

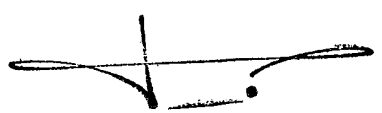
RESUMO

"PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE NOVAS VACINAS-VIVAS DE SHIGELLA
NÃO-REVERSÍVEIS"

Este invento refere-se a vacinas vivas e métodos para as preparar, para a protecção de um hospedeiro contra um microorganismo patogénico. As vacinas são preparadas introduzindo, pelo menos, uma modificação num gene envolvido em, pelo menos um, normalmente em dois caminhos biosintéticos, envolvendo a produção de produtos pouco prováveis de serem encontrados no hospedeiro susceptível a doenças. A modificação resulta numa alteração do gene, que não pode ser reparada numa fase única, isto é, por anulação e inversões do polinucleotídeo. Onde o gene aro sofre uma tal alteração, os mutantes auxotróficos resultantes requerem aminoácidos aromáticos, ácido p-aminobenzóico, e ácido 2,3-dihidroxi-benzóico, ou uma fonte altamente concentrada de ferro absorvível. As mutações auxotróficas possuem uma virulência substancialmente reduzida, ou mesmo inexistente, enquanto retêm a desejada imunogenicidade para iniciar a resposta imunogénica. Podem ser utilizadas várias técnicas para proporcionar a desejada alteração. A estirpe SL1479 Salmonella typhimurium foi depositada, no ATCC, em 7 de Setembro de 1982, e foi-lhe dado o Nº. de acesso 39183, no ATCC; A estirpe SL1438 Salmonella dublin foi depositada em 7 de Setembro de 1982, no ATCC, e foi-lhe dado, no ATCC, o Nº. de acesso 39184. A estirpe 531Ty Salmonella typhi foi depositada, no ATCC, em 21 de Novembro de 1984, e foi-lhe concedido, no



ATCC, o Nº. de acesso 39926. A estirpe SFL114 Shigella flexneri foi depositada, no ATCC, em 14 de Março de 1988, e foi-lhe dado, no ATCC, o Nº. de acesso 53755.



TITULAR: THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR
UNIVERSITY

EPIGRAFE: "PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE NOVAS VACINAS VIVAS DE
SHIGELLA NÃO-REVERSIVEIS"

M E M O R I A D E S C R I T I V A

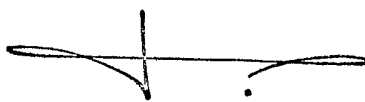
REFERENCIA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido é uma continuação em parte do pedido norte americano Nº. de Série 798.052, depositado em 14 de Novembro de 1985, que é uma continuação em parte do pedido norte americano Nº. de Série 675.381, depositado em 27 de Novembro de 1984, que é uma continuação em parte do pedido norte americano Nº. de Série 415.291, depositado em 7 de Setembro de 1982, actualmente Patente norte americana Nº. 4.550.081, emitida em 29 de Outubro de 1985, que é uma continuação em parte do pedido norte americano Nº. de Série 151.002, depositado em 19 de Maio de 1980, agora abandonado, cuja exposição se encontra aqui incorporada por referência.

INTRODUÇÃO

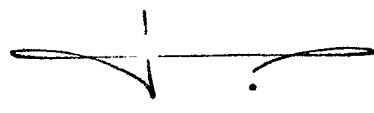
Campo da Invenção

Esta invenção refere-se a vacinas vivas contra micro-organismos patogénicos, particularmente bactérias.



Antecedentes da Invenção

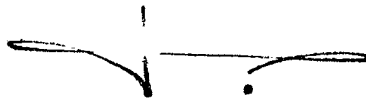
A vacinação com estirpes vivas enfraquecidas é usada extensivamente e com sucesso na prevenção de várias doenças virais do homem, tal como a polio, varíola, e sarampo. Por contraste, vacinas vivas são usadas apenas contra algumas doenças bacterianas do homem, ou de animais domésticos: vacina BCG para a prevenção da tuberculose, vacina da estirpe 19 contra a brucelosa bovina, e vacina de Sterne de esporos contra o carbúnculo no gado. Até agora, em muitas investigações de infecções experimentais de Salmonella, as vacinas vivas mostraram vantagens sobre as vacinas mortas: (i) elas evitam, frequentemente, em vez de adiarem apenas, a multiplicação da Salmonella, no fígado e baço, multiplicação essa que pode levar à morte; (ii) elas proporcionam boa protecção contra um desafio por via oral, em situações em que vacinas mortas, administradas por injeção ou oralmente, são relativamente ineficazes; (iii) em alguns casos a infecção de vacinas vivas confere capacidade de eliminar rapidamente o desafio das bactérias no fígado, baço, etc., presumivelmente através de células mediadoras de imunidade, em contraste com as vacinas mortas que despertam, principalmente, imunidade tumoral, sem muita capacidade para eliminar bactérias virulentas. O uso de vacinas de Salmonella viva, contudo, é dificultado por um número de factores. Algumas estirpes consideradas para uso como vacinas vivas, retêm um grau inaceitável de virulência, por reversão ou de outra forma. Algumas vacinas vivas manifestam uma pequena persistência de imunidade atribuída ao rápido desaparecimento da estirpe da vacina dos tecidos do hospedeiro, e, em alguns casos, imunidade incompleta de tal forma que alguns animais vacinados



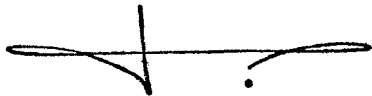
morrem depois de um grande desafio com o inóculo de uma estirpe virulenta.

As estirpes não-virulentas usadas como vacinas têm sido obtidas de várias formas. A estirpe BCG foi obtida por processos empíricos, durante cultura in vitro, prolongada, e provavelmente devem essa não-virulência a múltiplas mutações não identificadas. A vacina de esporos de Bacillus anthracis de Sterne é uma estirpe que perdeu a capacidade de sintetizar a cápsula de polipéptido, importante como determinante de virulência, mas não como antígeno "protector". Alguns experimentadores têm usado como vacinas vivas apenas uma dose subletal de uma estirpe "selvagem" de virulência relativamente baixa, no sentido em que o LD50 é um elevado número de bactérias --, uma situação em que há um risco evidente de uma infecção difícil ou fatal se desenvolver em alguns dos sujeitos vacinados, e de transmissão a outros hospedeiros.

Recentemente, estirpes bacterianas têm sido desenvolvidas para uso como vacinas vivas que são mutantes estreptomicina-dependentes, de estirpes de algumas espécies patogénicas. Mutantes de Shigella flexneri e Shigella sonnei estreptomicina-dependentes têm sido extensivamente usadas como vacinas vivas, administradas pela boca, para protecção, e mostram ambas ser seguras e eficientes. Em infecções experimentais de Salmonella, contudo, mutantes estreptomicina-dependentes parecem ser apenas moderadamente satisfatórios. Em geral, mutantes "espontâneos" de bactérias de espécies Gram-negativas, i.e., mutantes incapazes de produzir lipopolissacárido normal são não-virulentos, mas provaram ser insatisfatórios como vacinas vivas devido a falharem



na protecção. Devem ser referidas duas excepções. (i) em Salmonella a mutação do gene galE impede a síntese do lipopolissacárido do normal, a não ser que a bactéria esteja munida de galactose pré-formada. Um mutante galE da S. typhimurium é realmente não-virulento em animais pequenos de laboratório, mas desperta boa imunidade. Enquanto os anticorpos anti-O foram produzidos, a bactéria galE deve ter obtido galactose suficiente no interior dos tecidos do hospedeiro, para que eles produzam, no mínimo, al gum lipopolissacárido O-específico. Recentemente, um mutante galE de S. typhi, dado por alimentação a voluntários humanos, provou não ser virulento, e conferir uma protecção razoável contra posteriores desafios orais com uma estirpe virulenta da mesma espécie. Além disso, os primeiros relatórios de um ensaio em campo desta estirpe, dados por via oral a crianças de escolas na Alexandria, Egipto, indicam que esta fornece uma excelente protecção contra o risco de contracção de febre tifóide, que tem uma elevada incidência nestas crianças. A não virulência de estirpes galE parece ser condicionada na presença de mecanismos de defesa normais de células de hospedeiro, uma vez que a administração do agente citotóxico ciclofosfamida a ratos previamente injectados com um mutante galE de S. thyphimurium, não patogénico, a animais não tratados, acelera infecções fatais devido à multiplicação da estirpe galE. (ii) Um mutante espontâneo de S. dublin é usado em rotina na Grã-Bretanha como vacina viva, dada por injeção parenteral, para protecção de vitelos recém-nascidos, contra as frequentes infecções fatais de Salmonella, que antigamente eram predominantes; como a estirpe usada mostra ter perdido a parte O-específica do lipopolissacárido, ela actua presumivelmente por



invocação de "imunidade não específica", provavelmente por causar activação de macrofagos.

Uma vez que as vacinas têm, substancialmente, uma maior probabilidade de êxito no fornecimento de protecção ao hospedeiro contra uma subsequente invasão de uma estirpe virulenta selvagem, é desejável desenvolver novas vacinas vivas que anulem as falhas das vacinas previamente preparadas. Uma vez que a resposta imunitária dos hospedeiros vertebrados aos antigénios, em particular antigénios de superfície, dos microorganismos patogénicos é o mecanismo básico de protecção, por vacinação, uma vacina viva deve reter o complemento antigénico do tipo selvagem da estirpe. A vacina viva deve ser não virulenta, substancialmente incapaz de multiplicação no hospedeiro, e não ter probabilidade substancial de reverter numa estirpe selvagem virulenta.

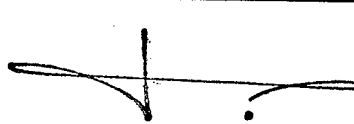
Uma vacina viva não virulenta deve ainda servir como hospedeiro para a expressão de antigénios que devem estar localizados no citoplasma, transportados para o plasma ou para a membrana exterior ou segregados para fornecer imunogénios para uma resposta imunogénica pelo hospedeiro mamífero. Usando uma vacina viva como transportadora de um imunogénio, particularmente um hospedeiro invasor, como a Salmonella typhi, um forte estímulo pode ser fornecido ao sistema imunitário, particularmente ao sistema imunitário humoral. Desta maneira, muitos dos benefícios da aplicação de patogénios vivos atenuados, tal como bactérias, fungos, protozoários e vírus podem ser alcançados sem relação com a reversão a uma forma virulenta.



Literatura Relevante

Sandhu et al., Infection and Immunity (1986) 13:527, descreve a perda de virulência de Aspergillus fumigatus num mutante auxotrófico em relação ao ácido p-aminobenzoico. Morris et al., Brit. J. Exptl. Path. (1976) 57:354 descreve o efeito da depleção dos linfócitos T e B na protecção de ratos vacinados com um mutante galE de Salmonella typhimurium. Lyman et al., Inf. Imm. (1977) 15:491 compara a virulência do 0:9, aro e 0:4,5,12 S. typhimurium his⁺ transductantes para ratos. Descrições do uso de elementos translocáveis para causar de deleções ou inversões podem ser encontradas no Kleckner et al., J. Mol. Biol. (1977) 116:125; Kleckner et al., ibid 127:89; e Kleckner et al., Genetics (1978) 90:427-464. Patente norte americana Nº4.337.314, para Oeschger et al., descreve a preparação de vacinas vivas de estirpes H. influenza por combinação de mutações ocasionais numa só estirpe. Hoiseth e Stocker, J. Bacteriol. (1985) 163:355-361, descreve a relação entre os genes aroA e serC de S. typhimurium.

Numa comunicação privada o Dr. John Roth, do Department of Biology, Universidade de Utah, desenvolveu duas estirpes de S. typhimurium LT2, nas quais a transposição Tn10, conferindo resistência à tetraciclina, foi inserido num gene do caminho biosintético aromático, causando, desse modo, incapacidade de sintetizar o precursor usual dos aminoácidos aromáticos e de dois metabolitos bacterianos, p-aminobenzoato (precursor do metabolito essencial ácido fólico), e dihidroxibenzoato (precursor do composto quelante de ferro enterochelina ou enterobactina). R. J. Yancey, Infection and Immunity, (1979) 24:174 informa que uma mutação causadora de incapacidade de sintetizar inte-



rochelina adquirida numa estirpe de S. typhimurium virulenta, relativamente aos ratos, provoca uma considerável redução na virulência. O bloco metabólico encontra-se entre o ácido corísmico e enterobactina, de modo a que a mutação não cause a necessidade do p-aminobenzoato. Em Maio de 1979 foi apresentado um documento por Stocker e Hoiseth intitulado "Effect of Genetic Defects in Iron Assimilation on Aromatic Biosynthesis on Virulence of Salmonella typhimurium".

Um número de diferentes vacinas de Shigella foi encontrado com vários graus de êxito. Imunizações parenterais de macacos e do homem com vacinas de Shigella inactivadas pelo calor eliciaram elevados teores de anticorpos circulantes. Nenhuma dessas vacinas confere protecção contra desafios experimentais (Formal et al., Shigellosis. In: Bacterial vaccines) (Ed Germanier, R) (1984) pags 167-186; Shaughnessy et al., J. Am. Med. Assoc. (1946) 132:352-368) ou infecção natural em ensaios de campo (Higgins et al., Am. J. Trop. Med. Hyg. (1955) 4:281-288). De maneira análoga, a imunização subcutânea com S. flexneri viva virulenta falha na condução de uma resposta protectora imune em macacos rhesus (Formal et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1967) 25:347-349).

Foram feitas três tentativas para a construção de uma vacina oral de Sigella viva segura. Formal et al. (J. Bacteriol. (1965) 90:63-68) isolou uma estirpe mutante de S. Flexneri 2a que, quando administrada em várias doses, conferia resistência em macacos. No entanto, em estudos humanos em que a vacina foi administrada em doses elevadas foram observados efeitos secundários como vômitos, diarreia, e manifesta disenteria. Além dis-



so, organismos reversíveis com propriedades do tipo selvagem foram isolados a partir de cultura de fezes. (DuPont et al., J. Infect. Dis. (1972) 125:5-11). Duma forma análoga, Istrati et al. (Meitert et al., Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol. (1984) 43: 251-278) passou periodicamente S. flexneri 2a, e obteve um mutante não invasivo designado por T₃₂. Quando a vacina era administrada em doses múltiplas de 10¹⁰ bactérias, mostrou ser segura e conferiu protecção em humanos.

A segunda tentativa consistiu em utilizar estirpes mutantes da Shigella sp. dependentes da estreptomicina, como vacinas orais atenuadas (Mel et al., Bull. WHO (1965) 32:647-655; Mel et al., Bull. WHO (1971) 45:457-464; e Mel et al., Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. (1974) 21:109-114). Apesar de Mel et al. (1965), supra terem demonstrado que uma protecção serotipo-específica (baseada na imunidade dirigida contra o lipopolissacárido O-antigénico do envólucro da célula bacteriana) foi obtida, outros resultados indicaram que a vacina era insuficiente para prevenir a doença (Levine et al., J. Pediatr. (1974) 84:803-806), e que os revertentes estreptomicina-independentes foram isolados (Levine et al., J. Infect. Dis. (1975) 131:704-707), o que parou o desenvolvimento deste tipo de vacina.

Vacinas híbridas compreendendo quer Shigella modificada por inserção de uma sequência de DNA de outro organismo, ou outro organismo modificado por inserção de genes codificadores de antigénios de Shigella foram produzidos como uma terceira tentativa. Formal et al., J. Bacteriol. (1965) 89:1374-1382 inseriu uma porção do cromossoma de E. coli K12 numa estirpe de S. flexneri virulenta, o que produziu um organismo atenuado que é insuficien-



te para fornecer protecção quando usado como uma vacina. Levine et al., J. Infect. Dis. (1977) 136:577-582 modificou a E.coli K12 inserindo nos locais contendo genes que codificam para o tipo-específico e factores grupo-específicos do antígeno O (LPS), cuja vacina falhou no fornecer de protecção. A adição do gene de um plasmídeo invasor da S. flexneri à E. coli K12 modificada atrás descrita produz uma vacina que pareceu ser eficaz em testes em macacos rhesus (Formal et al., Infect. Immun. (1984) 46: 465-469). Ver também Formal et al., Infect Immun. (1981) 34:746 750 em que genes de antígeno-O da S. sonnei foram introduzidos em S. typhi estirpe 21a.

SUMARIO DA INVENÇÃO

As vacinas vivas são fornecidas para vacinar um hospedeiro contra um microorganismo patogénico, particularmente bactérias, assim como servir de transportadores de imunogénios de outros patogénios, particularmente microorganismos, incluindo vírus, procariotas e eucariotas. As vacinas vivas são preparadas produzindo mutantes auxotróficos de uma estirpe patogénica, nos quais pelo menos um, usualmente dois ou mais, caminhos biossintéticos, são bloqueados, de tal forma que o mutante bacteriano necessita, para proliferar, de, pelo menos um, e, preferencialmente, dois ou mais nutrientes que normalmente não estão disponíveis no hospedeiro nas quantidades necessárias ao organismo.

A mutação auxotrófica é um resultado uma modificação genética num gene estrutural, cuja modificação não pode ser reparada por nenhum passo simples. Estas modificações genéticas incluem deleção e/ou inversão de um segmento polinucleotídico



de um gene principalmente quando a inversão ocorre imediatamente adjacente a uma inserção de uma sequência estranha de nucleótidos no gene. Para os fins desta invenção, estas modificações serão referidas como "mutações não-reversíveis". Normalmente, a mutação não-reversível não afecta a constituição antigénica do microorganismo patogénico, e, em particular, não altera os seus antígenos superficiais, alguns dos quais podem ser importantes determinantes de patogenicidade. Os mutantes auxotróficos resultantes têm substancialmente uma probabilidade nula de reversão, enquanto têm as mesmas, ou substancialmente as mesmas características imunogénicas que a estirpe virulenta, de forma a que produzam uma resposta imunogénica eficaz.

São obtidos, em particular, mutantes auxotróficos, utilizando uma estirpe virulenta contendo, de preferência, um marcador genético que permita a sua selecção e criando, pelo menos, uma mutação não-reversível, num ou mais gene(s), de modo a produzir um bloqueio completo na biossíntese de um ou mais metabolito(s) essenciais que normalmente não estão disponíveis em tecidos de vertebrados. Por isolamento do mutante e seu "screening", para a incapacidade de reversão, a perda de virulência e capacidade imunizadora, quando usado como vacinas vivas, podem ser obtidas estirpes úteis para vacinas vivas.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO ESPECÍFICAS

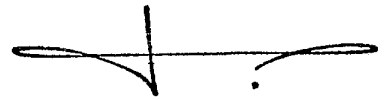
Vacinas preparadas a partir de microorganismos vivos, não virulentos são fornecidas, as quais são particularmente úteis na vacinação de hospedeiros vertebrados susceptíveis a doenças dos correspondentes microorganismos patogénicos. Os microorganismos



não virulentos, principalmente as bactérias, podem servir como transportadores de antígenos de outros patógenos, de maneira a produzir uma resposta múltipla imunogénica, e promover protecção humoral e/ou celular a dois ou mais patógenos. Os microorganismos são auxotróficos, têm um bloqueio completo não-reversível em pelo menos um, usualmente vários caminhos biossintéticos provocando a necessidade de nutriente(s) não disponíveis no animal a ser vacinado, em quantidades suficientes para permitir a multiplicação do microorganismo. Assim, as estirpes de vacinas devem ser crescidas em meios suplementados com nutriente(s), e quando introduzidas no hospedeiro continuarão a viver (até serem eliminadas pela resposta imunitária do hospedeiro), mas serão incapazes de proliferar.

O bloco não-reversível é criado introduzindo uma mutação num gene codificador de um enzima não essencial, necessário numa fase particular de um caminho biossintético. Como o produto desse caminho não está acessível no hospedeiro a ser vacinado, o microorganismo será incapaz de proliferar, apesar de estar vivo e reter as suas características antigénicas nativas. A mutação é não-reversível porque o restabelecimento da função do gene normal pode ocorrer apenas por uma coincidência casual ocorrida em mais do que um acontecimento, sendo cada um destes acontecimentos muito raro.

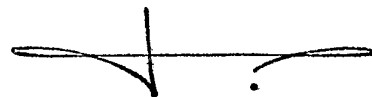
No caso de uma deleção, a mutação de restabelecimento da informação genética requiere muitas coincidências casuais de inserção de nucleótidos, sequencialmente, para repôr a informação genética perdida. No caso de uma inserção seguida de inversão, o restabelecimento da actividade do gene requererá a coincidência



de uma deleção precisa da sequência inserida, e uma re-inversão precisa da sequência invertida adjacente, possuindo cada uma extraordinariamente pequena, e pouco detectável, frequência de ocorrência. Assim, dada um dos dois tipos de mutações auxotróficas não-reversíveis tem uma probabilidade substancialmente nula de reverter para a prototrofia.

Enquanto um único bloco não-reversível fornece um elevado grau de segurança contra uma possível reversão a virulência, existem ainda acontecimentos que, apesar de improváveis, têm uma probabilidade finita de ocorrerem. Existem oportunidades de reversão quando existem microorganismos no hospedeiro que podem transferir, por conjugação, a capacidade genética, para o organismo não virulento. Alternativamente, poderá haver um caminho biossintético crítico alternativo que, por rara mutação, ou em condições de stress, poderá tornar-se operativo. Em terceiro lugar, um nutriente administrado ao hospedeiro pode servir como o metabolito necessário resultando numa proliferação patogénica e virulência. Por esta razão terá interesse desenvolver vacinas de microorganismos vivos com dois blocos de caminhos separados e não relacionados, que serão viáveis e com uma vida razoavelmente longa no hospedeiro, fornecer uma resposta imunitária forte após a administração ao hospedeiro, e sirvam como transportadores para antigénios de outros patogénios, para fornecer protecção imunitária destes patogénios.

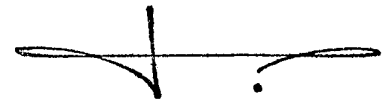
Em adição às mutações auxotróficas que prevêm a multiplicação em animais vacinados, é desejável que o microorganismo a usar como vacina viva tenha um ou mais "caractéres marcadores" genéticos sendo mais facilmente distinguíveis de outros microor-



ganismos da mesma espécie, quer de estirpes selvagens, quer de estirpes de vacinas vivas. Convenientemente, o marcador deverá ser uma necessidade nutricional, tal como a necessidade de histidina. Estas marcas são úteis na distinção da estirpe da vacina e das estirpes tipo selvagem, particularmente quando um paciente vacinado sucumbe à infecção, como resultado da exposição antes da imunidade da vacina ter sido estabelecida.

Depois da manipulação do microorganismo, de modo a introduzir uma ou mais mutações não-reversíveis em alguns dos membros da população, os microorganismos são crescidos sob condições que facilitem o isolamento dos mutantes auxotróficos, quer em condições em que estes mutantes tenham uma vantagem selectiva em relação à bactéria parental, quer em condições que permitam o seu fácil reconhecimento, das bactérias inalteradas, ou de outro tipo de mutantes. Os mutantes auxotróficos isolados são clonados e seleccionados relativamente à virulência, incapacidade de reversão, e capacidade de proteger o hospedeiro de uma estirpe patogénica virulenta.

O presente método destina-se à preparação de vacinas, e estas têm um grande número de vantagens sobre as primeiras vacinas. Em contraste com outras vacinas a presente invenção provê a causa exacta da perda de virulência. Contrariamente a outras estirpes de vacinas vivas que são não virulentas devido à alteração do carácter do lipopolissacárido, as presentes vacinas ficarão substancialmente inalteráveis no carácter antigénico O, tal como outros antígenos superficiais que podem ter importância na virulência e imunidade, tal como as principais proteínas da membrana exterior. Assim, as presentes vacinas estimularão a produção de anticorpos



anti-O, que se sabe serem componentes importantes na obtenção de imunidade por vacinação. As presentes estirpes deverão ser capazes de persistir no hospedeiro por longos períodos de tempo, normalmente semanas, para aumentar a eficácia do efeito imunizante, por estimulação contínua do sistema imunitário do hospedeiro até que o sistema referido tenha limpo todos os organismos. Os mutantes auxotróficos com mutações completas, não-reversíveis, terão, substancialmente, uma probabilidade de reverterem à virulência nula. Visto que a não-virulência depende da ausência de metabolitos importantes nos tecidos do hospedeiro, e não de uma função celular do hospedeiro, as presentes estirpes serão não-virulentas, mesmo em hospedeiros imuno-deficientes.

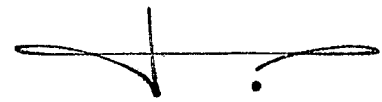
A presente invenção é particularmente aplicável, entre as bactérias, a uma larga variedade de estirpes de Salmonella, mais particularmente de grupos A, B, ou D, que incluem a maioria das espécies que são patogénios específicos de alguns hospedeiros vertebrados. Exemplos de doenças causadas por Salmonella, para as quais podem ser produzidas vacinas vivas, são S. Typhimurium; S. typhi; S. abortusovi; S. abortus-equi; S. dublin; S. gallinarum; S. pullorum; assim como outras que são conhecidas ou podem ser descobertas como causadoras de infecções em mamíferos.

Outros organismos para os quais a presente invenção pode também ser aplicada incluem Shigella, Particularmente S. flexneri e S. sonnei; Haemophilus, particularmente H. influenzae, mais particularmente tipo b; Bordetella, particularmente B. pertussis; Neisseria, particularmente N. meningitidis e N. gonorrhoeae; Pasteuralla, particularmente P. multocida e Yersinia, particularmente Y. pestis.

As vacinas podem ser usadas numa grande variedade de animais, assim como no homem. Incluídos nestes animais domésticos, que hoje são tratados por vacinas ou poderão sê-lo, se susceptíveis a doenças bacterianas, encontram-se as galinhas, vacas, porcos, cavalos, cabras, e carneiros, para referir os animais domésticos mais importantes.

Na preparação das vacinas vivas escolhe-se uma estirpe do patógeno que, de preferência, tenha um marcador para distintuir o mutante auxotrófico a ser produzido, de outros membros da estirpe. Alternativamente, este marcador pode ser introduzido na estirpe da vacina. Podem ser empregues vários marcadores, tal como a resistência a antibiótico, ou a droga sintética antibacteriana, um bloqueio num caminho biossintético, causando a necessidade de um aminoácido, e.g, histidina, ou um acontecimento semelhante. A limitação do marcador particular é que este não deve afectar o carácter imunogénico do microorganismo, nem deve interferir com o processo do microorganismo no processar da vacina viva. O marcador alterará o fenótipo para permitir o reconhecimento deste microorganismo.

O organismo em estudo será então processado de modo a fornecer uma ou mais mutações não-reversíveis. Cada mutação não-reversível envolverá um polinucleótido com mais do que 5 nucleótidos, preferivelmente um polinucleótido com, no mínimo, 10 nucleótidos, e bloqueará pelo menos um, preferivelmente mais caminhos biossintéticos, normalmente 2 ou mais. As mutações podem ser deleções, inserções, ou inversões, ou combinações destas. Os caminhos biossintéticos bloqueados não devem estar envolvidos na produção dos antígenos envolvidos com a virulência do microorganismo, nem



com a resposta imunitária do hospedeiro à infecção pelo microorganismo. Várias técnicas podem ser empregues para introdução de deleções ou inserção de inversões, de modo a obter um microorganismo possuindo o caminho biossintético global, não-reversível, desejado bloqueado.

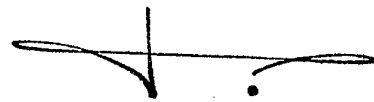
A escolha do gene será determinada pela capacidade de mutar o gene sem destruir a viabilidade do microorganismo; a natureza essencial do produto expresso pelo gene, e pela necessidade da ausência do produto no hospedeiro pretendido. O gene bloqueado deve impedir a produção de um enzima requerido no caminho biossintético de um metabolito necessário à multiplicação, mas, por outro lado, não necessário para viabilidade. Os genes de interesse particular incluem muitos dos genes aro, tal como aroA, aroB, aroD, e aroE; pab que está envolvido na produção de ácido p-aminobenzoico; e os genes pur que estão envolvidos na conversão de inusina-menofosfato em adenosina-menofosfato, causando a necessidade de adenina ou de um composto de adenina.

Uma técnica para produzir um bloqueio não-reversível no caminho biossintético é o emprego de elementos translocáveis, em particular, transposições. Os transposições são segmentos de dupla cadeia de DNA, com alguns milhares de nucleótidos, e contendo normalmente um gene de resistência a um antibiótico ou outra droga antibacteriana, juntamente com genes que podem efectuar a inserção de uma cópia do transposão em algum dos muitos locais diferentes no DNA da bactéria, onde se encontra o transposão. A inserção de um transposão num gene que especifica a sequência de aminoácidos de uma proteína enzimaticamente activa, provoca a perda completa da capacidade de sintetizar essa proteína na forma activa. Con-



tudo, todo o transposição é, a uma baixa frequência (por exemplo 10^{-8} /bactéria/geração), apagado ou excisado do gene no qual estava inserido, sendo este gene, consequentemente, restabelecido para o seu estado original, de modo que especifica novamente uma proteína enzimaticamente activa. Esta excisão precisa do transposição provoca perda de resistência ao antibiótico ou outro agente antibacteriano, que resultou da acção do gene de resistência do transposição.

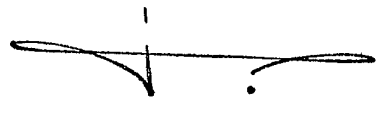
Além da excisão precisa, também ocorre perda de resistência conferida pelo transposição, por outros tipos de acontecimentos que são muito mais frequentes que a excisão precisa, e não resultam na reconstituição da forma original do gene, e, portanto não resultam na restauração da função do gene perdida. Dois tipos destes acontecimentos resultam na produção de uma forma não-reversível e não-funcional do gene, no qual o transposição foi inserido: um acontecimento é a deleção de um segmento de DNA compreendendo uma parte ou o total do transposição, incluindo o seu gene de resistência, e um segmento de DNA extendido de um lado do local de inserção, extendendo-se, portanto, por vezes inteiramente através de parte do gene no qual o transposição foi inserido, de um lado do local de inserção; o outro acontecimento é a deleção de uma parte do transposição, e inversão simultânea de um segmento de DNA que inclui material genético extendido de um lado do local da inserção original, i.e., parte ou toda a porção do gene afectado a um lado do local da inserção original. O restabelecimento do gene afectado para o seu estado original pode então ocorrer apenas por uma deleção precisa da parte restante do transposição, juntamente com re-inversão exactamente do



segmento de DNA invertido, i.e., pela ocorrência coincidente de dois acontecimentos, cada um com uma probabilidade pouco frequente, provavelmente indetectavelmente rara.

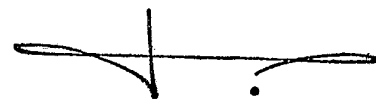
A consequência de cada um destes dois tipos de acontecimentos, deleção ou deleção mais inversão, ocorrendo numa bactéria com uma inserção de um transposão num gene que especifica um enzima biossintético é alterar a bactéria contendo o transposão, auxotrófica, resistente a antibiótico, com uma lesão genética causando um defeito num enzima, que, embora completa, é passível de rara reversão, para uma bactéria sensível a antibiótico, com o mesmo defeito no enzima, tal como antes, ausência do transposão intacto, e recentemente não mais sujeita a correções por acontecimentos de reversão raros. Assim, quando o transposão é inserido num gene que especifica um enzima usado num caminho biossintético, originando um metabolito ou metabolitos essenciais à multiplicação da bactéria, mas não disponíveis no seu hospedeiro vertebrado, o resultado final é uma estirpe bacteriana com uma mutação completa e não-reversível causando não-virulência.

O isolamento dos mutantes auxotróficos pode ser facilitado pelo uso de penicilina para matar as bactérias não-auxotróficas, e aumentar, assim, a proporção dos mutantes exactamente nutricionais na população. Uma vez que o mutante, com o carácter auxotrófico desejado, tenha sido isolado, uma grande população de mutantes pode ser seleccionada pela presença de qualquer descendente capaz de crescer sem o metabolito relevante, testando, assim, a probabilidade de reversão da mutação; este teste é feito de maneira mais rigorosa se a população é primeiramente exposta a um agente mutagénico ou agentes capazes de induzir uma grande varie-



dade de modificações mutacionais, i.e., substituições de bases, deslocação de estrutura (frameshifts) etc. Além disso, se um sistema de recombinação estiver disponível, um mutante com uma deleção de um segmento de um gene cobrindo os locais de dois ou mais mutantes pontuais pode ser reconhecido pela ausência de recombinantes do tipo selvagem, quando o mutante da deleção é cruzado com cada um dos mutantes pontuais em questão. Desta forma, pode-se assegurar que o mutante auxotrófico investigado é quase certamente o resultado de uma deleção, mais do que uma mutação pontual.

Um fago transdutor geral, como o fago P1, capaz de se adsorver a bactérias de uma grande gama de géneros (se necessário depois da apropriada modificação genética do carácter do seu lipopolissacárido, para fornecer a capacidade necessária para adsorver este fago) pode ser usado para transdutar um gene biossintético não funcional, tal como o gene aro ou pur inactivado por inserção de um transposição ou de outra forma, do seu hospedeiro original para uma estirpe bacteriana patogénica de diferentes espécies ou género, onde terá alguma probabilidade de incorporação no cromossoma, substituindo assim o gene homólogo do tipo selvagem, para produzir um transductante auxotrófico. No entanto, a frequência desta substituição parece ser muito reduzida pela incompleta homologia das sequências de bases dos genes correspondentes em bactérias de diferentes géneros. O DNA mediado por transformação ou conjugação bacteriana pode ser usado, duma forma análoga, para transferir um aro, pur ou outro gene biossintético inactivado por inserção de um transposição ou, de outro modo, em bactérias de espécies ou géneros diferentes dos da estirpe ori-



ginal, para originar bactérias auxotróficas agora não-virulentas devido à necessidade de um metabolito não disponível no hospedeiro vertebrado, e incapaz de reverter à prototrofia devido à presença quer de uma deleção quer de uma inserção-inversão.

A conjugação pode também ser empregue envolvendo cruzamento conjugacional de uma estirpe virulenta com uma estirpe não virulenta acessível, tendo o gene mutado não-reversível desejado..Empregando uma estirpe Hfr ou F^+ com uma estirpe virulenta F^- , pode ocorrer a transferência do gene mutado para a estirpe virulenta com recombinação resultando na substituição do gene selvagem pelo gene mutado. Pode-se então seleccionar o auxotrófico, como descrito atrás.

O uso de um fago transdutor, a transformação mediada de DNA, e/ou conjugação pode também ser empregue para introduzir, sucessivamente, dois ou mais genes mutados, independentemente, numa estirpe hospedeira a ser usada como vacina. A presença de duas mutações completamente independentes, tendo cada uma uma probabilidade de reversão extremamente baixa, fornece uma segurança quase absoluta de que a estirpe da vacina não se pode tornar virulenta. Na secção experimental está descrita a construção destas duas mutações dobradas (aroA⁻, purA⁻) usando o fago transdutor P22, para transferir as mutações independentes em Salmonella. Também é descrita a produção de uma mutação aroD⁻ de Shigella usando o fago transdutor P1.

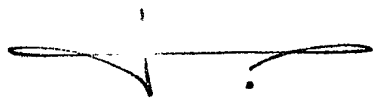
De acordo com a presente invenção, as vacinas são produzidas por introdução de uma mutação não-reversível em, pelo menos, um gene, em que cada mutação é um número suficiente de bases de uma sequência para garantir uma probabilidade substancial nula



de reversão, e a segurança da não expressão de cada gene mutado, no sentido da sua total incapacidade para determinar a proteína enzimaticamente activa. Adicionalmente, cada gene escolhido deverá estar envolvido em, pelo menos um, e de preferência, pelo menos dois, caminhos biossintéticos, para produzir metabolitos que estejam presentes raramente no hospedeiro ou completamente ausentes. O tipo de gene e o número escolhido resultaram de tal maneira que o fornecimento dos nutrientes necessários para proliferação pelo hospedeiro da vacina tenha uma probabilidade aproximadamente nula. Foi mostrado que estas condições são preenchidas pelos genes aroA e purA de Salmonella, particularmente typhimurium dublin e typhi, de forma a que estes genes são preferidos, apesar de outros genes, como previamente indicado, poderem também servir como local da mutação não-reversível.

No caso de transdução, a transposição tem um marcador que permite a selecção dos microorganismos transductados. Por exemplo, se a transposição fornece resistência a um biostato ou biocida, e.g. antibiótico, por crescimento do microorganismo transductado, num meio nutriente contendo o agente bioactivo, selecciona-se o microorganismo transductado num meio nutriente contendo o agente bioactivo, e selecciona-se a estirpe transductante. Podem-se também aplicar outras técnicas, como será descrito adiante, para seleccionar os membros da estirpe transductante que sofreram excisão de todo ou parte da transposição no qual este transporta consigo uma porção do gene que tinha sido integrada na transposição, ou resulta numa inversão de uma porção do gene.

De modo a isolar a estirpe auxotrófica produzida quer por transdução, mutagénese, transformação ou de outra maneira, é



desejável fornecer uma pressão selectiva à estirpe virulenta tratada para aumentar a proporção da estirpe auxotrófica desejada. Uma técnica consiste em empregar uma droga, e.g. uma penicilina, que é letal apenas para as bactérias em multiplicação. Empregando um meio nutriente que não forneça um ou mais dos produtos metabólicos requeridos pela estirpe auxotrófica, devido à mutação introduzida acima, a estirpe auxotrófica será inibida de multiplicação, enquanto a estirpe parente virulenta se multiplicará, e, assim, será morta pela penicilina. Normalmente, pelo menos cerca de 99% das bactérias, e menos que 100% são mortas, de forma a que as sobreviventes, cerca de 0,05 a 1% das bactérias originais, têm um grande aumento de concentração da estirpe auxotrófica. Pode-se, então, aumentar as bactérias sobreviventes num meio suplementar que permita a multiplicação da estirpe auxotrófica, e repetir a acção mortal da penicilina, até que se isole os auxotróficos de uma colónia simples e estabelecer a ausência completa de qualquer uma das estirpes parentes virulentas.

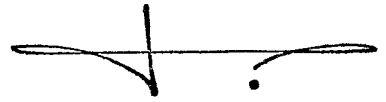
A estirpe auxotrófica resultante será uma vacina viva não virulenta, contendo a desejada imunogenicidade, em que a deleção não afectará a produção dos antigénios que despotam a natural resposta imunitária do hospedeiro. Ao mesmo tempo, a deleção resulta numa vacina viva não virulenta, incapaz de crescer no hospedeiro e incapaz de reverter numa estirpe virulenta.

Duas estirpes de Salmonella particularmente úteis, tendo uma deleção aroA foram preparadas geralmente como se segue. Uma estirpe de Salmonella característica foi exposta a um fago transductor crescido numa estirpe diferente de Salmonella que é aroA554::Tn10, e a selecção foi feita por aumento de resistência à te-

traciclina. Os transductantes aromático-dependentes, resistentes à tetraciclina, foram incubados num meio Bochner. Os mutantes que cresceram bem nesse meio foram replicados e seleccionados para a incapacidade de reverterem à independência aromática, indicando uma deleção ou deleção-inversão da mutação no aroA. Os transductantes podem ser seleccionados empregando ratos e uma estirpe que é não virulenta, e que fornece protecção contra a inoculação com uma estirpe virulenta seleccionada. De preferência pode-se introduzir um marcador, por exemplo, autotrofia, para prover uma necessidade nutricional que permite, então, uma rápida determinação da ocorrência de reversão, quando um hospedeiro contrai Salmonella, quando sujeito a uma vacinação subsequente com a vacina preparada de acordo com esta invenção.. A construção de estirpes Salmonella aroA⁻, purA⁻ está também descrita na secção experimental.

Um ataque de Shigella que induz desintéria bacilar confere protecção contra posteriores ataques por Shigella de espécies que causaram o ataque original, mas não protege contra doenças causadas por Shigella de espécies diferentes. Os métodos usados com Shigella flexneri são também aplicados a outras espécies importantes como Shigella dysenteriae tipo 1, que provoca a doença mais grave e é a maior causa de mortalidade em muitas partes do mundo, e Shigella sonnei, a causa mais comum de doença em países desenvolvidos, uma doença relativamente secundária mas de grande incómodo.

Um exemplo de um grupo de vacinas vivas da estirpe Shigella foi produzido usando Shigella flexneri. Às estirpes de Shigella flexneri são atribuídos serotipos pela estrutura do seu antígeno O. A unidade repetida do oligossacárido da cadeia de polissacárido



cárido do lipopolissacárido (LPS) da superfície bacteriana (cujá estrutura determina a constituição do antígeno O), consiste de uma unidade básica de quatro açúcares, idêntica em todos os serotipos (excepto o serotipo 6). No tipo Y não há adições à unidade básica, mas em cada um dos outros serotipos uma ou duas unidades de glucose ou acetil são ligadas a pontos que diferem conforme o serotipo. Estas modificações da unidade básica são determinadas por profagos (víruses bacterianas latentes) transportados por estirpes de outros tipos que não o tipo Y. A estirpe do tipo Y pode ser convertida em qualquer um dos outros tipos incluindo 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b e 5, tornando-o lisogénico com o apropriado bacteriofago(s).

A administração de vacinas vivas de Shigella flexneri a soldados na Jugoslávia foi feita para reduzir a incidência de desinteria devida a estirpes do mesmo serotipo que o da estirpe de vacina, mas não para afectar a incidência da doença devida a outros serotipos (i.e., a protecção parecia ser específica do tipo). A presente estirpe de vacina viva, SFL114, consequentemente foi construída a partir de uma estirpe parente do tipo Y, para que possa, se necessário, ser convertida no serotipo 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5, ou outro, por lisogenização com o fago apropriado.

Quase todos os isolados de Shigella recentes são resistentes a vários antibióticos e a maioria das estirpes testadas para modificação para uma estirpe de vacina na presente invenção não crescem, ou crescem apenas muito lentamente em meios simples, quimicamente definidos, isto é, meios com composições químicas definidas. Contudo, preferencialmente uma estirpe de vacina viva deve ser sensível a todos os antibióticos e antibacterianos sinté-

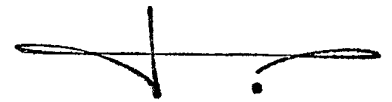


ticos que são activos contra estirpes de Shigella isolados, antes da era do antibiótico. Além disso, por conveniência na determinação do carácter nutricional, uma estirpe usada como parente de derivados auxotróficos deve ter requisitos nutricionais simples.

A estirpe de Shigella sp. a ser usada como vacina viva deve ser capaz de invadir células humanas, já que estirpes não invasoras, embora não virulentas, mostraram não serem eficazes como vacinas vivas. A propriedade invasora da estirpe depende da posse do seu plasmídeo "invasor", que na Shigella flexneri tem um tamanho de cerca de 140 Md. A presença deste plasmídeo pode ser determinada pela capacidade da bactéria em se ligar ao corante quando cresce num meio apropriado contendo Congo Red (Congo Red positivo) e pela presença de um plasmídeo produtor de uma banda DNA do tamanho apropriado.

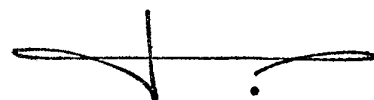
A estirpe de Shigella sp. a ser usada como vacina viva, apesar de capaz de invadir células humanas, tem que ser incapaz de proliferar nas mesmas por muito poucas gerações, uma vez que a multiplicação não restrita resulta em doença. Estirpes capazes de causar disenteria no homem ou em macacos produzem queratoconjuntivite quando se instalam no saco conjuntivo das cobaias (a reacção é chamada teste Serenei positivo). Uma estirpe a ser usada como vacina viva deve, por isso, ser Congo Red positiva e Serenei negativa.

As estirpes de vacinas vivas de Shigella flexneri desta invenção são construídas como se segue. É obtido um bloqueio completo, preferencialmente irreversível, num caminho biossintético que conduz a um metabolito que a bactéria tem de obter, para que se possa multiplicar mas que não está disponível (ou não disponí-



vel em concentrações suficientes) nos tecidos do hospedeiro. Este bloqueio pode ser feito por uma variedade de métodos, incluindo mutagénese espontânea ou induzida por mutagénio; ou pela introdução de uma mutação não-reversível, previamente caracterizada, por transferência genética de um organismo relacionado, por uma série de métodos; ou por manipulação in vitro de um gene bio-sintético clonado, seguida da sua introdução no cromossoma da estirpe de Shigella sp.. Convenientemente, o bloqueio é produzido por inserção de um transposão num gene cuja função é essencial no caminho bio-sintético em questão. O transposão confere uma propriedade selectiva, como resistência a um antibiótico. Uma estirpe de Shigella com um transposão adequado inserido num gene apropriado pode ser obtida também por mutagénese da estirpe por transposições, com selecção para uma marca determinada pelo transposão, como resistência a antibiótico ou outra. As bactérias resultantes são seleccionadas para detectar os auxotróficos produzidos por inserção do transposão num gene no caminho bio-sintético relacionado. Mais convenientemente, o gene bio-sintético do tipo selvagem da estirpe Shigella sp. é substituído pelo gene correspondente de outra estirpe da mesma espécie ou relacionada, por transducção ou algum outro processo de transferência genética, onde o gene correspondente está já inactivado por inserção do transposão. As células contendo o carácter de resistência determinado pelo transposão são seleccionadas.

Uma estirpe Shigella com um transposão determinante do carácter auxotrófico, se serenei-negativa ou Congo Red positivo, é não virulenta e eficaz como vacina viva no homem. No entanto, esta estirpe deve, pelo menos teoricamente, perder o seu novo ca-



rácter auxotrófico e, assim, recuperar a virulência pelo acontecimento incomum de "excisão limpa" da inserção do transposão. Esta possibilidade pode ser eliminada pelo isolamento de um mutante que perdeu o carácter de resistência conferida pelo transposão, por uma segunda deleção-inversão provocada pelo transposão, ou mutação deleção estendendo-se para além do transposão, para ou através da região codificante do próprio gene biossintético. Os mutantes secundários em que toda ou uma porção substancial da região codificante foi anulada podem ser identificados, contra estes mutantes sensíveis ao antibiótico, pela sua falha na ligação de uma sonda consistindo na sequência de DNA correspondente do gene do tipo selvagem. Mutantes secundários com inversões afectando a região codificante podem ainda ser identificados por sondagem, apesar de ser duma forma menos simples.

Uma estirpe de Shigella flexneri com um gene aroD inactivado por um transposão, provocando a necessidade de metabolitos aromáticos, incluindo o ácido p-aminobenzoico e, consequentemente, não virulenta, é geralmente construída como se segue. Um derivado aromático-dependente da estirpe de Shigella flexneri Y234-79 foi obtida por transdução com selecção de resistência à tetraciclina. O lisado transdutor usado, G2272, foi o fago P1 Cm C-ts obtido por indução térmica de um derivado lisogénico da estirpe NK5131, que é um derivado resintente à tetraciclina da E. coli K12 que é aromático-dependente devido à inserção do transposão Tn10 que afecta o gene aroD.

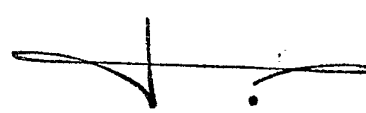
A transdução origina clones tetraciclina-resistentes, mostrando dependência aromática. Um tal clone, Congo-Red positivos, foi designado SFL114. A estirpe SFL114 retém um carácter



suave como mostrado pela aglutinação por um anticorpo anti-Y monoclonal, tem o plasmídeo 140 Md, e invade células HeLa e Hep-2, em cultura, com uma eficiência próxima da dos seus parentes, Y234-79. Contudo, o clone SFL114 não produz querato-conjuntivite em qualquer dos 11 porcos da índia testados, o que indica que esta estirpe deve ser não-virulenta.

A estirpe SFL114, sob a forma em que foi isolada pode, tecnicamente, reverter à independência aromática e, então, a virulência, pelo raro acontecimento de excisão completa do transposão, apesar dos esforços para demonstrar esta reversão, falhou. Assim, uma série de mutantes da SFL114, sensíveis à tetraciclina, que resultam de uma deleção provocada por um transposão, ou mutações deleção-inversão, extendidas desde o interior do transposão, pelo menos através dos seus genes de resistência à tetraciclina, e em alguns dos mutantes, no DNA do gene no qual o Tn10 é inserido (neste caso aroD) foram isolados. Estes mutantes sensíveis à tetraciclina foram seleccionados pela capacidade de se ligarem a uma sonda DNA que inclui todos excepto os 75 pares de base N-terminais da região codificante do gene aroD⁺ da E. coli. Este "screening" mostrou que alguns dos isolados falharam na ligação da sonda, indicando uma deleção que se estende através de toda ou quase toda a região codificante do gene aroD. Portanto, estes clones têm uma total incapacidade de reverter a aro⁺. Esta estirpe é tão eficaz como vacina viva como os seus parentes, SFL114, mas totalmente segura no que respeita à reversão. A construção destas estirpes é descrita em detalhe na secção experimental.

Para fornecer a apresentação de antígenos de outras espécies que não o hospedeiro não virulento, um ou mais genes codi-



ficando para os antígenos desejados, ou para os enzimas de síntese do(s) antígeno(s) desejados, devem ser introduzidos no hospedeiro como cassetes de expressão. Por cassetes de expressão entende-se as regiões de transcrição e translação, iniciação e terminação que rodeiam os genes estruturais de interesse, com os genes estruturais no controle regulador destas regiões, isto é, devidamente espaçados e sendo 5' e 3' relativamente ao gene estrutural, respectivamente. Onde estão envolvidos os genes estruturais das bactérias e do bacteriófago, as regiões reguladoras naturais ou do tipo selvagem são usualmente, mas não sempre, suficientes. Com os genes estruturais dos eucariotas (incluindo vírus) e, ocasionalmente, com procariotas, os genes estruturais estão junto da região reguladora reconhecida pelo hospedeiro bacteriano.

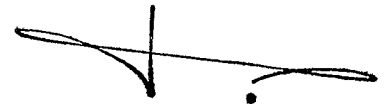
As cassetes de expressão podem ser uma construção ou formar uma parte de um plasmídeo ocorrendo naturalmente, tal como o plasmídeo que codifica os enzimas para a produção da parte específica O do LPS da Shigella sonnei. Se a cassette de expressão for uma construção pode ser ligada a um sistema de replicação para manutenção episomal, ou pode ser introduzido na bactéria em condições de recombinação e integração. A construção é normalmente ligada a um marcador, e.g. um gene estrutural e regiões reguladoras fornecendo resistência a um antibiótico, ou complementação num hospedeiro auxotrófico, de tal modo que o vector de expressão incluirá, usualmente, um sistema de replicação, i.e., plasmídeo ou viral, um ou mais marcadores e a cassette de expressão do gene estrutural com interesse.

Os genes estruturais com interesse podem vir de diversas fontes, tal como bactérias, vírus, fungos, protozoários, parasitas, metazoários ou outros. Os genes estruturais podem codificar



proteínas de invólucros, proteínas capsulares, proteínas de superfície, toxinas, tais como exotoxinas, enterotoxinas, ou os genes de interesse podem especificar proteínas, enzimas, ou outras proteínas necessárias à síntese de antígenos de polissacarídeos ou oligossacarídeos ou para modificação de um antígeno contendo sacarídeo, como o LPS, da estirpe bacteriana hospedeira, ou para síntese de um antígeno polipeptídico, tal como o antígeno capsular do Bacillus anthracis. Estes genes podem ser isolados de maneiras convencionais empregando sondas em que, pelo menos uma sequência parcial de aminoácidos ou ácidos nucleicos é conhecida, usando manchas "western" para detecção da expressão, usando λ gt11 para expressão das proteínas fundidas para obtenção de sondas, identificação do antígeno por reação de colônias de bactérias transconjugantes com anticorpos e detectando a formação de complexos, e.g., aglutinação, etc.

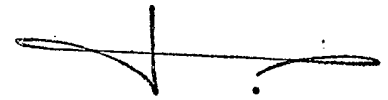
Os genes específicos de interesse incluem aqueles que especificam enterotoxinas instáveis e estáveis ao calor, de estirpes enterotoxigênicas E. coli ou Vibrio cholerae, HBsAg, proteínas de superfície, de envólucro ou capsulares de T. cruzi, B. pertussis, Streptococci, e.g., S. pneumoniae, Haemophilus, e.g., H. influenzae, Neisseria, e.g., N. meningitidis, Pseudomonas, e.g., P. aeruginosa, Pasteurella, Yersinia, Chlamydia, Rickettsia, adenovirus, astrovirus, arenavirus, coronavirus, vírus herpes, mixovirus, paramixovirus, papovavirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus, reovirus, retrovirus, rhabdovirus, rotavirus, togavirus, etc, ou os genes que especificam os enzimas necessários para a síntese de antígenos de polissacarídeos, e.g., polissacarídeo capsular do Meningococcus, ou para modificação do antígeno do oligo ou polissacarídeo da estirpe bacteriana hospedeira.



A construção ou vector deve ser introduzida na estirpe hospedeira por um meio conveniente como a conjugação, e.g., estirpe F^+ ou Hfr, transformação, e.g., DNA precipitado por Ca, transfecção, transducção, etc. Os hospedeiros modificados podem então ser seleccionados em meio selectivo empregando o fenótipo do marcador.

Estas vacinas podem ser usadas numa grande variedade de vertebrados. Estas vacinas serão particularmente usadas com mamíferos como o homem e animais domésticos. Os animais domésticos incluem bovinos, ovinos, suínos, cavalos, caprinos, aves domésticas, roedores, e.g., coelhos, ou outro animal que deva estar preso num cativeiro ou possa ser um vector de uma doença que afecte um vertebrado doméstico.

A forma de aplicação da vacina pode ser bastante variada, sendo aplicável qualquer um dos métodos convencionais de administração de uma vacina viva. Estes incluem aplicação oral, numa base sólida fisiologicamente aceitável, ou numa dispersão fisiologicamente aceitável, parenteralmente, por injeção, ou duma forma semelhante. A dosagem da vacina (número de bactérias, número de administrações) depende da via de administração e variará de acordo com as espécies a serem protegidas. Para os ratos, de peso de 15-20g, uma dose de cerca de 3×10^5 bactérias vivas de uma estirpe de vacinas aro não-reversível de S. typhimurium, dado num volume de 0,2 ml de um sal por injeção intra-peritoneal, parece segura e eficaz, conforme foi avaliada pelo resultado de um desafio parenteral posterior com a S. typhimurium virulenta. Também foi dado aos ratos 3×10^7 bactérias vivas da mesma estirpe em cubos de pão humedificado com 0,1ml do caldo da cultura, fornecido depois de



6 horas sem outro alimento. Provou-se que esta dose é inofensiva e que confere protecção imunitária. Observações em vitelos vacinados sugeriram que a administração de bactérias vivas da mesma estirpe por injeção intra-muscular, ou por alimentação em doses um milhar de vezes superiores às utilizadas para os ratos, é segura e pode ser apropriada. Uma ou mais administrações adicionais pode ser fornecida como doses de reforço, usualmente em intervalos convenientes, tal como duas ou três semanas.

As formulações das vacinas vivas podem ser muito variadas desejavelmente fornecendo a formulação um aumento da resposta imunogénica. A vacina viva pode ser fornecida num cubo de açúcar ou pão em tampão salino, usando como veículo um óleo fisiologicamente aceitável, ou semelhante.

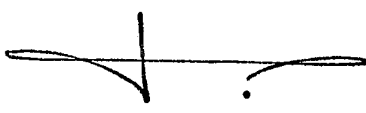
Os seguintes exemplos são mostrados como forma de ilustração e não como limitação.

PARTE EXPERIMENTAL

SALMONELLA

Construção de Estirpes aro⁻

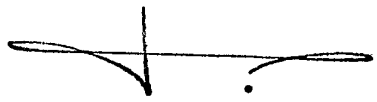
Uma vacina viva derivada de Salmonella typhimurium foi preparada como segue. Como estirpe parente, empregou-se uma estirpe virulenta de rato S. typhimurium SL4522 que é uma descendente da estirpe selvagem S. typhimurium M7471 do subgrupo S. thyphimurium chamada FIRN (Morgenroth e Duguid, Gent. Res. (1968), 11:151-169). Este subgrupo é definido pela sua incapacidade de fermentar ramnose ou inositol, e falha na produção de fimbriado ou estacas do tipo 1. Foi dado à estirpe M7471 um factor colicina ou plasmí-



deo, Col E1-K30, por conjugação, e então transformada, por sucessivas exposições ao mutagénio, maltose negativa, necessitando de leucina e cistina tornando-se necessitada, em seguida, de histidina, por transducção na mutação hisC527 (uma mutação amber). A construção genética da estirpe inicial, SL4522, é, então, S. typhimurium M7471 (ColE1-K30) malB479 leu-1051 CysI1173 hisC527 (MacPhee et al., J. Gen. Microbiol. (1975) 87:1-10). Esta estirpe que retém a sua virulência aos ratos foi reisolada de um rato que morreu de um pequeno inóculo, e o reisolado foi designado SL3201.

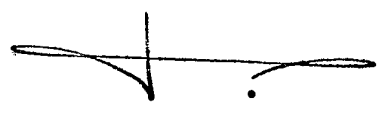
Foi utilizada S. typhimurium contendo um transposição que confere resistência à tetraciclina e estando presente no gene aroA, designada como estirpe TT1455 e tendo uma constituição genética S. typhimurium LT2 aroA554::Tn10, como fonte do transposição utilizado na presente preparação. Esta estirpe foi desenvolvida e está disponível no Department of Biology, Universidade de Utah, Salt Lake City, Dr. John Roth, e foi depositada no ATCC com Nº. de depósito 33275. O local de inserção do transposição Tn10 é no gene aroA, que está localizado na posição 19 do mapa de ligação e especifica o enzima 3-enolpiruvilchiquimato -5-fosfato sintetase. A estirpe TT1455 não pode crescer num meio quimicamente definido, a não ser que contendo os metabolitos essenciais derivados do ácido corísmico, i.e., os aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina, e triptofano, e 2 metabolitos aromáticos secundários, p-aminobenzoato, necessário como precursor do ácido fólico, e ácido 2,3-dihidroxibenzoico, como precursor dos compostos quelantes de ferro enterobactina (enteroquelina).

Na transducção foi empregue um mutante transductor, HT105/1 (Schmiger, Mol.Gen.Genet. (1972) 119:75-88) do fago transductor



geral P22 contendo uma mutação adicional himt, impedindo a lisogenização e facilitando a preparação de stocks de fagos de elevado título. De acordo com as técnicas convencionais, este fago foi aumentado na estirpe TTL455; o lisado resultante, depois de removidas todas as bactérias, por centrifugação, foi ainda tratado por membranas de filtração. Uma placa de agar nutriente (Oxoid blood agar base Nº.2, code CM55), suplementada com tetraciclina (25 µg/ml) foi inoculada com o caldo da cultura da estirpe receptora SL3201; foram aplicadas gotas do lisado do fago, com um volume aproximado de 0,01ml, à placa, e as placas foram inoculadas a 37⁰C por cerca de 18 horas. Depois da incubação, a área de cada gota mostra muitas colónias grandes (aproximadamente 2 mm de diâmetro) de transductantes "completos" tetraciclina-resistentes (também muitas colónias muito pequenas de transductantes abortivos), enquanto que o agar entre as gotas não mostra crescimento. Foram obtidos dois clones de transductantes tetraciclina-resistentes, reisolados a partir de colónias simples e testados para confirmar a libertação do fago P22, e foram então designados como estirpes SL3217 e SL3218. Mostraram o fenótipo esperado ao necessitarem para o crescimento de tirosina, fenilalanina, triptofano, p-aminobenzoato, e 2,3-dihidroxibenzoato. As estirpes SL3217 e SL3218 mostraram a esperada perda de virulência a ratos, providas de crescimento na presença de tetraciclina, para evitar a acumulação de revertentes aromático-independentes.

O isolamento de variantes tetraciclina-sensíveis é facilitado pelo facto da tetraciclina, em concentrações apropriadas, evitar a multiplicação de bactérias sensíveis à tetraciclina, sem as matar, enquanto que a penicilina mata as bactérias em multipli



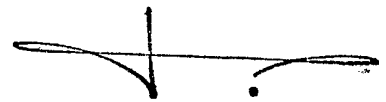
cação, mas poupa as bactérias que não se multiplicam. A técnica da selecção por penicilina é usada para isolamento de variantes sensíveis à tetraciclina de aroA::Tn10 Estirpe SL3218. A estirpe foi primeiro desenvolvida num meio sem tetraciclina até uma concentração aproximadamente de 9×10^8 cfu/ml; esta cultura foi, então, diluída 1:10 num meio contendo tetraciclina, 5µg/ml, e a cultura diluída foi incubada a 37°C, com arejamento durante 75 min. foi adicionada ampicilina, 2,5µg/ml e incubada com agitação até 290 min; a cultura foi então deixada à temperatura ambiente, sem agitação, durante a noite. As bactérias sobreviventes foram lavadas num filtro de membrana, para remover a ampicilina, e plaqueadas num meio indicador contendo corantes, e uma concentração muito baixa de tetraciclina. Neste meio, as bactérias sensíveis à tetraciclina produzem colónias pequenas e escuras, enquanto as bactérias resistentes à tetraciclina produzem colónias grandes e opacas. O tratamento com ampicilina reduz o número de bactérias viáveis de cerca de 10^{-5} , seis de 386 colónias sobreviventes testadas provaram ser tetraciclina-sensíveis. Estes dois isolados, designados SL3235 e SL3236, mostraram assemelhar-se com as suas estirpes parentes SL3218 no carácter nutricional, mas diferem dela não apenas na sua sensibilidade à tetraciclina, mas também na sua falha na produção de quaisquer revertentes aromático-dependentes em testes que deveriam ter detectado reversão com uma frequência de um em 10^{11} /bactérias/geração. Uma destas estirpes, SL3235, quando usada como vacina viva em ratos e vitelos, mostrou não reverter à independência aromática de virulência. Uma outra estirpe de vacina aro⁻ não-reversível, foi preparada a partir de S2357/65, uma estirpe de Salmonella typhimurium conhecida a partir de outras experiências por ser altamente virulenta para vitelos. A

estirpe S2357/65 é prototrófica: para fornecer um carácter marcador foi sujeita a transdução primeiro hisD8557::Tn10 (consequentemente fenotipicamente com necessidade de histidina não satisfeita por histidinol, e tetraciclina-resistente), depois por uma segunda transdução torna-se hisD⁺ hisG46 (deste modo, fenotipicamente com necessidade de histidina ou histidinol, e sensíveis à tetraciclina). Este derivado, SL323, mostrou causar infecção quando administrado a um vitelo, A estirpe de passagem do vitelo, chamada SL344, foi então tornada aroA544::Tn10, por transdução do TT1455, como descrito atrás; a estirpe hisG46 aroA544::Tn10, assim obtida, foi chamada SL1346. Um mutante sensível à tetraciclina, ainda aromático-dependente, mas agora incapaz de reverter à independência aromática, foi então isolado de SL1346, por um novo método, i.e., seleccionado num nutriente agar contendo clorotetraciclina, 50µg/ml, adicionado antes da autoclave, e ácido fusárico, 12µg/ml, adicionado depois da autoclave. Este meio evita, ou, pelo menos atrasa muito o crescimento das bactérias tetraciclina-resistentes mas permite um bom crescimento de bactérias tetraciclina-sensíveis. Ambas, esta estirpe e duas estirpes aroA::Tn10, SL3217 e SL3218, crescem com tetraciclina, para evitar a acumulação de aro⁺ tetraciclina-sensível, portanto virulentas, tendo os revertentes mostrado ser eficazes como vacinas vivas quando administrados a ratos por via intraperitoneal. (i) Experiências com estirpes SL3217 e SL3218; a ratos CV1 foram dadas ca. 2×10^5 vacinas vivas de estirpe bacteriana, i.p.; desafiadas dois meses depois com 2×10^6 bactérias (i.e. mais do que 20.000LD50) de S. typhimurium virulenta estirpe SL3201, i.p.: nenhuma morte em dois meses de observação. (ii) às fêmeas de ratos CBA/N×DBA/LN F1



foram dadas 10^6 ou 10^5 vacinas vivas da estirpe SL3235, i.p.: desafiadas cinco semanas mais tarde com 10^6 bactérias (Ca. 100 LD50) da S. typhimurium estirpe TML, o.p.: nenhuma morte em quinze dias de observação. Noutras experiências, a estirpe de vacina aro⁻ estável, SL3235, mostrou não causar morte (nem qualquer efeito óbvio de doença) quando injectada intraperitonealmente mesmo em ratos excepcionalmente susceptíveis a infecção com Salmonella typhimurium, quer em consequência de uma primeira injeção intravenosa de sílica macroparticulada, assim como da destruição da função fagocítica de macrofagos, ou em ratos excepcionalmente susceptíveis devido a um defeito genético na capacidade de responder ao lipopolissacárido, i.e., estirpe C3H/Heg. Um derivado de um dependente aromático, não-reversível, assim obtido, número SL3261, mostrou ser não virulento para ratos e vitelos, por via parenteral ou oral. Adicionalmente, um derivado do tipo aroA::Tn10, derivado de forma semelhante por transdução de uma estirpe, virulenta a vitelos, de espécies patogénicas relativamente aos bovinos, Salmonella Dublin, mostrou ser não virulenta a ratos; e derivados de aroA::Tn10, presumivelmente não virulentos, foram obtidos por transdução de várias estirpes isoladas recentemente de patogénicos humanos, Salmonella typhi.

A vacina viva S. typhimurium SL1479 aro⁻ foi preparada como se segue. A estirpe parente foi S. typhimurium UCD108-11 (Dr. Bradford Smith, University of California at Davis). A estirpe UCD108-11 passada por um vitelo e reisolada foi designada SL1420 como número de stock e caracterizada como sendo não exacta nutricionalmente, resistente a vários antibióticos, incluindo tetraciclina, e suave mas resistente aos principais fagos transdu-



ctores O-específicos, incluindo P22. A estirpe SL1420 foi exposta a um fago transductor crescido numa estirpe aroA554::Tn10 de S. typhimurium, e seleccionada por um aumento de resistência à tetraciclina, plaqueando num meio nutriente de agar com tetraciclina (50mg/ml). Os transductantes representativos de maior resistência à tetraciclina, aromático-dependentes, e inalterados na sensibilidade ao molde do fago, foram seleccionados, e um foi escolhido e designado estirpe SL1421. A estirpe parente cresceu bem em meio Bochner (Bochner et al., J. Bact. (1980) 143:926-933) sugerindo que a resistência à tetraciclina foi determinada por outro mecanismo que não a resistência conferida pelo Tn10. A estirpe SL1421 cresceu pouco no meio Bochner permitindo a selecção de colónias crescidas nas placas de meio Bochner suplementado com ácido dihidroxibenzoico. Um destes variantes mostrou ser aromático-dependente e estar inalterado no molde do fago, e não originou revertentes aromático-independentes, com uma frequência detectável (quanto ao aro⁺ originou zero, numa população final de, aproximadamente, 9×10^{10} bactérias em placas de meio, com um teor de triptofano limitante do crescimento). Foi testada a virulência neste mutante designado SL1452. Cinco ratos BALB/c (machos, idade aproximada, 18 semanas) receberam, cada um, cerca de $3,5 \times 10^6$ bactérias vivas da estirpe SL1452 por injeção intraperitoneal (i.p.).

Os ratos usados foram obtidos de uma colónia da linha inata BALB/c, derivados de Caesarian, e mantidos em barreiras com uma flora estreita definida, no Departamento de Radiologia, Stanford University School of Medicine. Os ratos desta linha têm uma susceptibilidade conhecida elevada a infecções a S. typhimurium, e uma conhecida incapacidade de serem protegidos contra esta infec-



ção por imunização com vacinas mortas por calor (Robson et al., J. Infect. Dis. (1972) 126:378-386). Todos sobreviveram até ao dia 50 e, aparentemente bem, depois disso.

Para testar a capacidade imunizante da estirpe SL1452 os cinco sobreviventes da injeção, i.p., foram desafiados sete semanas após a vacinação por injeção i.p., de cerca de 5×10^5 bactérias da estirpe SL1420 (estirpe progenitora virulenta). Morreram quatro ratos de controle (não vacinados) nos dias 4, 4, 4 e 5 depois do desafio. Um dos cinco ratos vacinados morreu por infecção da S. typhimurium e os outros quatro ratos vacinados sobreviveram e com bom aspecto até ao 14º dia após o desafio.

Foi então introduzido um marcador genético na estirpe da vacina SL1452 para permitir a identificação. A estirpe SL1452 foi tratada com um fago transdutor crescido numa estirpe S. typhimurium transportando hisD8557::Tn10, e a selecção feita por aumento de resistência à tetraciclina. Encontraram-se transductantes representativos do carácter nutricional esperado, $Aro^- HisD^-$ (i.e., uma necessidade de histidina não satisfeita por histidinol). O transductante seleccionado foi designado estirpe SL1474. Esta estirpe foi exposta a um fago transdutor crescido numa linha HisC527 de S. typhimurium, e a selecção foi feita num meio definido com aromáticos e histidinol, como fonte de histidina. Alguns transductantes eram ainda aromático-dependentes e necessitavam de histidina, mas eram capazes de usar histidinol em lugar de histidina (i.e., de carácter nutricional esperado da substituição de his0::Tn10 hisC⁺ do receptor por hisD⁺ hisC527 do dador). Um destes transductantes nomeado SL1479, de constituição UCD108-111 aroA554::Tn10/DI hisC527 foi empregue em testes em vitelos (DI-delecção-inversão).



Uma vacina viva *S. typhimurium* estirpe SL1479 foi dada a 10 vitelos de 2 semanas de idade, por injeção intramuscular (i.m.), usualmente $1,5 \times 10^9$ bactérias vivas como sua primeira injeção. Nenhum deles perdeu o apetite ou ficou seriamente doente, e só um desenvolveu diarreia. Nenhum deu fezes com cultura positiva para Salmonella. A três vitelos com duas semanas foram dadas, aproximadamente, $1,5 \times 10^{11}$ bactérias vivas da estirpe SL1479, pela boca, como sua primeira vacinação. Nenhum deles perdeu o apetite, mas um desenvolveu diarreia; os três deram fezes com culturas positivas, como se esperava. As reações a uma segunda dose de vacina viva, intramuscular ou por via oral, não foram mais severas que à primeira dose.

Para testar a proteção conferida por vacinação, grupos de vitelos com cinco semanas, também não vacinados (controle), ou vacinados duas vezes com *S. typhimurium* SL1479 viva, via intramuscular ou oral, foram desafiados por administração oral de $1,5 \times 10^{11}$ bactérias vivas de uma estirpe *S. typhimurium* virulenta a vitelos, usualmente a estirpe UCD108-111, mas a alguns vitelos foi dada a estirpe SL1323.

Todos os 16 vitelos de controle desafiados mostraram anorexia e depressão; 15 tinham diarreia e 14 morreram. Dos sete vitelos que receberam duas doses de vacina viva por via i.m., três tiveram diarreia depois de desafiados, dois tornaram-se anoréticos e deprimidos, e um morreu. As diferenças entre os vitelos de controle e estes vacinados i.m., relativamente à morte, (14 de 16 vs. 1 de 7) e à anorexia e depressão (16 de 16 vs 2 de 7) são estatisticamente significativas (p[probabilidade] - menor que 0,001 para cada comparação). Dos três vitelos que receberam duas doses de vacina viva SL1479 por via oral, dois tiveram diarreia depois de



desafiados e um ficou anorético e deprimido; nenhum morreu. As diferenças entre os vitelos de controle e vacinados oralmente, relativamente à morte (14 de 16 vs 0 de 3), e de anorexia e depressão (16 de 16 vs 1 de 3) são estatisticamente significativas (p menor que 0,01 para cada comparação).

O desenvolvimento da estirpe S. dublin SL1438 seguiu substancialmente o procedimento descrito anteriormente para a S. typhimurium. A estirpe inicial S. dublin S4454 (Dr. Clifford Wray, Central Veterinary Laboratory of the British Ministry of Agriculture, Weybridge, Inglaterra), mostrou ter o carácter nutricional esperado (i.e., com uma dependência incompleta de ácido nicotínico, ou outro não exacto), suave, mas resistente ou apenas ligeiramente sensível aos fagos transdutores O-específicos gerais P22, P22h, KB1, a A3, e sensíveis a todos os antibióticos estudados, incluindo tetraciclina. A estirpe foi designada SL1363 e mostrou ser virulenta por injeção intraperitoneal de 4×10^4 bactérias vivas em ratos BALB/c.

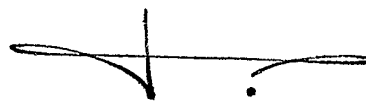
A estirpe SL1363 foi exposta ao fago transductor crescido em S. typhimurium TT47 de genotipo hisD8557::Tn10 e os transductantes tetraciclina-resistentes foram seleccionados. Um transductante de fenotipo nutricional HisD^- e de sensibilidade à forma do fago inalterada, foi seleccionado e designado SL1365, e exposto ao fago desenvolvido numa estirpe S. typhimurium de genotipo hisG46 hisD⁺. Os transductantes foram seleccionados num meio com histidinol, como única fonte de histidina, e um transductante seleccionado da forma inalterada e necessitando quer de histidina quer de histidinol (i.e., hisD⁺ hisG46) e designado com o rótulo SL1367. Quando são dadas cerca de 3×10^7 bactérias da estirpe



SL1367 num cubo de pão, a três ratos BALB/c previamente privados de alimentação por uma série de horas, os três morrem cerca de sete dias mais tarde. Quando a mesma estirpe é administrada a um vitelo, causa-lhe uma rápida infecção fatal, e o reisolamento mostra inalteração no fenotipo nutricional. A estirpe SL1372 foi então tratada com o fago desenvolvido numa estirpe aroA554::Tn10 S. typhimurium, e a selecção feita por resistência à tetraciclina. Um transductante seleccionado que requer suplementos aromáticos, assim como histidina e ácido nicotínico, e uma inalteração na forma do fago foi designada SL1437. Os mutantes da estirpe SL1437, sensíveis à tetraciclina, foram seleccionados por incubação em placas com meio Bochner, suplementado com ácido 2,3-dihidroxibenzoico, para permitir a síntese de enterobactina. Um variante tetraciclina-sensível, mas ainda aro^- , foi seleccionado e designado SL1437, e mostrou não produzir revententes aromático-independentes, com uma diferença detectável.

A estirpe SL1437 foi dada em quantidades diferentes a três grupos de 5 ratos i.p., deixando-os durante a noite a 37°C , numa cultura sem agitação. Nenhum dos ratos vacinados mostrou quaisquer efeitos de doença aparentes, mesmo no caso de 3×10^6 bactérias, quando dada em dose maior.

Para testar a capacidade imunizante da estirpe SL1438, os ratos da experiência acima referida, e também um grupo de controle de cinco ratos não vacinados foram desafiados 30 dias, depois da vacinação com injeção i.p. de 3×10^5 bactérias da estirpe SL1372 (i.e., a estirpe virulenta S. dublin tornada hisG46, reisolada de um vitelo infectado por alimentação). Os resultados obtidos depois de 93 dias de desafio, de controle, foram a morte de 5 dos 5 nos dias 4,4,5,5 e 6. Dos vacinados com um nível de 3×10^4 ,



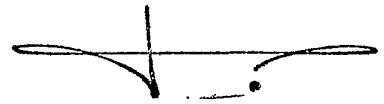
de 5 morreram 3, nos dias 5, 8 e 8, e 2 de 5 ficaram doentes, mas recuperaram. Dos vacinados com um nível de 3×10^5 , de 5 morreram 2 nos dias 7 e 13, e 3 de 5 pareciam doentes mas recuperaram. Dos vacinados com um nível de 3×10^6 bactérias vivas da estirpe SL1438, morreram 0 de 5, e 5 permaneceram aparentemente bem. Ao nível de 3×10^6 bactérias vivas da estirpe SL1438, uma única dose i.p. mostrou proteger a estirpe altamente susceptível de ratos BALB/c.

Vitelos com cinco semanas foram então empregues, sendo quer vacinados quer não vacinados para controle, para testar a adequação de S. dublin estirpe SL1438 como vacina viva. A vacinação foi feita por duas doses i.m. de $1,5 \times 10^9$ da bactéria da presente estirpe. Todos os vitelos foram então desafiados por administração de $1,5 \times 10^{10}$ bactérias da estirpe SL1367 de S. dublin virulenta a vitelos. Os três vitelos de controle morreram. Nenhum dos vitelos vacinados morreu.

Construção de Estirpes aro⁻ pur⁻

Procedimento da Transdução

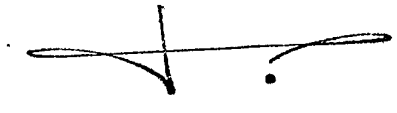
Cada um dos vários passos de transdução foi efectuado utilizando um derivado do fago P22 (P22 HT105/1 int) altamente transductor e não lisogenizador. Este fago foi propagado, por métodos standard, na estirpe S. typhimurium usada como dadora. O lisado usado era bacteriologicamente estéril e contendo um título, na estirpe indicadora de S. typhimurium SL1027 P22-sensível, com, pelo menos, 3×10^9 unidades/ml ao formar placas. Os transductantes foram obtidos pelo procedimento "gotas-em-clareira", em que as placas do meio selectivo do fenotipo transductante foram inoculadas enchendo com o meio de cultura da estirpe receptora, o fluido em



excesso foi retirado por pipetagem, e a superfície do agar foi secada por evaporação. As gotas do lisado fágico, limpas e apropriadamente diluídas, foram então aplicadas e secas e, em seguida, incubadas a 37⁰C.

Os transductantes tetraciclina-resistentes foram seleccionados numa base de agar de sangue "Oxoid", código CM55, suplementado com 25 µg/ml de tetraciclina. Para as estirpes receptoras deficientes na biossíntese aromática, este meio foi suplementado com ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DBA), para permitir a síntese de enterobactina que é requerida para capturar ferro férrico. Para seleccionar os transductantes com carácter nutricional alterado, foi usado um meio simples definido suplementado com triptofano e cistina (necessidade do tipo selvagem S. typhi).

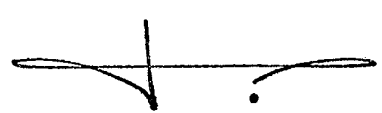
As placas transductantes foram inspeccionadas 1, 2, 3 e 4 dias depois da incubação, e as colónias que apareceram nas áreas redondas foram picadas e purificadas por riscagem e selecção de colónias discretas, num meio igual ao que foi usado na selecção. Em geral, as colónias transductantes desenvolveram-se mais tarde, e em número muito menor, e.g., por um factor de 10³ nos cruzamentos em que a estirpe receptora foi S. typhi, comparados com aqueles em que foi a S. typhimurium, a dadora. Isto resulta de uma incompleta homologia genética dos genes da dadora S. typhimurium com os genes correspondentes da S. typhi receptora, reduzindo grandemente a frequência de acontecimentos de cruzamentos e, assim, de integração de genes dadores em cromossomas receptores. Os clones transductantes purificados foram testados para assegurar que eram S. typhi, e não contaminantes aéreos, e para confirmar que tinham o fenótipo procurado.



Introdução da deleção do aroA

A introdução da deleção do aroA foi efectuada em dois passos de transdução. No primeiro passo, a estirpe parente (CDC80-10) foi tratada com lisado fágico G2077 que é o fago P22 HT 105/1int crescido em S. typhimurium estirpe TT472, que é aroA (serC)1121::Tn10. Esperava-se que os transductantes desejados fossem tetraciclina-resistentes e auxotróficos, requerendo quer metabólitos aromáticos (devido à perda da função do gene aroA), quer serina e piridoxina (devido à perda da função do gene serC), como resultado da inserção do transposição Tn10, no cromossoma, na parte próxima do promotor do operão serC e aroA. Depois da purificação foi testado o carácter nutricional dos transductantes tetraciclina-resistentes, para verificar se tinham adquirido os requisitos esperados. Os transductantes aro⁻ e serC⁻ da estirpe parente CDC10-80 foram designados 511Ty.

Os transductantes 510Ty e 511Ty foram usados como receptores numa segunda transdução utilizando lisado fágico G2013 crescido em S. typhimurium SL5253, que tem a deleção DEL407 estendida do interior do transposição Tn10 no aroA554::Tn10, para a direita, para remover o gene de resistência à tetraciclina do transposição, um dos seus elementos IS10 constituintes, e a porção adjacente do gene aroA, que inclui os locais das mutações pontuais aro 1, 89, 102, 55, 46 e 30, que podem recombinar-se umas com as outras para originar aro⁺, e definir, assim, locais diferentes no gene aroA. Esperava-se que os transductantes desejados tivessem uma deleção de uma parte do aroA, mas com a função serC normal, requerendo, portanto, metabólitos aromáticos, mas não serina ou piridoxina. Clones de transductantes encontrados ainda, exactamente, para metabólitos aromáticos, mas tetraciclina-sensíveis,



e não necessitando de serina ou de piridoxina, conclui-se que tinham surgido por substituição do aroA(serC)::Tn10 do receptor pela deleção serC⁺ aroA do dador. O transductante derivado do 511Ty foi designado 515Ty.

Introdução como Marcador de uma Necessidade de Histidina

A primeira estirpe dadora usada foi SL5173, que é S. typhimurium hisD8557::Tn10, tendo o Tn10 inserido no gene hisD, e causando incapacidade de efectuar o último passo da biossíntese de histidina, e uma necessidade de histidina não satisfeita pela provisão com histidinol. O lisado G2023 do fago crescido na estirpe SL5173 foi aplicado a S. typhi estirpe 515Ty tendo a deleção aroA descrita anteriormente. Foram seleccionados transductantes tetraciclina-resistentes, e depois da purificação foi testado o carácter nutricional. Um clone com uma necessidade de histidina não satisfeita pela provisão com histidinol foi seleccionado e designado 521Ty.

O transductante foi então tratado com fago lisado G1715 em S. typhimurium estirpe hisG46, tendo uma mutação num gene do operão his (biossíntese de histidina), que não o hisD, fornecendo, assim, uma necessidade de histidina que pode ser satisfeita pela provisão com histidinol. A selecção foi feita em meio definido, suplementado com cistina e metabolitos aromáticos, juntamente com histidinol (100µg/ml). Um transductante requerendo metabolitos aromáticos, assim como histidina ou histidinol, foi designado 523Ty.

Introdução da Deleção de purA

As estirpes SL5475 e SL5505 são ambas S. typhimurium



LT2 purA115 zjb-908::Tn10 derivadas de S. typhimurium estirpe LT2 tendo uma mutação por deleção em purA e tendo um transposição Tn10 inserido num local silencioso (zjb-908)::Tn10, quando o fago transductor P22 HT105/1 int, crescido na estirpe SL5475 ou estirpe SL5505 é aplicado a um receptor tetraciclina-sensível pur⁺ S. typhimurium. A estirpe SL5475 foi construída pelo método standard (Kleckner et al., J. Mol. Biol. (1977):125), para obtenção de uma inserção do transposição num local do cromossoma perto do gene de interesse como se segue. A estirpe LT2 purA155 (conhecida por ter uma deleção de parte do gene purA) foi tratada com o fago transductor crescido numa combinação de vários milhares de clones tetraciclina-resistentes, resultando cada um de uma inserção independente do transposição Tn10, em algum ponto do cromossoma de um tipo selvagem da estirpe S. typhimurium. Várias centenas de transductantes tetraciclina-resistentes, assim evocados, da estirpe purA155 foram seleccionados para detectar qualquer um que se tenha tornado purina-independente. Um destes clones foi encontrado e designado SL5464. Crê-se que tenha incorporado um fragmento cromossomal transduzido incluindo o gene purA⁺ e uma inserção adjacente Tn10. Pela convenção que indica uma localização aproximada das inserções do cromossoma, esta estirpe foi chamada zjb-908::Tn10. Um lisado fágico transductor da estirpe SL5464 (LT2 purA⁺ zjb-908::Tn10) foi utilizado, em seguida, para evocar transductantes tetraciclina-resistentes da estirpe LT2 purA155. De doze clones tetraciclina-resistentes, assim obtidos, só três eram purina-dependentes, como os seus parentes. Crê-se que resultaram da incorporação de um transductado zjb-908::Tn10 sem incorporação do gene adjacente purA⁺ do dador. Um destes três clones de constituição purA155 zjb-908::Tn10 foi designado SL5475, e usado como dador dos dois



genes firmemente ligados.

Para introduzir a deleção de purA155 em 523Ty foi utilizado um lisado fágico da estirpe SL5475 às estirpes recipientes S. typhi tetraciclina-sensíveis, e foi feita a seleção dos transductantes tetraciclina-resistentes, pelo mesmo procedimento descrito atrás, para a introdução da mutação do aroA(serC)::Tn10. Depois do reisolamento de colônias simples, os clones de transductantes tetraciclina-resistentes foram testados por necessidade de adenina (além das suas necessidades prévias de metabolitos aromáticos e histidina). Foi obtido um transductante zjb-906::Tn10, com deleção purA155 e designado 531Ty.

Remoção da Resistência à Tetraciclina

Os mutantes tetraciclina-sensíveis da 531Ty foram obtidos espalhando um meio de cultura diluído num meio que retarda o crescimento de estirpes que são tetraciclina-resistentes, devido à presença de Tn10 (Bochner et al., J. Bacteriol. (1980) 143:926). Este meio foi modificado pela adição de ácido 2,3-dihidrobenczoico, a cerca de 1µg/ml, devido ao defeito aro da estirpe S. typhi usada. Os mutantes tetraciclina-sensíveis, assim obtidos, resultantes da deleção da parte do transposição causadora da resistência à tetraciclina, foram inspeccionados para confirmar que tinham o carácter nutricional inalterado e que tinham os caracteres antigénicos do tipo selvagem do S. typhi seu ancestral. Um assim isolado, designado 541Ty, constitui um Vi-positivo aro(deln.) his purA(deln.) tetraciclina-sensível, estirpe de vacina viva, na linha CDC10-80.

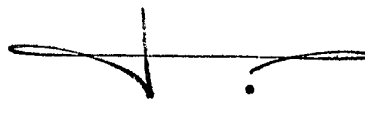
Preparação de Estirpes aro⁻ pur⁻ Vi⁻

Mutantes Vi-negativos são obtidos de 531Ty por ris-

cagem de colônias de bactérias mutantes resistentes a fagos, desenvolvidas em áreas de lises causadas por aplicação do fago Vi I, II (adaptação A ou E1) ou IV, ou uma mistura dos quatro fagos. Os mutantes resistentes a fagos, depois do reisolamento de colônias simples foram testados pela presença ou ausência de antígenos Vi, por testes de aglutinação de placas, usando soro anti-Vi comercialmente disponível, e testando a sensibilidade de cada um dos fagos Vi-específicos. Um mutante com resultado Vi-negativo, em ambos os testes, e retendo o seu caráter nutricional parental, e caráter antigénico O ancestral foi designado 543Ty, e constitui uma estirpe de vacina viva Vi-negativa.

Ambas as 541Ty e 543Ty foram dadas como alimentos a voluntários com resultados geralmente satisfatórios. Não houve nenhum efeito de doença em qualquer um dos voluntários, e alguns voluntários mostraram evidência serológica de resposta imunitária. Adicionalmente, alguns voluntários excretam a estirpe da vacina num dia ou dois, demonstrando, no mínimo, um período de viabilidade pequeno.

Clements et al., Infect Immun. (1984)46:564-569, relata a preparação do plasmídeo pJC217 contendo o gene de expressão de 56KD B, região do operão da enterotoxina sensível ao calor da E. coli. O plasmídeo pJC217 é transformado nas estirpes 541Ty e 543Ty, como descrito em Clements et al., supra. A expressão do LT-B é confirmada por um ensaio ELISA. Placas de microtitulação são pré-revestidas com 7,5 µg/reservatório de gangliosídeos misturados (tipo III), depois com 1µg/reservatório de LT-B purificado. Os reagentes e o antisoro estão disponíveis na Sigma Chemical Co. As amostras foram muito diluídas em PBS (pH 7,2)-0,05% Tween-20. As colônias resistentes à ampicilina foram testadas por LT-B. Os



transformantes LT-B positivos são então usados para imunização na S. typhi, e na enterotoxina sensível ao calor, como previamente descrito.

SHIGELLA

Caracterização da Estirpe Parente

A estirpe Y234/79 (Shigella flexneri tipo Y) cresceu bem em meio definido simples suplementado apenas com ácido nicotínico, e é sensível a todos os antibióticos e antibacterianos sensíveis testados incluindo ampicilina, cefalotina, tetraciclina, doxiciclina, gentamicina, trimetoprina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, e sulfadiazina. Esta estirpe, designada SFL1, possui o plasmídeo 140 Md, requerido por Shigella para invasões. A presença do plasmídeo foi certificada pela presença de uma banda de DNA plasmídico do tamanho esperado, pela capacidade da estirpe se ligar a um corante quando cresce num meio apropriado contendo Congo Red, e pela capacidade de invadir células humanas em cultura. Além disso, a estirpe é serenei-positiva. Isto é, produz queratoconjuntivite depois de instilada nos sacos conjuntivos de porcos da Índia. Todas estas propriedades indicam capacidade de causar disenteria no homem.

Estirpe Dadora

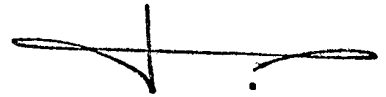
A estirpe Nk5131 é um mutante aromático-dependente com uma inserção de Tn10, de E. coli K12, recebida da Dra. Nancy Kleckner (Department of Biology, Harvard University). O gene inativado pelo transposão Tn10 foi identificado como aroD, pelo fenotipo nutricional da estirpe Nk5131 (aromático-dependente mas cres-



cendo em meio definido com ácido chiquímico em vez de compostos aromáticos), pelos resultados dos cruzamentos transduccionais dos mutantes conhecidos aroB, aroD, e aroE (estas são as três classes de mutantes que produzem o fenotipo nutricional descrito), e por evidência de co-transducção com o gene pps. O mutante moderado foi designado pelo símbolo aroD25::Tn10.

Lisado Transductor

Com vista a obter um stock do fago capaz de transduzir o gene aroD25::Tn10, a estirpe NK5131, tratada com o fago P1 Cm C-ts foi incubada a 30⁰C, em placas de base de agar com sangue, suplementadas com cloranfenicol, 25µg/ml, para seleccionar as bactérias tornadas lisogénicas por este fago, cujo genoma inclui um transposição com resistência a cloranfenicol. O crescimento resistente a cloranfenicol obtido foi inoculado num meio que foi incubado a 30⁰, durante cerca de 18 horas. Dez ml deste meio de cultura foram adicionados a 20 ml de meio L. A mistura foi agitada a 30⁰, durante 3 horas, sendo neste tempo adicionados mais 10 ml de meio L. A mistura foi incubada num banho de água a 42⁰C, para induzir o ciclo lítico. Este fago, devido à sua mutação C-ts, não consegue persistir como profago a temperaturas menores que 37⁰C. Depois de 90 minutos a mistura é incubada, sem agitação, a 37⁰, durante 90 minutos, e depois centrifugada; o sobrenadante, esterilizado por pasteurização e adição de clorofórmio, constitui o lisado G2272. Este lisado tem um teor de 2x10⁹ unidades que se formam em placas/ml, em Shigella sp. estirpe 16, como indicador.

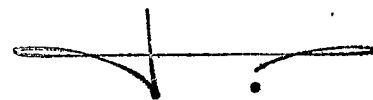


Isolamento de Transductantes Tetraciclina-Resistentes da Estirpe Y234-79

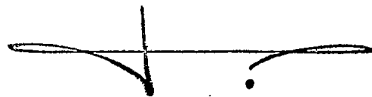
Para obter transductantes aroD25::Tn10 de Shigella flexneri estirpe Y234-79, uma sublinha designada SFL113, fornecida pelo Dr. Alf Lindberg, e que ele provou ser Congo-Red positiva e Senerei positiva, foi usada como receptora. Placas de base de agar com sangue "Oxoid" suplementadas com tetraciclina, 25µg/ml, e com ácido nicotínico, e ácido 2,3-dihidroxibenzoico, cada um com 1µg/ml, foram inoculadas em abundância com um meio de cultura durante uma noite da estirpe SLF113. O meio em excesso foi pipetado para fora, e quando a superfície do agar tinha secado, gotas (volume de cerca de 0,01ml) do lisado G2272, diluído de 1/100 ou 1/10 ou não diluído, estavam depositadas, quatro gotas de cada diluição em cada uma de oito placas. Depois de três dias de incubação a 37⁰ observou-se um total de 11 colónias, todas nas áreas das gotas dos lisados não diluídos. O inóculo do lisado G2272, não diluído, não cresceu no agar de base de sangue, mostrando que o lisado é bacteriologicamente estéril. Oito das onze colónias foram investigadas, depois de um reisolamento das colónias isoladas no meio selectivo, em que tinham sido obtidas. Provou-se que todas eram aromático-dependentes, e conclui-se serem transductantes Shigella flexneri Y234-79 aroD25::Tn10. Uma das oito que confirmou o tipo Y da Shigella flexneri, pelo teste de aglutinação de superfícies lisas e é Congo-Red positiva, foi designada SFL114, e armazenada a -70⁰.

Isolamento de Mutantes por Delecção Não-Reversíveis, Tetraciclina-Sensíveis da Estirpe SFL114

A estirpe SFL114, como outras estirpes que são auxo-



tróficas, devido à inativação de um gene biossintético por inserção de Tn10, pode, teoricamente, tornar-se tipo selvagem, neste caso aroD⁺ (aromático-independente) e, assim, presumivelmente virulenta, por "excisão limpa" do transposão, e uma das duas cópias do segmento com nove pares de base (parte da sequência de bases do gene do tipo selvagem) que o flanqueiam. A possibilidade desta reversão é eliminada por uma segunda, gerada pelo Tn10, mutação no aroD25::Tn10, causando a perda da resistência à tetraciclina se a segunda mutação for, quer a deleção ou a deleção-inversão, de um segmento de DNA estendido do interior do Tn10 até ao DNA do próprio gene aroD. Os mutantes tetraciclina-sensíveis de estirpes de E. coli ou Salmonella sp. transportando o Tn10 são facilmente isolados por incubação no meio descrito por Bochner et al., (1980, J. Bact., 143, 926-933), no qual as estirpes tetraciclina-resistentes crescem pouco ou nem crescem. As primeiras tentativas para isolar mutantes de SFL114 tetraciclina-sensíveis, por este procedimento, foram um insucesso. Um procedimento modificado foi mais tarde usado para seleccionar mutantes tetraciclina-sensíveis. O meio usado, contendo ácido fusárico em apenas 1µg/ml, em vez de 10µg/ml e clorotetraciclina HCl (adicionado antes da autoclave), em 10µg/ml, em vez de 50µg/ml. O meio usado foi suplementado com ácido 2,3-dihidroxibenzoico, já que as estirpes aromático-dependentes, mesmo que tetraciclina-sensíveis, não crescem em meio Bochner, a não ser que seja tão suplementado que permita a síntese de compostos capturadores de ferro, enterobactina (enteroquelina). A incubação em placas do meio atrás referido, inoculado com 0,1ml de um meio de cultura diluído de 1/100 da estirpe SFL114 originou cerca de 100 colónias por placa. A maioria das colónias mostrou ser mutantes tetraciclina-sensíveis. Vinte mutantes de SFL114 foram in-



vestigados para saber se algum deles resulta de uma deleção que afecte o gene aroD.

Construção da Sonda

O plasmídeo pKD201, descrito por Duncan et al (Biochemical Journal, 1986, 238, 475) contém um fragmento ClaI de 1,8 Kb que inclui o gene aroD⁺ da E. coli; este plasmídeo foi fornecido pelo professor John Coggins (Department of Biochemistry, University of Glasgow). O DNA plasmídico foi extraído e purificado. O DNA plasmídico foi digerido com endonucleases EcoRV e ClaI; foi extraída uma banda de, aproximadamente, 1 Kb de um gel de agarose. Com base na sequência de nucleótidos do aroD⁺ publicada (Duncan et al., supra), o fragmento foi concluído de modo a compreender a sequência do nucleótido 778 até ao nucleótido 1798, portanto todas, excepto os 75 pares de bases N-terminal da região do código do gene aroD, juntamente com cerca de 370 pares de bases extendidos em direcção à terminação translacional do codão do gene. O DNA extraído foi tratado com fenol, e precipitado com etanol. Apenas foi vista uma banda na electroforese em gel de agarose. Uma amostra do fragmento foi incubada com dCTP, dATP frio, dGTP, dTTP marcados radioactivamente e polimerase; o DNA foi recuperado por passagem através de uma coluna de Biogel.

Para hibridização das colónias, uma placa com um inóculo riscado dos mutantes Congo-Red-negativos, dos 20 mutantes de SFL114 tetraciclina-sensíveis foi armazenado com um filtro de nitrocelulose depois da incubação. As bactérias transferidas para o filtro foram lisadas e o seu DNA foi desnaturado. Depois de seco ao ar, o filtro foi seco a 60⁰ in vacuo durante 2 horas. Depois das lavagens apropriadas, o filtro seco foi incubado durante a noite a

42⁰C, na presença da sonda marcada radioactivamente, depois lavado várias vezes, seco ao ar, e exposto a um filme de raio X, com écran intensificado a -70⁰C, durante a noite.

A autoradiografia resultante mostrou que os variantes Congo-Red-negativos dos dezoito mutantes de SFL114 tetraciclina-sensíveis ligaram a sondas da mesma extensão da SFL114, mas os variantes Congo-Red-negativos dos mutantes números 13 e 19 não a ligaram em nenhuma extensão detectável. Um teste repetido confirmou a falha dos números 13 e 19, ambas as estirpes originais Congo-Red-positivas e os seus variantes Congo-Red-negativos, na sua ligação à sonda. Conclui-se que o número 13 (agora designado SFL123) e número 19 (agora SFL124) têm deleções originadas por Tn10 que removeu toda ou quase toda a sequência do código do gene aroD.

A deleção transportada, ou quase toda a sequência do código do gene aroD pode significar que o local de inserção do Tn10 que produz o anulamento aroD25::Tn10 está no interior da região promotora do gene, entre o seu promotor e a sequência do código, e no interior da região N-terminal de cerca de 75 pares de bases na sua região do código; uma deleção para a direita do Tn10 inserido neste local, em direcção a um alvo a jusante do gene estrutural produziria o resultado observado. Além disso, a sequência de bases anterior do gene aroD (Duncan et al., Biochemical Journal, 1986, 238, 417) mostra a presença de duas cópias quase perfeitas (uma base incorrecta contra seis) do alvo preferido para a inserção do Tn10 no interior da suposta região promotora do gene aroD. A inserção de Tn10 no aroD25::Tn10 pode ser num destes dois locais alvos, causando a não expressão do gene estrutural devido à ausência de um promotor eficaz. As observações descritas indicam que a inserção do transposição no aroD25::Tn10 é, quer no promotor quer entre o promo-

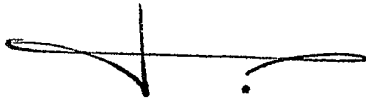
tor e o início da região código ou, menos provavelmente, no interior dos primeiros centos ou perto dos pares de bases da região código. Os dois mutantes por deleção, número 13 e 19, (agora SFL123 e SFL124), independentemente do local de inserção, perderam toda ou quase toda da sua região código do gene, e estão, assim, incapazes de se reverterem.

Ensaio da Estirpe SFL114 em Macacos

A estirpe S. flexneri Y234-79 parente é suspensa num tampão de bicarbonato-citrato e inserida, usando uma sonda de alimentação nasal a um bebé, no estômago de macacos Macacca fascicularis, com 2-4 anos de idade, como controle. Dos cinco macacos aos quais foi dada uma dose infectante de 1×10^{11} bactérias, quatro desenvolveram uma diarreia profusa e mucosa que durou 1-3 dias. De dois macacos aos quais foi dado 1×10^9 bactérias, um desenvolveu diarreia. Em todo o caso os macacos tiveram, no mínimo, três culturas de fezes negativas antes de terem sido infectados. A estirpe do tipo selvagem foi recuperada de amostras fecais, no dia seguinte à infecção, e foi espalhada numa média de 17 dias (entre 9 e 35 dias).

A um grupo de nove macacos, separadamente presos, foi dada uma vacina da estirpe SFL114, por via oral, numa dose de, aproximadamente, $2-3 \times 10^{10}$ bactérias nos dias 0, 7, 14 e 39. A estirpe da vacina foi bem tolerada, e não se verificou diarreia em qualquer um dos macacos, em nenhum instante. A estirpe da vacina foi recuperada em amostras fecais em todos os macacos, e foi espalhada numa média de 2 dias (entre 1 e 4 dias).

Foram recolhidas amostras de soro de macacos antes de serem imunizados, e depois em intervalos. Amostras de fezes foram



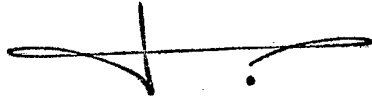
igualmente recolhidas, homogenizadas em tampão fosfato salino, e armazenadas a -70°C antes de ensaiadas. As amostras de soro e fezes foram então estudadas através de ensaios imunizados com enzimas com S. flexneri serotipo Y, ib e 2a LPS, e uma fracção proteica da membrana exterior especificada por um plasmídeo grande em S. flexneri, como antigénio. Os macacos responderam com um aumento significativo do título do soro contra o antigene Y LPS em todas as classes de anticorpos (Tabela 1).

TABELA 1

<u>Dia</u>	<u>IgA</u>	<u>IgM</u>	<u>IgG</u>
0	140 (50-240)	300 (90-570)	550 (110-1800)
6	230 (30-510)	370 (120-1900)	610 (110-1640)
13	380 (50-1230)	580 (160-1900)	1030 (180-1340)
25	240 (50-510)	440 (100-1490)	1210 (250-4000)
46	310 (60-1000)	510 (90-1780)	1280 (310-4000)
60	800 (110-1870)	590 (130-1630)	1840 (230-4000)

Títulos (médio e (gamma)) de classes de anticorpos específicos de soro contra lipopolissacárido Y de Shigella flexneri, estimado por ensaio imunizado por enzima, em macacos imunizados oralmente com S. flexneri SFL114 nos dias 0, 7, 14 e 39 ($2-3 \times 10^{10}$ bactérias) e desafiados no dia 52 com S. flexneri Y234-79 (1×10^{11} bactérias).

Os valores médios foram para além da duplicação para IgA e IgG. Contudo nenhuma ou apenas uma pequena resposta (<50% do título aumentou) se verificou para IgA em 3/9 macacos, para IgM em 5/9, e para IgG em 2/9 dos macacos. Depois da infecção de



desafio, verificaram-se elevados títulos em todos os macacos, exceptuando-se dois.

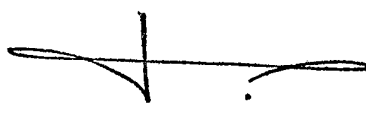
As titulações feitas em suspensões de fezes mostraram um aumento significativo do título de IgA, mas nenhum aumento no IgG (Tabela 2).

TABELA 2

<u>Dia</u>	<u>IgA</u>	<u>IgG</u>
0	160 (60-420)	130 (60-280)
4	110 (40-170)	70 (50-100)
10	400 (50-1910)	90 (40-140)
42	360 (160-740)	130 (20-370)
56	900 (80-2450)	100 (50-200)

Títulos (médio e (gama)) dos anticorpos IgA e IgG, em fezes contra lipopolissacárido Y de Shigella flexneri, estimados por ensaios imunizados com enzimas em macacos imunizados oralmente com S. flexneri SFL114, nos dias 0, 7, 14 e 39 ($2-3 \times 10^{10}$ bactérias), e desafiados no dia 52 com S. flexneri Y234-79 (1×10^{11} bactérias).

Estes resultados indicaram que os anticorpos SIgA foram produzidos, e que ocorreu uma pequena (ou nenhuma) perda do soro. Todos os macacos, excepto um, responderam com um aumento de IgA. Os títulos mais elevados de IgA das fezes foram observados depois da infecção de desafio. A maioria do soro dos macacos tem títulos muito elevados contra a fracção proteica da membrana exterior, antes da imunização com a vacina da estirpe SPL114. Um aumento significativo dos títulos de IgA e IgG foi observado em apenas 3/9 dos ma-



cacos.

Todos os macacos foram desafiados oralmente com a estirpe parente Y234/79 (1×10^{11} bactérias) no dia 52, 13 dias depois da última imunização. Nenhum dos macacos mostrou qualquer sinal de doença ou desenvolveu qualquer diarreia. A estirpe de desafio foi recuperada de amostras fecais, e excretada antes da imunização. Assim, a imunização com S. flexneri SFL114 protege contra infecções sintomáticas no desafio com a estirpe parente do tipo selvagem homóloga, mas não afecta a duração de abrigo da estirpe parente.

todos os macacos foram sujeitos a colonoscopia com biopsias simultâneas, desde o cólon próximo até ao recto, antes da imunização, e 3 dias depois da imunização e desafio. Os resultados são mostrados na tabela 3.

TABELA 3

	Macacos de Controle aos que foi dado SFL1	Grupo de Vacina ao qual foi dado SFL114			
		Antes da Imunização	Dia 3	Dia 17	Dia 56
Superfície Epitelial Erosão/ Ulceração	++	0	0	0	0
Hiperplasia Epitelial	+	0	0	+	+
Inflamação Intersticial	++	0	+	+	++
Inflamação do folículo	+	0	0	+	+

Valores morfológicos semi-quantitativos encontrados em biopsias de mucosas do cólon de macacos Macacca fascicularis imunizados e desafiados com Shigella flexneri. A vacina S. flexneri SFL114 nos dias

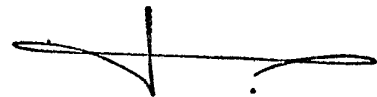


0, 7, 14, e 39. Desafio com Y234/79 no dia 52. 0=encontro negativo, +=encontro pequeno/com algum grau/focal, ++ = encontro de grau moderado/geral.

A colonoscopia mostrou que os macacos não imunizados tinham uma mucosa perfeitamente normal. Depois do desafio, observou-se um avermelhamento e hipertemia da mucosa. Uma examinação hispatológica mostrou um desarranjo superficial com erosões epiteliais de úlceras de mucosas remendadas do cólon ascendente até ao recto (tabela 3). Além disso, verificou-se uma inflamação intersticial moderada com algum envolvimento inflamatório das mucosas dos folículos. Foi observada hiperplasia epitelial secundária em muitas áreas da superfície e no istmo do folículo.

Os macacos imunizados com S. flexneri estirpe SFL114 perderam grande parte dos sinais morfológicos de infecção e inflamação, como observado a olho nú. As biopsias feitas depois da primeira imunização revelaram apenas uma suave inflamação intersticial (tabela 3). Depois de 3 doses de imunização eram também visíveis uma fraca hiperplasia epitelial, e um envolvimento inflamatório dos folículos. Estes resultados, e a verdadeira demonstração por microscopia electrónica da estirpe da vacina no interior da mucosa, confirmaram propriedades invasoras da estirpe e demonstraram que se tinha multiplicado na mucosa.

A colonoscopia feita depois da infecção de desafio também mostrou uma mucosa normal. A examinação histológica da biopsia não revelou erosões superficiais. Contudo, no interstício, observou-se uma inflamação moderada. Apenas alguns folículos foram afectados por inflamação, e a hiperplasia epitelial reactiva foi fraca e focal.



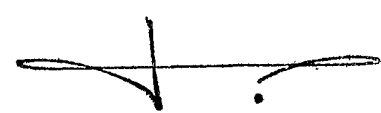
Os resultados das examinações histológicas mostram que a vacinação com a estirpe construída SFL114 aromática-dependente produz uma defesa imune local que evita danos da mucosa intestinal. A defesa não é exclusivamente causada por uma resposta sIgA local prevenindo a invasão, mas uma defesa significativa do hospedeiro é causada pela morte da estirpe de desafio S. flexneri depois desta a ter invadido. Mecanismos celulares imunitários são possíveis candidatos a esta defesa do hospedeiro.

Estes dados demonstraram que a estirpe S. flexneri SFL114 tem todas as características necessárias a uma vacina contra a disenteria causada por S. flexneri. Esta tem uma mutação definida não-reversível, causando dependência de metabolitos aromáticos não disponíveis, em tecidos de mamíferos. É invasiva com propensão para a multiplicação intra-celular limitada. Esta contém todos os antígenos protectores identificados (e provavelmente um número de não-identificados) e produz uma resposta de anticorpos, quer local quer circulante, e uma resposta celular imunitária.

A estirpe é bem tolerada por macacos e é espalhada em mais de quatro dias, o que deve indicar, no mínimo, uma multiplicação interna limitada, e colonização do intestino.

Teste da Estirpe SFL114 num Voluntário Humano

A Shigella flexneri estirpe SFL114, de serotipo Y necessitando de aromáticos devido à mutação aroD:25::Tn10 introduzida por transducção, provada já serenei-negativa, e não virulenta a macacos, tem sido agora testada por alimentação a voluntários humanos.

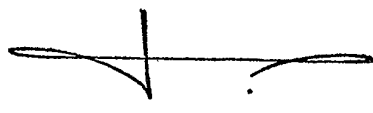


Num teste piloto, o grupo do laboratório bebeu uma dose de 10^5 , 10^7 ou 10^9 unidades formadoras de colónias da estirpe SFL114 suspensa num tampão fosfato salino (PBS). Não resultaram efeitos adversos.

No principal ensaio os voluntários eram estudantes de medicina novos, 33 homens e 14 mulheres. Depois de consentimento informado e de história médica apropriada, testes físicos e de laboratório, os voluntários foram divididos em dois grupos. Um grupo de 17 homens e 5 mulheres ingeriram uma dose simples de 10^{10} unidades formadoras de colónias da estirpe SFL114 suspensas em PBS. Um segundo grupo, 16 homens e 9 mulheres, ingeriram 10^9 unidades formadoras de colónias. Todos os voluntários foram vistos diariamente e as espécies aparecidas nas fezes e o algodão resultante da limpeza do recto, foram cultivados durante vários dias. Inicialmente, uma espécie de fezes foi cultivada quantitativamente para determinar o número de unidades formadoras de colónias de Shigella por grama de fezes.

Nenhum voluntário de qualquer dos grupos teve falta de apetite, vômitos, náuseas, febre (superior a $37,5^0$), fezes com sangue ou muco, desconforto abdominal grave, ou diarreia forte. No grupo 10^{10} , muitos dos voluntários (oito no 1º dia, quatro no 2º dia) apresentaram um fraco ou moderado desconforto abdominal e/ou desprendimento ou fezes aguadas durante 2-4 dias. No grupo 10^9 , 1-3 voluntários verificaram desprendimento ou fezes aguadas, não mais do que duas vezes por dia, ou um suave desconforto abdominal.

Foi isolada Shigella flexneri tipo Y de espécies fecais e/ou de algodões que limpavam rectos de quase todos os voluntários (percentagem cumulativa positiva próximo do dia 5, mais de 80% no



grupo 10^9 , e mais de 90% no grupo 10^{10}). Menos de 10% dos voluntários eram cultura-positiva no dia 5 ou depois.

Estes resultados demonstraram que a estirpe SFL114 é uma estirpe segura de vacina viva, quando administrada por via oral, mesmo que em doses tão grandes como 10^{10} unidades formadoras de colónias. Além disso, os resultados estabeleceram que uma dose de 10^{10} unidades formadoras de colónias provoca apenas efeitos secundários triviais. O número de *Shigella* por grama de fezes, nos primeiros dois dias depois da administração, indicaram que houve multiplicação limitada da estirpe da vacina viva, quer nas células epiteliais do cólon, quer no lúmus do intestino, ou em ambos. Isto demonstra que a administração resulta numa resposta imunitária satisfatória, pelo menos na região intestinal. Assim, a administração da vacina confere protecção contra infecções naturais, pelo menos para a *Shigella flexneri* de serótipo Y, e para estirpes reactivas cruzadas.

Como é evidente pelo que foi dito atrás, a presente invenção fornece vacinas vivas seguras contra uma série de microorganismos patogénicos, particularmente bactérias, como exemplificado por *Salmonella* e *Shigella*. As estirpes auxotróficas de vacinas fornecem blocos não reversíveis num caminho biossintético, o que assegura que, apesar das estirpes viverem no organismo hospedeiro, elas são substancialmente incapazes de proliferarem aí. Além disso, os organismos mutados retêm as mesmas, ou substancialmente as mesmas características antigénicas que os organismos virulentos, não mutados, induzindo, assim, uma resposta imunitária protectora.

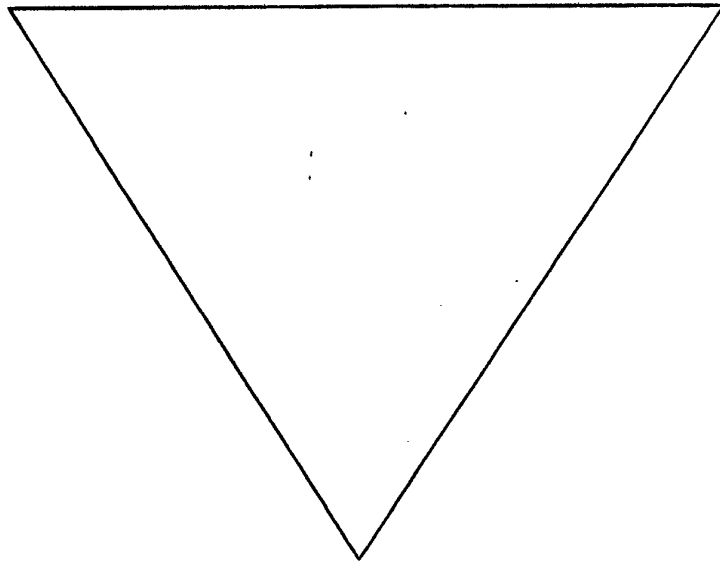
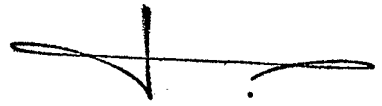
O presente procedimento pode ser usado com uma larga variedade de organismos biossintéticos, utilizando o transposição



apropriado a adquirir aro⁻, ou outros derivados mutantes. Outros organismos, com particular interesse são Escherichia, particularmente E. coli; Klebsiella, particularmente K. pneumoniae. Utilizando um transposição apropriado que é inserido num gene apropriado da biossíntese de aromáticos, técnicas como a transdução com um fago transductor geral apropriado, e.g., P1, pode ser empregue para se obter aro⁻, ou outros mutantes não virulentos de organismos patogénicos que são não-reversíveis.

Todas as publicações e pedidos de patentes mencionados nesta Memória Descritiva são indicadores do nível de aptidão dos peritos no ramo ao qual esta invenção diz respeito. Todas as publicações e pedidos de patentes estão aqui incorporados como referência, na mesma extensão como se cada publicação individual ou pedido de patente fosse específica e individualmente indicada para serem incorporadas como referência.

Estando a invenção completamente descrita, será óbvio para alguém normalmente entendido no ramo que muitas alterações e modificações podem ser feitas na mesma, sem que se afastem do espírito e âmbito das reivindicações anexas.



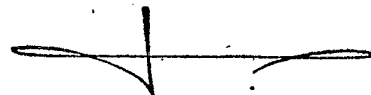
REIVINDICAÇÕES

1- Um processo de preparação de uma estirpe de Shigella viva, exigindo, pelo menos, um metabolito essencial que não está disponível num hospedeiro mamífero, como um resultado de uma mutação não-reversível, caracterizado pelo facto de compreender:

- a mutação de uma estirpe de Shigella viva, com um agente mutagénico; e

- a selecção de clones de Shigella mutados possuindo uma mutação não-reversível, resultando numa exigência de, pelo menos, um metabolito essencial não disponível num hospedeiro mamífero.

2- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 1, carac-



racterizado pelo facto da referida estirpe de Shigella ser um serotipo Shigella flexneri.

3- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto da referida estirpe compreender um bacteriófago lisogénico.

4- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto do referido agente mutante ser um transposição.

5- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizado pelo facto da referida estirpe possuir as seguintes propriedades:

-aroD⁻ não-reversível; "sereney" negativa; Vermelho Congo positivo; Serotipo Y; sensibilidade a uma pluralidade de antibióticos; e capacidade de desenvolvimento em meios quimicamente definidos.

6- Um processo de preparação de uma vacina de estirpe de Shigella flexneri, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) a inserção de um transposição que proporciona a resistência antibiótica, num gene aro da bactéria Shigella flexneri;

(b) a selecção de mutantes de Shigella flexneri que se tornaram sensíveis ao antibiótico;

(c) o "screening" desses mutantes escolhidos para os mutantes possuindo uma anulação ou anulação-inversão, que se estende para dentro do referido gene aro, para proporcionar células possuindo uma mutação não-reversível; e

(d) a selecção dos mutantes que possuem uma mutação não-reversível, os quais são "Sereny" negativos, e Vermelho congo positivos, para utilização como sendo a referida estirpe de vacina.

7- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 6, caracterizado pelo facto do referido transposição ser inserido no dito gene aro, substituindo um gene aro da dita bactéria Shigella, por um gene aro de E. coli, que foi previamente inactivado pela inserção de um transposição.

8- Um processo, conforme reivindicado na reivindicação 6, caracterizado pelo facto do referido transposição ser Tn10, e do dito gene aro ser aroD.

Lisboa, 21 de Março de 1989
PELO AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
O ADJUNTO

