéuticos en diversos entornos de enfermedad.

20 ANTECEDENTES

[0004] Se sabe desde hace mucho tiempo que los organismos microbianos y sus componentes afectan al sistema inmunológico de los mamíferos. La infección por bacterias y virus virulentos puede provocar enfermedades graves o la muerte. Contribuyendo a ello, los componentes purificados de bacterias y virus también pueden provocar patología al inducir respuestas inflamatorias o de otra manera provocar que el sistema inmunológico se comporte de manera indeseable. A pesar de esto, las vacunas que incluyen bacterias enteras, virus o partes de los mismos no solo han demostrado ser una de las herramientas más poderosas que la medicina ha desarrollado para prevenir infecciones graves, sino también puede provocar otros efectos beneficiosos. Por ejemplo, en modelos experimentales, se descubrió que una vacuna experimental viva atenuada frente a la tos ferina llamada BPZE1 (véase el documento WO2007104451A1) no solo protege frente a la *Bordetella pertussis* virulenta, sino también ejerce potentes efectos antialérgicos y antiasmáticos al amortiguar las respuestas hiperinmunitarias a los alérgenos (véase el documento WO2013066272A1).

[0005] Sin embargo, el desarrollo de vacunas seguras y eficaces sigue siendo un desafío por varias razones. Entre estas, a pesar de las modernas técnicas de biología molecular y de los avances significativos en la presente comprensión de la microbiología y la inmunología, sigue siendo bastante difícil producir un producto de vacuna que esté suficientemente atenuado como para no provocar una patología significativa, mientras que al mismo tiempo sea lo suficientemente inmunogénico para inducir una respuesta inmunitaria eficaz y duradera frente al patógeno diana. En el caso de vacunas bacterianas de células enteras vivas atenuadas, llegar a un nivel óptimo de atenuación es particularmente problemático porque la sobreatenuación mediante la reducción de la cantidad o actividad de los factores de virulencia puede dar como resultado una vacuna poco inmunogénica y/o incapaz de sobrevivir o replicarse en un sujeto durante un tiempo suficiente después de la administración para inducir una respuesta inmunitaria. Diversas cepas de *Bordetella* en las cuales se elimina o se reduce la expresión de diversas toxinas, se desvelan en el documento US2842529, el documento WO2010/012501, el documento WO2103/066627, el documento WO2007/104451, el documento WO2013/066272, el documento US8986709 y el documento US9119804.

35 50 SUMARIO

[0006] La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

[0007] Se describe en el presente documento el desarrollo de cepas de *Bordetella* deficientes en pertactina y su uso para inducir respuestas inmunitarias protectoras frente a la infección patológica por *Bordetella*, así como para tratar o prevenir la inflamación del tracto respiratorio como la que se observa en el asma alérgica. La pertactina, una proteína de la membrana externa de bacterias *Bordetella*, actúa como un factor de virulencia al promover la adhesión a una diversidad de células. En los experimentos descritos a continuación, se descubrió que un mutante deficiente en pertactina de BPZE1, denominado BPZE1P (depositado de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes ("CNCM"), 25, Rue du Docteur Roux, París Cedex 15, 75724, Francia, el 12 de diciembre de 2016, con el número de registro CNCM-I-5150), fue capaz de colonizar el tracto respiratorio, inducir respuestas de anticuerpos frente a *Bordetella* y proteger frente a y tratar enfermedad pulmonar alérgica. El descubrimiento fue sorprendente porque, como otros han demostrado, la pertactina era necesaria para que *Bordetella* resistiera la eliminación mediada por neutrófilos, se habría esperado que *B. pertussis* deficiente en este factor de virulencia se eliminaría demasiado rápido para permitir la inducción de una respuesta inmunitaria protectora. Véase, Inatsuka et al. Infect. Immun. 2010; 78: 2901-2909.

- [0008] En ausencia de anticuerpos anti-pertactina, BPZE1P colonizó los pulmones tan eficientemente como BPZE1 e indujo inmunidad protectora frente a la exposición a *B. pertussis* tan eficientemente como BPZE1. En presencia de anticuerpos anti-pertactina, BPZE1P colonizó los pulmones del ratón significativamente mejor que BPZE1. Por lo tanto, las cepas de *B. pertussis* deficientes en pertactina tales como BPZE1P pueden ser ventajosas para proteger frente a la inflamación de las vías respiratorias en sujetos con altos títulos preexistentes de anticuerpos frente a la pertactina, incluyendo aquellos previamente vacunados con vacunas acelulares que contienen pertactina.
- [0009] En consecuencia se describen en el presente documento métodos para reducir o prevenir el desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias en un sujeto mediante la administración al tracto respiratorio del sujeto de una cantidad de una composición que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable y bacterias *Bordetella* vivas deficientes en pertactina suficientes para colonizar el tracto respiratorio del sujeto y, de ese modo, reducir o prevenir el desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias en el sujeto. En estos métodos, la inflamación del tracto respiratorio puede estar asociada a uno o más de resistencia de las vías respiratorias, infiltración de eosinófilos en los pulmones del sujeto y/o cantidades aumentadas de citocinas inflamatorias en los pulmones del sujeto. La colonización del tracto respiratorio del sujeto puede dar como resultado una reducción o prevención de dicha resistencia de las vías respiratorias, infiltración de eosinófilos y/o aumento de las cantidades de citocinas inflamatorias.
- [0010] También se describen en el presente documento composiciones que incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable y bacterias *Bordetella* vivas deficientes en pertactina capaces de colonizar el tracto respiratorio de un sujeto y reducir o prevenir el desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias en el sujeto.
- [0011] En los métodos y composiciones descritos en el presente documento, las bacterias *Bordetella* vivas deficientes en pertactina pueden carecer de un gen funcional que codifique la pertactina, también ser deficientes en citotoxina traqueal (TCT), toxina pertussis (PTX) y/o toxina dermonecrótica (DNT). Las bacterias *Bordetella* vivas deficientes en pertactina pueden ser BPZE1P. La inflamación de las vías respiratorias puede estar provocada por la exposición a un alérgeno y el sujeto puede ser uno diagnosticado con asma, enfermedad pulmonar intersticial o rinitis alérgica; uno que tenga más de 10 ng por ml de anticuerpos anti-pertactina en su suero; o uno que se haya inmunizado previamente con una vacuna que contenga pertactina o un antígeno similar a la pertactina.
- [0012] Como se usa en el presente documento, la "pertactina" es la proteína de la membrana de la superficie externa producida por *Bordetella pertussis* y sus parientes cercanos, tales como *Bordetella parapertussis* que está implicada en la unión de bacterias *Bordetella* a las células hospedadoras como se describe en Leininger *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU., 1991, 88:345-9. Las regiones conservadas en esta proteína, tales como sus dominios pasajero y autotransportador, contribuyen directamente a la virulencia y la patogenicidad general de estos organismos.
- [0013] Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PTX" se refiere a la toxina de la tos ferina, un factor de virulencia importante de *B. pertussis*, que induce cambios metabólicos y altera las respuestas inmunitarias en el hospedador como se describe en Saukkonen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1992, 89:118-122.
- [0014] Como se usa en el presente documento, la abreviatura "DNT" se refiere a la toxina dermonecrótica de la tos ferina (también llamada toxina letal), una toxina que se encuentra en *B. pertussis* que induce inflamación, vasoconstricción y lesiones dermonecróticas en sitios donde *B. pertussis* coloniza el tracto respiratorio. Véase Fukui-Miyazaki *et al.*, BMC Microbiol. 2010, 10:247.
- [0015] Como se usa en el presente documento, la abreviatura "TCT" se refiere a citotoxina traqueal, un disacárido tetrapeptídico derivado del peptidoglucano sintetizado por bordetellas, que induce la producción de interleucina-1 y óxido nítrico sintasa y provoca estasis de los cílios y efectos letales en las células epiteliales respiratorias. Véase Luker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1993, 90, 2365-2369.
- [0016] Como se usa en el presente documento, una cepa de *Bordetella* "deficiente en pertactina" es aquella que presenta al menos menos del 50 % (por ejemplo, menos del 50, el 40, el 30, el 20, el 10, el 5, el 4, el 3, el 2 o el 1 %) de la actividad de pertactina encontrada en BPZE1 en las condiciones descritas en la sección de Ejemplos a continuación, una que no presenta actividad detectable de pertactina o una que no presenta expresión detectable de pertactina como se determina por transferencia Western.
- [0017] El término "funcional" cuando se refiere a una toxina o factor de virulencia en una cepa bacteriana significa que (i) la toxina/el factor de virulencia expresado por la cepa no ha sido mutado para eliminar o al menos reducir en más del 50 % su actividad enzimática en comparación con la versión no mutada de la toxina/el factor, y/o (ii) que una cepa bacteriana que expresa la toxina/el factor no ha sido diseñada o seleccionada para eliminar o al menos reducir en más del 50 % el número de moléculas de esa toxina/factor en comparación con la cepa de partida de la que se derivó la cepa modificada por ingeniería genética o seleccionada.
- [0018] El término "mamífero", "sujeto mamífero" o "sujeto" abarca cualquiera de los diversos animales vertebrados de sangre caliente de la clase *Mammalia*, incluyendo seres humanos.
- [0019] A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos usados en el presente documento tienen

el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, las realizaciones particulares analizadas a continuación son solamente ilustrativas y no pretenden ser limitantes.

5 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0020]

- 10 La Figura 1A es un diagrama que muestra la estructura de un plásmido usado en la construcción de BPZE1P.
 La Figura 1B es otro diagrama que muestra la construcción de BPZE1P y fotografías de geles que muestran los resultados de la amplificación por PCR de los fragmentos prn UPg y prn Log.
 La Figura 1C son fotografías de inmunotransferencias que muestran la presencia de pertactina en BPZE1, pero no en lisados y sobrenadantes de BPZE1P.
- 15 La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de la colonización pulmonar en ratones Balb/c usando BPZE1 o BPZE1P.
 La Figura 3 es un gráfico que muestra los títulos totales de IgG después de la administración de BPZE1P o BPZE1 a ratones.
 La Figura 4A es un gráfico que muestra la protección mediada por BPZE1 y BPZE1P en ratones Balb/c expuestos por vía intranasal con 10^6 bacterias *B. pertussis* viables de la cepa BPSM.
- 20 La Figura 4B es un gráfico que muestra la protección mediada por BPZE1 y BPZE1P en ratones Balb/c expuestos por vía intranasal con 10^6 bacterias *B. pertussis* viables de la cepa BPSMP.
 La Figura 4C es un gráfico que muestra la protección mediada por BPZE1 y BPZE1P en ratones Balb/c expuestos por vía intranasal con 10^6 bacterias *B. pertussis* viables de la cepa B1917.
- 25 La Figura 5 es un gráfico que muestra la idoneidad de BPZE1 y BPZE1P en ratones preinmunizados con una vacuna de *B. pertussis* acelular (aPv).
 La Figura 6 es un diagrama del protocolo experimental de un ensayo de respuesta de las vías respiratorias en ratones alérgicos vacunados con BPZE1, BPZE1P o dejados sin vacunar, y un gráfico que muestra los resultados del ensayo.
- 30 La Figura 7A es un gráfico que muestra la infiltración total de la población de células de las vías respiratorias en el líquido broncoalveolar (BAL) de los ratones alérgicos de los experimentos que se muestran en la Fig. 6.
 La Figura 7B es un gráfico que muestra el porcentaje de eosinófilos en las células del líquido BAL de los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
 La Figura 7C es un gráfico que muestra el porcentaje de neutrófilos en las células del líquido BAL de los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
- 35 La Figura 7D es un gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos en las células del líquido BAL de los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
 La Figura 7E es un gráfico que muestra el porcentaje de macrófagos en las células del líquido BAL de los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
 La Figura 8A es un gráfico que muestra la cantidad de IL-1 α normalizada frente a las proteínas totales medidas en el lóbulo pulmonar en los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
- 40 La Figura 8B es un gráfico que muestra la cantidad de IL-1 β normalizada frente las proteínas totales medidas en el lóbulo pulmonar en los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
 La Figura 8C es un gráfico que muestra la cantidad de IL-6 normalizada frente las proteínas totales medidas en el lóbulo pulmonar en los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
- 45 La Figura 8D es un gráfico que muestra la cantidad de IL-13 normalizada frente las proteínas totales medidas en el lóbulo pulmonar en los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
 La Figura 8E es un gráfico que muestra la cantidad de CXCL1 normalizada frente las proteínas totales medidas en el lóbulo pulmonar en los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
 La Figura 8F es un gráfico que muestra la cantidad de CXCL9 normalizada frente las proteínas totales medidas en el lóbulo pulmonar en los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
- 50 La Figura 8G es un gráfico que muestra la cantidad de CXCL10 normalizada frente a las proteínas totales medidas en el lóbulo pulmonar en los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
 La Figura 8H es un gráfico que muestra la cantidad de GM-CSF normalizada frente a las proteínas totales medidas en el lóbulo pulmonar en los ratones alérgicos de los experimentos mostrados en la Fig. 6.
- 55 La Figura 9 es un diagrama del protocolo experimental de un ensayo de respuesta de las vías respiratorias en un modelo terapéutico de ratones alérgicos vacunados con BPZE1, BPZE1P o dejados sin vacunar, y un gráfico que muestra los resultados del ensayo.

60 DESCRIPCIÓN DETALLADA

- [0021] Se describen en el presente documento cepas de *Bordetella* deficientes en pertactina y su uso en la estimulación de las respuestas inmunitarias anti-*Bordetella* así como en la prevención y el tratamiento de la inflamación del tracto respiratorio.

- 65 Metodología general

[0022] Los métodos que implican técnicas convencionales microbiológicas, inmunitarias, biológicas moleculares y médicas se describen en el presente documento. Los métodos microbiológicos se describen en Methods for General and Molecular Microbiology (3^a Ed.), Reddy *et al.*, ed., ASM Press. Los métodos inmunológicos son generalmente conocidos en la técnica y se describen en tratados de metodología tales como Current Protocols in Immunology, Coligan *et al.*, ed., John Wiley & Sons, Nueva York. Las técnicas de biología molecular se describen en detalle en tratados tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a ed., vol. 1-3, Sambrook *et al.*, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; y Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*, ed., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York. Los métodos generales de tratamiento médico se describen en McPhee y Papadakis, Current Medical Diagnosis and Treatment 2010, 49^a Edición, McGraw-Hill Medical, 2010; y Fauci *et al.*, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17^a Edición, McGraw-Hill Professional, 2008.

Cepas de *Bordetella* deficientes en pertactina

[0023] Las especies de *Bordetella* tales como *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica* que son deficientes en la expresión de pertactina (por ejemplo, aquellas que expresan al menos el 50, el 60, el 70, el 80, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 % menos de pertactina que las cepas correspondientes) pueden usarse para generar respuestas inmunitarias frente a especies de *Bordetella*, así como para tratar y/o prevenir la inflamación del tracto respiratorio tales como aquellas producidas en el asma alérgica. *Bordetella pertussis* viva, atenuada, deficiente en pertactina y *Bordetella parapertussis* viva, atenuada, deficiente en pertactina se prefieren para su uso en el tratamiento o la prevención de inflamación alérgica del tracto respiratorio en sujetos humanos. Las cepas de *Bordetella* vivas atenuadas deficientes en pertactina descritas en el presente documento pueden prepararse adaptando métodos conocidos en la técnica tales como aquellos descritos en la sección de Ejemplos a continuación. La cepa de partida puede ser cualquier especie de *Bordetella* adecuada. Los ejemplos de especies de *Bordetella* incluyen *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. Se prefiere *B. pertussis* para su uso como la cepa de partida para vacunas y métodos para prevenir la infección por tos ferina. Varias cepas de *Bordetella* adecuadas para su uso como cepas de partida están disponibles en colecciones de cultivos establecidos (por ejemplo, la American Type Culture Collection en Manassas, Virginia) o pueden aislarse de reservorios naturales (por ejemplo, un paciente con tos ferina) mediante técnicas conocidas (por ejemplo, como se describe en Aoyama *et al.*, Dev. Biol. Stand, 73:185-92, 1991).

[0024] Las cepas de *Bordetella* que expresan pertactina funcional pueden volverse deficientes en esta molécula o en su actividad mediante selección o, preferentemente para fines de estabilidad, mutagénesis (por ejemplo, eliminación del gen *prn* nativo como se describe a continuación). Como alternativa, las especies de *Bordetella* deficientes en pertactina también pueden aislarse de fuentes naturales (por ejemplo, sujetos humanos u otros mamíferos infectados o colonizados con dichas cepas). Debido a que la atenuación insuficiente de una cepa patógena de *Bordetella* podría provocar una infección patológica en un sujeto, se prefiere que la cepa de *Bordetella* deficiente en pertactina usada también tenga niveles más bajos de otros factores de virulencia funcionales. Por otra parte, para garantizar que la cepa de *Bordetella* deficiente en pertactina conserve la capacidad de colonizar a un sujeto y ejercer un efecto protector sobre la inflamación del tracto respiratorio, no debe atenuarse excesivamente. La atenuación podría lograrse mutando la cepa para reducir su expresión de pertactina y uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) de los siguientes: toxina pertussis (PTX), toxina dermonecrótica (DNT), citotoxina traqueal (TCT), adenilato ciclasa (AC), lipopolisacárido (LPS), hemaglutinina filamentosa (FHA) o cualquiera de los componentes regulados por bvg. La atenuación también podría lograrse mutando la cepa para reducir la actividad biológica de la pertactina y uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) de los siguientes: toxina pertussis (PTX), toxina dermonecrótica (DNT), citotoxina traqueal (TCT), adenilato ciclasa (AC), lipopolisacárido (LPS), hemaglutinina filamentosa (FHA) o cualquiera de los componentes regulados por bvg. Los ejemplos de métodos para fabricar dichos mutantes se describen en el presente documento y en la Patente de EE.UU. N.º 9.119.804. En los experimentos presentados a continuación, una cepa de *Bordetella* deficiente en pertactina funcional, PTX funcional, DNT funcional y TCT fue capaz de colonizar el tracto respiratorio de los sujetos, inducir respuestas inmunitarias frente *Bordetella* y reducir o prevenir el desarrollo de respuestas alérgicas e inflamatorias. En consecuencia, se prefieren las cepas de *Bordetella*, tales como BPZE1P, que son deficientes en estos cuatro factores de virulencia y pueden colonizar a un sujeto e inducir respuestas inmunitarias dirigidas a cepas de *Bordetella* y/o reducen o previenen el desarrollo de respuestas alérgicas e inflamatorias.

[0025] En la técnica se conocen diversos métodos para atenuar una cepa bacteriana infecciosa. Estos incluyen pasajes de la cepa *in vitro* hasta que se pierda la virulencia, mutagénesis química no específica seguida de cribado y selección basados en el fenotipo y uso de técnicas de biología molecular específicas tales como las descritas en la sección de Ejemplos a continuación (incluyendo intercambio alélico) y en Methods for General and Molecular Microbiology (3^a Ed.), Reddy *et al.*, ed., ASM Press. Usando estos métodos, los genes que codifican pertactina, PTX y/o DNT pueden eliminarse o mutarse a una forma enzimáticamente inactiva (lo que se prefiere cuando se desea conservar la antigenicidad de la toxina). La producción de TCT puede reducirse significativamente (por ejemplo, > que el 99,99, el 99,90, el 99,8, el 99,7, el 99,6, el 99,5, el 99,0, el 98, el 97, el 96, el 95 o el 90 %) al reemplazar el gen *ampG* nativo (a diferencia de otras especies, el *ampG* de *B. pertussis* no recicla activamente el peptidoglucano que contiene TCT) por un gen *ampG* heterólogo (por ejemplo, de *E. coli* u otra especie gramnegativa), o al mutar el gen *ampG* nativo de tal manera que sea activo en el reciclaje del peptidoglucano.

[0026] La modificación de una cepa inicial para reducir o eliminar la actividad de la toxina/el factor de virulencia

puede confirmarse mediante la secuenciación del ADN genómico o de los genes que codifican las toxinas de las cepas modificadas. También puede usarse transferencia Southern, Northern y/o Western para confirmar que se han eliminado los genes diana o que se ha reducido o eliminado la expresión de los factores diana. También puede evaluarse la actividad biológica para confirmar la reducción o la eliminación de la actividad de la toxina/el factor de virulencia. Una vez confirmadas las modificaciones, las cepas modificadas pueden analizarse para determinar su capacidad de colonizar un sujeto e inducir inmunidad protectora frente a la infección por *Bordetella* o para reducir o prevenir el desarrollo de respuestas alérgicas e inflamatorias mediante métodos conocidos tales como aquellos descritos en la sección de Ejemplos a continuación.

10 Composiciones para modular la respuesta inmunitaria

[0027] Las cepas de *Bordetella* vivas atenuadas descritas en el presente documento pueden usarse en composiciones que protegen a un sujeto mamífero de desarrollar una infección por *Bordetella* (por ejemplo, tos ferina) o para reducir los síntomas de dicha infección. También pueden usarse para reducir o prevenir el desarrollo de respuestas alérgicas e inflamatorias en un sujeto tales como asma, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar intersticial, alergias alimentarias, alergia al cacahuete, alergias a veneno, dermatitis atópica, hipersensibilidad de contacto y anafilaxia. Para su uso en composiciones terapéuticas o profilácticas, las cepas de *Bordetella* vivas atenuadas normalmente se formulan con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas, agua destilada, emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles y similares.

[0028] Las vacunas pueden envasarse en forma farmacéutica unitaria para una administración conveniente a un sujeto. Por ejemplo, una dosis única de entre 1×10^4 hasta 1×10^9 (por ejemplo, 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , o 1×10^9 +/- 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 %) bacterias vivas de la cepa de *Bordetella* atenuada seleccionada y cualquier excipiente pueden estar contenidos por separado en un envase o en un dispositivo de administración. La vacuna puede estar contenida dentro de un dispositivo de administración tal como una jeringa, un dispositivo pulverizador o un insuflador.

30 Formulaciones/Dosis/Administración

[0029] La presente invención no reivindica métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

[0030] Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano, un niño humano o un neonato, un adulto humano, un ser humano con alto riesgo de desarrollar complicaciones por tos ferina, un ser humano con enfermedad pulmonar, un ser humano que está o estará inmunodeprimido y un ser humano que tiene o está en alto riesgo de desarrollar inflamación del tracto respiratorio tales como asma, rinitis alérgica o enfermedad pulmonar intersticial) mediante cualquier método adecuado que deposite las bacterias dentro de la composición en el tracto respiratorio u otro compartimento mucoso. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse por inhalación o introducción intranasal, por ejemplo, usando un inhalador, una jeringa, un insuflador, un dispositivo de pulverización, etc.

[0031] Las cepas de *Bordetella* deficientes en pertactina descritas en el presente documento pueden formularse como composiciones para administración a un sujeto. Se mezcla una cantidad adecuada de bacterias vivas con un excipiente o vehículo farmacéuticamente adecuado tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua destilada, emulsiones tales como unas emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles y similares. En algunos casos, la vacuna puede liofilizarse y a continuación reconstituirse antes de su administración. El uso de excipientes o vehículos farmacéuticamente adecuados que sean compatibles con la administración mucosa (particularmente nasal, bronquial o pulmonar) es la preferida para colonizar el tracto respiratorio. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto convencional en este campo y USP/NF.

[0032] Cuando se formula para administración por vía mucosa, cada dosis de una composición puede incluir una cantidad suficiente de bacterias *Bordetella* vivas deficientes en pertactina para dar como resultado la colonización del sitio mucoso, por ejemplo, aproximadamente (es decir, +/- 50 %) 5×10^3 a 5×10^9 bacterias. Para la administración a sujetos humanos, la dosis puede incluir aproximadamente 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , o 1×10^{10} bacterias *Bordetella* vivas deficientes en pertactina. La dosis puede administrarse una vez o en múltiples ocasiones (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) a intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 12 meses. Generalmente, se administran cantidades suficientes de una composición para producir la colonización y la respuesta protectora y/o antiinflamatoria. Se administran cantidades adicionales después de que la respuesta protectora y/o antiinflamatoria inducida disminuya (por ejemplo, después de que el sujeto vuelve a sufrir los síntomas de inflamación del tracto respiratorio).

[0033] Los sujetos a los que se les puede administrar una composición que contiene bacterias *Bordetella* vivas deficientes en pertactina pueden incluir cualquiera capaces de ser colonizados con una cepa bacteriana de *Bordetella* viva deficiente en pertactina seleccionada. Por ejemplo, el sujeto puede ser un mamífero tal como un ser humano. Los sujetos humanos que tienen o en alto riesgo de desarrollar, inflamación del tracto respiratorio tales como aquellas que

padecen o son propensas a desarrollar asma alérgica o rinitis alérgica, son receptores preferidos de la composición. Aunque la composición puede usarse en sujetos independientemente de sus títulos de anticuerpos anti-pertactina, la composición puede usarse en aquellos que tienen títulos medibles (por ejemplo, más de 10, 20, 50, 100, 200 o 500 ng por ml de suero) de anticuerpos anti-pertactina y aquellos que se han inmunizado anteriormente con una vacuna que contiene pertactina o un antígeno similar a la pertactina debido a que las cepas bacterianas de *Bordetella* deficientes en pertactina no están sujetas a respuestas inmunitarias dirigidas a la pertactina.

[0034] La eficacia de las composiciones para amortiguar la inflamación del tracto respiratorio puede evaluarse mediante métodos conocidos, por ejemplo, midiendo el número de células inflamatorias, los títulos de IgE, los niveles de citocinas/quimiocinas proinflamatorias (tales como eotaxina, GM-CSF, IFN γ , IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-18 y TNF α) en el líquido extraído del tracto respiratorio (por ejemplo, líquido de lavado broncoalveolar), o parámetros clínicos tales como espirometría o nivel de disnea, tos, sibilancias o capacidad respiratoria. La mejora en cualquiera de uno o más de estos parámetros (al menos el 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80, el 90 % o más de mejora en comparación con un sujeto que no recibe la composición) indica que la composición es eficaz.

También pueden usarse modelos animales de inflamación alérgica del tracto respiratorio para evaluar la eficacia de una composición, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 8.986.709.

Ejemplos

20 Ejemplo 1: construcción y caracterización de una cepa de *B. pertussis* deficiente en pertactina

[0035] *Escherichia coli* DH5 α , SM10 y *B. pertussis* BPZE1, BPSM (Menozzi *et al.*, Infect Immun 1994;62:769-778) y B1917 (Bart *et al.* Genome Announc 2014;2(6)) se usaron en este estudio. Las cepas de *Bordetella* se cultivaron a 37° C en agar Bordet-Gengou (BG), suplementado con glicerol al 1 % y sangre de oveja desfibrinada al 10 %. Después del cultivo, las bacterias se recolectaron raspando las placas y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a la densidad deseada. Para el cultivo líquido las cepas de *Bordetella* cepas se cultivaron a 37° C en medio Stainer-Scholte modificado (Imazumi *et al.* Infect Immun 1983;41:1138-1143) que contiene 1 g/l de heptaquis (2,6-di-o-metil) β -ciclodextrina (Sigma). Las cepas de *E. coli* usadas para los procedimientos de clonación se cultivaron en caldo LB o en placas de agar LB. En caso necesario, se usó estreptomicina (Sm) a 100 μ g/ml, gentamicina (Gm) a 10 μ g/ml y ampicilina (Amp) a 100 μ g/ml.

[0036] Para eliminar *prn*, el gen que codifica la pertactina, en BPZE1, un fragmento de 739 pb en dirección 3' (*prn* LO) del gen *prn* y un fragmento de 759 pb en dirección 5' (*prn* UP) del gen *prn* se clonaron en pSS4940 para introducir la eliminación de *prn* en los genomas de BPZE1 y BPSM por recombinación homóloga. Haciendo referencia a las Fig. 1A y 1B, las regiones flanqueantes de *prn* en dirección 3' y en dirección 5' se amplificaron por PCR usando *prn*_KO_fw (ATCCTCAAGCAAGACTGCGAGCTG) (SEQ ID NO:1)) y *OL_prn*_KO_rv (GGGGATAGACCCTCTCGCTTGGATGCCAGGTGGAGAGCA) (SEQ ID NO:2)), y *OL_prn*_KO fw (TGCTCTCCACCTGGCATCCAAGCGAGGAGGGTCTATCCCC) (SEQ ID NO:3)) y *prn*_KO_rv (CCATCATCCTGTACGACCGCCT) (SEQ ID NO:4)), respectivamente, como cebadores. Estos fragmentos sirvieron a continuación como plantilla para una elongación por PCR usando *prn*_KO fw y *prn*_KO rv como cebadores. El fragmento resultante (que contiene la eliminación de *prn*) se insertó en el vector TOPO blunt® (ThermoFisher Scientific) y a continuación se escindió como un fragmento *Kpn*I-*Not*I. El fragmento *Kpn*I-*Not*I escindido se insertó en pSS4940 digerido con *Kpn*I- y *Not*I, un derivado de pSS4245 (Inatsuka *et al.*, Infect Immun 2010;78:2901-2909). El plásmido resultante se transformó en *E. coli* SM10, que a continuación se conjugó con BPZE1. Después de dos eventos sucesivos de recombinación homóloga, como se describe en otra parte (Mielcarek *et al.*, PLoS Pathog 2006;2:e65), en referencia a la Fig. 1B, se usó PCR para confirmar la eliminación de todo el gen *prn* amplificando las regiones flanqueantes que cubren la construcción usando *prn*KO_UP (TTCTTGCACGAACAGATCAAAC) (SEQ ID NO:5) - *prn*KOin_UPrv (CTGCTGGTCATCGCGAACT) (SEQ ID NO:6) para la región 5' y *prn*KOin_LOfw (CGCCCATTCTCCCTGTTCC) (SEQ ID NO:7)-*prn*KO_LO (GAACAGGAACGGAAACAGGCG) (SEQ ID NO:8)) para la región 3'. Una cepa portadora de la eliminación de *prn* se seleccionó y se denominó BPZE1P. Se usó la misma estrategia para construir un mutante BPSM deficiente en pertactina, llamado BPSMP.

[0037] La presencia de pertactina se probó mediante inmunotransferencia de lisados y sobrenadantes de BPZE1 y BPZE1P, usando Prn purificada (List Biological laboratories) como control para el tamaño correcto de la banda. Para la extracción de proteínas, las cepas BPZE1 y BPZE1P se sembraron en agar sangre BG y se incubaron durante 48 h a 37° C. Después del crecimiento, las bacterias se rasparon de las placas, se resuspendieron en 10 ml de medio Stainer-Scholte y se cultivaron durante 4 días a 37° C. Las bacterias se recolectaron a continuación por centrifugación. Los sobrenadantes se recuperaron y se trataron con ácido tricloroacético (TCA) como se describió anteriormente (Solans *et al.*, PLoS Pathog 2014;10:e1004183) para la concentración de proteínas. Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en PBS complementado con un cóctel de inhibidores de proteasa sin EDTA (Roche) y se lisaron usando una célula de presión francesa. Los restos bacterianos se eliminaron mediante centrifugación durante 30 minutos a 15.000 x g y los sobrenadantes se recuperaron para inmunotransferencia. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 12 % y a continuación se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el sistema celular Criterion™ (Bio-Rad). Después de bloquear con leche descremada en polvo al 5 % p/v en PBS 0,01 % Tween 20 durante 30 min, la membrana se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-pertactina a una dilución de 1:1.000. A continuación, se añadió cabra anti-HRP de ratón (Abcam) a una dilución de 1:10.000 y la transferencia se desarrolló

usando sustratos quimioluminiscentes (GE Healthcare). Como se muestra en la Figura 1C, se detectó una proteína reactiva al anticuerpo anti-pertactina que migraba conjuntamente con la pertactina purificada en el sobrenadante de BPZE1, pero no en el sobrenadante de BPZE1P. Esta proteína no se detectó en el lisado de células bacterianas de BPZE1 ni de BPZE1P.

- 5 Ejemplo 2: BPZE1P coloniza ratones tan bien como BPZE1
- [0038] A grupos de 18 ratones de seis semanas de edad se les inoculó por vía intranasal 20 µl de PBS que contenía 10⁶ bacterias viables como se describió anteriormente (Mielcarek *et al.*, anteriormente citado). En los puntos de tiempo 10 indicados (3 horas, 3 días, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días), se sacrificaron 3 ratones por grupo y se extrajeron los pulmones y se homogeneizaron para medir el número total de unidades formadoras de colonias (UFC). El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de 2 vías, usando la prueba de comparación post hoc de Bonferroni con intervalos de confianza del 95 %. Haciendo referencia a la Fig. 2, tanto BPZE1 como BPZE1P colonizaron a los animales igualmente bien. Ambas cepas exhibieron un máximo de multiplicación 3 días después de 15 la vacunación y la colonización persistió durante 4 semanas. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre estas cepas en su capacidad para colonizar los pulmones del ratón.

Ejemplo 3: BPZE1P es inmunogénico y protector frente a la exposición con *B. pertussis* virulenta como BPZE1

- 20 [0039] La inmunidad inducida por BPZE1P en comparación con BPZE1 se midió mediante la valoración de anticuerpos del suero inmunitario del ratón después de la vacunación nasal. Se vacunaron intranasalmente grupos de 8 ratones con 10⁵ BPZE1 o BPZE1P viables. Cuatro semanas después, los ratones se desangraron y se midieron los títulos totales de IgG frente al lisado total de BPSM. La sangre se centrifugó durante 5 min a 5.000 x g para separar el suero de las células. Los títulos de anticuerpos frente a *B. pertussis* se estimaron usando ensayos de inmunoadsorción 25 enzimática (ELISA) como se describió anteriormente (Mielcarek *et al.*, anteriormente citado), usando el total de lisado de *B. pertussis* BPSM a 1 µg de proteína total por pocillo. El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prism. Como se muestra en la Fig. 3, los ratones vacunados con BPZE1 y BPZE1P exhibieron títulos de anticuerpos mucho más altos que los ratones de control sin exposición previa. No se detectó diferencia significativa 30 en los títulos de anticuerpos entre los ratones vacunados con BPZE1 y BPZE1P.
- [0040] La eficacia protectora de BPZE1P en comparación con BPZE1 se probó en un protocolo de protección subóptimo midiendo los recuentos de UFC en los pulmones 7 días después del desafío y comparando un grupo sin exposición previa con los grupos vacunados. Se vacunaron intranasalmente grupos de 8 ratones de seis semanas de edad con 20 µl de PBS que contenía 10⁵ BPZE1 o BPZE1P viables o se dejaron sin vacunar. Cuatro semanas después, 35 todos los ratones se expusieron intranasalmente a 20 µl de PBS que contenía 10⁶ BPSM, BPSMP o B1917 viables. Tres horas después de la exposición, se sacrificaron 3 ratones por grupo y se recogieron los pulmones y se homogeneizaron para el recuento de UFC. Los 5 ratones restantes por grupo se sacrificaron 7 días después de la exposición para el recuento de UFC. Tres horas después de la infección, se sacrificaron 3 ratones y se les extrajeron los pulmones para determinar el recuento de UFC poco después de la exposición. Siete días después de la infección, 40 los 5 ratones restantes fueron sacrificados, se les extrajeron los pulmones y se midieron los recuentos de UFC. El análisis estadístico se realizó aplicando una prueba ANOVA paramétrica de 2 vías, usando la prueba de comparación post hoc de Bonferroni con un intervalo de confianza del 95 %. *, p < 0,005; **, p < 0,001; ***, p < 0,0001. Como se muestra en las Fig. 4A-C, la vacunación con cualquiera de las cepas protegió frente a la exposición con BPSM, BPSMP y B1917 igualmente bien. Estos resultados muestran que la eliminación de *prn* no impacta en la capacidad protectora 45 de la vacuna viva atenuada, ni frente a la cepa de laboratorio BPSM, su derivado deficiente en pertactina BPSMP o el aislado clínico B1917.

Ejemplo 4: BPZE1P aumenta la captación de la vacuna pulmonar en ratones vacunados con aPy

- 50 [0041] Se investigó la capacidad de BPZE1P para colonizar los pulmones de ratones que tenían anticuerpos preexistentes frente a la pertactina. Se vacunaron por vía subcutánea grupos de 8 ratones de seis semanas de edad con 1/5 de la dosis humana de la vacuna acelular frente a la tos ferina (aPy; Infanrix, GSK; que contiene toxina pertussis inactivada, hemaglutinina filamentosa y pertactina). Cuatro semanas después, los ratones se reforzaron con la misma dosis de aPy. Cuatro semanas después del refuerzo, los ratones se infectaron por vía intranasal con 10⁶ BPZE1 o BPZE1P. Tres horas después de la infección, se sacrificaron 3 ratones y se extrajeron los pulmones para determinar el recuento de UFC. Siete días después de la infección, los 5 ratones restantes fueron sacrificados, se extrajeron los pulmones y se midieron los recuentos de UFC. El análisis estadístico se realizó aplicando una prueba ANOVA paramétrica de 2 vías, usando la prueba de comparación post hoc de Bonferroni con un intervalo de confianza del 95 %. ***, p < 0,0001. Haciendo referencia a la Fig., 5, a 3 horas después de la administración, no se observó ninguna diferencia significativa en la colonización entre las dos cepas. En cambio, siete días después de la inocular, BPZE1P colonizó los pulmones significativamente mejor que BPZE1. Los ratones infectados con BPZE1P tenían casi 10⁴ UFC en los pulmones 7 días después de la administración, mientras que los recuentos de UFC en los pulmones de los ratones a los que se les administró BPZE1 alcanzaron 10² UFC. Estos datos muestran que la eliminación del gen *prn* mejora la captación pulmonar de BPZE1 en ratones preinmunizados con aPy que contiene pertactina.

- 65 Ejemplo 5: BPZE1P y BPZE1 protegen igualmente bien frente a la inflamación alérgica de las vías respiratorias

[0042] Se investigó el efecto de la vacunación con BPZE1P sobre la respuesta de las vías respiratorias en ratones alérgicos como se describe en el protocolo mostrado en la Fig. 6. Se vacunaron intranasalmente grupos de ratones de 4 semanas de edad con 20 µl de PBS que contenía 10^6 BPZE1 o BPZE1P viables o se dejaron sin vacunar. Cuatro semanas después, los ratones se sensibilizaron por vía intranasal con 20 µl de ácaros del polvo doméstico (HDM; Stallergenes SA) de 5 índices de reactividad (IR) de extracto de *Dermatophagoides farinae* (Derf 5IR) o 20 µl de PBS como control. Diez días después, los ratones se expusieron por vía intranasal con 20 µl de Derf 5IR o PBS diariamente durante 5 días y, dos días después, los ratones fueron anestesiados e intubados intratraquealmente para ventilación mecánica usando el dispositivo FlexiVent (SCIREQ ®). A continuación, los ratones se expusieron a concentraciones crecientes de metacolina nebulizada (0-50 mg/ml en PBS) (Sigma-Aldrich) para determinar la resistencia en sus vías respiratorias mediante pleitismografía. El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación de una prueba ANOVA paramétrica de 2 vías, usando la prueba de comparación post hoc de Bonferroni con un intervalo de confianza del 95 %. ***, p < 0,0001; **, p < 0,001; *, p < 0,005. En la Fig. 6, las comparaciones entre Derf 5IR y BPZE1 + Derf 5IR se representan con la línea continua y las comparaciones entre Derf 5IR y BPZE1P + Derf 5IR se representan con la línea discontinua. Tanto los ratones vacunados con BPZE1 como con BPZE1P presentaron significativamente menos resistencia en sus vías respiratorias tras el tratamiento con metacolina a 6, 12 y 25 mg/ml en comparación con los ratones no vacunados. La resistencia de los ratones vacunados fue comparable a la del grupo de control PBS, que no se sensibilizó, ni se expuso durante todo el experimento.

Ejemplo 6: Medición de la infiltración de células pulmonares y perfiles de citocinas

[0043] Se evaluó la infiltración de la población de células de las vías respiratorias en los ratones alérgicos del experimento que se muestra en la Fig. 6 y que se analiza inmediatamente más arriba. Después de las mediciones de pleitismografía, se recogieron líquidos de lavado broncoalveolar (BAL) para medir la infiltración celular en las vías respiratorias. Las células de los líquidos de BAL se recogieron por centrifugación a 1200 rpm durante 5 min a 4°C, se resuspendieron en PBS para el recuento celular usando el Shandon cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific) y se tiñeron con May Grünwald Giemsa (DiffQuik®) para el recuento de tipos celulares. Se midió el número total de células en el líquido BAL de ratones (Fig. 7A) y se calcularon los porcentajes de eosinófilos (Fig. 7B), neutrófilos (Fig. 7C), linfocitos (Fig. 7D) y macrófagos (Fig. 7E). El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación de una prueba ANOVA paramétrica unidireccional, usando la prueba de comparación post hoc de Bonferroni con un intervalo de confianza del 95 %. ***, p < 0,0001; *, p < 0,005. La vacunación con BPZE1 o BPZE1P redujo significativamente el reclutamiento de células totales en las vías respiratorias después de la exposición y el desafío con alérgenos, en comparación con los ratones no vacunados (Figura 7A). Esta reducción reflejó esencialmente la reducción en el reclutamiento de eosinófilos en los ratones vacunados (Figura 7B), mientras que no hubo cambios significativos en los porcentajes de neutrófilos o linfocitos (Figura 7C y D) entre los ratones vacunados y no vacunados. Se observó un aumento pequeño pero significativo en el porcentaje de macrófagos en los ratones que se vacunaron con BPZE1P (Figura 7E).

[0044] Despues de BAL, se recogieron los lóbulos del pulmón derecho y se congelaron directamente en nitrógeno líquido para la extracción de proteínas. Los lóbulos pulmonares se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis, PBS con nonidet P40 al 0,5 % y cóctel inhibidor de proteasa (Roche ®) y se homogeneizó a 4°C usando T-18 Ultra-Turrax (Ika ®). Las muestras se centrifugaron y se recogieron los sobrenadantes para la cuantificación de proteínas totales usando el ensayo de proteína BCA de Pierce™ (Thermo Fisher Scientific) y para mediciones de citocinas y quimiocinas usando el panel de ratón Cytokine 20-Plex (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) según las especificaciones del fabricante. Haciendo referencia a la Fig. 8, los niveles de citocinas se representan como la normalización de la cuantificación de citocinas/quimiocinas frente a las proteínas totales medidas en el lóbulo pulmonar. El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación de una prueba ANOVA paramétrica unidireccional, usando la prueba de comparación post hoc de Bonferroni con un intervalo de confianza del 95 %. **, p < 0,001. *, p < 0,005.

[0045] Como se muestra en la Figura 8, Los ratones tratados con HDM (Derf 5IR) produjeron niveles significativamente mayores de IL1α e IL1β en los pulmones, en comparación con los ratones no tratados. La vacunación con BPZE1 o BPZE1P antes de la sensibilización a HDM disminuyó significativamente estos niveles (Figura 8A y B). Se observó una tendencia similar para IL6 e IL13, aunque las diferencias entre los ratones vacunados y no vacunados no alcanzaron significación estadística (Figura 8C y D). Se observaron Niveles significativamente más bajos de CXCL1 (KC) inducido, CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) y GM-CSF en los ratones vacunados en comparación con los ratones que solo fueron tratados con HDM (Figura 8F-H). Generalmente, no hubo diferencia estadística entre los ratones vacunados con BPZE1 y los vacunados con BPZE1P.

[0046] Ejemplo 7: La vacunación de sujetos presensibilizados con BPZE1 o BPZE1P presenta niveles significativamente más bajos de resistencia de las vías respiratorias en comparación con aquellos que no fueron vacunados. Como se muestra en el diagrama de la Fig. 9, se sensibilizaron grupos de ratones de 5 semanas por vía intranasal con Derf 5IR o se les administró PBS, y a continuación se vacunaron con 10^6 BPZE1 o BPZE1P, o se dejaron sin vacunar. Nueve días después, los ratones se expusieron por vía intranasal con Derf 5IR o PBS durante 5 días. Dos días después de la última exposición, los ratones fueron anestesiados y se midió su resistencia en las vías respiratorias mediante pleitismografía como se describió anteriormente. El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación de una prueba ANOVA paramétrica de 2 vías, usando la prueba de comparación post hoc de Bonferroni con un intervalo de confianza del 95 %. ***, p < 0,0001. **, p < 0,001. Las comparaciones entre Derf 5IR y BPZE1 +

Derf 5IR se representan mediante la línea continua y las comparaciones entre Derf 5IR y BPZE1P + Derf 5IR se representan mediante la línea discontinua. Los ratones vacunados con BPZE1 o BPZE1P presentan niveles significativamente más bajos de resistencia de las vías respiratorias en comparación con aquellos que no fueron vacunados. De nuevo, la resistencia de las vías respiratorias de los ratones vacunados fue indistinguible de la del grupo de control, que no fueron sensibilizados ni se expusieron a Derf 5IR.

5

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cepa de bacterias *Bordetella* vivas atenuadas deficientes en toxina pertussis (PTX) y deficientes en pertactina suficientes para colonizar el tracto respiratorio de un sujeto para su uso en la reducción o la prevención del desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias en un sujeto diagnosticado con asma, enfermedad pulmonar intersticial o rinitis alérgica en donde la cepa de bacterias *Bordetella* vivas atenuadas deficientes en toxina pertussis (PTX) y deficientes en pertactina también son deficientes en citotoxina traqueal (TCT) y toxina dermonecrótica (DNT).
5
10. 2. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la inflamación de las vías respiratorias se **caracteriza por** la resistencia de las vías respiratorias, y la colonización del tracto respiratorio del sujeto dando como resultado la reducción o la prevención del desarrollo de resistencia de las vías respiratorias en el sujeto.
15. 3. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la inflamación de las vías respiratorias se **caracteriza por** la infiltración de eosinófilos en los pulmones del sujeto y la colonización de las vías respiratorias del sujeto dando como resultado la reducción o la prevención de la infiltración de eosinófilos.
20. 4. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la inflamación de las vías respiratorias se **caracteriza por** cantidades aumentadas de citocinas inflamatorias en los pulmones del sujeto y la colonización del tracto respiratorio del sujeto resulta en la reducción o la prevención del desarrollo de cantidades aumentadas de citocinas inflamatorias.
25
5. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cepa de bacterias *Bordetella* vivas atenuadas deficientes en toxina pertussis (PTX) y deficientes en pertactina carece de un gen funcional que codifica la pertactina.
30
6. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cepa de bacterias *Bordetella* vivas atenuadas deficientes en toxina pertussis (PTX) y deficientes en pertactina es la cepa BPZE1P depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes con el número de registro CNCM-I-5150.
35
7. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la inflamación de las vías respiratorias está provocada por la exposición a un alérgeno.
8. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene más de 10 ng por ml de anticuerpos anti-pertactina en su suero.
35
9. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto se ha inmunizado previamente con una vacuna que contiene pertactina o un antígeno similar a la pertactina.
40. 10. La cepa BPZE1P depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes con el número de registro CNCM-I-5150.

ES 3 027 194 T3

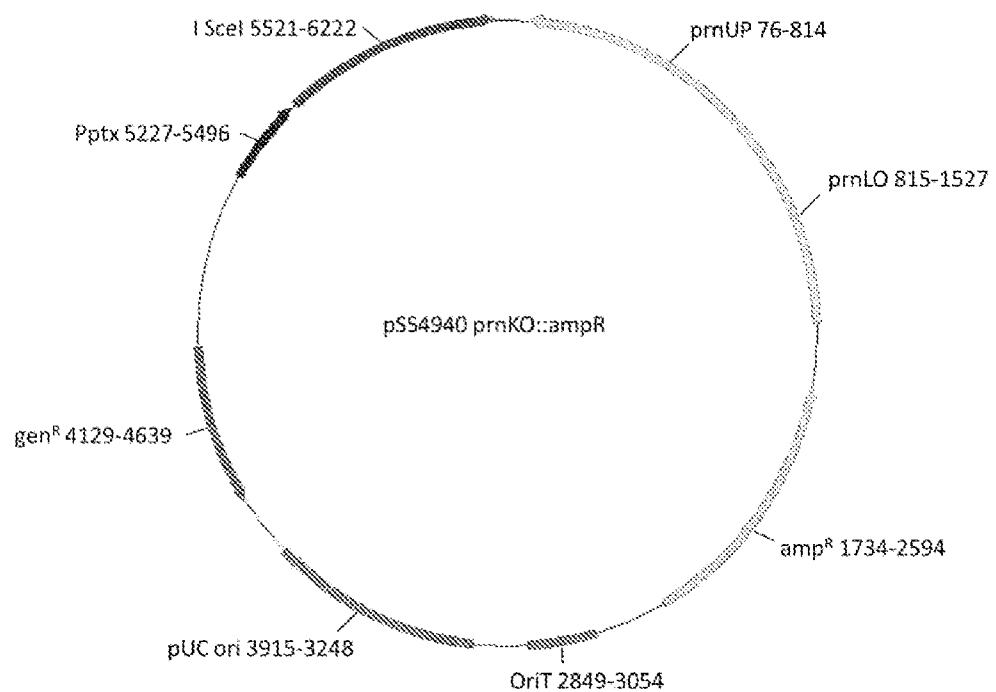
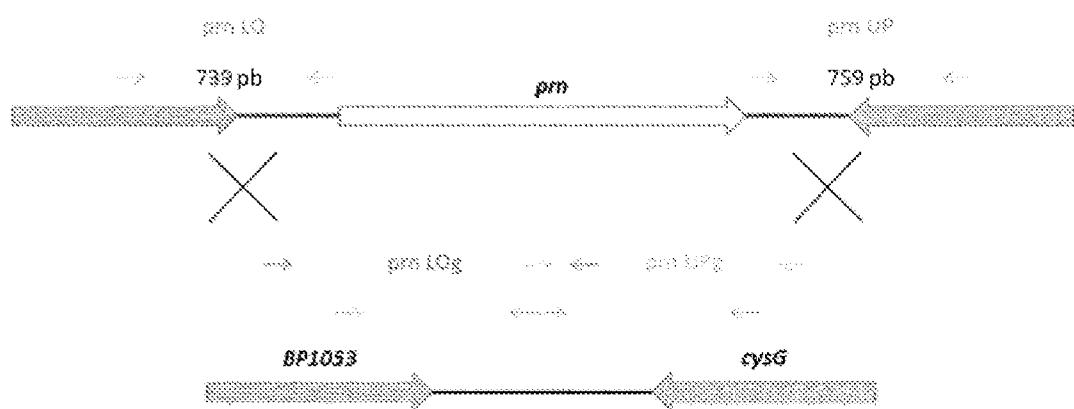
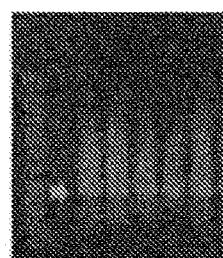


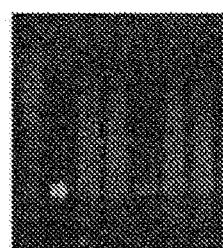
FIG. 1 A



PCR de construcción de BPZE1P



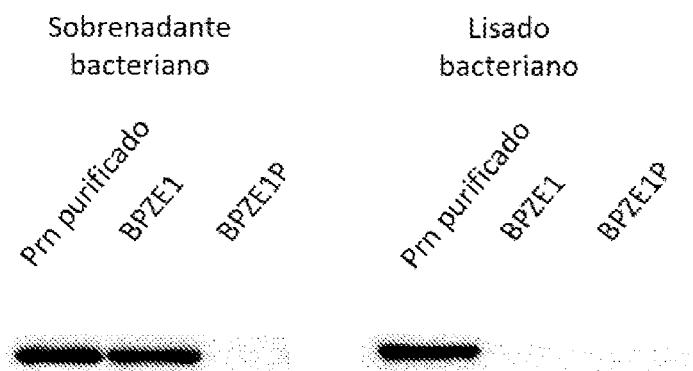
PCR de *prn UPg*



PCR de *prn LOg*

FIG. 1B

FIG. 1C



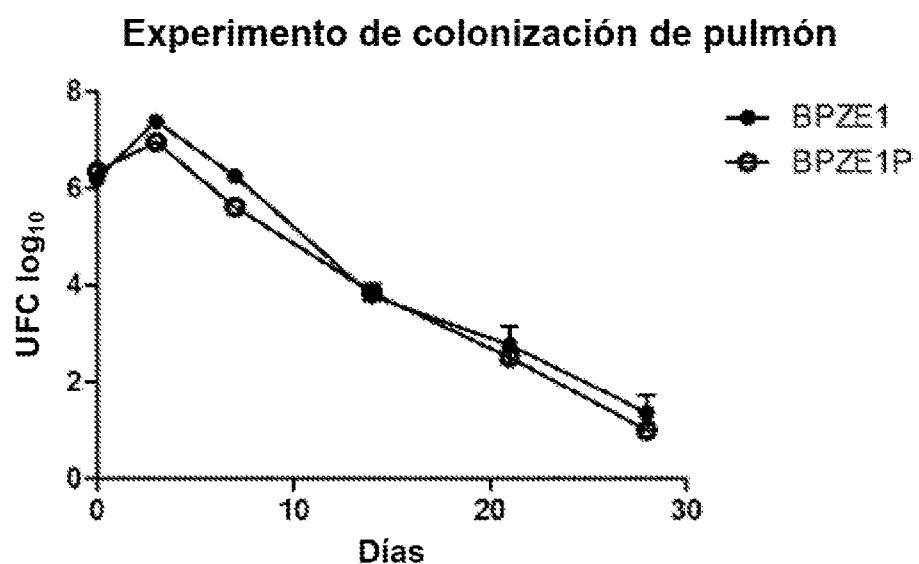


FIG. 2

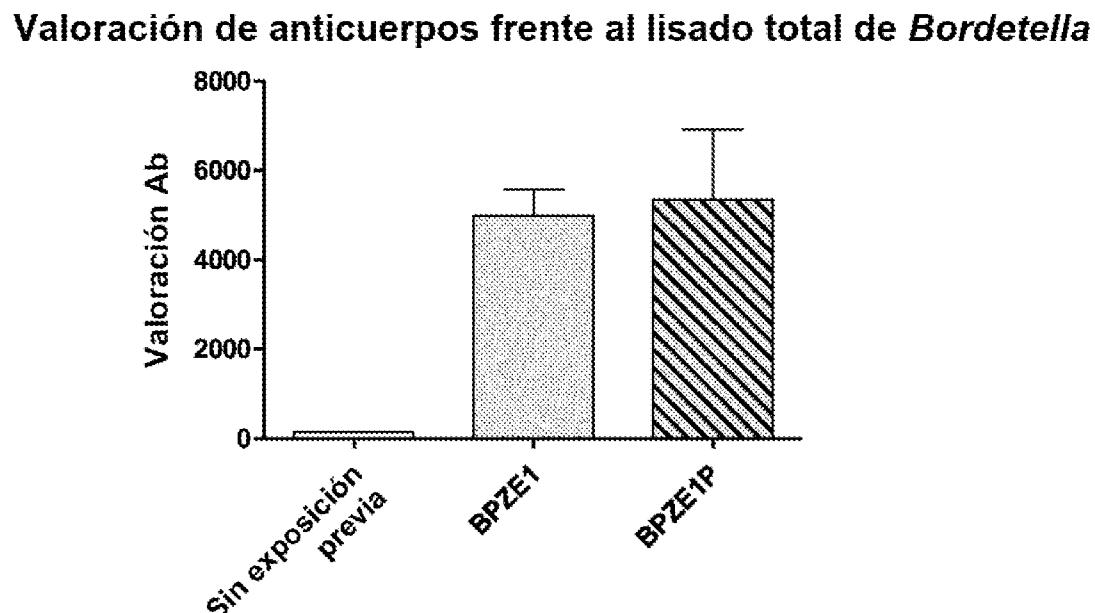


FIG. 3

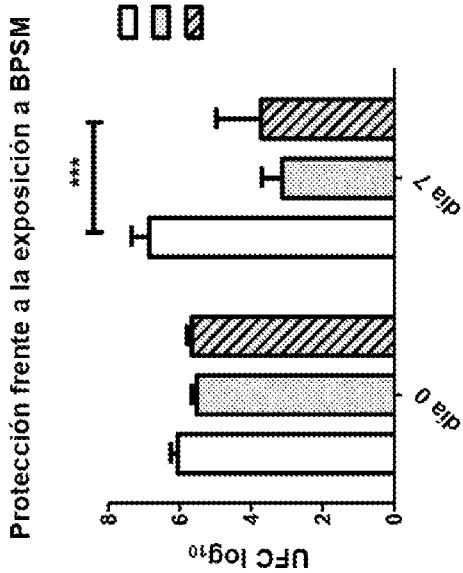


FIG. 4 A

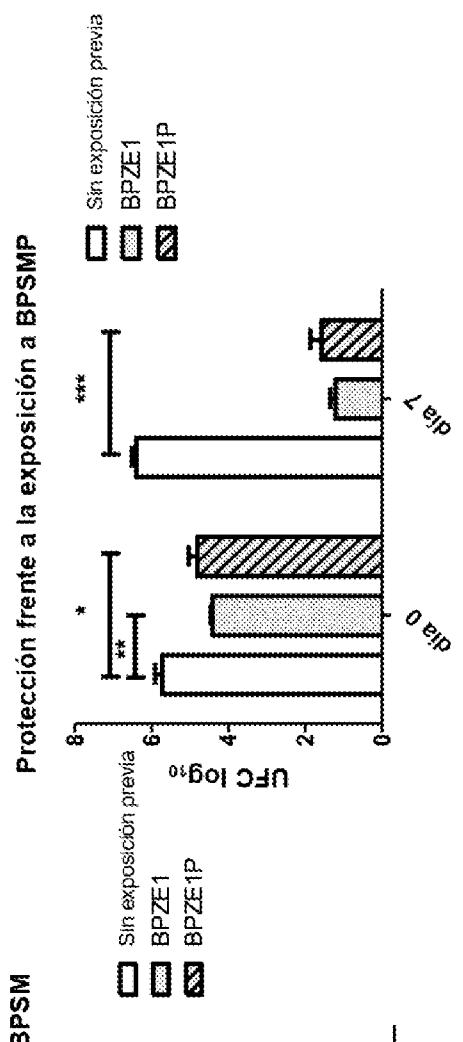


FIG. 4 B

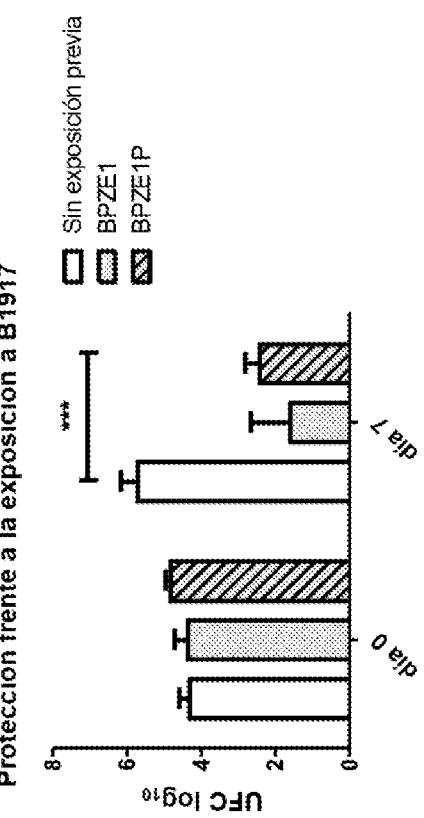


FIG. 4 C

Idoneidad para la colonización de BPZE1P

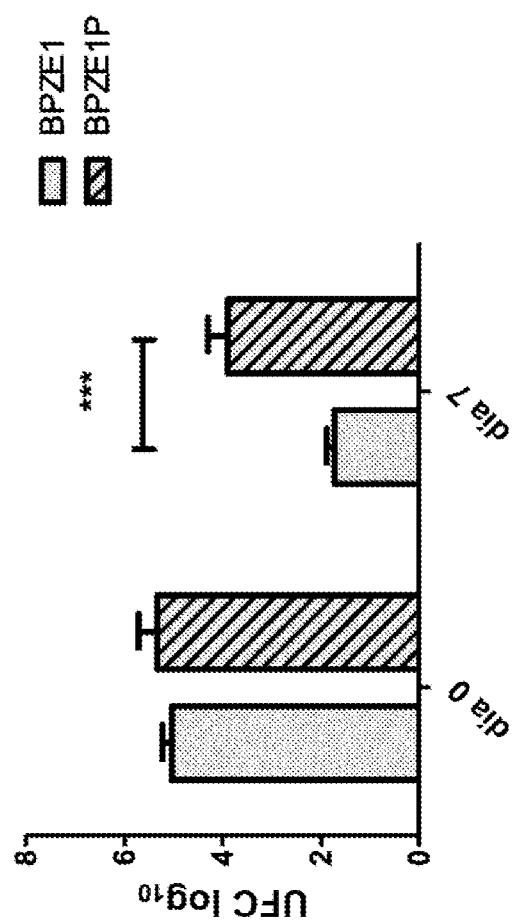


FIG. 5

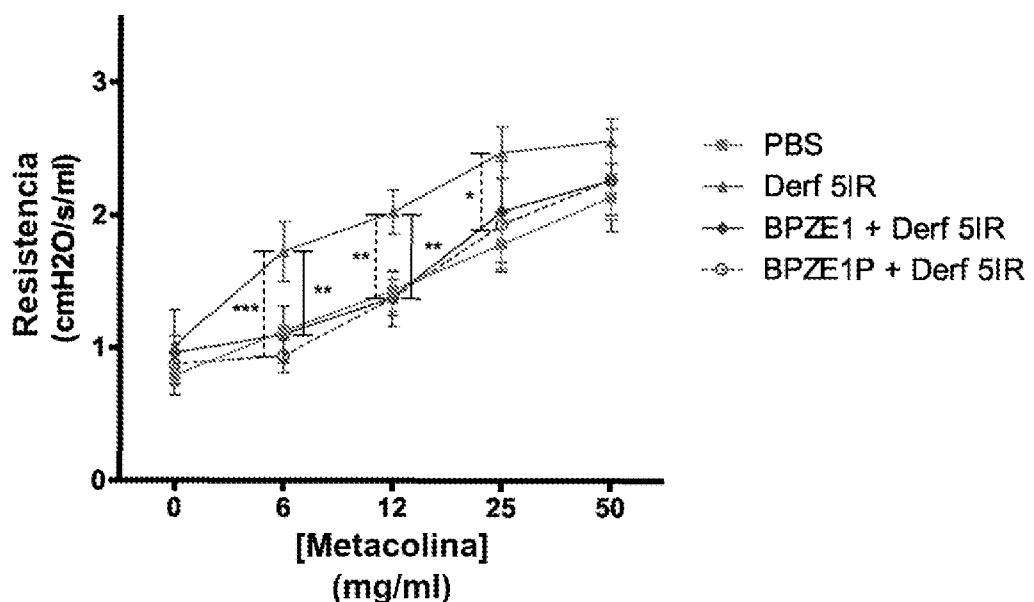


FIG. 6

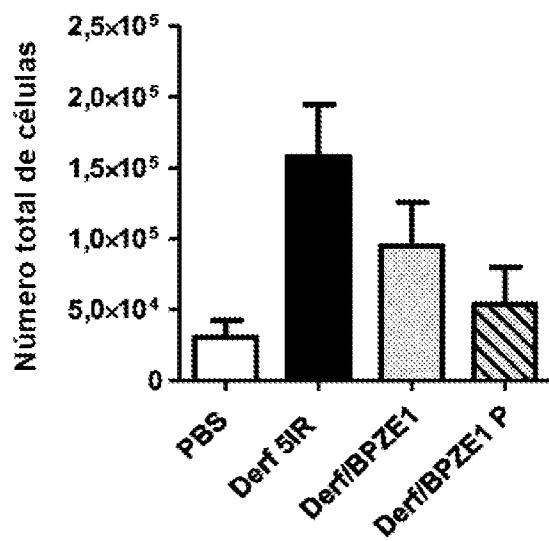


FIG. 7A

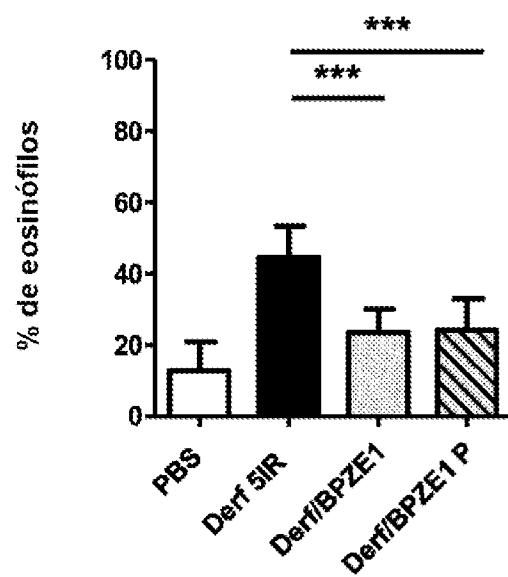


FIG. 7B

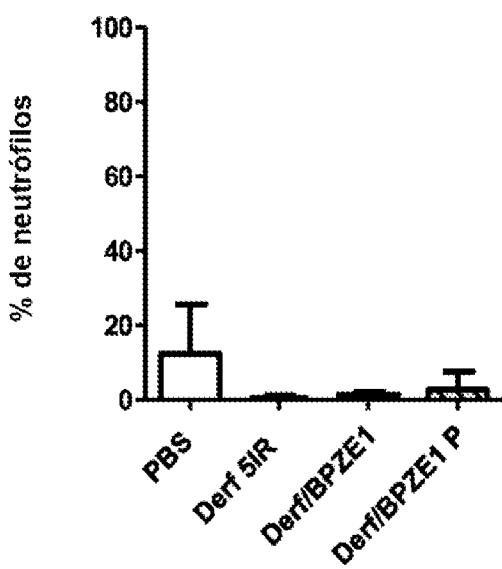


FIG. 7C

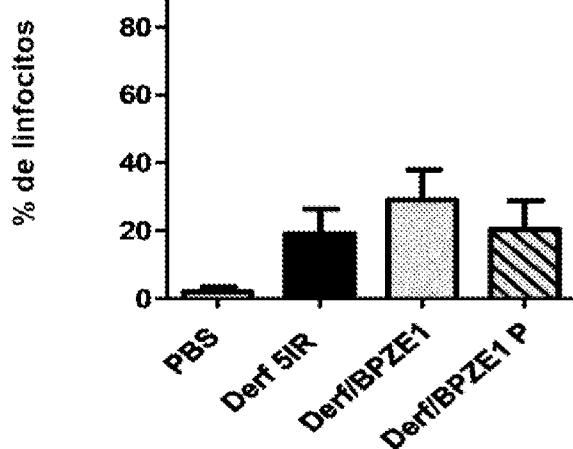


FIG. 7D

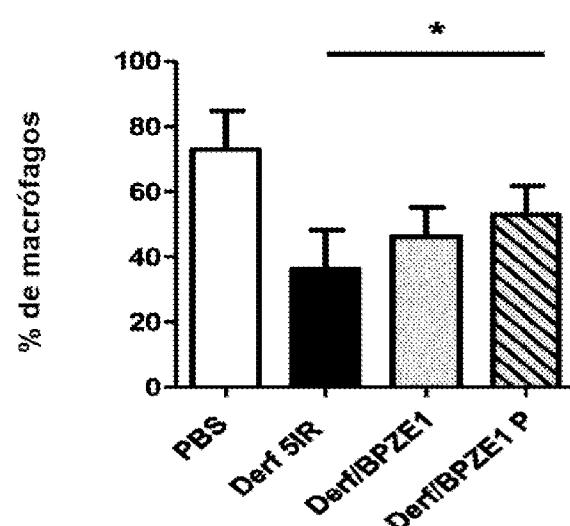


FIG. 7E

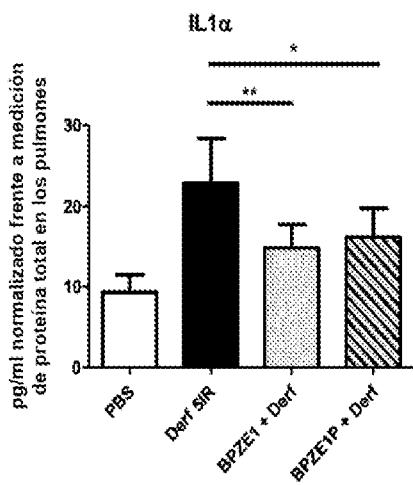


FIG. 8A

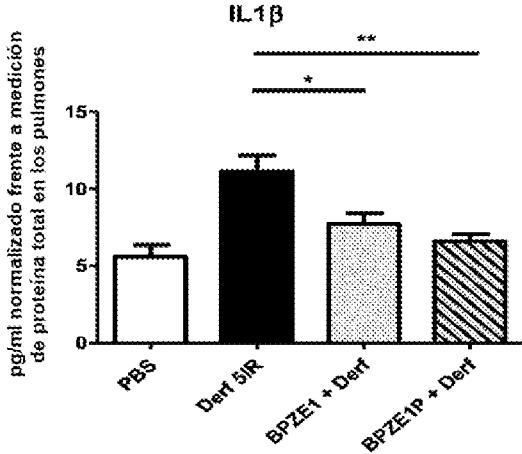


FIG. 8B

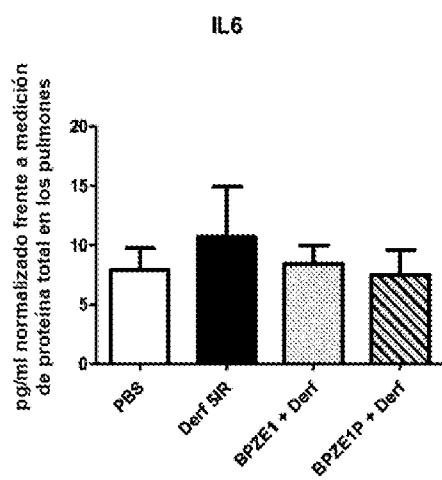


FIG. 8C

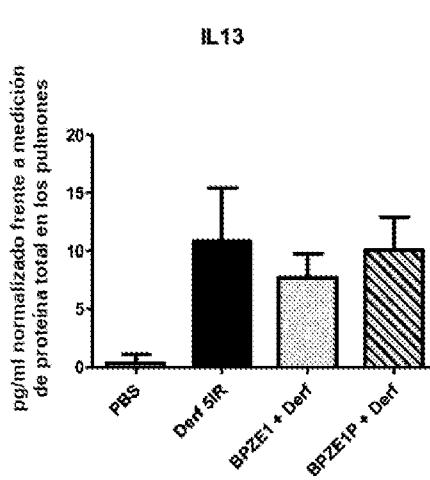


FIG. 8D

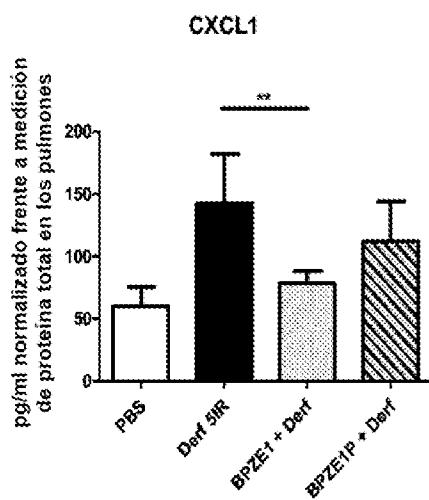


FIG. 8E

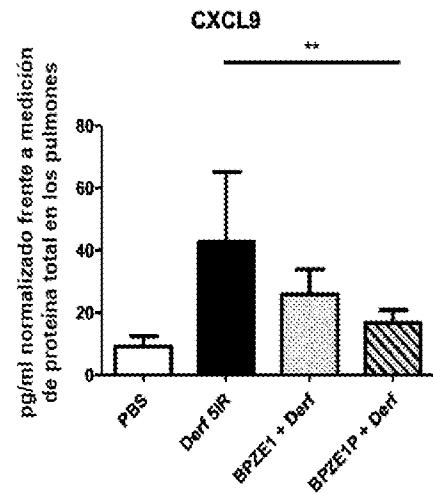


FIG. 8F

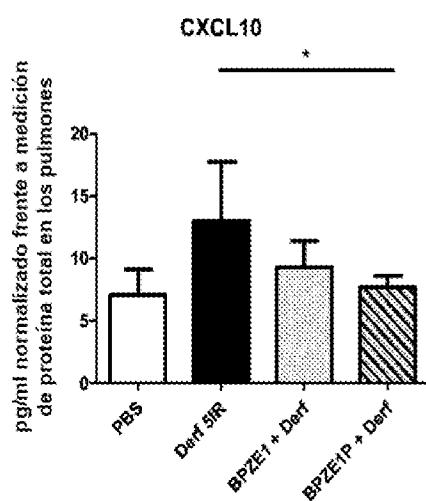


FIG. 8G

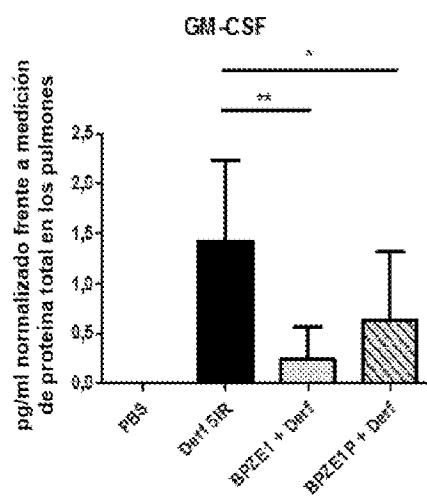


FIG. 8H

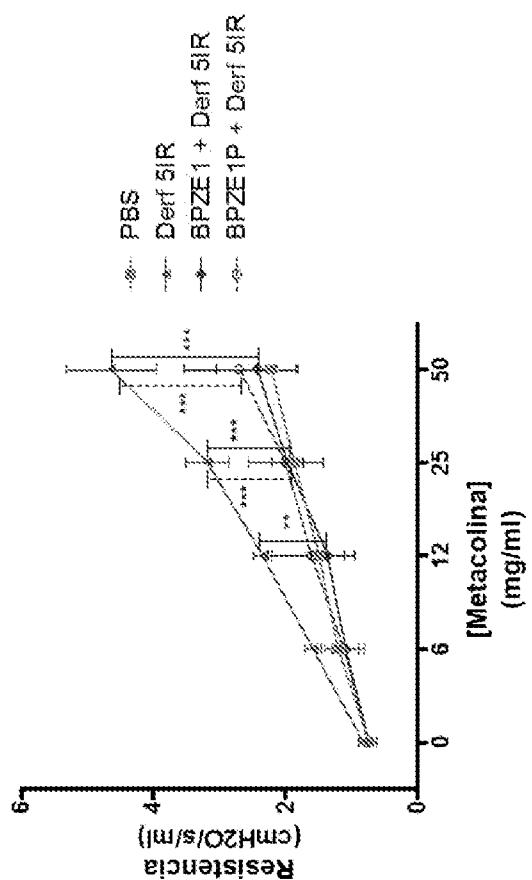
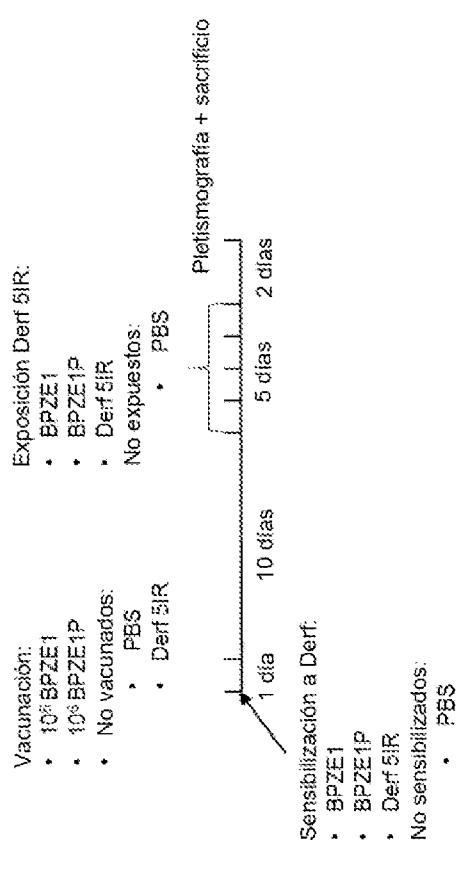


FIG. 9