



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 88329 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C12N015/00 A	C12N001/20 B
A61K039/09 B	C12N001/20 C
C12R001:46 C	C12N001/20 D

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1988.08.24	(73) <i>Títular(es):</i> EDWUIN H. BEACHEY 2909 CENTRAL AVENUE MEMPHIS, TN 38111 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1987.08.24 US 088626	THOMAS H. BEACHEY 1542 TUTWILER AVENUE MEMPHIS TN US
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.06.30	(72) <i>Inventor(es):</i>
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 01/95 1995.01.19	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* BACTÉRIAS NÃO VIRULENTAS CONTRA INFECÇÕES ESTREPTOCÓCICAS

(57) *Resumo:*

[Fig.]

68 108

Ref: 372.4712P

(492.4888R)

PATENTE Nº. 88 329

"Bactérias não virulentas contra infecções estreptocócicas"

para que

EDWIN H. BEACHEY, THOMAS P. POIRIER e
MICHAEL A. KEHOE, pretendem obter privi
légio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se a bactérias não virulentas nas quais foram clonadas sequências de nucleótidos heterólogas codificando para a expressão dos antigénios da proteína M estreptocócica, bactérias essas que são eficazes para induzir anticorpos opsonicos contra as infecções estreptocócicas. Estas bactérias são úteis para a vacinação contra as bactérias Streptococcus pyogenes.

-2-

MEMÓRIA DESCRITIVA

A presente invenção refere-se à imunização contra as infecções por estreptococos, mais particularmente contra as infecções por estreptococos do grupo A.

A invenção tem extensas e importantes implicações. Tanto quanto é sabido pelo inventor, é proporcionado pela primeira vez um veículo biológico vivo que transporta um antigénio protector de bactérias virulentas, antigénio esse que é eficaz na imunização contra infecções provocadas pelas bactérias virulentas. Entende-se que as concretizações aqui descritas são aplicáveis a aplicações, processos e utilizações mais extensas e de maior alcance.

A pesquisa para uma vacina segura e eficaz contra as estirpes de estreptococos do grupo A que desencadeiam a febre reumática e a doença reumática do coração tem prosseguido desde há mais de sessenta anos. Lancefield, "Current Knowledge of Type-Specific M Protein Antigens to Group A Streptococci", J. Immunol, Vol. 89, pg 307-313 (1962). Foi já dado a conhecer que poucas espécies bacterianas têm sido sujeitas a uma investigação tão intensiva, durante este século, quanto a Streptococcus pyogenes ou a estreptococos do grupo A. A medida que crescia a convicção de que este organismo era primeiro o principal, e depois o agente exclusivo da febre reumática aguda, os investigadores procuraram com muita determinação e esforço, isolar o produto da bactéria cujos componentes tóxicos ou antigénios pudessem estar relacionados com o processo reumático. Para um estudo mais profundo sobre a febre reumática e a infecção por estreptococos veja-se Stollerman, Rheumatic Fever and Streptococcal Infection (New York Clinical Cardiological Monographs, Grune and Stratton, 1975). O papel central da proteína M na imunidade contra os estreptococos do grupo A foi revisto por Stollerman. Faz-se também referência a Beachey e Seyer, "Primary Structure and Immunochemistry of Group A Streptococcal M Proteins," Seminars in Infections Disease, Vol. 4, pg 401-410 (J.B. Robbins, J.C. Hill and J.C.

Sadoff, eds, Georg Thiemeverlag, pub., New York and Stuttgart, 1982).

A maior parte dos esforços no sentido de desenvolver uma vacina foram frustrados por reacções tóxicas graves a qua se todos os produtos estreptocócicos introduzidos no hospedeiro humano. Alguns destes produtos têm mostrado dar origem a anticorpos que reagem em cruzado com os tecidos do hospedeiro, especialmente com o coração. Kaplan e Meyerserian, "An Immunological Cross-Reaction Between Group A Streptococcal Cells and Human Heart Tissue," Lancet, Vol. i, pg 706-710 (1962); Zabriskie e Freimer, "An Immunological Relationship Between the Group A Streptococcus and Mammalian Muscle," J. Exp. Med., Vol. 124, pg 661-678 (1966). Apesar de já estar estabelecido há muito tempo que a proteína M na superfície dos estreptococos do grupo A contém os antígenos protectores destes organismos, surgiu o receio de que a proteína M isolada pudesse estar associada com antígenos reactivos em cruzado e potencialmente nefastos para os tecidos que dessem origem à febre reumática em vez de a evitar. Este receio foi perpetuado pela descoberta de que certos estreptococos reumatogénicos produzem proteínas M que estão intimamente associadas com um antígeno reactivo em cruzado com o coração. Kaplan, "Immunologic Relation of Streptococcal and Tissue Antigens. I. Properties of an Antigen in Certain Strains of Group A Streptococci Exhibiting an Immunologic Cross-Reaction With Human Heart Tissue," J. Immunol. Vol. 90, pg 595 (1963). De facto, foi recentemente estabelecido que uma das moléculas da proteína M contém, no seio da sua estrutura covalente, um epitopo que induz um anticorpo protector anti-estreptocócico que reage também em cruzado com uma proteína sarcolemar do tecido do coração humano. Dale e Beachey, "Protective Antigenic Determinant of Streptococcal M Protein Shared With Sarcolemmal Membran Protein of Human Heart," J. Exp. Med., Vol. 156, pg 1165-1176 (1982).

A patente dos Estados Unidos No. 4,284,537, de E. Beachey, concedida em 18 de Agosto de 1981, revela a sequência de aminoácidos de dois fragmentos peptídicos derivados da pro

-4-

teína M tipo 24. É também revelado que cada um destes fragmentos naturais, quando ligados covalentemente a um veículo como a polilisina, foi capaz de induzir anticorpos opsonicos, específicos para um dado tipo, eficazes contra Streptococcus pyogenes. Cada um destes fragmentos era um extracto natural e cada um continha 35 aminoácidos.

A patente dos Estados Unidos No. 4,454,121, de E. Beachey, concedida em 12 de Junho de 1984, revela um péptido sintético (S-CB7) e que um dos determinantes protectores se encontra localizado num fragmento específico de S-CB7 da proteína M tipo 24 que contém apenas doze resíduos de aminoácidos (S-CB7(18-29)). O S-CB7, como descrito, difere do fragmento nativo CB-7 por o resíduo terminal COOH de S-CB7 ser metionina, em vez de homoserina. A especificação mostra e descreve também, conjugados ligados covalentemente, de S-CB7 e veículos hapteno apropriados, naturais, como BSA ou OVA, ou sintéticos, como polilisina. Outros detalhes acerca deste trabalho foram publicados em Nature a 30 de Julho de 1981, por Beachey e col., 292, páginas 457-459.

A patente dos Estados Unidos No. 4,521,334, intitulada "Synthetic Polypeptide Fragments," de Edwin H. Beachey, concedida em 4 de Junho de 1985, revela a sequência de aminoácidos de três fragmentos peptídicos CB3, CB4 e CB5, e sequências de 35 e 37 aminoácidos da proteína M tipo 24 que contém determinantes antigénicos correspondentes aos determinantes antigénicos contidos em CB3-CB7. A patente dos Estados Unidos No. 4,597,967, intitulada "Synthetic Polypeptide Fragments," de Edwin H. Beachey, concedida em 1 de Julho de 1986, revela que estes fragmentos, quando ligados covalentemente a um veículo como a polilisina, são capazes de induzir anticorpos opsonicos, específicos para um dado tipo, eficazes contra Streptococcus pyogenes.

A patente dos Estados Unidos No. 739,963 intitulada "Biologically Active Hybrid Peptides of Streptococcal M Protein and Compositions and Use" de Edwin H. Beachey et al. depositada em 31 Maio de 1985, revela sequências peptídicas con

-5-

tendo fragmentos de proteínas M5, M6 e M24, que são capazes de induzir anticorpos opsônicos e bactericidas para Streptococcus pyogenes que não são sorologicamente reactivas em cruzado com os antigénios de tecido do coração humano ou do hospedeiro. O pedido dos Estados Unidos No. 839,750, entitulado "Synthetic M Proteins-Streptococci Type 6" de Edwin H. Beachey, e col. depositado em 14 Março de 1986 descreve a síntese de conjugados do antigénio da proteína M6. O pedido dos Estados Unidos No. 858,436 entitulado "Localization of Protective Epitopes of the Amino Terminus of Type S Streptococcal M Protein," de Edwin H. Beachey, e col. depositado em 1 Maio de 1986, descreve a síntese de conjugados de antigénio da proteína M5.

As patentes anteriores revelam pequenos fragmentos peptídicos que são imunogénicos e contribuem para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra as infecções estreptocócicas que dão início a febres e à doença reumática do coração. A abordagem efectuada foi a de que os péptidos muito pequenos permitiriam dispor de uma grande porção da molécula da proteína M e portanto deveriam reduzir as possibilidades de induzirem reacções imunológicas em cruzado contra os tecidos do hospedeiro. Veja-se por exemplo a patente dos Estados Unidos No. 4,454,121, acima referida, colunas 1 e 2.

Para uma informação adicional em relação à imunidade protectora especifica para um dado tipo, evocada por péptidos sintéticos da proteína M de Streptococcus pyogenes, veja-se Beachey et al., "Type Specific Protective Immunity Evoked by Synthetic Peptide of Streptococcus pyogenes M Protein," Nature, Vol. 292, No. 5822, pp 457-459 (30 de Julho de 1981).

Para literatura adicional neste campo veja-se Hasty e col., "Hybridomas Antibodies Against Protective and Non-Protective Antigenic Determinants of a Structurally Defined Polypeptide Fragment of Streptococcal M Protein," J. Exp. Med. Vol. 155, p 1010 (Abril de 1982); e Hopp e Woods, "Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino Acid Sequences," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, No. 6 pp 3824-28 (Junho

68 108

Ref: 372.4712P

(492.4888R)

-6-

de 1981).

Não obstante estes avanços, subsiste ainda uma necessidade imperiosa, que não foi satisfeita até ao presente, de uma vacina administrável oralmente, que incorpore estes polipeptidos imunogénicos não reactivos em cruzado. Administrando estes péptidos na forma de uma bactéria recombinante não-virulenta atenuada capaz de os sintetizar, a presente invenção marca mais um passo em frente e proporciona mais um avanço nas ciências médicas, particularmente no controlo das infecções estreptocócicas.

Conhecem-se numerosos serótipos de proteínas M, codificados em genes que são alelos uns dos outros. Cada serotipo corresponde a uma estirpe diferente de S. pyogenes, e esses serotipos diferem apenas nas suas sequências amino terminais.

A presente invenção refere-se de forma geral a uma abordagem da engenharia genética à síntese de um antigénio ou fragmento de antigénio da proteína M estreptocócica que é eficaz na indução de anticorpos opsónicos contra infecções estreptocócicas.

Num sentido mais específico, a invenção proporciona uma bactéria não virulenta transformada que contém uma sequência de nucleótidos heteróloga, sequência de nucleótidos essa que é codificada e expressa um antigénio da proteína M estreptocócica.

A invenção proporciona também um hospedeiro não virulento transformado no qual o antigénio expresso da proteína M estreptocócica é eficaz na indução de anticorpos opsónicos contra a infecção estreptocócica.

Outro objecto da presente invenção é proporcionar também um antigénio de proteína, eficaz contra formas virulentas da bactéria não virulenta.

Um objecto específico da invenção é proporcionar uma bactéria não virulenta transformada do género Salmonella, especificamente da espécie typhimurium, que porta um plasmídeo que codifica para um gene da proteína M, mais especificamente para

-7-

o gene da proteína M tipo 5.

Outro objecto da invenção é proporcionar um antigénio da proteína M estreptocócica eficaz na indução de anticorpos opsónicos que conferem imunidade sistémica contra as infecções estreptocócicas.

Um objecto da presente invenção é proporcionar um antigénio multivalente da proteína M estreptocócica, eficaz na indução de anticorpos opsónicos contra mais de um serotipo da estirpe M estreptocócica.

Outro objecto da presente invenção é proporcionar um antigénio expresso da proteína M estreptocócica que é expresso no citoplasma e não é expresso na superfície da bactéria.

É ainda objecto da invenção proporcionar um antigénio da proteína M estreptocócica que, quando expresso pelo hospedeiro, particularmente um hospedeiro microbiano heterólogo não virulento no qual tenha sido clonado o gene para o antigénio da proteína M estreptocócica, é um antigénio eficaz induz imunidade e não é sorologicamente reactivo em cruzado com os antigénios de tecidos humanos, especialmente os do coração. Um outro objectivo da invenção é proporcionar uma bactéria não virulenta transformada não pertencente à espécie do grupo A do género Streptococcus.

Outro objecto da presente invenção é um hospedeiro transformado, por exemplo uma bactéria, particularmente uma bactéria entérica não virulenta que, apesar da sua não virulência, induza ainda anticorpos. É um objectivo desta invenção proporcionar uma bactéria hospedeira não-virulenta, transformada, que não forme colónias no sujeito a ser imunizado, mas que se multiplique até à extensão limitada necessária para induzir anticorpos.

Um objectivo desta invenção é a transformação de Salmonella typhimurium. Outro objectivo desta invenção é a transformação de Streptococcus sanguis.

Outro objectivo da invenção é uma bactéria hospedeira não virulenta, transformada, na qual foi clonada uma sequência heteróloga de nucleótidos de outra espécie bacteriana, se



-8-

quência de nucleótidos essa que é codificada para e expressa o antigénio da proteína que é eficaz para induzir anticorpos opsonicos contra as outras espécies bacterianas.

Outro objectivo importante da invenção é proporcionar as sequências de nucleótidos transportadas pelo gene que codifica e expressa os antigénios das outras espécies bacterianas.

Outro objecto do invento é proporcionar vários outros componentes obtidos por engenharia genética que conduzem ao hospedeiro não virulento transformado.

Outro objecto da invenção é a clonação na bactéria hospedeira das sequências de nucleótidos/^{que}codificam para polipéptidos eficazes na indução de anticorpos opsonicos contra infecções estreptocócicas, em particular para serotipos estreptocócicos 5, 6 e 24.

Outro objecto da invenção é a clonação na bactéria hospedeira, das sequências de nucleótidos codificadas para um antigénio de superfície de E. coli que induz anticorpos anti-adesivos.

Outro objecto da invenção é proporcionar os passos de engenharia genética que conduzem à preparação das bactérias não virulentas.

Outro objectivo da invenção é a preparação de plasmídeos e outras construções necessárias para clonar na estirpe S. typhimurium a sequência de nucleótidos heteróloga que expressa os antigénios desejados da proteína M estreptocócica. Um objectivo importante da invenção é a preparação de plasmídeos que são expressos de forma estável em Aro⁻S. typhimurium SL3261.

Outro objecto da invenção é um processo de imunização de um mamífero, como um humano, no qual se administra a esse mamífero, numa dosagem eficaz para induzir anticorpos opsonicos e conferir imunidade sistémica contra infecções estreptocócicas, a bactéria não virulenta transformada, acima descrita, contendo a sequência de nucleótidos heteróloga. São tam-

-9-

bém objecto do invento os plasmídeos (e vectores).

Um importante objecto da invenção é a administração oral das composições da invenção, apesar de se proporcionarem também com esta invenção outros tipos de administração, incluindo a via parentérica.

Um aspecto importante da invenção é proporcionar imunidade contra infecções orais do tipo estreptocócico.

Outro aspecto da invenção é proporcionar uma composição não virulenta que é muito bem tolerada pelo sujeito ao qual a composição é administrada.

É um aspecto da invenção digno de menção, o facto de a imunidade conferida ao paciente ser sistémica e ser conferida comparativamente rápida e completamente, mesmo quando administrada por via oral.

Outros objectos da invenção tornar-se-ão evidentes a partir da descrição que se segue. Outras características e vantagens da invenção tornar-se-ão visíveis a partir dos exemplos que se seguem e por referência ao desenho em apêndice no qual:

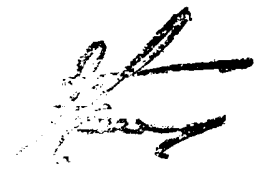
A Fig. 1 apresenta uma análise "Immunoblot" (imunomarcacção) da proteína M do tipo 5 expressa por Salmonella typhimurium LB5000 (faixa 1) e SL3261 (faixa 2-9) transformada por pMK207.

Em adição às patentes e publicações referidas acima, outras obras da técnica anterior que foram tomadas em consideração na descrição desta invenção incluem:

Beachey, et als., "Repeating Covalent Structure and Protective Immunogenicity of Native and Synthetic Polypeptide Fragments of Type 24 Streptococcal M Protein," J. Biol. Chem., Vol. 258, No. 21 pp 13,250-13,257 (1983).

van de Rijn, et als., "Group A Streptococcal Antigens Cross-Reactive with Myocardium," J. Exp. Med., Vol. 146, pp. 579-599 (1977).

van de Rijn, et als., "Immunochemical Analysis of Inta



-10-

ct M Protein Secreted From Cell Wall-Less Streptococci," Infect. Immun., Vol. 32, pp. 86-91 (1981).

Edman and Begg, "A Protein Sequenator," European J. Biochem. Vol. 1, pp. 80-91 (1967).

Phillips, et als., "Streptococcal M Protein: Helical Coiled - Coil Structure and Arrangement on the Cell Surface," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, No. 8 pp. 4689-4693 (Agosto de 1981).

Laver, et als, "Antigenic Drift in Type A Influenza Virus: Peptide Mapping and Antigenic Analysis of A/PR/8/34-(HON1) Variants Selected With Monoclonal Antibodies," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 76, No. 3, pp. 1425-1429 (Março de 1979).

Atassi, "Antigenic Structure of Myoglobin: The Complete Immunochemical Anatomy of a Protein and Conclusions Relating to Antigenic Structures of Proteins," Immunochemistry, Vol. 12, pp. 423-438 (1975).

Kabat, Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, pp. 89-100 (Holt, Rhinehart & Winston, New York, (1968).

Nisonoff, Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. 1, pp. 120-187 (1977).

Munoz, Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. 3, pp. 146-160 (1970).

Manjula e Fischetti, "Tropomyosin-like Seven Residue Periodicity in Three Immunologically Distinct Streptococcal M Proteins and its Implications for the Antiphagocytic Property of the Molecule," J. Exp. Med., Vol. 155, pp. 695-708 (1980).

Beachey e Stollerman, "Toxic Effects of Streptococcal M Protein on Platelets and Polymorphonuclear Leukocytes in Human Blood," J. Exp. Med. Vol. 134, pp. 351-365 (1971).

Dale, et als., "Heterogeneity of Type-Specific and Cross-Reactive Antigenic Determinants Within a Single M Pro-

-11-

tein of Group A Streptococci, " J. Exp. Med. Vol. 155, pp. 1026-1038 (1980).

Beachey, et als. "Purification and Properties of M Protein Extracted from Group A Streptococci with Pepsin:

Covalent Structure of the Amino Terminal Region of Type 24 M Antigen," J. Exp. Med. Vol. 145 pp. 1469-1483 (1977).

Beachey, et als., "Primary Structure of Protective Antigens of Type 24 Streptococcal M Protein," J. Biol. Chem., Vol. 255, pp. 6284-6289 (1980).

Beachey, et als., "Repeating Covalent Structure of Streptococcal M Protein," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, pp. 3163-3167 (1978).

Beachey, et als., "Human Immune Response to Immunization with a Structurally Defined Polypeptide Fragment of Streptococcal M Protein," J. Exp. Med., Vol. 150, pp. 862 (1979).

Brown, et al., "An Attenuated aroA Salmonella typhimurium Vaccine Elicits Humoral and Cellular Immunity to Cloned -Galactosidase in Mice," The Journal of Infectious Diseases, Vol. 155, No. 1 (Janeiro de 1987). Esta publicação discute a estirpe SL3261 de Salmonella typhimurium e uma estirpe de vacina aroA atenuada que foi utilizada como veículo para o plasmídeo pXY411.

Esta publicação de Brown, et al., é aqui incorporada por referência. Outra publicação de interesse é Hoiseth and Stocker, "Aromatic-dependent Salmonella Typhimurium are Non-Virulent and Effective as Live Vaccines," Nature, Vol. 291 (21 de Maio de 1981); Smith, et al., "Aromatic-Dependent Salmonella Typhimurium are Non-Virulent and Effective as Live Vaccines," Am. J. Vet. Res., Vol. 45, No. 1 (Janeiro de 1984); Smith et al., "Vaccination of Calves Against Salmonella Dublin with Aromatic-Dependent Salmonella Typhimurium," Am. J. Vet. Res., Vol. 15, No. 11 (Novembro de 1984); Maskell, et al., "Attenuated Salmonella Typhimurium as Live Oral Vaccines and Carriers for Delivering Antigens to the Secretory Immune System," Vaccines 86 (Cold Spring Harbor Laboratory 1986).

-12-

As patentes no campo da engenharia genética de interes se geral incluem:

Patente dos Estados Unidos No. 4,428,941 intitulada "Nucleotide Sequence Coding the Surface of the Hepatitis B Virus, Vector Containing Said Nucleotide Sequence, Process Allowing the Obtention Thereof and Antigen Obtained Thereby," concedida a Francis Galibert, et als., em 31 de Janeiro de 1984; Patente dos Estados Unidos No. 4,518,584 intitulada "Human Recombinant Interleukin - 2 Muteins," concedida a Mark et als em 21 de Maio de 1985; Patente dos Estados Unidos No. 4,588,585 intitulada "Human Recombinant Cysteine Depleted Interferon-B Muteins," concedida a Mark et als., em 13 de Maio de 1986; e Patente dos Estados Unidos No. 4,625,252 intitulada "Recombinant Bacterial Plasmids Containing the Coding Sequences of Insulin Genes," concedida a Rutter et als em 24 de Março de 1987.

Patente dos Estados Unidos No. 4,666,846 intitulada "Novel Cloning Vectors Containing Selectable Genetic Markers for Use in Streptomyces and Related Organisms," concedida a Fayerman, et als em 19 de Maio de 1987 e Patente dos Estados Unidos No. 4,666,847 intitulada "Recombinant DNA Means and Methods," concedida a Alford et als em 19 de Maio de 1987.

De acordo com a invenção é preferível que o plasmídeo que codifica o gene da proteína M seja primeiro clonado e expresso em Escherichia coli. Podem utilizar-se quaisquer outros bacilos entérico do grupo coliforme como Klebsiella ou Enterobacter, mas E. coli é normalmente preferido. Em seguida o plasmídeo que transporta o gene M é isolado e purificado e faz-se então uma construção para transformar as bactérias não virulentas desejadas, como a aroA-S. typhimurium (SL3261). Deverá notar-se que esta estirpe mutante exibe um marcador nutricional tanto para PABA como 2,3-DHB. Veja-se Brown et al, acima citado. Deverá notar-se que outra espécie de S. typhimurium desejada é recA S. typhimurium, particularmente a estirpe Ty2la. Veja-se Clements, et al., "Construction of a Potencial Live Aro Vaccine for typhoid type fever and cholera - E. coli - related diarrheas," Infect. Immun., 46:564-9 (1984). Vejam-se

-13-

também as outras referências citadas, no acima citado artigo de Brown, et al, que são também aqui incorporadas por referência.

É preferível obter o gene da proteína M a partir de uma estirpe virulenta de S. pyogenes. No entanto, é possível obter o gene a partir de uma estirpe não virulenta, atenuada, de S. pyogenes ou mesmo fabricar a sequência de nucleótidos codificada para a proteína M desejada.

Os vectores de clonagem de ADN recombinante da presente invenção não estão limitados à utilização numa única espécie ou estirpe de Salmonella. Pelo contrário, os vectores são largamente aplicáveis e podem ser transformados em células hospedeiras de outras bactérias gram-negativas como as do género Enterobacteriaceae (como Shigella e Klebsiella como Klebsiella pneumoniae, Enterobactérias como Enterobacter aerogenes). Salmonellae, como Salmonella arizona e Citrobacter podem ser utilizadas desde que propriamente atenuadas ou tornadas não-virulentas.

As espécies comuns de Salmonella que podem ser utilizadas quando atenuadas e tornadas não virulentas incluem as seguintes:

S. paratyphi A, S. schottmulleri, S. typhimurium, S. paratyphi C, S. choleraesuis, S. montevideo, S. newport, S. typhi, S. enteritidis, S. gallinarum, S. anatum.

De acordo com a invenção podem também utilizar-se como, hospedeiro para os vectores de clonagem de ADN recombinante da presente invenção, bactérias do género Streptococcus que sejam não virulentas ou que tenham sido tornadas não virulentas ou atenuadas, incluindo Streptococci dos grupos imunológicos A-O mas geralmente outros que não A. Os Streptococci adequados que podem ser utilizados como hospedeiro bacteriano incluem S. Cremoris, S. Faecalis, S. Salivarius, S. Mitior, S. Mitis, S. Mutans e S. Sanguis, sendo a última espécie a espécie preferida presentemente.

Os microorganismos apropriados adicionais que podem

-14-

ser atenuados e transformados de acordo com a invenção são conhecidos. Pode fazer-se referência a Davis, et al., Microbiology, (Harper & Row, Segunda Edição, 1973).

Em geral qualquer bactéria entérica pode servir como bactéria hospedeira. É preferível que a bactéria hospedeira sobreviva no sujeito apenas o tempo suficiente para induzir a resposta opsónica, mas em geral pode utilizar-se qualquer estirpe bacteriana que tenha sido atenuada para não colonizar mas que continue a multiplicar-se até um grau limitado para induzir anticorpos para a proteína estranha. Numa concretização preferida da invenção, é utilizada a estirpe Aro⁻ de S. typhimurium, que requer dois metabolitos não encontrados nos tecidos de mamíferos, PABA e 2,3-DHB. Como resultado, as bactérias inoculadas morrem após várias gerações por falta destes metabolitos. Veja-se Hoiseth e Stocker acima citados.

No entanto, pode empregar-se qualquer agente microbiano mutado com uma deficiência metabólica para compostos nutricionais não encontrados nos tecidos do sujeito a ser imunizado, ou qualquer um assim produzido por manipulações genéticas.

Deverá notar-se que a aro⁻ Salmonella typhimurium SL-3261 não virulenta, na qual foi transformado um plasmídeo contendo o gene estrutural codificando o antigénio da proteína M de serótipo 5, expressa a molécula completa da proteína 5M, expressão essa que é confinada quase exclusivamente ao compartimento citoplasmático de S. typhimurium. Constitui um aspecto único e inesperado desta invenção o facto de um antigénio de superfície imunogénico e protector como o antigénio da proteína M estreptocócica ser expresso no citoplasma da bactéria hospedeira não virulenta.

Assim, pode verificar-se que de acordo com a invenção, a sequência de nucleótidos desejada que codifica e expressa o antigénio da proteína que é eficaz para induzir anticorpos opsónicos contra as infecções estreptocócicas, particularmente do serótipo 5, pode ser clonada numa grande variedade de hospe

-15-

deiros. Num sentido mais alargado, portanto, o hospedeiro transformado no qual se encontra a sequência de nucleótidos após replicação não necessita de ser heterólogo relativamente a sequência de nucleótidos, nem a sequência necessita de ser heteróloga relativamente aos microorganismos.

De acordo com uma concretização específica do método de imunização de um animal de sangue quente, foi demonstrado que

a) a administração peroral de até $1,65 \times 10^9$ Salmonella não virulenta, mutante, contendo o plasmídeo pMK207 codificando a proteína M estreptocócica do serótipo 5 era tolerada em ratinhos;

b) o plasmídeo pMK207 era extremamente estável tanto in vitro como in vivo;

c) os ratinhos que receberam a maior dose (10^9) de bactérias retiveram (harbored) os microorganismos no fígado durante um período tão longo como três semanas sem efeitos de doença;

d) os ratinhos imunizados oralmente com Salmonella transformada não virulenta que expressa o gene do antigénio da proteína M estreptocócica do Serótipo 5 desenvolveram anticorpos opsonícos no soro, tão cedo quanto três semanas, contra os estreptococos do serótipo M5; e

e) os ratinhos imunizados ficaram totalmente protegidos em três semanas contra os "desafios" intra-peritoniais dos estreptococos do serótipo M5 homólogo (mas não do serótipo M24 heterólogo). É digno de menção o facto de não se observar uma imunidade reactiva em cruzado quando a composição da invenção é administrada oralmente. A expressão citoplasmática do antigénio da proteína M na bactéria não virulenta é especialmente vantajosa para esta administração oral. O antigénio fica protegido, no citoplasma da bactéria não virulenta dos ácidos do estômago e de outros agentes danificantes até que a célula não virulenta morra e liberte o antigénio, ordinariamente no intestino delgado, local preferido para a libertação dos antigénios.

De acordo com a invenção, a bactéria não virulenta pode também ser utilizada como hospedeiro para vectores de clonação de ADN recombinante, contendo sequências de nucleótidos que co

-16-

dificam e expressam polipéptidos imunogénicos que são especificamente eficazes para conferir imunidade contra infecções estreptocócicas e que não são reactivas em cruzado com os antígenos dos tecidos humanos, especialmente com os do coração.

Os polipéptidos imunogénicos de acordo com a invenção incluem oligopéptidos sintéticos que copiam regiões de moléculas de proteína M que não têm epitopos auto-imunes, como descrito na Patente dos Estados Unidos No. 4,284,537 concedida a E. Beachey em 18 de Agosto de 1981, Patente dos Estados Unidos No. 4,454,121 concedida a E. Beachey em 12 de Junho de 1984, Patente dos Estados Unidos No. 4,521,334 concedida a E. Beachey em 4 de Junho de 1985, Patente dos Estados Unidos No. 4,597,967 concedida a E. Beachey em 1 de Julho de 1986 pedido dos Estados Unidos No. de série 739,963, de E. Beachey et al., apresentado em 31 de Maio de 1985, Pedido dos Estados Unidos No de série 839,750 de E. Beachey et al., apresentado em 14 de Março de 1986 e Pedido dos Estados Unidos No de série 858,436 de E. Beachey et al. apresentado em 1 de Maio de 1986, todos citados acima e incorporados por referência.

A capacidade dos polipéptidos de serótipo M24 como veículo para uma vacina altamente polivalente tem sido testada com outros fragmentos de polipéptidos do serótipo M.

Outra abordagem da invenção tem sido a utilização de bactérias Streptococcus Sanguis que têm sido transformadas com os plasmídeos que expressam a proteína M. A expressão da proteína M do serótipo do tipo 5 em S. sanguis tem sido levada a cabo. O gene da proteína M foi transportado num plasmídeo vector vaivém ("Shuttle") e transformado na bactéria hospedeira, a qual mostrou expressar os fibrilos da proteína M de serótipo 5 na superfície do organismo. Além disso, os organismos foram capazes de ligar fibrinogénio o qual por sua vez tornou o microorganismo resistente à fagocitose.

De acordo com a invenção, um método desejável para efectuar a imunização contra as infecções estreptocócicas é a instilação de S. sanguis atenuada intranasalmente para evocar

-17-

respostas locais imunes no sítio preciso em que os estreptococos entram geralmente no hospedeiro.

Outra abordagem da invenção tem sido a clonagem no organismo hospedeiro, em conjunto com o plasmídeo que expressa a proteína M, de um plasmídeo que expressa o antigénio de uma terceira espécie bacteriana. Em particular, um plasmídeo pSH-2 clonado a partir da estirpe CSH50 de E. coli, foi clonado em Sal. typhimurium provocando a expressão pelo hospedeiro dum antigénio de superfície de E. coli de 29 Kilodalton que induz anticorpos anti-adesivos Fim H. Estes anticorpos anti-adesivos não são apenas eficazes contra E. coli, são também eficazes contra outras bactérias gram-negativas.

Outras vantagens características da invenção surgirão nos exemplos não limitativos que se seguem.

EXEMPLO 1

TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIA HOSPEDEIRA NÃO VIRULENTA PARA EXPRESSAR A PROTEÍNA M ESTREPTOCÓCICA

A estirpe aro⁻ de Salmonella typhimurium SL3261, desenvolvida por Stocker e Hoseith (citada acima) foi escolhida porque esta forma mutante de agente microbiano é capaz de efectuar invasão mas não causa doença. Esta estirpe mutante exige um marcador nutricional tanto para o ácido p-aminobenzóico (PABA) como para o ácido 2,3-di-hidrobenczóico (DHB). Veja-se Stocker e Hoseith, citados acima.

O gene estrutural do antigénio da proteína M5 (Smp5) foi clonado e expresso em E. coli LE392 como descrito por Kehoe, et als., "Cloning and Genetic Analysis of Serotype 5M Protein Determinant of Group A Streptococci; Evidence for Multiple Copies of the M5 Determinant in the Streptococcus pyogenes Genome," Infect Immun., Vol. 48, pp 190-197 (1985) e Poirer, et als., "Expression of Protective and Cardiac Tissue Cross-Reactive Epitopes of Type 5 Streptococcal M Protein in Escherichia coli," Infect. Immun. Vol. 48, pp. 198-203 (1985),

sendo ambas aqui incorporadas por referência.

O plasmídeo pMK207 foi isolado, purificado e transformado primeiro numa estirpe rm^+ LB5000 de Sal. typhimurium, como descrito por Bullas e Ryo, "Salmonella typhimurium LT2 Strains which are r^-m^+ for all Three Chromosomally Located Systems of DNA Restriction and Modification," J. Bacteriol., Vol. 156, pp. 471-474 (1983) e Lederberg e Cohen, "Transformation of Salmonella typhimurium by Plasmid Deoxyribonucleic Acid," J. Bacteriol., Vol. 119, pp. 1072-1074 (1974), sendo ambas aqui incorporadas por referência. O plasmídeo isolado e purificado de LB5000 foi então utilizado para transformar o aro^- Sal. typhimurium SL3261 utilizando os procedimentos acima descritos por Lederberg e Cohen e Bullas e Ryo.

As estirpes transformadas LB5000 e SL3261 expressam a molécula da proteína M5 completa como demonstrado pela análise Western Blot dos lisados celulares completos (Fig. 1; faixas 1 e 2). O tripeto típico da proteína M5 (Veja-se Poirer et als., e Kehoe, et als., citados acima) migrou como bandas de M_r 59, 56 e 54K. Os estudos preliminares, destinados a determinar a localização da proteína M5 como expressa por Sal. typhimurium SL3261, indicaram que a proteína recombinante se encontrava confinada quase exclusivamente ao compartimento citoplásmico. A proteína M5 foi expressa de forma estável por SL3261 mesmo na ausência de pressão antibiótica, isto é, a expressão tornou-se evidente após subculturas repetidas durante cinco dias, o que representa aproximadamente 35 gerações de crescimento (Fig. 1; faixas 3-8).

EXEMPLO 2

TOLERÂNCIA DO RATINHO A SAL. TYPHIMURIUM SL3261 TRANSFORMADO

Em estudos preliminares, desafiaram-se ratinhos BALB/c com doses crescentes de SL3261-pMK207 para determinar se os animais tolerariam ou não os organismos transformados. Nenhum dos ratinhos, que recebeu até um máximo de $1,65 \times 10^9$

-19-

organismos por dose oral, adoeceu ou morreu.

1, 3, 5 e 10 semanas após a inoculação, sacrificaram-se dois ratinhos de cada grupo de dosagem e os seus fígados, baços e intestinos foram cultivados para pesquisa de SL3261-pMK207 em ágar de McConkey contendo 50 mg/ml de sulfato de canamicina e 10 mg/ml de PABA e de DHB. Puderam isolar-se colônias não fermentadoras da lactose após uma semana, apenas a partir dos ratinhos que tinham recebido 10^6 organismos ou mais, e após três semanas, apenas a partir dos ratinhos que receberam 10^9 organismos. (Tabela 1). Não foram recuperados quaisquer isolados após três semanas. As colônias isoladas ao fim de três semanas expressaram uma proteína M5 intacta, o que sugere que smp5 era estável in vivo (Fig 1; faixa 9). Os soros de 1, 3, 5, 9, 10, 15 e 20 semanas de ratinhos inoculados oralmente; mostraram exibir anticorpos contra a proteína M do tipo 5 e contra estreptococos do tipo 5, por experiências ELISA e de opsonização respectivamente (Tabela 2). A saliva obtida de ratinhos que tinham uma post imunização de 20 semanas mostrou também possuir anticorpos anti-proteína M5, principalmente da classe IgA (Tabela 3).

TABELA 1

DISTRIBUIÇÃO DE SALMONELLA TYPHIMURIUM SL3261 NOS
ORGÃOS DE RATINHOS BALB/c APÓS IMUNIZAÇÃO ORAL

DOSE DE INOCULAÇÃO ¹	DISTRIBUIÇÃO DA SALMONELLA NOS ORGÃOS ² :											
	INTESTINO			FÍGADO-VESÍCULA BILIAR			BAÇO					
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 1	Semana 2	Semana 3			
1,7x10 ⁹	2,1x10 ⁴	<50	<50	4x10 ²	3x10 ²	<50	4x10 ²	<50	<50	<50	<50	
1,7x10 ⁸	<200	<50	ND ³	8x10 ²	<50	ND	4x10 ²	<50	<50	ND	ND	
1,7x10 ⁷	<200	<50	ND	1x10 ²	<50	ND	1x10 ²	<50	<50	ND	ND	
1,7x10 ⁶	<100	ND	ND	<50	ND	ND	<50	ND	ND	ND	ND	
1,7x10 ⁵	<100	ND	ND	<50	ND	ND	<50	ND	<50	ND	ND	
1,7x10 ⁴	<100	ND	ND	<50	ND	ND	<50	ND	<50	ND	ND	

1 - Os ratinhos receberam em série doses orais 10 vezes diluídas de S. typhimurium da estirpe SL3261 começando com 1,7x10⁹ unidades formadoras de colónias (cfu) no dia 1 (dose inicial), com uma dose de reforço oral começando com 1,1x10⁹ cfu no dia 5. Cada dose foi suspensa em 25 µl de solução salina tamponada com fosfato (PES, pH 7,2) contendo 5 µg ml⁻¹ de sulfato de canamicina, e 1 µg ml⁻¹ de ácido para-aminoben-zóico (PABA) e 1 µg ml⁻¹ de ácido 2,3-di-hidroxiben-zóico (DHB). Os ratinhos foram sacrificados 1, 2 e 3 semanas após a administração da dose inicial.

2 - O intestino (do esfíncter pilórico ao recto) fígado-vesícula biliar e baço foram removidos assepticamente, colocados, em PBS, homogenizados com um Collector[®] (IOC mesh; Bellco), e postos em placas em ágar MacConken contendo 10 µg ml⁻¹ de PABA e 1 µg ml⁻¹ de DHB com ou sem 50 µg ml⁻¹ de canamicina. 3 - Não determinado.

TABELA 2

Opsonização de S. pyogenes M do tipo 5 com soro anti-proteína M5 de ratinho, obtido de ratinhos BALB/c imunizados oralmente com S. typhimurium SL3261-pMK207 e respectivos títulos ELISA anti-proteína pepM

Teste de Soro	Titulo ELISA ¹			Percentagem de opsonização ²	
	IgA	IgG	IgM	Tipo 5	Tipo 24
Pre-immune	< 50	< 50	< 50	0	2
1 semana	100	200	< 50	4	4
3 semanas	400	400	< 50	36	0
5 semanas	800	800	< 50	52	2
9 semanas	100	1600	200	90	2
10 semanas	50	800	400	92	2
15 semanas	100	800	400	52	0
15 semanas ³	800	12800	800	82	0
20 semanas	< 50	400	200	10	2
20 semanas ³	400	3200	200	80	2
Anti-pepM5 ⁴	ND ⁵	ND	ND	96	2
Anti-pepM24 ⁴	ND	ND	ND	0	98

1 - Os títulos ELISA foram determinados usando pepM5 imobilizado reagido com soros anti-SL3261-pMK207 de ratinhos BALB/c seguido de -IgA, -IgG ou -IgM de cabra anti-ratinho conjugada com peroxidase. Todos os antissoros dos ratinhos que reagiram contra o pepM24 imobilizado deram títulos < 50.

2 - A opsonização foi determinada como a percentagem total de neutrófilos com estreptococos associados.

3 - Os ratinhos receberam um reforço 48 horas antes da sangria com 50 µg de pepM5 em solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2.

4 - Tanto anti-pepM5 como anti-pepM24 foram preparados em coelhos para servir como controlos positivos (reação homóloga) e

TABELA 2 (Continuação)

negativos (reação heteróloga).

5 - Os títulos de anticorpos para anti-pepM5 ou anti-pepM24 de coelhos não foram determinados.

TABELA 3

Resposta de anticorpos¹ salivares contra a proteína M5 em ratinhos BALB/c imunizados oralmente com S. typhimurium SL3261-pMK207.

Teste do Soro	Título ELISA ² contra pepM5	
	IgA	IgA+IgG+IgM
Pré-imune	<4	<4
20 semanas ³	32	32
20 semanas+reforço ⁴	64	128

1 - A saliva foi recolhida, e reunida, dos ratinhos (quatro por grupo) após indução intraperitoneal com 0,1 ml de pilocarpina a 2%.

2 - Os títulos ELISA foram determinados usando pepM5 imobilizado reagido com saliva (diluída em série duas vezes) recolhida de ratinhos BALB/c imunizados com SL3261-pMK207 seguido de -IgA de cabra anti-ratinho conjugado com peroxidase ou uma mistura de IgA+IgG+IgM anti-ratinho.

3 - Os ratinhos foram imunizados 20 semanas antes da recolha de saliva (veja-se Tabela 2).

4 - Os ratinhos receberam uma injeção com uma dose de reforço de 50 µg de pepM5 em 0,1 ml de solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2, 60 horas antes da recolha de saliva.

EXEMPLO 3

Um grupo de ratinhos foi inoculado oralmente com duas

68 108

Ref: 372.4712P

(492.4888R)

-23-

doses de SL3261-pMK207 e desafiado 22 dias após a primeira dose com estreptococos do tipo 5 ou 24; ou com o parente virulento Sal. typhimurium 1344 (Tabela 3). Como pode ser facilmente visualizado pelos resultados, os ratinhos que receberam o mutante de Sal. typhimurium que expressa M5 ficaram totalmente protegidos contra qualquer desafio intra-peritoneal de estreptococos do tipo 5, mas não contra estreptococos do tipo 24. Os ratinhos de controlo desafiados intraperitonealmente com a Sal. typhimurium SL1344 virulento ficaram também protegidos. Os ratinhos desafiados com o tipo 5 apresentavam-se protegidos contra uma dose que excedia o LD₅₀ em 10 vezes (Tabela 4). Esta protecção contra o desafio parentérico por estreptococos do tipo 5 indica que a imunidade conferida é sistémica.

TABELA 4

Desafio por injeção intra-peritoneal de estreptococos do tipo 5 e do tipo 24 ou de S. typhimurium SL1344 em ratinhos BALB/c imunizados oralmente com S. typhimurium aro⁻ vivo transformado com pMK207 que expressa a proteína M do tipo 5

Organismos de desafio ²	Dose ³	Sobreviventes ^{4,5}	
		Não Imunizador	Imunizador
Estreptococos M5	1,7x10 ⁴	2/4	4/5
(Estirpe de Smith)	1,7x10 ⁵	0/4	5/5
	1,7x10 ⁶	0/4	5/5
Estreptococos M24	1,6x10 ³	1/3	1/3
(Estirpe de Vaughn)	1,6x10 ⁴	0/3	0/3
	1,6x10 ⁵	0/3	0/3
<u>S. typhimurium</u>	7,3x10 ¹	0/3	3/3
(Estirpe SL1344)	7,3x10 ²	0/3	3/3
	7,3x10 ³	0/3	3/3

1 - Cada ratinho imunizado recebeu 1,2x10⁹ unidades formadoras de colônias (cfu) de S. typhimurium SL3261 transformado com pMK207, 22 dias, e 1,6x10⁹ cfu 17 dias antes do desafio. Cada dose foi administrada oralmente, suspensa em 25 μ l de solução salina tamponada com fosfato contendo 5 μ g ml⁻¹ de sulfato de canamicina e 1 μ g ml⁻¹ de ácido para-aminobenzóico e 1 μ g ml⁻¹ de ácido 2,3-di-hidroxibenzóico.

2 - O LD₅₀ para os estreptococos M5 e M24 e para SL1344 em ratinhos BALB/c foi de aproximadamente 2x10⁴, 3x10³ e 1x10⁰ cfu respectivamente.

3 - A dose foi determinada como cfu administrado.

4 - A sobrevivência foi registada como o número de ratinhos sobreviventes dividido pelo número de ratinhos desafiados.

5 - Todas as mortes registadas ocorreram entre 3 e 6 dias após o desafio. Todos os ratinhos sobreviventes apresentaram-se saudáveis até 30 dias após o desafio.

-25-

Um grupo de ratinhos BALB/c que tinha sido imunizado oralmente com SL3261-pMK207 foi desafiado intra-nasalmente com estreptococcus do tipo 5 ou 24, ou com o parente virulento Sal. typhimurium SL1344. Como pode ser verificado na Tabela 5, apenas os ratinhos imunizados oralmente com SL3261-pMK207 foram capazes de sobreviver a um desafio intra-nasal com uma dosagem de organismos homólogos que seria de outra forma suficiente para matar todos os animais imunizados. Além disso, a protecção conferida por Sal. typhimurium SL3261 que expressa a proteína recombinante M5 é específica do tipo M como demonstrado pela incapacidade dos ratinhos desafiados intra-nasalmente para tolerar os estreptococos M do tipo 24. O facto de os ratinhos serem refractários ao desafio por inoculação intra-nasal sugeriu que a imunização oral com Sal. typhimurium SL3261 que expressa a proteína 5M foi suficiente para conferir imunidade local.

TABELA 5

Desafio por inoculação intra-nasal de estreptococos M do tipo 5 ou do tipo 24 onde S. typhimurium em ratinho BALB/c imunizados oralmente com S. typhimurium aro⁻ vivo transformado com pMK207 que expressa a proteína M do tipo 5

Organismos de desafio ²	Dose ³	Sobreviventes ^{4,5}	
		Não Imunizador	Imunizador
Estreptococos M5 (Estirpe de Smith)	$3,9 \times 10^7$	0/4	6/6
Estreptococos M24 (Estirpe de Vaughn)	$3,5 \times 10^7$	0/4	0/6
<u>S. typhimurium</u> (Estirpe SL1344)	$4,3 \times 10^4$	0/4	6/6

1 - Cada ratinho imunizado recebeu $1,2 \times 10^9$ unidades formadoras de colónias (cfu) de S. typhimurium SL3261 transformado com pMK207 no dia 1 e $1,6 \times 10^9$ cfu no dia 5. Cada dose foi adminis-

TABELA 5 (Continuação)

trada oralmente suspensa em 25 μ l de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2) contendo 5 μ g ml^{-1} de sulfato de canamicina e 1 μ g ml^{-1} de ácido para-aminobenzóico e 1 μ g ml^{-1} de ácido 2,3-di-hidroxibenzóico.

2 - A dose de desafio foi determinada como as cfu administradas intra-nasalmente em 20 μ l de PBS (10 μ l por fossa nasal).

3 - Os ratinhos foram desafiados 13 semanas após a imunização inicial (isto é, dia 1).

4 - A sobrevivência foi registada como o número de ratinhos sobreviventes sobre o número de ratinhos desafiados.

5 - As mortes provocadas pelos estreptococos ocorreram entre 2 e 4 dias enquanto que as mortes devidas à salmonella ocorreram entre 5 e 7 dias após o desafio. Todos os ratinhos sobreviventes pareciam saudáveis até 30 dias após o desafio.

Os exemplos anteriores não devem ser entendidos como limitações, sendo meramente ilustrativos da invenção. A invenção inclui também as combinações de qualquer número de sequências de polipéptidos imunogénicos de qualquer antigénio da proteína estreptocócica do serótipo M numa ligação covalente a um veículo natural ou sintético para criar uma vacina multivalente altamente protectora contra os estreptococos do serótipo M.

A invenção inclui também a utilização de uma sequência polipeptídica da proteína M como veículo ao qual as outras sequências estão covalentemente ligadas, evocando uma resposta opsonica para cada um dos serótipos estreptocócicos, cujos polipéptidos estão ligados ao veículo, bem como o serótipo estreptocócico, cujo polipéptido serve de veículo.

A invenção inclui também a codificação de uma sequência de nucleótidos para esse polipéptido multivalente num cromossoma de S. pyogenes na região do gene estrutural da proteína M, a sua clonagem em plasmídeos e a transformação dos plasmídeos em bactérias hospedeiras não virulentas. São preferidas as se-

68 108

Ref: 372.4712P

(492.4888R)

-27-

quências de nucleótidos sintéticas, mas podem também empregar-se sequências de nucleótidos obtidas a partir de células bacterianas vivas. A invenção inclui também a clonação em bactérias hospedeiras não-virulentas já transformadas para expressar polipéptidos imunogénicos induzindo respostas opsónicas contra material genético de infecções estreptocócicas do tipo M para a expressão de polipéptidos imunogénicos que induzem respostas opsónicas contra outras espécies de bactérias virulentas e a ligação covalente de ambas as espécies de polipéptidos. A invenção inclui também o organismo hospedeiro não virulento, atenuado, resultante, administrável oralmente como vacina de largo espectro capaz de induzir respostas opsónicas contra mais de uma espécie de bactérias.

Os peritos na especialidade não terão qualquer dificuldade em desenvolver diversas variantes no procedimento e produtos que se encontram dentro do espírito da invenção e no âmbito das reivindicações ou seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo para a preparação de uma vacina caracterizado por o referido processo compreender a incorporação, como agente vacinante activo, de uma bactéria viva, não virulenta, transformada por uma sequência nucleotídica heteróloga exprimindo pelo menos um antigénio imunizante da proteína M estreptocócica específico para serotipo que é eficaz para induzir anticorpos opsónicos contra infecções estreptocócicas sem induzir anticorpos que reagem de modo cruzado com antigénios do tecido do coração humano.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a sequência nucleotídica heteróloga estar contida num plasmídeo.

3 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2 caracterizado por a sequência nucleotídica heteróloga expressar pelo menos um antigénio seleccionado de entre o grupo consistindo em antigénios da proteína M eficazes para induzirem anticorpos opsónicos contra estreptococos dos serotipos 5, 6 e 24.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por a sequência nucleotídica heteróloga exprimir pelo menos um antigénio da proteína M estreptocócica que confere imunidade contra estreptococos do tipo 5.

5 - Processo para a preparação de uma bactéria viva, não virulenta, transformada, por transformação de uma bactéria não virulenta com uma sequência nucleotídica heteróloga exprimindo pelo menos um antigénio imunizante da proteína M estreptocócica específico para serotipo eficaz para induzir anticorpos opsónicos contra infecções estreptocócicas sem induzir anticorpos que reagem de modo cruzado com antigénios do tecido do coração humano caracterizado por a referida bactéria ter uma variação mutacional que provoca uma deficiência nutricional.

6 - Processo para a preparação de uma bactéria viva, não virulenta, transformada, por transformação de uma bactéria não virulenta com uma sequência nucleotídica heteróloga exprimindo pelo menos um antigénio imunizante da proteína M estreptocócica que é eficaz para induzir anticorpos opsonicos contra infecções estreptocócicas sem induzir anticorpos que reagem de modo cruzado com antigénios do tecido do coração humano caracterizado por a referida bactéria hospedeira não virulenta ser seleccionada de entre o grupo que consiste em Salmonella e Streptococcus.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6 caracterizado por o hospedeiro não virulento transformado ser uma Salmonella seleccionada de entre o grupo consistindo em: Salmonella paratyphi, Salmonella scottmulleri, Salmonella typhimurium, Salmonella choleraesuis, Salmonella montevideo, Salmonella newport, Salmonella typhi, Salmonella enteritidis, Salmonella gallinarum e Salmonella anatum.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 7 caracterizado por a Salmonella ser uma estirpe não virulenta transformada de Salmonella typhimurium.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 6 caracterizado por o hospedeiro não virulento transformado ser um Streptococcus seleccionado de entre o grupo que consiste em: Streptococcus cremoris, Streptococcus faecalis, Streptococcus salivarius, Streptococcus mitior, Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 9 caracterizado por o hospedeiro não virulento transformado ser uma estirpe de Streptococcus sanguis ou de Streptococcus mutans.

11 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 ou 10 caracterizado por a sequência nucleotídica heteróloga exprimir pelo menos um antigénio seleccionado de entre o grupo

68.108

Ref: 372.4712P

(492.4888R)

-30-

consistindo de antigénios da proteína M eficazes para induzirem anticorpos opsonicos contra estreptococos dos tipos 5, 6 e 24.

12 - Processo de acordo com a reivindicação 11 caracterizado por a sequência nucleotídica heteróloga exprimir um antigénio de proteína M estreptocócica que confere imunidade contra estreptococos do tipo 5.

13 - Processo para a preparação de uma vacina caracterizado por o referido processo compreender a incorporação, como agente activo de vacinação, de uma bactéria obtida por um processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 12.

14 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 13 caracterizado por a referida vacina conferir imunidade sistémica.

15 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 13 caracterizado por a referida vacina conferir imunidade local.

16 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 13 a 15 caracterizado por a referida vacina conferir imunidade através de administração oral.

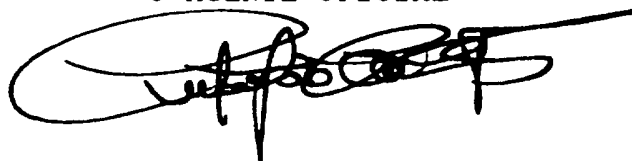
17 - Processo para a preparação de uma composição terapêutica caracterizado por compreender a mistura de um transportador biologicamente aceitável com uma bactéria viva, transformada, não virulenta, tal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 16.

18 - Processo de acordo com a reivindicação 17 caracterizado por a referida composição ser administrável oralmente.

Lisboa, 24. AGO. 1988

Por EDWIN H. BEACHEY, THOMAS P. POIRIER e
MICHAEL A. KEHOE

- O AGENTE OFICIAL -



1/1

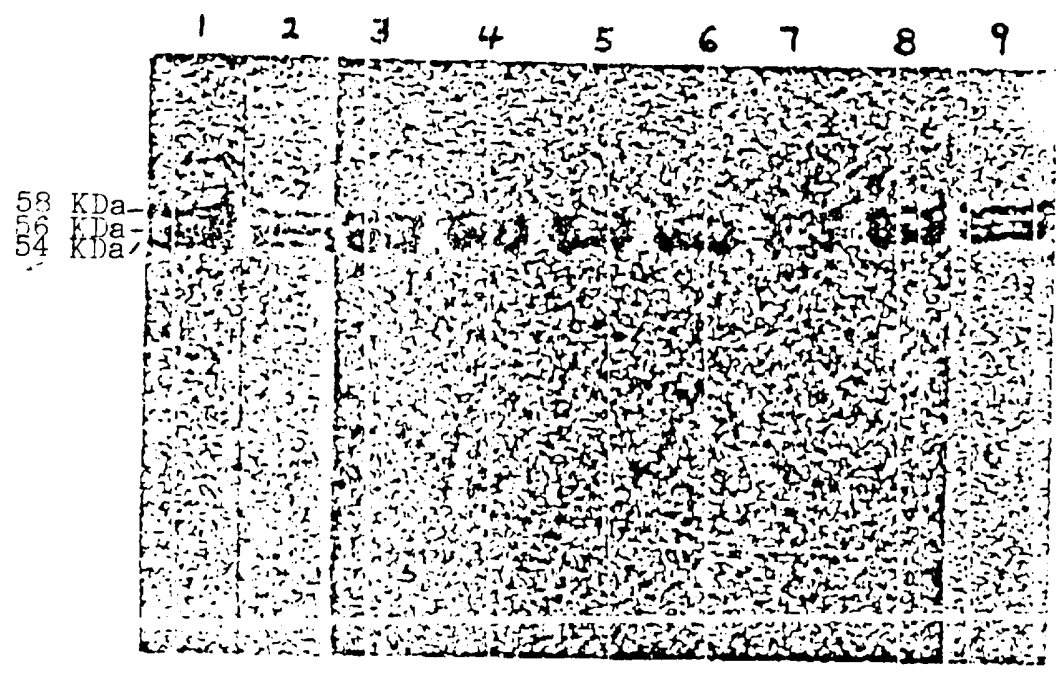


FIGURA 1

EDWIN H. BEACHEY, THOMAS P. POIRIER e
MICHAEL A. KEHDE