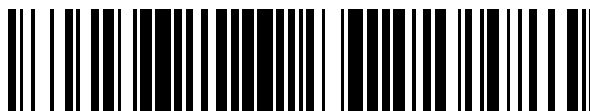


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 695**

51 Int. Cl.:
C07K 14/315 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08864055 .2**
96 Fecha de presentación: **18.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2235046**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2010**

54 Título: **Formas mutantes de estreptolisina O**

30 Prioridad:
21.12.2007 US 16193 P
13.08.2008 US 88381 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2012

73 Titular/es:
NOVARTIS AG (100.0%)
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH

72 Inventor/es:
BENSI, GIULIANO;
MARGARIT Y ROS, IMMACULADA;
CHIAROT, EMILIANO;
GRANDI, GUIDO y
SCARSELLI, MARIA

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 391 695 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formas mutantes de estreptolisina O

Campo de la invención

La invención se refiere a los campos de la inmunología y la vacunología.

5 Antecedentes de la invención

La estreptolisina O (SLO; GAS25) es uno de los factores de virulencia más importantes del patógeno humano *Streptococcus pyogenes* (GAS). Debido a su capacidad para provocar una respuesta inmunitaria temprana e intensa en seres humanos, se usa rutinariamente como marcador de diagnóstico de infección por GAS.

10 La SLO pertenece a la familia de las citolisinas activadas con tiol altamente homólogas (TACY), que ejercen su actividad citolítica por la interacción con colesterol sobre la membrana celular, auto-oligomerización y formación de poros. Además, su capacidad para activar directamente la vía del complemento clásica por unión a la región Fc de IgG humana puede producir el ataque directo mediado por complemento sobre células huésped. Las TACY también pueden interferir con la defensa del huésped y la función de células inmunitarias por medio de la inducción de citocinas y mediadores inflamatorios.

15 Algunas TACY pueden proteger pasiva y activamente a los animales de laboratorio. Véase FEMS Lett. 182, 197-205, 2000. Sin embargo, el uso de estas toxinas como candidatos a vacuna ha sido dificultado por su complejo patrón de efectos secundarios perjudiciales. Por tanto, hay una necesidad en la materia de proteínas SLO que no sean tóxicas.

20 El documento WO 2005/108419 describe composiciones de vacuna que comprenden proteínas de citolisina de unión a colesterol mutantes que incluyen proteínas SLO mutantes.

El documento WO 93/05155 describe la expresión y purificación de una proteína SLO mutante y el análisis de su actividad hemolítica.

Pinkey y col. (Infection and Immunity 57:8, 1989) describen el análisis de las actividades hemolíticas de SLO natural y varias proteínas SLO mutantes.

25 El documento GB 2233977 describe proteínas SLO mutantes y describe el análisis de su actividad citolítica.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1. Modelo informático tridimensional de SLO. Las prolinas se representan como espacio relleno. Pro427 está coloreada en blanco.

30 **FIG. 2.** Gráfica que muestra los resultados del ensayo hemolítico usando extractos de *E. coli* que contienen SLO natural y el mutante de SLO P427L.

FIG. 3. Fotomicrografía de gel de SDS-poliacrilamida que muestra el mutante de SLO purificado P427L.

FIG. 4. Gráfica que muestra los resultados del ensayo hemolítico usando SLO natural purificada y el mutante de SLO P427L.

35 **FIG. 5.** Fotomicrografía de gel de SDS-poliacrilamida de sobrenadantes de lisado de *E. coli*. Carril A, control negativo de *E. coli*; carril B, rSLO natural, sin marca; carril C, rSLO P427L, sin marca; y carril D, rSLO natural purificada, sin marca (5 mg).

FIG. 6. Gráfica que demuestra que bajo las mismas condiciones el mutante de SLO P427L es 1000 veces menos hemolítico que SLO natural.

40 **FIG. 7.** Gráfica que demuestra los efectos del colesterol sobre la hemólisis por SLO natural y el mutante de SLO P427L.

FIG. 8. Fotomicrografías del análisis de SDS-PAGE de proteínas sin marca totales en extractos de células. **FIG. 8A**, expresión de proteínas sin marca SLO natural y P427L; **FIG. 8B**, expresión de proteínas sin marca SLO P427L + W535, P427L + C530G, y P427L + C530G + W535F.

45 **FIG. 9.** Fotomicrografía del análisis de SDS-PAGE de proteínas marcadas con His totales en extractos de células.

FIG. 10. Fotomicrografía del análisis de SDS-PAGE de proteínas marcadas con His purificadas.

FIG. 11. Fotomicrografías del análisis de SDS-PAGE de proteínas sin marca purificadas. **FIG. 11A**, Carriles:

A, SLO natural sin marca; B, SLO P427L sin marca; marcadores de peso molecular (116-66,2-45-35-25-18,4-14,4); la flecha negra indica proteína SLO purificada de mutantes y clones naturales. **FIG. 11B**, carril A, SLO natural sin marca (3 µg), carril B, SLO P427L-W535F sin marca (3 µg); marcadores de peso molecular (116-66,2-45-35-25-18,4-14,4); la flecha negra indica proteína SLO purificada de mutantes y clones naturales.

5 **FIG. 12.** Fotomicrografía de análisis de SDS-PAGE de proteína SLO natural sin marca purificada. Muestras de diferentes lotes de purificación de SLO natural se analizaron bajo condiciones reductoras y no reductoras.

FIG. 13. Gráfica que muestra los resultados de las pruebas de hemólisis de mutantes de SLO marcados con His.

FIG. 14. Gráfica que muestra la inhibición de la actividad hemolítica inducida por SLO por antisuero anti-SLO.

10 **FIG. 15.** Gráfica que muestra la valoración de la inhibición por antisuero anti-SLO de la hemólisis de SLO.

FIG. 16. Gráfica que muestra la valoración de la actividad hemolítica de SLO.

FIG. 17. Gráfica que muestra la valoración de la actividad hemolítica de SLO natural, SLO natural químicamente desintoxicada y mutantes de SLO (P427L; P427L + W535F).

15 **FIG. 18.** Gráfica que muestra la valoración de la actividad hemolítica de SLO natural y mutantes de SLO (P427L; P427L + W535F).

FIG. 19. Gráfica que muestra la valoración de la actividad hemolítica de SLO natural y SLO natural químicamente desintoxicada.

FIG. 20. Gráfica que muestra la dilución de antisuero contra el mutante de SLO P427L + W535F requerida para obtener el 50 % de reducción de la actividad hemolítica de SLO (50 ng/ml de SLO).

20 **FIG. 21.** Gráfica que muestra la dilución de antisuero contra el mutante de SLO P427L + W535F requerida para obtener el 50 % de reducción de actividad hemolítica de SLO (100 ng/ml de SLO).

FIG. 22. Curva de valoración que muestra que los ensayos de inhibición de la hemólisis se realizaron con concentraciones de toxina que permitieron el 100 % de hemólisis.

25 **FIG. 23.** Alineamiento de proteínas SLO. M1_SF370, SEC ID N°: 1; M12_2096, SEC ID N°: 2; M12_9429, SEC ID N°: 3; M1_5005, SEC ID N°: 4; M2, SEC ID N°: 5; M28, SEC ID N°: 6; M6, SEC ID N°: 7; M18, SEC ID N°: 8; M5, SEC ID N°: 9; M3, SEC ID N°: 10; M3_SSI, SEC ID N°: 11; y M4, SEC ID N°: 12.

30 **FIG. 24.** Alineamiento de SLO natural y mutantes de SLO marcados con His. SLO_M1 strainSF370, SEC ID N°: 1; SLO WT_histagged, SEC ID N°: 13; SLOmut.P427L_histagged, SEC ID N°: 15; SLOmut.C530G_histagged, SEC ID N°: 16; SLOmut.DeltaA248_histagged, SEC ID N°: 17; SLOmut.W535F_histagged, SEC ID N°: 18; y SLOmutW535F&D482N_histagged, SEC ID N°: 19.

FIG. 25. Gráfica que compara la reducción de la actividad hemolítica de SLO por antisuero contra SLO natural y antisuero contra el mutante de SLO P427L + W535F.

FIG. 26. Gráfica que muestra las propiedades protectoras *in vivo* del mutante de SLO recombinante P427L + W535F usando tanto alumbre como MF59 como adyuvante.

35 **Descripción detallada de la invención**

La invención proporciona mutantes de estreptolisina O (SLO; GAS25) que no son tóxicos, pero que todavía mantienen la capacidad para inducir protección contra *S. pyogenes*. Formas mutantes de SLO son útiles, entre otras cosas, en composiciones de vacuna, para inducir protección contra *S. pyogenes*.

40 La invención proporciona una proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada según SEC ID N°: 1 en la que los aminoácidos en las posiciones P427 y W535 están sustituidos por otro aminoácido, y en la que la actividad hemolítica de la proteína SLO mutante se reduce al menos el 50 % con respecto a SLO natural.

La invención también proporciona una proteína SLO mutante purificada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 25 y SEC ID N°: 27.

45 La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína SLO mutante como se ha descrito anteriormente.

La invención también proporciona una composición de vacuna que comprende:

(a) un agente activo seleccionado de:

- (i) proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada como se ha descrito anteriormente; y
- (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada como se ha descrito anteriormente; y

(b) un vehículo farmacéuticamente aceptable

5 La invención también proporciona un procedimiento de preparación de una vacuna para la prevención o el tratamiento de infección por *Streptococcus pyogenes* que comprende combinar:

(a) un agente activo seleccionado de:

- (i) una proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada como se ha descrito anteriormente; y
- (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada como se ha descrito anteriormente; y

(b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona el uso de un agente activo en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir infección por *Streptococcus pyogenes*, en el que el agente activo está seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) una proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada como se ha descrito anteriormente; y
- (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada como se ha descrito anteriormente.

La invención también proporciona una proteína SLO mutante purificada como se ha descrito anteriormente o una molécula de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente para su uso como una vacuna.

20 La invención también proporciona una proteína SLO mutante purificada como se ha descrito anteriormente, una molécula de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente, o una composición de vacuna como se ha descrito anteriormente para su uso en terapia, tal como para tratar o prevenir infección por *Streptococcus pyogenes*.

Proteínas SLO mutantes

25 Las formas mutantes de SLO según la invención tienen al menos el 50 % menos de actividad hemolítica que SLO natural (por ejemplo, el 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o el 100 %) con respecto a SLO natural como se ha determinado por un ensayo hemolítico, pero son inmunogénicas, por ejemplo, confieren protección contra la exposición mortal a GAS en un modelo de ratón (por ejemplo, véase el Ejemplo 7). Los mutantes de SLO desvelados en el presente documento incluyen los mutantes de SLO P427L (SEC ID N°: 20), W535F (SEC ID N°: 21), C530G (SEC ID N°: 22), ΔA248 (SEC ID N°: 23), W535F + D482N (SEC ID N°: 24), P427L + W535F (SEC ID N°: 25), P427L + C530G (SEC ID N°: 26) y P427L + C530G + W535F (SEC ID N°: 27). La divulgación también incluye versiones marcadas con His de estos mutantes. Ejemplos se muestran en la **FIG. 24**.

35 Los mutantes de SLO desvelados en el presente documento incluyen aquellos con una alteración de aminoácidos (es decir, una sustitución, delección o inserción) en uno o más de los aminoácidos P427, W535, C530, A248 y D482 enumerados según la secuencia de SLO natural mostrada en SEC ID N°: 1. La **FIG. 23** proporciona un alineamiento de secuencias de GAS25 natural de diferentes tipos de M.

Los mutantes de SLO desvelados en el presente documento incluyen alteraciones de un único aminoácido, de dobles o triples aminoácidos ("mutantes únicos", "mutantes dobles", "mutantes triples") en las posiciones P427, W535, C530, A248 y/o D482. Por tanto, los mutantes de SLO pueden comprender los siguientes:

- i. P427L (SEC ID N°: 20), P427R, P427N, P427C, P427Q, P427E, P427G, P427H, P427I, P427L, P427K, P427M, P427F, P427A, P427S, P427T, P427W, P427Y o P427V;
- ii. W535F (SEC ID N°: 21), W535R, W535N, W535D, W535C, W535Q, W535E, W535G, W535I, W535L, W535K, W535M, W535A, W535P, W535S, W535T, W535Y o W535V;
- iii. C530G (SEC ID N°: 22), C530R, C530N, C530D, C530S, C530Q, C530E, C530A, C530H, C530I, C530L, C530K, C530M, C530F, C530P, C530T, C530W, C530Y o C530V;
- 45 iv. D482L, D482R, D482N, D482C, D482Q, D482E, D482G, D482H, D482I, D482L, D482K, D482M, D482F, D482A, D482S, D482T, D482W, D482Y o D482V;
- v. A248L, A248R, A248N, A248C, A248Q, A248E, A248G, A248H, A248I, A248L, A248K, A248M, A248F, A248S, A248T, A248W, A248Y o A248V
- vi. ΔP427; o ΔW535; o ΔC530; o ΔD482; o ΔA248 (SEC ID N°: 23); y
- 50 vii. combinaciones de los mismos, tales como W535F + D482N (SEC ID N°: 24), P427L + W535F (SEC ID

Nº: 25), P427L + C530G (SEC ID Nº: 26) y P427L + C530G + W535F (SEC ID Nº: 27).

5 Mutantes dobles desvelados en el presente documento incluyen P427L + W535F (SEC ID Nº: 25), P427L + C530G (SEC ID Nº: 26), P427L + A248L, P427L + D482L, W535F + C530G, W535F + A248L, W535F + D482L, C530G + A248L y A248L + D482L. Mutantes triples incluyen P427L + C530G + A248L, P427L + C530G + D482L, P427L + A248L + D482L, P427L + C530G + W535F (SEC ID Nº: 27), W535F + C530G + A248L, W535F + C530G + D482L, W535F + A248L + D482L y C530G + A248L + D482L.

10 Proteínas SLO mutantes desveladas en el presente documento también incluyen polipéptidos de fusión que comprenden una proteína SLO mutante como se ha desvelado anteriormente y otro antígeno de GAS. Los antígenos de GAS se desvelan, por ejemplo, en el documento WO 02/34771 e incluyen, pero no se limitan a, GAS39 (spy0266; gi-15674446), GAS40 (spy0269; gi-15674449), GAS42 (spy0287; gi-15674461), GAS45 (M5005_spy0249; gi-71910063), GAS57 (spy0416; gi-15674549), GAS58 (spy0430; gi-15674556), GAS84 (spy1274; gi-15675229), GAS95 (spy1733; gi-15675582), GAS117 (spy0448; gi-15674571), GAS130 (spy0591; gi-15674677), GAS137 (spy0652; gi-15674720), GAS159 (spy1105; gi-15675088), GAS193 (spy2025; gi-15675802), GAS202 (spy1309; gi-15675258), GAS217 (spy0925; gi-15674945), GAS236 (spy1126; gi-15675106), GAS253 (spy1524; gi-15675423), GAS277 (spy1939; gi-15675742), GAS294 (spy1173; gi-15675145), GAS309 (spy0124; gi-15674341), GAS366 (spy1525; gi-15675424), GAS372 (spy1625; gi-15675501), GAS384 (spy1874; gi-15675693), GAS389 (spy1981; gi-15675772), GAS504 (spy1751; gi-15675600), GAS509 (spy1618; gi-15675496), GAS290 (spy1959; gi-15675757), GAS511 (spy1743; gi-15675592), GAS527 (spy1204; gi-15675169), GAS529 (spy1280; gi-15675233) y GAS533 (spy1877; gi-15675696). Otros antígenos de GAS incluyen, pero no se limitan a, GAS68 (Spy0163; gi13621456), GAS84 (Spy1274; gi13622398), GAS88 (Spy1361; gi13622470), GAS89 (Spy1390; gi13622493), GAS98 (Spy1882; gi13622916), GAS99 (Spy1979; gi13622993), GAS102 (Spy2016; gi13623025), GAS146 (Spy0763; gi13621942), GAS195 (Spy2043; gi13623043), GAS561 (Spy1134; gi13622269), GAS 179 (Spy1718, gi13622773) y GAS681 (Spy1152; gi1362228).

Moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas SLO mutantes

25 La invención incluye moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas SLO mutantes. También se desvelan moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que tienen al menos el 50 % de identidad de secuencias con tales moléculas. Dependiendo de la secuencia particular, el grado de identidad de secuencias es preferentemente superior al 50 % (por ejemplo, el 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más). La identidad entre secuencias de nucleótidos se determina preferentemente por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman como se implementa en el programa MPSRCH (Oxford Molecular) usando una búsqueda de huecos afín con los parámetros penalización por apertura de hueco = 12 y penalización por extensión de hueco = 1.

35 En el presente documento también se desvelan moléculas de ácidos nucleicos que pueden hibridarse con estas moléculas. Las reacciones de hibridación pueden realizarse en condiciones de diferente "rigurosidad". Las condiciones que aumentan la rigurosidad de una reacción de hibridación son ampliamente conocidas y publicadas en la materia. Véase, por ejemplo, la página 7.52 de Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989. Ejemplos de condiciones relevantes incluyen (en orden de rigurosidad creciente): temperaturas de incubación de 25 °C, 37 °C, 50 °C, 55 °C y 68 °C; concentraciones de tampón de 10X SSC, 6X SSC, 1X SSC y 0,1X SSC (siendo SSC NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM) y sus equivalentes usando otros sistemas tampón; 40 concentraciones de formamida del 0 %, 25 %, 50 % y 75 %; tiempos de incubación de 5 minutos a 24 horas; 1, 2 o más etapas de lavado; tiempos de lavado-incubación de 1, 2 ó 15 minutos; y disoluciones de lavado de 6X SSC, 1X SSC, 0,1X SSC, o agua desionizada. Las técnicas de hibridación y su optimización son muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, 1989; Ausubel y col., eds., Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed., 1999; patente de EE.UU. 5.707.829; Ausubel y col., eds., Current Protocols in Molecular Biology, suplemento 30, 1987.

45 En algunos aspectos, las moléculas de ácidos nucleicos desveladas en el presente documento se hibridan con una diana bajo condiciones de baja rigurosidad; en otras realizaciones, las moléculas de ácidos nucleicos desveladas en el presente documento se hibridan bajo condiciones de rigurosidad intermedias; en ciertos aspectos, las moléculas de ácidos nucleicos desveladas en el presente documento se hibridan bajo condiciones de alta rigurosidad. Un ejemplo de una condición de hibridación de baja rigurosidad es 50 °C y 10X SSC. Un ejemplo de una condición de hibridación de rigurosidad intermedia es 55 °C y 1X SSC. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta rigurosidad es 68 °C y 0,1X SSC.

Producción de proteínas SLO mutantes

Producción recombinante

55 La redundancia del código genético es muy conocida. Por tanto, cualquier molécula de ácido nucleico (polinucleótido) que codifique proteína SLO natural o una proteína mutante SLO de la invención puede usarse para producir esa proteína recombinantemente. Ejemplos de secuencias de nucleótidos que codifican SLO natural, el mutante de SLO P427L, W535F, C530G, ΔA248, W535F + D482N, P427L + W535F, P427L + C530G y P427L + C530G + W535F se proporcionan en la lista de secuencias (véanse también SEC ID NO: 28, 29, 30, 31, 32 y 33).

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican SLO natural también pueden aislarse de la bacteria *S. pyogenes* apropiada usando técnicas de purificación de ácidos nucleicos convencionales o pueden sintetizarse usando una técnica de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o usando un sintetizador automático. Véase Caruthers y col., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215 223, 1980; Horn y col. Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225 232, 1980; Hunkapiller y col., Nature 310, 105-11, 1984; Grantham y col. Nucleic Acids Res. 9, r43-r74, 1981.

Las moléculas de ADNc pueden prepararse con técnicas de biología molecular convencionales usando ARNm como molde. Las moléculas de ADNc pueden replicarse después usando técnicas de biología molecular muy conocidas en la técnica. Una técnica de amplificación, tal como PCR, puede usarse para obtener copias adicionales de polinucleótidos de la invención, usando tanto ADN genómico como ADNc como molde.

Si se desea, los polinucleótidos pueden manipularse usando procedimientos generalmente conocidos en la técnica para alterar las secuencias codificantes de antígeno por una variedad de motivos que incluyen, pero no se limitan a, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento y/o expresión del polipéptido o producto de ARNm. Puede usarse barajado de ADN por fragmentación al azar y reensamblaje por PCR de fragmentos de genes y oligonucleótidos sintéticos para manipular las secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, puede usarse mutagénesis dirigida a sitio para insertar nuevos sitios de restricción, alterar los patrones de glucosilación, cambiar la preferencia de codones, producir variantes de corte y empalme, introducir mutaciones, etc.

Pueden usarse modificaciones de secuencias, tales como la adición de una secuencia de marca de purificación u optimización de codones para facilitar la expresión. Por ejemplo, la secuencia líder del extremo N puede reemplazarse con una secuencia que codifica una proteína de marca tal como polihistidina ("HIS") o glutatión S-transferasa ("GST"). Tales proteínas de marca pueden usarse para facilitar la purificación, detección y estabilidad de la proteína expresada. Los codones preferidos por un huésped procarionta o eucariota particular pueden seleccionarse para aumentar la tasa de expresión de proteínas o para producir un transcrito de ARN que tiene propiedades deseables tales como una semivida que es mayor a la de un transcrito generado a partir de la secuencia que se produce naturalmente. Estos procedimientos son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en el documento WO05/0325

Vectores de expresión

Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína SLO mutante puede insertarse en un vector de expresión que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Pueden usarse procedimientos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia para la construcción de vectores de expresión que contienen secuencias codificantes y elementos de control de la transcripción y traducción apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación genética *in vivo*.

Células huésped

Las células huésped para producir proteínas SLO mutantes pueden ser procariontas o eucariotas. *E. coli* es una célula huésped preferida, pero otros huéspedes adecuados incluyen *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (por ejemplo, *M. tuberculosis*), levaduras, baculovirus, células de mamífero, etc.

Una cepa de célula huésped puede elegirse por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar el polipéptido expresado en el modo deseado. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraducciona que escinde una forma "prepro" del polipéptido también puede usarse para facilitar la correcta inserción, plegamiento y/o función. Diferentes células huésped que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para las actividades postraducciona están disponibles de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) y pueden elegirse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de una proteína extraña. Véase el documento WO 01/98340.

Las construcciones de expresión pueden introducirse en células huésped usando técnicas bien establecidas que incluyen, pero no se limitan a, transferencia de ADN mediada por policones de transferrina, transfección con ácidos nucleicos desnudos o encapsulados, fusión celular mediada por liposomas, transporte intracelular de perlas de látex recubiertas por ADN, fusión de protoplastos, infección vírica, electroporación, procedimientos de "pistola de genes" y transfección mediada por DEAE o fosfato de calcio.

Las células huésped transformadas con vectores de expresión pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína del cultivo celular. La proteína producida por una célula transformada puede secretarse o estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia de nucleótidos y/o el vector de expresión usado. Aquellos expertos en la materia entienden que los vectores de expresión pueden diseñarse para contener secuencias señal que dirigen la secreción de antígenos solubles por una membrana celular procarionta o eucariota.

Purificación

Pueden incluirse secuencias de exportación de señales en una proteína SLO mutante recombinantemente producida de manera que el antígeno pueda purificarse del medio de cultivo celular usando procedimientos conocidos. Alternativamente, las proteínas SLO mutantes recombinantemente producidas de la invención pueden aislarse de células huésped manipuladas y separarse de otros componentes en la célula tales como proteínas, hidratos de carbono o lípidos usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de exclusión por tamaño, fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y electroforesis preparativa en gel. Una preparación de proteínas SLO mutantes purificadas es al menos el 80 % pura; preferentemente, las preparaciones son el 90 %, 95 % o el 99 % puras. La pureza de las preparaciones puede evaluarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Cuando corresponda, las proteínas SLO mutantes pueden solubilizarse, por ejemplo, con urea.

Síntesis química

Las proteínas SLO mutantes pueden sintetizarse, por ejemplo, usando técnicas en fase sólida. Véase, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-54, 1963; Roberge y col., Science 269, 202-04, 1995. La síntesis de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431 A (Perkin Elmer). Opcionalmente, los fragmentos de una proteína SLO mutante pueden sintetizarse por separado y combinarse usando procedimientos químicos para producir una molécula de longitud completa.

Anticuerpos

En el presente documento también se desvelan anticuerpos que se unen específicamente a una proteína SLO mutante de la invención, pero que no se unen a la proteína SLO natural. El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, además de fragmentos de las mismas, que pueden unirse a un antígeno. Éstos incluyen moléculas de anticuerpos híbridos (quiméricos) (por ejemplo, Winter y col., Nature 349, 293-99, 1991; patente de EE.UU. 4.816.567); fragmentos F(ab')₂ y F(ab) y moléculas Fv; heterodímeros no covalentes (por ejemplo, Inbar y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2659-62, 1972; Ehrlich y col., Biochem 19, 4091-96, 1980); moléculas de Fv monocatenario (sFv) (por ejemplo, Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 5897-83, 1988); construcciones de fragmentos de anticuerpos diméricos y triméricos; minicuerpos (por ejemplo, Pack y col., Biochem 31, 1579-84, 1992; Cumber y col., J. Immunology 149B, 120-26, 1992); moléculas de anticuerpos humanizados (por ejemplo, Riechmann y col., Nature 332, 323-27, 1988; Verhoeven y col., Science 239, 1534-36, 1988; y publicación de patente de RU nº GB 2.276.169 publicada el 21 de septiembre de 1994); y cualquier fragmento funcional obtenido de tales moléculas, además de anticuerpos obtenidos por procedimientos no convencionales tales como expresión en fago. Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Los procedimientos de obtención de anticuerpos monoclonales son muy conocidos en la técnica.

Normalmente, para formar un epítipo se requieren al menos 6, 7, 8, 10 ó 12 aminoácidos contiguo. Sin embargo, los epítopos que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo, al menos 15, 25 ó 50 aminoácidos. Pueden usarse diversos inmunoensayos (por ejemplo, transferencias Western, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones, u otros ensayos inmunológicos conocidos en la técnica) para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Numerosos protocolos para los ensayos de unión competitiva o inmunoradiométricos son muy conocidos en la técnica. Tales inmunoensayos normalmente implican la medición de la formación de complejos entre un inmunogén y un anticuerpo que se une específicamente al inmunogén. Una preparación de anticuerpos que se une específicamente a una proteína SLO mutante normalmente proporciona una señal de detección al menos 5, 10 ó 20 veces superior a una señal de detección proporcionada con otras proteínas cuando se usan en un ensayo inmunológico y no proporciona una señal detectable si se pone en contacto con proteína SLO natural. Preferentemente, los anticuerpos no detectan otras proteínas en ensayos inmunológicos y pueden inmunoprecipitar del antígeno particular en disolución.

Generación de anticuerpos

Las proteínas SLO mutantes o antígenos polipeptídicos no SLO (descritos más adelante) pueden usarse para inmunizar un mamífero tal como ratón, rata, conejo, cobaya, mono o ser humano para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, un antígeno puede conjugarse con una proteína portadora, tal como albúmina de suero bovino, tiroglobulina y hemocianina de lapa californiana. Dependiendo de las especies huésped pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund, geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio) y sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol). Entre los adyuvantes usados en seres humanos, BCG (bacillus de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son especialmente útiles.

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un antígeno pueden prepararse usando cualquier

técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridomas, la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos y la técnica de hibridomas de EBV (Kohler y col., Nature 256, 495-497, 1985; Kozbor y col., J Immunol. Methods 81, 31-42, 1985; Cote y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 2026-2030, 1983; Cole y col., Mol. Cell Biol. 62, 109-120, 1984).

- 5 Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos," el corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón para genes de anticuerpo humano para obtener una molécula con especificidad por antígeno y actividad biológica apropiadas (Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6851-6855, 1984; Neuberger y col., Nature 312, 604-608, 1984; Takeda y col., Nature 314, 452-454, 1985). También pueden
- 10 "humanizarse" anticuerpos monoclonales y otros para prevenir que un paciente organice una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo cuando se usa terapéuticamente. Tales anticuerpos pueden ser suficientemente similares en secuencia a los anticuerpos humanos que van a usarse directamente en terapia o pueden requerir la alteración de algunos residuos clave. Diferencias de secuencias entre anticuerpos de roedor y secuencias humanas pueden minimizarse sustituyendo residuos que se diferencian de aquellos en las secuencias humanas por mutagénesis dirigida a sitio de residuos individuales o injertando regiones determinantes de la complementariedad enteras.
- 15 Alternativamente, los anticuerpos humanizados pueden producirse usando procedimientos recombinantes, como se describe más adelante. Los anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno particular pueden contener sitios de unión a antígeno que son tanto parcialmente como están completamente humanizados, como se desvela en el documento U.S. 5.565.332.

- 20 Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios pueden adaptarse usando procedimientos conocidos en la técnica para producir anticuerpos monocatenarios que se unen específicamente a un antígeno particular. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de composición idiótipica distinta, pueden generarse por barajado de cadenas de bibliotecas de inmunoglobulina combinatorias aleatorias (Burton, Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 11120-23, 1991).

- 25 Los anticuerpos monocatenarios también pueden construirse usando un procedimiento de amplificación de ADN tal como PCR usando ADNc de hibridoma como molde (Thirion y col., 1996, Eur. J Cancer Prev. 5, 507-11). Los anticuerpos monocatenarios pueden ser mono- o biespecíficos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. La construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos tetravalentes se enseña, por ejemplo, en Coloma & Morrison, Nat. Biotechnol. 15, 159-63, 1997. La construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos bivalentes se enseña en Mallender & Voss, J. Biol. Chem. 269, 199-206, 1994.

- 30 Una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monocatenario puede construirse usando síntesis de nucleótidos manual o automatizada, clonarse en una construcción de expresión usando procedimientos de ADN recombinante convencionales e introducirse en una célula para expresar la secuencia codificante, como se describe más adelante. Alternativamente, los anticuerpos monocatenarios pueden producirse directamente usando, por ejemplo, tecnología de fago filamentoso (Verhaar y col., Int. J. Cancer 61, 497-501, 1995; Nicholls y col., J. Immunol. Meth. 165, 81-91, 1993).
- 35

Los anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno particular también pueden producirse induciendo la producción *in vivo* en la población de linfocitos o cribando bibliotecas o paneles de inmunoglobulina de reactivos de unión altamente específicos como se desvela en la bibliografía (Orlandi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833-3837, 1989; Winter y col., Nature 349, 293-299, 1991).

- 40 Pueden construirse anticuerpos quiméricos como se desvela en el documento WO 93/03151. También pueden prepararse proteínas de unión que se derivan de inmunoglobulinas y que son multivalentes y multispecíficas, tal como los "diacuerpos" descritos en el documento WO 94/13804.

- 45 Los anticuerpos pueden purificarse por procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden purificarse por afinidad por paso sobre una columna a la que está unida el antígeno relevante. Los anticuerpos unidos pueden entonces eluirse de la columna usando un tampón con una alta concentración de sales.

Composiciones farmacéuticas

- La invención también proporciona composiciones para su uso como medicamentos (por ejemplo, como composiciones inmunogénicas o vacunas). Las composiciones de la invención son útiles para prevenir y/o tratar enfermedad producida como resultado de infección por *S. pyogenes* y comprenden al menos un agente activo que puede ser un polipéptido, una molécula de ácido nucleico o un anticuerpo. Dicha enfermedad puede ser, por ejemplo, bacteremia, meningitis, fiebre puerperal, fiebre escarlata, erisipelas, faringitis, impétigo, fascitis necrotizante, miositis o síndrome de choque tóxico.
- 50

- Las composiciones que contienen proteínas SLO mutantes son preferentemente composiciones inmunogénicas y son más preferentemente composiciones de vacuna. El pH de tales composiciones está preferentemente entre 6 y 8, preferentemente aproximadamente 7. El pH puede mantenerse por el uso de un tampón. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. La composición puede ser isotónica con respecto a los seres humanos.
- 55

Las vacunas según la invención pueden usarse tanto profilácticamente como terapéuticamente, pero normalmente serán profilácticas. Por consiguiente, la invención incluye un procedimiento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de una infección por *Streptococcus pyogenes*. El animal es preferentemente un mamífero, lo más preferentemente un ser humano. Los procedimientos implican administrar al animal una cantidad terapéutica o

5 profiláctica de las composiciones inmunogénicas de la invención.

Algunas composiciones de la invención comprenden una proteína SLO mutante de polipéptido como se describe en el presente documento. Otras composiciones de la invención comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica el (las) proteína(s) SLO mutante(s) y, opcionalmente, otros antígenos que pueden incluirse en la composición (véase más adelante). Véase, por ejemplo, Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283; Donnelly y col. (1997) *Ann. Rev Immunol* 15:617-648; Scott-Taylor & Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480; Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447; Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120; Dubensky y col. (2000) *Mol Med* 6:723-732; Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74; Donnelly y col. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S90-193; Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90. Normalmente, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido.

10

15 En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden incluir uno o más agentes activos adicionales. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, (a) otra proteína SLO mutante de la invención, (b) un antígeno polipeptídico que es útil en una vacuna pediátrica, (c) un antígeno polipeptídico que es útil en una vacuna para ancianos o individuos inmunodeprimidos, (d) una molécula de ácido nucleico que codifica (a)-(c), y un anticuerpo que se une específicamente a (a)-(c).

20 *Antígenos adicionales*

Las composiciones de la invención pueden administrarse conjuntamente con uno o más antígenos adicionales para su uso en procedimientos terapéuticos o profilácticos de la presente invención. Antígenos adecuados incluyen aquellos enumerados más adelante. Adicionalmente, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir infecciones producidas por cualquiera de los patógenos enumerados más adelante. Además

25 de la combinación con los antígenos descritos más adelante, las composiciones de la invención también pueden combinarse con un adyuvante como se describe en el presente documento.

Antígenos para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes antígenos expuestos más adelante, o antígenos derivados de uno o más de los patógenos expuestos más adelante:

A. Antígenos bacterianos

30 Antígenos bacterianos adecuados para su uso en la invención incluyen proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos y vesículas de la membrana externa que pueden aislarse, purificarse o derivarse de una bacteria. Además, los antígenos bacterianos pueden incluir lisados bacterianos y formulaciones de bacterias inactivadas. Los antígenos bacterianos pueden producirse por expresión recombinante. Los antígenos bacterianos incluyen preferentemente epítopes que se exponen sobre la superficie de la bacteria durante al menos una etapa de su ciclo vital. Los

35 antígenos bacterianos se conservan preferentemente a través de múltiples serotipos. Los antígenos bacterianos incluyen antígenos derivados de una o más de las bacterias expuestas más adelante, además de los ejemplos de antígenos específicos identificados más adelante.

Neisseria meningitidis: los antígenos de *Meningitidis* pueden incluir proteínas (tales como aquellas identificadas en las referencias 1 - 7), sacáridos (incluyendo un polisacárido, oligosacárido o lipopolisacárido), o vesículas de la membrana externa [Referencias 8, 9, 10, 11] purificadas o derivadas de un serogrupo de *N. meningitidis* tal como A, C, W135, Y y/o B. Los antígenos de proteína de *Meningitidis* pueden seleccionarse de adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de Fe y proteínas asociadas a la membrana (preferentemente proteínas integrales de membrana externa).

40

45 *Streptococcus pneumoniae*: los antígenos de *Streptococcus pneumoniae* pueden incluir un sacárido (incluyendo un polisacárido o un oligosacárido) y/o proteína de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de sacárido pueden seleccionarse de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Los antígenos de proteína pueden seleccionarse, por ejemplo, de una proteína identificada en los documentos WO 98/18931, WO 98/18930, la patente de EE.UU. nº 6.699.703, la patente de EE.UU. nº 6.800.744, los documentos WO 97/43303 y WO 97/37026. Las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* pueden seleccionarse

50 de la familia de la tríada de polihistidina (PhtX), la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados de LytX, proteínas químéricas de truncados de CbpX-truncados de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 o Sp133.

Streptococcus pyogenes (*Streptococcus* del grupo A): los antígenos de *Streptococcus* del grupo A pueden incluir una proteína identificada en los documentos WO 02/34771 o WO 2005/032582 (incluyendo, pero no se limitan a,

55 GAS39 (spy0266; gi-15674446), GAS40 (spy0269; gi-15674449), GAS42 (spy0287; gi-15674461), GAS45 (M5005_spy0249; gi-71910063), GAS57 (spy0416; gi-15674549), GAS58 (spy0430; gi-15674556), GAS84 (spy1274; gi-15675229), GAS95 (spy1733; gi-15675582), GAS117 (spy0448; gi-15674571), GAS130 (spy0591; gi-15674677), GAS137 (spy0652; gi-15674720), GAS159 (spy1105; gi-15675088), GAS193 (spy2025; gi-15675802), GAS202

(spy1309; gi-15675258), GAS217 (spy0925; gi-15674945), GAS236 (spy1126; gi-15675106), GAS253 (spy1524; gi-15675423), GAS277 (spy1939; gi-15675742), GAS294 (spy1173; gi-15675145), GAS309 (spy0124; gi-15674341), GAS366 (spy1525; gi-15675424), GAS372 (spy1625; gi-15675501), GAS384 (spy1874; gi-15675693), GAS389 (spy1981; gi-15675772), GAS504 (spy1751; gi-15675600), GAS509 (spy1618; gi-15675496), GAS290 (spy1959; gi-15675757), GAS511 (spy1743; gi-15675592), GAS527 (spy1204; gi-15675169), GAS529 (spy1280; gi-15675233), y GAS533 (spy1877; gi-15675696)), fusiones de fragmentos de proteínas GAS M (incluyendo aquellas descritas en el documento WO 02/094851, y Dale, Vaccine (1999) 17:193-200, y Dale, Vaccine 14(10): 944-948), proteína de unión a fibronectina (Sfb1), proteína asociada a hemo estreptocócico (Shp) y estreptolisina S (SagA). Otros antígenos de GAS incluyen GAS68 (Spy0163; gi13621456), GAS84 (Spy1274; gi13622398), GAS88 (Spy1361; gi13622470), GAS89 (Spy1390; gi13622493), GAS98 (Spy1882; gi13622916), GAS99 (Spy1979; gi13622993), GAS102 (Spy2016, gi13623025), GAS146 (Spy0763; gi13621942), GAS 195 (Spy2043; gi13623043), GAS561 (Spy1134; gi13622269), GAS 179 (Spy1718, gi13622773) y GAS681 (spy1152; gi1362228).

Moraxella catarrhalis: los antígenos de *Moraxella* incluyen antígenos identificados en los documentos WO 02/18595 y WO 99/58562, antígenos de proteína de membrana externa (HMW-OMP), antígeno C y/o LPS.

15 *Bordetella pertussis*: los antígenos de *Pertussis* incluyen holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3.

20 *Staphylococcus aureus*: los antígenos de *Staphylococcus aureus* incluyen polisacáridos capsulares de tipo 5 y 8 de *S. aureus* opcionalmente conjugados con exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante no tóxica tal como StaphVAX™, o antígenos derivados de proteínas de superficie, invasinas (leucocidina, cinasas, hialuronidasa), factores de superficie que inhiben la asfixia fagocítica (cápsula, proteína A), carotenoides, producción de catalasa, proteína A, coagulasa, factor de coagulación y/o toxinas que dañan la membrana (opcionalmente desintoxicadas) que lisan membranas de células eucariotas (hemolisinas, leucotoxina, leucocidina).

Staphylococcus epidermidis: los antígenos de *S. epidermidis* incluyen antígeno asociado a cieno (SAA).

25 *Clostridium tetani* (tétanos): los antígenos del tétanos incluyen toxoide tetánico (TT), usado preferentemente como una proteína portadora junto con/conjugada con las composiciones de la presente invención.

Corynebacterium diphtheriae (difteria): los antígenos de la difteria incluyen toxina diftérica, preferentemente desintoxicados, tales como CRM197. Antígenos adicionales que pueden modular, inhibir o asociarse a una ribosilación de ADP se contemplan para la combinación/coadministración/conjugación con las composiciones de la presente invención. Los toxoides de la difteria pueden usarse como proteínas portadoras.

30 *Haemophilus influenzae B (Hib)*: los antígenos de *Hib* incluyen un antígeno de sacárido de Hib.

Pseudomonas aeruginosa: los antígenos de *Pseudomonas* incluyen endotoxina A, proteína Wzz, LPS de *P. aeruginosa*, más particularmente LPS aislada de PAO1 (serotipo O5) y/o proteínas de membrana externa, que incluyen proteínas F de membrana externa (OprF) (Infect Immun. 2001 May; 69(5):3510-3515).

Legionella pneumophila: los antígenos bacterianos pueden derivarse de *Legionella pneumophila*.

35 *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B): los antígenos de *Streptococcus* del grupo B incluyen un antígeno de proteína o de sacárido identificado en los documentos WO 02/34771, WO 03/093306, WO 04/041157 o WO 2005/002619 (que incluye proteínas GBS 80, GBS 104, GBS 276 y GBS 322, y que incluye antígenos de sacárido derivados de los serotipos Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII y VIII).

40 *Neisseria gonorrhoeae*: los antígenos de *gonorrhoeae* incluyen proteína Por (o porina) tal como PorB (véase Zhu y col., Vaccine (2004) 22:660 - 669), una proteína de unión a transferrina tal como TbpA y TbpB (véase Price y col., Infection and Immunity (2004) 71(1):277 - 283), una proteína de opacidad (tal como Opa), una proteína modificable por reducción (Rmp) y preparaciones de vesículas de la membrana externa (OMV) (véase Plante y col., J Infectious Disease (2000) 182:848 - 855), véanse también, por ejemplo, los documentos WO99/24578, WO99/36544, WO99/57280, WO02/079243).

45 *Chlamydia trachomatis*: los antígenos de *Chlamydia trachomatis* incluyen antígenos derivados de los serotipos A, B, Ba y C (agentes de tracoma, una causa de ceguera), serotipos L1, L2 y L3 (asociados a linfogranuloma venéreo) y serotipos, D-K. Los antígenos de *Chlamydia trachomatis* también pueden incluir un antígeno identificado en los documentos WO 00/37494, WO 03/049762, WO 03/068811 o WO 05/002619 que incluye PepA (CT045), LcrE (CT089), ArtJ (CT381), ADNK (CT396), CT398, similar a OmpH (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), AtoS (CT467), CT547, Eno (CT587), HrtA (CT823) y MurG (CT761).

50 *Treponema pallidum* (sífilis): los antígenos de la sífilis incluyen el antígeno TmpA.

Haemophilus ducreyi (que produce chancroide): los antígenos de *Ducreyi* incluyen proteína de membrana externa (DsrA).

Enterococcus faecalis o *Enterococcus faecium*: los antígenos incluyen una repetición de trisacáridos u otros antígenos derivados de *Enterococcus* proporcionados en la patente de EE.UU. nº 6.756.361.

Helicobacter pylori: los antígenos de *H. pylori* incluyen Cag, Vac, Nap, HopX, HopY y/o antígeno de ureasa.

5 *Staphylococcus saprophyticus*: los antígenos incluyen la hemaglutinina de 160 kDa del antígeno de *S. saprophyticus*.

Yersinia enterocolitica: los antígenos incluyen LPS (Infect Immun. 2002 August; 70(8): 4414).

E. coli: los antígenos de *E. coli* pueden derivarse de cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

10 *Bacillus anthracis* (ántrax): los antígenos de *B. anthracis* están opcionalmente desintoxicados y puede seleccionarse de componentes A (factor letal (LF) y factor de edema (EF)), ambos de los cuales pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (PA).

15 *Yersinia pestis* (plaga): los antígenos de plagas incluyen antígeno capsular F1 (Infect Immun. 2003 Jan; 71(1)): 374-383, LPS (Infect Immun. 1999 Oct; 67(10): 5395), antígeno V de *Yersinia pestis* (Infect Immun. 1997 Nov; 65(11): 4476-4482).

20 *Mycobacterium tuberculosis*: los antígenos de *Tuberculosis* incluyen lipoproteínas, LPS, antígenos BCG, una proteína de fusión de antígeno 85B (Ag85B) y/o ESAT-6 opcionalmente formulado en vesículas de lípido catiónico (Infect Immun. 2004 October; 72(10): 6148), antígenos asociados a isocitrato deshidrogenasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Aug 24; 101(34): 12652) y/o antígenos de MPT51 (Infect Immun. 2004 July; 72(7): 3829).

Rickettsia: los antígenos incluyen proteínas de membrana externa que incluyen la proteína de membrana externa A y/o B (OmpB) (Biochim Biophys Acta. 2004 Nov 1; 1702(2):145), LPS y antígeno de proteína de superficie (SPA) (J Autoimmun. 1989 Jun; 2 Suppl:81).

Listeria monocytogenes: los antígenos bacterianos pueden derivarse de *Listeria monocytogenes*.

25 *Chlamydia pneumoniae*: los antígenos incluyen aquellos identificados en el documento WO 02/02606.

Vibrio cholerae: los antígenos incluyen antígenos de proteínasa, LPS, particularmente lipopolisacáridos de *Vibrio cholerae* II, polisacáridos O-específicos O1 Inaba, *V. cholera* O139, antígenos de la vacuna IEM108 (Infect Immun. 2003 Oct;71(10):5498-504) y/o toxina de *Zonula occludens* (Zot).

30 *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea): los antígenos incluyen polisacáridos capsulares preferentemente conjugados (Vi, por ejemplo, vax-TyVi).

35 *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme): los antígenos incluyen lipoproteínas (tales como OspA, OspB, Osp C y Osp D), otras proteínas de superficie tales como proteínas relacionadas con OspE (Erps), proteínas de unión a decorina (tales como DbpA) y proteínas VI antigénicamente variables tales como antígenos asociados a P39 y P13 (una proteína de membrana integral, Infect Immun. 2001 May; 69(5): 3323-3334) y proteína de variación antigénica VlsE J Clin Microbiol. 1999 Dec; 37(12): 3997).

Porphyromonas gingivalis: los antígenos incluyen la proteína de membrana externa (OMP).

Klebsiella: los antígenos incluyen una OMP, que incluye OMP A, o un polisacárido opcionalmente conjugado con toxoide tetánico.

40 Otros antígenos bacterianos de la invención pueden ser antígenos capsulares, antígenos de polisacárido o antígenos de proteína de cualquiera de los anteriores. Otros antígenos bacterianos también pueden incluir una preparación de vesículas de la membrana externa (OMV). Adicionalmente, los antígenos incluyen versiones vivas, atenuadas y/o purificadas de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas. Los antígenos de la presente invención pueden derivarse de bacterias Gram-negativas o Gram-positivas. Los antígenos de la presente invención pueden derivarse de bacterias aerobias o anaerobias.

45 Adicionalmente, cualquiera de los sacáridos derivados de bacterianos anteriores (polisacáridos, LPS, LOS u oligosacáridos) puede conjugarse con otro agente o antígeno tal como una proteína portadora (por ejemplo, CRM197). Tal conjugación puede ser conjugación directa efectuada por la aminación reductora de restos carbonilo sobre los grupos sacárido con respecto a amino sobre la proteína, como se proporciona en la patente de EE.UU. nº 5.360.897 y Can J Biochem Cell Biol. 1984 May;62(5):270-5. Alternativamente, los sacáridos pueden conjugarse mediante un ligador tal como con succinamida u otros enlaces proporcionados en Bioconjugate Techniques, 1996 y
50 CRC, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, 1993.

B. Antígenos víricos

Antígenos víricos adecuados para uso en la invención incluyen virus inactivados (o destruidos), virus atenuados, formulaciones de virus fraccionados, formulaciones de subunidades purificadas, proteínas víricas que pueden aislarse, purificarse o derivarse de un virus, y partículas similares a virus (VLP). Los antígenos víricos pueden derivarse de virus propagados en cultivo celular u otro sustrato. Alternativamente, los antígenos víricos pueden expresarse recombinantemente. Los antígenos víricos incluyen preferentemente epítopes que se exponen sobre la superficie del virus durante al menos una fase de su ciclo vital. Los antígenos víricos se conservan preferentemente a través de múltiples serotipos o cepas aisladas. Los antígenos víricos incluyen antígenos derivados de uno o más de los virus expuestos a continuación, además de los ejemplos de antígenos específicos identificados a continuación.

Ortomixovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un ortomixovirus tal como la gripe A, B y C. Los antígenos de ortomixovirus pueden seleccionarse de una o más de las proteínas víricas que incluyen hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz (M1), proteína de membrana (M2), uno o más de los componentes de transcriptasa (PB1, PB2 y PA). Los antígenos preferidos incluyen HA y NA.

Los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas de gripe interpandémica (anuales). Alternativamente, los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas con la posibilidad de producir un brote pandémico (es decir, cepas de gripe con nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en cepas actualmente en circulación, o cepas de gripe que son patógenicas en sujetos aviáres y tienen la posibilidad de transmitirse horizontalmente en la población humana, o cepas de gripe que son patógenicas para seres humanos).

Virus Paramyxoviridae: los antígenos víricos pueden derivarse de virus *Paramyxoviridae* tales como pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV) y morbillivirus (sarampión).

Pneumovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un pneumovirus tal como el virus sincicial respiratorio (VSR), virus sincicial respiratorio bovino, virus de la neumonía de ratones y virus de la rinotraqueítis del pavo. Preferentemente, el pneumovirus es VSR. Los antígenos de pneumovirus pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas que incluyen las proteínas de superficie fusión (F), glucoproteína (G) y proteína hidrófoba pequeña (SH), proteínas de matriz M y M2, proteínas de nucleocápside N, P y L y proteínas no estructurales NS1 y NS2. Los antígenos de pneumovirus preferidos incluyen F, G y M. Véase, por ejemplo, J Gen Virol. 2004 Nov; 85(Pt 11):3229). Los antígenos de pneumovirus también pueden formularse en o derivarse de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus quiméricos VSR/PIV pueden comprender componentes de tanto VSR como PIV.

Paramixovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un paramixovirus tal como los tipos 1-4 del virus paragripal (PIV), paperas, virus de Sendai, virus simio 5, virus paragripal bovino y virus de la enfermedad de Newcastle. Preferentemente, el paramixovirus es PIV o paperas. Los antígenos de paramixovirus pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina-neuraminidasa (HN), proteínas de fusión F1 y F2, nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína grande (L) y proteína de matriz (M). Las proteínas de paramixovirus preferidas incluyen HN, F1 y F2. Los antígenos de paramixovirus también pueden formularse en o derivarse de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus quiméricos VSR/PIV pueden comprender componentes de tanto VSR como PIV. Las vacunas contra la paperas comercialmente disponibles incluyen virus de las paperas atenuado vivo en tanto una forma monovalente como en combinación con vacunas contra el sarampión y la rubeola (MMR).

Morbillivirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un morbillivirus tal como el sarampión. Los antígenos de morbillivirus pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina (H), glucoproteína (G), factor de fusión (F), proteína grande (L), nucleoproteína (NP), polimerasa fosfoproteína (P) y matriz (M). Las vacunas contra el sarampión comercialmente disponibles incluyen virus del sarampión atenuado vivo, normalmente en combinación con paperas y rubeola (MMR).

Picornavirus: los antígenos víricos pueden derivarse de picornavirus tales como enterovirus, rinovirus, heparnavirus, cardiovirus y aftovirus. Se prefieren antígenos derivados de enterovirus tales como virus de la poliomielitis.

Enterovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un enterovirus tal como los tipos 1, 2 ó 3 del virus de la poliomielitis, tipos 1 a 22 y 24 del virus Coxsackie A, tipos 1 a 6 del virus Coxsackie B, tipos 1 a 9, 11 a 27 y 29 a 34 de ecovirus (virus ECHO) y enterovirus 68 a 71. Preferentemente, el enterovirus es el virus de la poliomielitis. Los antígenos de enterovirus se seleccionan preferentemente de una o más de las siguientes proteínas de cápside VP1, VP2, VP3 y VP4. Las vacunas contra la poliomielitis comercialmente disponibles incluyen vacuna contra la poliomielitis inactivada (IPV) y vacuna oral contra el virus de la poliomielitis (OPV).

Heparnavirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un heparnavirus tal como virus de la hepatitis A (VHA). Las vacunas contra el VHA comercialmente disponibles incluyen vacuna contra el VHA inactivado.

Togavirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un togavirus tal como un rubivirus, un alfavirus o un arterivirus. Se prefieren antígenos derivados de rubivirus tales como el virus de la rubeola. Los antígenos de togavirus pueden seleccionarse de E1, E2, E3, C, NSP-1, NSPO-2, NSP-3 o NSP-4. Los antígenos de togavirus se seleccionan preferentemente de E1, E2 o E3. Las vacunas contra la rubeola comercialmente disponibles incluyen un virus

adaptado al frío vivo, normalmente en combinación con vacunas contra las paperas y el sarampión (MMR).

Flavivirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un flavivirus tal como la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), el dengue (tipos 1, 2, 3 ó 4), fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo occidental, encefalitis de San Luis, encefalitis rusa de primavera-verano, encefalitis de Powassan. Los antígenos de flavivirus pueden seleccionarse de PrM, M, C, E, NS-1, NS-2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. Los antígenos de flavivirus se seleccionan preferentemente de PrM, M y E. La vacuna contra la ETG comercialmente disponible incluye vacunas de virus inactivados.

Pestivirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un pestivirus tal como diarrea viral bovina (DVB), peste porcina clásica (PPC) o enfermedad de Border (BDV).

Hepadnavirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un hepadnavirus tal como virus de la hepatitis B. Los antígenos de hepadnavirus pueden seleccionarse de antígenos de superficie (L, M y S), antígenos de núcleo (HBc, HBe). Las vacunas contra el VHB comercialmente disponibles incluyen vacunas de subunidades que comprenden el antígeno de superficie proteína S.

Virus de la hepatitis C: los antígenos víricos pueden derivarse de un virus de la hepatitis C (VHC). Los antígenos del VHC pueden seleccionarse de uno o más de la poliproteína E1, E2, E1/E2, NS3/4, poliproteína del núcleo NS 3/4, núcleo y/o péptidos de las regiones no estructurales (Houghton y col., Hepatology (1991) 14:381).

Rabdovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un rabdovirus tal como un lyssavirus (virus de la rabia) y vesiculovirus (VSV). Los antígenos de rabdovirus pueden seleccionarse de glucoproteína (G), nucleoproteína (N), proteína grande (L), proteínas no estructurales (NS). Las vacunas contra el virus de la rabia comercialmente disponibles comprenden virus destruidos cultivados en células diploides humanas o células de pulmón de rhesus fetal.

Caliciviridae: los antígenos víricos pueden derivarse de Caliciviridae tales como virus Norwalk y virus similares a Norwalk tales como el virus de Hawai y el virus de las montañas nevadas.

Coronavirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un coronavirus, SARS, coronavirus respiratorio humano, bronquitis infecciosa aviar (BIA), virus de la hepatitis del ratón (VHR) y virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT). Los antígenos de coronavirus pueden seleccionarse de glicoproteína de la espícula (S), de la envuelta (E), de matriz (M), de nucleocápside (N) y de hemaglutinina-esterasa (HE). Preferentemente, el antígeno de coronavirus se deriva de un virus de SARS. Los antígenos víricos de SARS se describen en el documento WO 04/92360.

Retrovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un retrovirus tal como un oncovirus, un lentivirus o un espumavirus. Los antígenos de oncovirus pueden derivarse de HTLV-1, HTLV-2 o HTLV-5. Los antígenos de lentivirus pueden derivarse de VIH-1 o VIH-2. Los antígenos de retrovirus pueden seleccionarse de gag, pol, env, tax, tat, rex, rev, nef, vif, vpr y vpu. Los antígenos de VIH pueden seleccionarse de gag (p24 gag y p55 gag), env (gp160 y gp41), pol, tat, nef, rev vpu, miniproteínas, (preferentemente p55 gag y gp140v delete). Los antígenos de VIH pueden derivarse de una o más de las siguientes cepas: VIH11b, VIH5F2, VIH1AV, VIH1AI, VIH1MN, VIH-ICM235, VIH-1US4.

Reovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un reovirus tal como un ortoreovirus, un rotavirus, un orbivirus o un coltivirus. Los antígenos de reovirus pueden seleccionarse de proteínas estructurales λ 1, λ 2, λ 3, μ 1, μ 2, σ 1, σ 2, o σ 3, o proteínas no estructurales σ NS, μ NS o σ 1s. Los antígenos de reovirus preferidos pueden derivarse de un rotavirus. Los antígenos de rotavirus pueden seleccionarse de VP1, VP2, VP3, VP4 (o el producto escindido VP5 y VP8), NSP 1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4 o NSP5. Los antígenos de rotavirus preferidos incluyen VP4 (o el producto escindido VP5 y VP8) y VP7.

Parvovirus: los antígenos víricos pueden derivarse de un parvovirus tal como el parvovirus B19. Los antígenos de parvovirus pueden seleccionarse de VP-1, VP-2, VP-3, NS-1 y NS-2. Preferentemente, el antígeno de parvovirus es la proteína de la cápside VP-2.

Virus de la hepatitis delta (VHD): los antígenos víricos pueden derivarse de VHD, particularmente el antígeno δ del VHD (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.378.814).

Virus de la hepatitis E (VHE): los antígenos víricos pueden derivarse de VHE.

Virus de la hepatitis G (VHG): los antígenos víricos pueden derivarse de VHG.

Virus del herpes humano: los antígenos víricos pueden derivarse de un virus del herpes humano tal como el virus del herpes simple (VHS), virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), virus del herpes humano 6 (VHH6), virus del herpes humano 7 (VHH7) y virus del herpes humano 8 (VHH8). Los antígenos del virus del herpes humano pueden seleccionarse de proteínas inmediatas tempranas (α), proteínas tempranas (β) y proteínas tardías (γ). Los antígenos del VHS pueden derivarse de cepas de VHS-1 o VHS-2. Los antígenos del VHS pueden seleccionarse de glicoproteínas gB, gC, gD y gH, proteína de fusión (gB) o proteínas de inmunoescape

(gC, gE o gI). Los antígenos del VVZ pueden seleccionarse de proteínas de núcleo, de nucleocápside, del tegumento o de la envuelta. Una vacuna contra el VVZ atenuado vivo está comercialmente disponible. Los antígenos del VEB pueden seleccionarse de proteínas de antígeno temprano (EA), antígeno de la cápside viral (VCA) y glicoproteínas del antígeno de membrana (MA). Los antígenos de CMV pueden seleccionarse de proteínas de la

5

Papovavirus: los antígenos pueden derivarse de papovavirus tales como el virus del papiloma y el virus del polioma. Los virus del papiloma incluyen los serotipos de VPH 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 y 65. Preferentemente, los antígenos del VPH se derivan de los serotipos 6, 11, 16 ó 18. Los antígenos del VPH pueden seleccionarse de proteínas de la cápside (L1) y (L2), o E1 - E7, o fusiones de las mismas. Los

10

antígenos del VPH se formulan preferentemente en partículas similares a virus (VLP). Los virus del polioma incluyen virus BK y virus JK. Los antígenos del virus del polioma pueden seleccionarse de VP 1, VP2 o VP3.

Adicionalmente se proporcionan antígenos, composiciones, procedimientos y microbios incluidos en Vaccines, 4ª edición (Plotkin y Orenstein ed. 2004); Medical Microbiology 4ª edición (Murray y col. ed. 2002); Virology, 3ª edición (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2ª edición (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds. 1991), que se contemplan conjuntamente con las composiciones de la presente invención.

15

C. Antígenos fúngicos

Los antígenos fúngicos para uso en la invención pueden derivarse de uno o más de los hongos expuestos a continuación.

20

Los antígenos fúngicos pueden derivarse de dermatofitos, que incluyen: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypsum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. album, var. discoides, var. ochraceum, *Trichophyton violaceum* y/o *Trichophyton faviforme*

25

Los patógenos fúngicos pueden derivarse de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiospermum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigellii*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffeii*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Absidia* spp., *Mortierella* spp., *Cunninghamella* spp., *Saksenaea* spp.,

30

35

Alternaria spp., *Curvularia* spp., *Helminthosporium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Monolinia* spp., *Rhizoctonia* spp., *Paecilomyces* spp., *Pithomyces* spp. y *Cladosporium* spp.

Los procedimientos para producir un antígeno fúngico son muy conocidos en la técnica (véase la patente de EE.UU. nº 6.333.164). En un procedimiento preferido, una fracción solubilizada se extrae y se separa de una fracción insoluble que puede obtenerse a partir de células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular, caracterizado porque el procedimiento comprende las etapas de: obtener células fúngicas vivas; obtener células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular; romper las células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular; obtener una fracción insoluble; y extraer y separar una fracción solubilizada de la fracción insoluble.

40

45 D. Antígenos de ETS

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos derivados de una enfermedad de transmisión sexual (ETS). Tales antígenos pueden proporcionar profilaxis o terapia para ETS tales como clamidia, herpes genital, hepatitis (tal como VHC), condilomas acuminados, gonorrea, sífilis y/o chancroide (véase el documento WO00/15255). Los antígenos pueden derivarse de una o más ETS bacterianas o víricas. Los antígenos de ETS

50

55 E. Antígenos respiratorios

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos derivados de un patógeno que produce enfermedad respiratoria. Por ejemplo, antígenos respiratorios pueden derivarse de un virus respiratorio tal como

ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV), morbillivirus (sarampión), togavirus (rubeola), VVZ y coronavirus (SARS). Los antígenos respiratorios pueden derivarse de una bacteria que produce enfermedad respiratoria tal como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bacillus anthracis* y *Moraxella catarrhalis*. Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

F. Antígenos de vacunas pediátricas

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en sujetos pediátricos. Los sujetos pediátricos tienen normalmente menos de aproximadamente 3 años, o menos de aproximadamente 2 años, o menos de aproximadamente 1 año. Los antígenos pediátricos pueden administrarse múltiples veces durante el transcurso de 6 meses, 1, 2 ó 3 años. Los antígenos pediátricos pueden derivarse de un virus que puede elegirse como diana poblaciones pediátricas y/o un virus al que las poblaciones pediátricas son susceptibles de ser infectadas. Los antígenos víricos pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV y paperas), morbillivirus (sarampión), togavirus (rubeola), enterovirus (poliomielitis), VHB, coronavirus (SARS) y virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB). Los antígenos bacterianos pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Haemophilus influenzae B* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B) y *E. coli*. Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

G. Antígenos adecuados para uso en ancianos o individuos inmunodeprimidos

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en ancianos o individuos inmunodeprimidos. Tales individuos pueden necesitar ser vacunados más frecuentemente, con mayores dosis o con formulaciones complementarias para mejorar su respuesta inmunitaria a los antígenos elegidos como diana. Los antígenos que pueden elegirse como diana para uso en ancianos o individuos inmunodeprimidos incluyen antígenos derivados de uno o más de los siguientes patógenos: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Haemophilus influenzae B* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B), *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV y paperas), morbillivirus (sarampión), togavirus (Rubeola), enterovirus (polio), VHB, coronavirus (SARS), virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV). Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

H. Antígenos adecuados para uso en vacunas para adolescentes

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en sujetos adolescentes. Los adolescentes pueden estar en necesidad de un refuerzo de un antígeno pediátrico previamente administrado. Los antígenos pediátricos que pueden ser adecuados para uso en adolescentes se han descrito anteriormente. Además, los adolescentes pueden elegirse como diana para recibir antígenos derivados de un patógeno de ETS con el fin de garantizar inmunidad protectora o terapéutica antes del comienzo de la actividad sexual. Los antígenos de ETS que pueden ser adecuados para uso en adolescentes se han descrito anteriormente.

I. Formulaciones de antígeno

En otros aspectos de la invención se proporcionan procedimientos de producción de micropartículas que tienen antígenos adsorbidos. Los procedimientos comprenden: (a) proporcionar una emulsión dispersando una mezcla que comprende (i) agua, (ii) un detergente, (iii) un disolvente orgánico y (iv) un polímero biodegradable seleccionado del grupo que está constituido por un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, una policaprolactona, un polioortoéster, un polianhídrido y un policianoacrilato. El polímero está normalmente presente en la mezcla a una concentración de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 30 % con respecto al disolvente orgánico, mientras que el detergente está normalmente presente en la mezcla a una relación de detergente con respecto a polímero en peso/peso de aproximadamente 0,0001:1 a aproximadamente 0,1:1 (más normalmente aproximadamente 0,0001:1 a aproximadamente 0,1:1, aproximadamente 0,001:1 a aproximadamente 0,1:1, o aproximadamente 0,005:1 a aproximadamente 0,1:1); (b) eliminar el disolvente orgánico de la emulsión; y (c) adsorber un antígeno sobre la superficie de las micropartículas. En ciertas realizaciones, el polímero biodegradable está presente a una concentración de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 10 % con respecto al disolvente orgánico.

Las micropartículas para uso en este documento se formarán a partir de materiales que son esterilizables, no tóxicos y biodegradables. Tales materiales incluyen, sin limitación, poli(α -hidroxiácido), ácido polihidroxibutírico, policaprolactona, polioortoéster, polianhídrido, PACA y policianoacrilato. Preferentemente, las micropartículas para uso con la presente invención se derivan de un poli(α -hidroxiácido), en particular de una poli(láctida) ("PLA") o un copolímero de D,L-láctida y glicolida o ácido glicólico, tal como una poli(D,L-láctida-co-glicolida) ("PLG" o "PLGA"), o

un copolímero de D,L-lactida y caprolactona. Las micropartículas pueden derivarse de cualquiera de diversos materiales de partida poliméricos que tienen una variedad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros tales como PLG, una variedad de relaciones de lactida:glicolida cuya selección será ampliamente un asunto de elección que depende en parte de la macromolécula coadministrada. Estos parámetros se tratan más completamente más adelante.

Otros antígenos también pueden incluir una preparación de vesícula de membrana externa (OMV).

Procedimientos de formulación adicionales y antígenos (especialmente antígenos tumorales) se proporcionan en la patente de EE.UU. nº de serie 09/581772.

J. Referencias de antígenos

Las siguientes referencias incluyen antígenos útiles conjuntamente con las composiciones de la presente invención:

1. Solicitud de patente internacional WO99/24578
2. Solicitud de patente internacional WO99/36544.
3. Solicitud de patente internacional WO99/57280.
4. Solicitud de patente internacional WO00/22430.
5. Tettelin y col. (2000) *Science* 287:1809-1815.
6. Solicitud de patente internacional WO96/29412.
7. Pizza y col. (2000) *Science* 287:1816-1820.
8. Documento PCT WO01/52885.
9. Bjune y col. (1991) *Lancet* 338(8775).
10. Fuskasawa y col. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
11. Rosenqist y col. (1998) *Dev. Biol. Strand* 92:323-333.
12. Constantino y col. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
13. Constantino y col. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
14. Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
15. Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285,v.
16. Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
17. Solicitud de patente internacional presentada el 3 de junio de 2001 reivindicando prioridad del documento GB-0016363.4; documento WO02/02606; documento PCT IB/01/00166.
18. Kalman y col. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
19. Read y col. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
20. Shirai y col. (2000) *J. Infect. Dis* 181(Suppl 3):S524-S527.
21. Solicitud de patente internacional WO99/27105.
22. Solicitud de patente internacional WO00/27994.
23. Solicitud de patente internacional WO00/37494.
24. Solicitud de patente internacional WO99/28475.
25. Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
26. Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
27. Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
28. Hsu y col. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
29. Gastofsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
30. Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
31. *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
32. Del Giudice y col. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
33. Solicitud de patente internacional WO93/018150.
34. Solicitud de patente internacional WO99/53310.
35. Solicitud de patente internacional WO98/04702.
36. Ross y col. (2001) *Vaccine* 19:135-142.
37. Sutter y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
38. Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
39. Dreensen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
40. *MMWR Morb Mortal Wkly rep* 1998 Jan 16:47(1): 12, 9.
41. McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
42. Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
43. Solicitudes de patente de GB 0026333.5, 0028727.6 y 0105640.7.
44. Dale (1999) *Infect Disclin North Am* 13:227-43, viii.
45. Ferretti y col. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
46. Kuroda y col. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219.
47. Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
48. Lindberg (1999) *Vacuna* 17 Suppl 2:S28-36.
49. Buttery & Moxon (2000) *J R Coil Physicians Long* 34:163-168.
50. Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
51. Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:663-667.

52. Patente europea 0 477 508.
 53. Patente de EE.UU. nº 5.306.492.
 54. Solicitud de patente internacional WO98/42721.
 55. Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114.
 56. Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 012323368 y 012342335X.
 57. Solicitud de patente europea 0372501.
 58. Solicitud de patente europea 0378881.
 59. Solicitud de patente europea 0427347.
 60. Solicitud de patente internacional WO93/17712.
 61. Solicitud de patente internacional WO98/58668.
 62. Solicitud de patente europea 0471177.
 63. Solicitud de patente internacional WO00/56360.
 64. Solicitud de patente internacional WO00/67161.

Si se usa un antígeno de sacárido o de hidrato de carbono, está preferentemente conjugado con una proteína portadora con el fin de potenciar la inmunogenicidad. Véanse Ramsay y col. (2001) Lancet 357(9251):195-196; Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36; Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-168; Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii; Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567; patente europea 0 477 508; patente de EE.UU. 5,306,492; documento WO98/42721; Conjugate Vaccines (eds. Cruse y col.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114; Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 o 012342335X. Proteínas portadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos tales como toxoide de la difteria o tetánico. El toxoide diftérico CRM197 es particularmente preferido.

Otros polipéptidos portadores incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* (documento EP-A-0372501), péptidos sintéticos (documentos EP-A-0378881 y EP-A 0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO 93/17712 y WO 94/03208), proteínas de pertussis (documentos WO 98/58668 y EP A 0471177), proteína D de *H. influenzae* (documento WO 00/56360), citocinas (documento WO 91/01146), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, toxina A o B de *C. difficile* (documento WO 00/61761), proteínas de captación de hierro (documento WO 01/72337), etc. Si una mezcla comprende sacárido capsular de tanto los serogrupos A como C, puede preferirse que la relación (peso/peso) de sacárido MenA:sacárido MenC sea superior a 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior). Pueden conjugarse diferentes sacáridos con el mismo tipo de proteína portadora o tipo de proteína portadora diferente. Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier ligador adecuado si fuera necesario.

Los antígenos de proteínas tóxicas pueden desintoxicarse si es necesario, por ejemplo, desintoxicación de toxina de pertussis por medios químicos y/o genéticos.

Vehículos farmacéuticamente aceptables

Las composiciones de la invención comprenderán normalmente, además de los componentes anteriormente mencionados, uno o más "vehículos farmacéuticamente aceptables". Éstos incluyen cualquier vehículo que por sí mismo no induce la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Vehículos adecuados son normalmente macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas, tales como proteínas, polisacáridos, ácido poliláctico, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos (tal como gotitas de aceite o liposomas). Vehículos de este tipo son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Una composición también puede contener un diluyente, tal como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, puede estar presente una sustancia auxiliar, tal como un agente humectante o emulsionante, sustancia de tamponamiento del pH y similares. Una discusión meticulosa de componentes farmacéuticamente aceptables está disponible en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª ed., ISBN: 0683306472.

Agentes inmunorreguladores

Adyuvantes

Las vacunas de la invención pueden administrarse conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones incluirán normalmente un adyuvante. Los adyuvantes para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes expuestos más adelante:

A. Composiciones que contienen minerales

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

minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica (documento WO00/23105).

Las sales de aluminio pueden incluirse en vacunas de la invención de forma que la dosis de Al^{3+} esté entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

5 En una realización, el adyuvante basado en aluminio para su uso en la presente invención es alumbre (sulfato de aluminio y potasio ($AlK(SO_4)_2$)), o un derivado del alumbre tal como el formado *in situ* mezclando un antígeno en tampón fosfato con alumbre, seguido de valoración y precipitación con una base tal como hidróxido de amonio o hidróxido sódico.

10 Otro adyuvante basado en aluminio para su uso en formulaciones de vacuna de la presente invención es el adyuvante de hidróxido de aluminio ($Al(OH)_3$) u oxihidróxido de aluminio cristalino ($AlOOH$), que es un excelente adsorbente, que tiene un área superficial de aproximadamente 500 m^2/g . Alternativamente se proporciona el adyuvante de fosfato de aluminio ($AlPO_4$) o hidroxifosfato de aluminio que contienen grupos fosfato en lugar de alguno o todos los grupos hidroxilo del adyuvante de hidróxido de aluminio. Los adyuvantes de fosfato de aluminio preferidos proporcionados en este documento son amorfos y solubles en medios ácidos, básicos y neutros.

15 En otra realización, el adyuvante de la invención comprende tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio. En una realización más particular de la misma, el adyuvante tiene una mayor cantidad de fosfato de aluminio que el hidróxido de aluminio, tal como una relación de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o superior a 9:1 en peso de fosfato de aluminio con respecto a hidróxido de aluminio. Todavía más particular, las sales de aluminio en la vacuna están presentes a 0,4 a 1,0 mg por dosis de vacuna, o 0,4 a 0,8 mg por dosis de vacuna, o 0,5 a 0,7 mg por dosis de vacuna, o aproximadamente 0,6 mg por dosis de vacuna.

20 Generalmente, el (los) adyuvante(s) basado(s) en aluminio preferido(s), o relación de múltiples adyuvantes basados en aluminio tales como fosfato de aluminio con respecto a hidróxido de aluminio, se selecciona por la optimización de la atracción electrostática entre moléculas de forma que el antígeno lleve una carga opuesta a la del adyuvante al pH deseado. Por ejemplo, el adyuvante de fosfato de aluminio (punto isoelectrico = 4) se adsorbe a lisozima, pero no a albúmina a pH 7,4. Si la albúmina debiera ser la diana, se seleccionaría el adyuvante de hidróxido de aluminio (iep 11,4). Alternativamente, el pretratamiento de hidróxido de aluminio con fosfato reduce su punto isoelectrico, haciendo que sea un adyuvante preferido para antígenos más básicos.

B. Emulsiones de aceite

30 Las composiciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua tales como MF59 (5 % de escualeno, 0,5 % de TWEENTM 80, y 0,5 % de Span 85, formuladas en emulsiones de partículas submicrométricas usando un microfluidizador). Véase el documento WO90/14837. Véanse también Podda, Vaccine (2001) 19: 2673-2680; Frey y col., Vaccine (2003) 21:4234-4237. MF59 se usa como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente contra el virus de la gripe FLUADTM.

35 Adyuvantes particularmente preferidos para su uso en las composiciones son emulsiones de aceite en agua submicrométricas. Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas preferidas para su uso en este documento son emulsiones de escualeno/agua que opcionalmente contienen cantidades variables de MTP-PE tales como una emulsión de aceite en agua submicrométrica que contiene 4-5 % peso/volumen de escualeno, 0,25-1,0 % peso/volumen de TWEENTM 80 (poli(monooleato de oxiethylsorbitano)) y/o 0,25-1,0 % de SPAN 85TM (trioleato de sorbitano) y opcionalmente N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutaminilo-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), por ejemplo, la emulsión de aceite en agua submicrométrica conocida como
40 "MF59" (publicación internacional n° WO90/14837; patentes de EE.UU. n° 6.299.884 y 6.451.325, y Ott y col., en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. y Newman, M.J. eds.) Plenum Press, Nueva York, 1995, pág. 277-296). MF59 contiene 4-5 % peso/volumen de escualeno (por ejemplo 4,3 %), 0,25-0,5 % peso/volumen de TWEENTM 80 y 0,5 % peso/volumen de SPAN 85TM y opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE, formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador de modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA). Por ejemplo, MTP-PE puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0-500 $\mu g/dosis$, más preferentemente de 0-250 $\mu g/dosis$ y lo más preferentemente de 0-100 $\mu g/dosis$. Como se usa en este documento, el término "MF59-0" se refiere a la emulsión de aceite en agua submicrométrica anterior que carece de MTP-PE, mientras que el término MF59-MTP denota una formulación que contiene MTP-PE. Por ejemplo, "MF59-100" contiene 100 μg de MTP-PE por dosis, etc. MF69, otra emulsión de
45 aceite en agua submicrométrica para su uso en este documento, contiene 4,3 % peso/volumen de escualeno, 0,25 % peso/volumen de TWEENTM 80 y 0,75 % peso/volumen de SPAN 85TM y opcionalmente MTP-PE. Todavía otra emulsión de aceite en agua submicrométrica es MF75, también conocida como SAF, que contiene 10 % de escualeno, 0,4 % de TWEENTM 80, 5 % de polímero L121 bloqueado con Pluronic y thr-MDP, también microfluidizado en una emulsión submicrométrica. MF75-MTP denota una formulación de MF75 que incluye MTP, tal
50 como de 100-400 μg de MTP-PE por dosis.

Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas, los procedimientos de preparación de las mismas y los agentes inmunoestimulantes tales como muramilo péptidos para su uso en las composiciones se describen en detalle en el documento WO90/14837 y en las patentes de EE.UU. 6.299.884 y 6.451.325.

También puede usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) como adyuvantes en la invención.

C. Formulaciones de saponina

5 Las formulaciones de saponina también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia variedad de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado exhaustivamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas
10 tales como QS21, además de formulaciones de lípidos tales como ISCOM.

Las composiciones de saponina se han purificado usando cromatografía en capa fina de alta resolución (HP-TLC) y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC). Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la patente de EE.UU. 5.057.540. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol tal como colesterol (véase el documento WO96/33739).
15

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM). Los ISCOM normalmente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en los documentos EP0109942, WO96/11711 y WO96/33739. Opcionalmente, los ISCOM pueden carecer de detergente(s) adicional(es). Véase el documento 00/07621.
20

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponinas puede encontrarse en Barr y col., *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32:247-271. Véase también Sjolander y col., *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32:321-338.
25

D. Virosomas y partículas similares a virus (VLP)

Los virosomas y las partículas similares a virus (VLP) también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas víricos nativos. Las proteínas víricas pueden producirse recombinantemente o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como HA o NA), virus de la hepatitis B (tales como proteínas de núcleo o de cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la glosopeda, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Los VLP se tratan adicionalmente en los documentos WO03/024480, WO03/024481, y Niikura y col., *Virology* (2002) 293:273-280; Lenz y col., *Journal of Immunology* (2001) 5246-5355; Pinto y col., *Journal of Infectious Diseases* (2003) 188:327-338; y Gerber y col., *Journal of Virology* (2001) 75(10):4752-4760. Los virosomas se tratan adicionalmente en, por ejemplo, Gluck y col., *Vaccine* (2002) 20:B10-B16. Los virosomas de la gripe reconstituidos potenciadores de la inmunidad (IRIV) se usan como sistema de administración de antígeno de subunidad en el producto trivalente intranasal INFLEXAL™ {Mischler & Metcalfe (2002) *Vaccine* 20 Suppl 5:B17-23} y el producto INFLUVAC PLUS™.
30
35
40

E. Derivados bacterianos o microbianos

Adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como:

(1) Derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS)
45 Tales derivados incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se desvela en el documento EP 0 689 454. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son demasiado pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros (véase el documento EP 0 689 454). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A tales como derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, por ejemplo, RC-529. Véase Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
50

(2) Derivados del lípido A
Los derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en Meraldi y col., *Vaccine* (2003) 21:2485-2491; y Pajak y col., *Vaccine* (2003) 21:836-842.
55

(3) Oligonucleótidos inmunoestimulantes
Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una

citosa sin metilar seguida de guanosa y ligada por un enlace fosfato a una guanosa). También se ha mostrado que los ARN bicatenarios bacterianos u oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) son inmunoestimulantes.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Opcionalmente, la guanosa puede sustituirse con un análogo tal como 2'-desoxi-7-deazaguanosa. Véanse Kandimalla y col., *Nucleic Acids Research* (2003) 31(9): 2393-2400; documentos WO02/26757 y WO99/62923 para ejemplos de posibles sustituciones de análogos. El efecto del adyuvante de los oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente en Krieg, *Nature Medicine* (2003) 9(7): 831-835; McCluskie y col., *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2002) 32:179-185; documento WO98/40100; patente de EE.UU. nº 6.207.646; patente de EE.UU. nº 6.239.116 y patente de EE.UU. nº 6.429.199.

La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT. Véase Kandimalla y col., *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3): 654-658. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1 tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B tal como ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se tratan en Blackwell y col., *J. Immunol.* (2003) 170(8):4061-4068; Krieg, *TRENDS in Immunology* (2002) 23(2): 64-65 y el documento WO01/95935. Preferentemente, CpG es CpG-A ODN.

Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento de receptores. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos de CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, Kandimalla y col., *BBRC* (2003) 306:948-953; Kandimalla y col., *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3):664-658; Bhagat y col., *BBRC* (2003) 300:853-861, y el documento WO03/035836.

(4) Toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas

Las toxinas ribosilantes de ADP bacterianas y los derivados desintoxicados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en el documento WO95/17211 y como adyuvantes parenterales en el documento WO98/42375. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-192G. El uso de toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las siguientes referencias: Beignon y col., *Infection and Immunity* (2002) 70(6):3012-3019; Pizza y col., *Vaccine* (2001) 19:2534-2541; Pizza y col., *Int. J. Med. Microbiol* (2000) 290(4-5):455-461; Scharton-Kersten y col., *Infection and Immunity* (2000) 68(9):5306-5313; Ryan y col., *Infection and Immunity* (1999) 67(12):6270-6280; Partidos y col., *Immunol. Lett.* (1999) 67(3):209-216; Peppoloni y col., *Vaccines* (2003) 2(2):285-293; y Pine y col., (2002) *J. Control Release* (2002) 85(1-3):263-270. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ribosilantes de ADP expuestas en Domenighini y col., *Mol. Microbiol* (1995) 15(6):1165-1167.

F. Bioadhesivos y mucoadhesivos

También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas (Singh y col. (2001) *J. Cont. Rele.* 70:267-276) o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención. Véase el documento WO99/27960.

G. Micropartículas

Las micropartículas también pueden usarse como adyuvantes en la invención. Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente ~200 nm a ~30 µm de diámetro, y lo más preferentemente ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para tener una superficie negativamente cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo, con un detergente catiónico tal como CTAB).

H. Liposomas

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en la patente de EE.UU. nº 6.090.406, en la patente de EE.UU. nº 5.916.588 y en el documento EP 0 626 169.

I. Formulaciones de polioxietilénéters y polioxietilénésteres

Adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen polioxietilénéters y polioxietilénésteres. Documento WO99/52549. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitano en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207), además de tensioactivos de polioxietilnalquiléter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO01/21152).

Los polioxietiléteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

J. Polifosfaceno (PCPP)

- 5 Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en Andrianov y col., "Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions", *Biomaterials* (1998) 19(1-3):109-115 y Payne y col., "Protein Release from Polyphosphazene Matrices", *Adv. Drug. Delivery Review* (1998) 31(3):185-196.

K. Muramilpéptidos

- 10 Ejemplos de muramilpéptidos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-1-alanil-d-isoglutaminil-1-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

L. Compuestos de imidazoquinolina

- 15 Ejemplos de compuestos de imidazoquinolina adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen imiquimod y sus análogos descritos adicionalmente en Stanley, *Clin Exp Dermatol* (2002) 27(7):571-577; Jones, *Curr Opin Investig Drugs* (2003) 4(2):214-218; y las patentes de EE.UU. 4.689.338, 5.389.640, 5.268.376, 4.929.624, 5.266.575, 5.352.784, 5.494.916, 5.482.936, 5.346.905, 5.395.937, 5.238.944, y 5.525.612.

M. Compuestos tiosemicarbazona

- 20 Ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, además de procedimientos de formulación, preparación y cribado para los compuestos, todos adecuados para uso como adyuvantes en la invención, incluyen aquellos descritos en el documento WO04/60308. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas tales como TNF- α .

N. Compuestos de triptantrina

- 25 Ejemplos de compuestos de triptantrina, además de procedimientos de formulación, preparación y cribado para los compuestos, todos adecuados para uso como adyuvantes en la invención, incluyen aquellos descritos en el documento WO04/64759. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas tales como TNF- α .

La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvante pueden usarse en la invención:

- (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (documento WO99/11241);
- 30 (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) (véase el documento 94/00153);
- (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol;
- (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) (documento WO98/57659);
- 35 (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (véanse las solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231);
- (6) SAF, que contiene el 10 % de escualano, el 0,4 % de Tween 80, el 5 % polímero de bloque de Pluronic L121 y thr-MDP, tanto microfluidizada en una emulsión submicrométrica como agitada con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula.
- 40 (7) sistema de adyuvante RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene el 2 % de escualano, el 0,2 % de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DETOX™); y
- 45 (8) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un derivado de LPS no tóxico (tal como 3dPML).
- (9) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulante (tal como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo de CpG).

O. Inmunomoduladores humanos

Los inmunomoduladores humanos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

5 Las sales de aluminio y MF59 son adyuvantes preferidos para su uso con vacunas contra la gripe inyectables. Las toxinas bacterianas y los bioadhesivos son adyuvantes preferidos para su uso con vacunas administradas a la mucosa tales como vacunas nasales.

Procedimientos terapéuticos

10 La invención proporciona las composiciones descritas anteriormente para su uso en terapia. La invención proporciona las composiciones descritas anteriormente para inducir o aumentar una respuesta inmunitaria a *S. pyogenes*. La invención proporciona procedimientos para inducir o aumentar una respuesta inmunitaria a *S. pyogenes* usando las composiciones descritas anteriormente. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y puede incluir anticuerpos y/o inmunidad mediada por célula (incluyendo inmunidad sistémica y mucosa). Respuestas inmunitarias incluyen respuestas de refuerzo.

15 Los adolescentes y niños, que incluyen niños pequeños y bebés, pueden recibir una vacuna para uso profiláctico; las vacunas terapéuticas normalmente se administran a adolescentes o adultos. Una vacuna prevista para niños también puede administrarse a adultos, por ejemplo, para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

20 Las enfermedades producidas por *Streptococcus pyogenes* que pueden prevenirse o tratarse según la invención incluyen, pero no se limitan a, faringitis (tal como dolor de garganta estreptocócico), fiebre escarlata, impétigo, erisipelas, celulitis, septicemia, síndrome de choque tóxico, fascitis necrotizante y secuelas tales como fiebre reumática y glomerulonefritis aguda. Las composiciones también pueden ser eficaces contra otras bacterias estreptocócicas, por ejemplo, GBS.

Pruebas para determinar la eficacia de la respuesta inmunitaria

25 Una forma de evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar la infección por GAS después de la administración de la composición de la invención. Una forma de evaluar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar respuestas inmunitarias contra las proteínas SLO mutantes en las composiciones de la invención después de la administración de la composición.

30 Otra forma de evaluar la inmunogenicidad de las proteínas componentes de las composiciones inmunogénicas de la presente invención es expresar proteínas SLO mutantes recombinantemente y cribar sueros de paciente o secreciones mucosas por inmunotransferencia. Una reacción positiva entre la proteína y el suero del paciente indica que el paciente ha organizado previamente una respuesta inmunitaria a la proteína en cuestión; es decir, la proteína es un inmunogén. Este procedimiento también puede usarse para identificar proteínas inmunodominantes y/o epítopes.

35 Otra forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica monitorizar infección por GAS después de la administración de las composiciones de la invención. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica monitorizar respuestas inmunitarias tanto sistémicamente (tal como monitorizar el nivel de la producción de IgG1 y IgG2a) como mucosamente (tal como monitorizar el nivel de producción de IgA) contra SLO después de la administración de la composición. Normalmente, las respuestas de anticuerpos específicos para suero se determinan después de la inmunización, pero antes de la exposición, mientras que las respuestas corporales de anticuerpos específicos para mucosa se determinan después de la inmunización y después de la exposición.

40 La composiciones de vacuna de la presente invención pueden evaluarse en modelos animales *in vitro* e *in vivo* antes de la administración al huésped, por ejemplo, ser humano. Modelos de ratón particularmente útiles incluyen aquellos en los que la inmunización intraperitoneal va seguida de tanto exposición intraperitoneal como exposición intranasal.

45 La eficacia de las composiciones inmunogénicas de la invención también puede determinarse *in vivo* inmunizando modelos animales (por ejemplo, cobayas o ratones) con las composiciones inmunogénicas y determinando el nivel de protección obtenida después de la exposición a GAS.

Los modelos de eficacia *in vivo* incluyen, pero no se limitan a: (i) un modelo de infección murina usando serotipos de GAS humanos; (ii) un modelo de enfermedad murina que es un modelo murino usando una cepa de GAS adaptada a ratón tal como la cepa M23 que es particularmente virulenta en ratones, y (iii) un modelo de primate usando cepas aisladas de GAS humanas.

50 La respuesta inmunitaria puede ser una o ambas de una respuesta inmunitaria TH1 y una respuesta TH2. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria mejorada o una potenciada o una alterada. La respuesta inmunitaria puede ser una o ambas de una respuesta inmunitaria sistémica y mucosa. Preferentemente, la respuesta inmunitaria es una respuesta al sistema y/o mucosa potenciada.

Una inmunidad sistémica y/o mucosa potenciada se refleja en una respuesta inmunitaria TH1 y/o TH2 potenciada. Preferentemente, la respuesta inmunitaria potenciada incluye un aumento en la producción de IgG1 y/o IgG2a y/o IgA.

5 Preferentemente, la respuesta inmunitaria a mucosa es una respuesta inmunitaria TH2. Preferentemente, la respuesta inmunitaria a mucosa incluye un aumento en la producción de IgA.

Las células TH2 activadas potencian la producción de anticuerpos y, por tanto, son de valor en responder a infecciones extracelulares. Las células TH2 activadas pueden secretar una o más de IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10. Una respuesta inmunitaria TH2 puede producir la producción de IgG1, IgE, IgA y linfocitos B de memoria para la futura protección.

10 Una respuesta inmunitaria TH2 puede incluir uno o más de un aumento en una o más de las citocinas asociadas a una respuesta inmunitaria TH2 (tal como IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10), o un aumento en la producción de IgG1, IgE, IgA y linfocitos B de memoria. Preferentemente, la respuesta inmunitaria TH2 potenciada incluirá un aumento en la producción de IgG1.

15 Una respuesta inmunitaria TH1 puede incluir uno o más de un aumento en CTL, un aumento en una o más de las citocinas asociadas a una respuesta inmunitaria TH1 (tal como IL-2, IFN γ y TNF- β), un aumento en macrófagos activados, un aumento en la actividad de NK o un aumento en la producción de IgG2a. Preferentemente, la respuesta inmunitaria TH1 potenciada incluirá un aumento en la producción de IgG2a.

20 Las composiciones inmunogénicas de la invención, en particular las composiciones inmunogénicas que comprenden una o más proteínas SLO mutantes de la presente invención, puede usarse tanto solas como en combinación con otros antígenos de GAS, opcionalmente con un agente inmunorregulador que puede provocar una respuesta Th1 y/o Th2.

25 La invención también comprende una composición inmunogénica que comprende uno o más agentes inmunorreguladores tales como una sal mineral, tal como una sal de aluminio, y un oligonucleótido que contiene un motivo CpG. Lo más preferentemente, la composición inmunogénica incluye tanto una sal de aluminio como un oligonucleótido que contiene un motivo CpG. Alternativamente, la composición inmunogénica incluye una toxina ribosilante de ADP tal como una toxina ribosilante de ADP desintoxicada y un oligonucleótido que contiene un motivo CpG. Preferentemente, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluye un adyuvante. El adyuvante puede seleccionarse de uno o más del grupo que consiste en un adyuvante de TH1 y adyuvante de TH2.

30 Las composiciones de la invención provocarán preferentemente tanto una respuesta inmunitaria mediada por célula, además de una respuesta inmunitaria humoral, con el fin de tratar eficazmente una infección por GAS. Esta respuesta inmunitaria inducirá preferentemente anticuerpos de acción prolongada (por ejemplo, neutralizantes) y una inmunidad mediada por célula que puede responder rápidamente tras la exposición a uno o más antígenos de GAS.

35 En una realización particularmente preferida, la composición inmunogénica comprende una o más proteínas SLO mutantes que provocan una respuesta de anticuerpo neutralizante y una o más proteínas SLO mutantes que provocan una respuesta inmunitaria mediada por célula. De esta forma, la respuesta del anticuerpo neutralizante previene o inhibe una infección por GAS inicial mientras que la respuesta inmunitaria mediada por célula que puede provocar una respuesta celular Th1 potenciada previene adicionalmente la propagación de la infección por GAS.

40 Las composiciones de la invención por lo general se administrarán directamente al paciente. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse tanto solas como como parte de una composición, por una variedad de vías diferentes. Ciertas vías pueden ser favorecidas para ciertas composiciones, ya que producen la generación de una respuesta inmunitaria más eficaz, preferentemente una respuesta CMI, o ya que es menos probable que induzcan efectos secundarios, o ya que son más fáciles para administración.

45 Los procedimientos de administración incluyen inyección parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o intersticial) y rectal, oral (por ejemplo, comprimido, espray), vaginal, tópica, transdérmica (por ejemplo, véase el documento WO 99/27961), transcutánea (por ejemplo, véanse los documentos WO02/074244 y WO02/064162), intranasal (por ejemplo, véase el documento WO03/028760), ocular, aural y pulmonar, u otra administración a mucosa.

50 A modo de ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden administrarse por una vía sistémica o una vía mucosa o una vía transdérmica o pueden administrarse directamente a un tejido específico. Como se usa en el presente documento, el término "administración sistémica" incluye, pero no se limita a, cualquier vía parenteral de administración. En particular, la administración parenteral incluye, pero no se limita a, inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramuscular o intraesternal, técnicas de infusión intravenosa, intraarterial o dialítica al riñón. Preferentemente, la administración parenteral sistémica es inyección intramuscular. Como se usa en el presente documento, el término "administración a mucosa" incluye, pero no se limita a oral, administración intranasal, intravaginal, intrarrectal, intratraqueal, intestinal y oftálmica.

55

El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis. Las múltiples dosis pueden usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de múltiples dosis, las diversas dosis pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes, por ejemplo, una sensibilización parenteral y refuerzo a mucosa, una sensibilización de mucosa y refuerzo parenteral, etc.

Las composiciones de la invención pueden prepararse de diversas formas. Por ejemplo, una composición puede prepararse como un inyectable, tanto como una disolución líquida como una suspensión. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de inyección (por ejemplo, una composición liofilizada). Una composición puede prepararse para administración por vía oral, tal como un comprimido o cápsula, como un spray, o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). Una composición puede prepararse para administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un spray. Una composición puede prepararse como un supositorio o pesario. Una composición puede prepararse para administración nasal, aural u ocular, por ejemplo, como gotas. Una composición puede estar en forma de kit, diseñado de forma que una composición combinada se reconstituya justo antes de la administración a un paciente. Tales kits pueden comprender una o más SLO mutantes u otros antígenos en forma líquida y uno o más antígenos liofilizados.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de SLO mutante u otros antígenos (o moléculas de ácidos nucleicos que codifican los antígenos), además de cualquier otro componente, según se necesite, tal como antibióticos. Una "cantidad inmunológicamente eficaz" es una cantidad que, cuando se administra a un individuo, tanto en una dosis única como como parte de una serie, aumenta una respuesta inmunitaria medible o previene o reduce un síntoma clínico.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden administrarse en combinación con una pauta de tratamiento con antibióticos. En una realización, el antibiótico se administra antes de la administración del antígeno de la invención o la composición que comprende la una o más proteínas SLO mutantes de la invención.

En otra realización, el antibiótico se administra posterior a la administración de una proteína SLO mutante de la invención. Ejemplos de antibióticos adecuados para su uso en el tratamiento de una infección por GAS incluyen, pero no se limitan a, penicilina o un derivado de la misma o clindamicina, cefalosporinas, glucopéptidos (por ejemplo, vancomicina), y cicloserina.

Sin embargo, la cantidad de agente activo en una composición varía dependiendo de la salud y la condición física del individuo que va a tratarse, de la edad, del grupo taxonómico del individuo que va a tratarse (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseada, de la formulación de la vacuna, de la evaluación del médico práctico de la situación médica y de otros factores relevantes. La cantidad se encontrará en un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse por ensayos rutinarios.

Kits

En el presente documento también se desvelan kits que comprenden uno o más recipientes de composiciones de la invención. Las composiciones pueden estar en forma líquida o pueden liofilizarse, como pueden los antígenos individuales. Recipientes adecuados para las composiciones incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales, que incluyen vidrio o plástico. Un recipiente puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por un agujero de inyección hipodérmica).

El kit puede comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer o disolución de dextrosa. También puede contener otros materiales útiles para el usuario final que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas. El kit también puede comprender un segundo o tercer recipiente con otro agente activo, por ejemplo, un antibiótico.

El kit también puede comprender un prospecto que contiene instrucciones escritas para procedimientos de inducir inmunidad contra *S. pyogenes* o para tratar infecciones por *S. pyogenes*. El prospecto puede ser un prospecto en borrador sin aprobar o puede ser un prospecto aprobado por la Agencia estadounidense del medicamento (FDA) u otro cuerpo regulador.

La divulgación anterior describe generalmente la presente invención. Puede obtenerse un entendimiento más completo por referencia a los siguientes ejemplos específicos, que sólo se proporcionan para los fines de ilustración y que no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Clonación de proteínas SLO naturales y mutantes

ES 2 391 695 T3

Los genes que codifican proteínas SLO naturales y mutantes se amplificaron por PCR usando los cebadores del genoma SF370 mostrado en la Tabla 1.

5 Los productos de PCR se digirieron con *NheI-XhoI* y se ligaron con el vector pet24b+ (Novagen) cortado con las mismas enzimas. Células electrocompetentes de DH5 α de *E. coli* se transformaron con las reacciones de ligación. Se añadió medio LBPTK y, después de incubación durante 1 h a 37 °C, con agitación a 250 rpm, se sembraron bacterias sobre placas LBPTK que contenían 50 μ g/ml de kanamicina. Las colonias positivas se identificaron por PCR de colonias.

10 Los plásmidos de colonias positivas se prepararon a partir de un cultivo durante la noche en medio LBPTK que contenía 50 μ g/ml de kanamicina y se analizaron por secuenciación de ADN, que confirmó el gen inserto esperado bajo el promotor de la T7 polimerasa. Las secuencias de ADN y proteína finales de los genes clonados se muestran en la lista de secuencias. Véase la Tabla 2.

Tabla 1.

gen	cebadores
SLO natural sin marca	25F <i>NheI</i> , GTGCGT <u>GCTAGCG</u> AATCGAACAAACAAAACACTGC (SEC ID N°: 34) 25rev = G _c ATTTCGATC <u>CCTCGAG</u> CTACTTATAAGTAATCGAACCATATG (SEC ID N°: 35)
SLO P427L sin marca	Cebadores externos: 25F <i>NheI</i> , GTGCGT <u>GCTAGCG</u> AATCGAACAAACAAAACACTGC (SEC ID N°: 34) 25rev, GCATTTCGATC <u>CCTCGAG</u> CTACTTATAAGTAATCGAACCATATG (SEC ID N°: 35) Cebadores internos: PL427_for, GCTACCTTCAGTAGAAAAACCTAGCTTATCCTATTTTCATACACC (SEC ID N°: 36) PL427_rev, GGTGTATGAAATAGGATAAGCTAGGTTTTTCTACTGAAGGTAGC (SEC ID N°: 37)
SLO natural marcada con His	25F <i>NheI</i> , GTGCGT <u>GCTAGCG</u> AATCGAACAAACAAAACACTGC (SEC ID N°: 34) 25revhis, GCATTTCGATC <u>CCTCGAG</u> CTTATAAGTAATCGAACCATATGGG (SEC ID N°: 38)
SLO W535F marcada con His	Cebadores externos: 25F <i>NheI</i> , GTGCGT <u>GCTAGCG</u> AATCGAACAAACAAAACACTGC (SEC ID N°: 34) 25revhis, GCATTTCGATC <u>CCTCGAG</u> CTTATAAGTAATCGAACCATATGGG (SEC ID N°: 38) Cebadores internos: WF535_for, GAGTGCACTGGCTTAGCTTTTGAATGGTGGCGAAAAGTGATC (SEC ID N°: 39) WF535_rev, GATCACTTTTCGCCACCATTTCGAAAGCTAAGCCAGTGCACTC (SEC ID N°: 40)
SLO D482N con His W535F-marcada	Cebadores externos: 25F <i>NheI</i> , GTGCGT <u>GCTAGCG</u> AATCGAACAAACAAAACACTGC (SEC ID N°: 34) 25revhis, GCATTTCGATC <u>CCTCGAG</u> CTTATAAGTAATCGAACCATATGGG (SEC ID N°: 38) Cebadores internos: WF535_for, GAGTGCACTGGCTTAGCTTTTGAATGGTGGCGAAAAGTGATC (SEC ID N°: 39) WF535_rev, GATCACTTTTCGCCACCATTTCGAAAGCTAAGCCAGTGCACTC (SEC ID N°: 40) y

ES 2 391 695 T3

(continuación)

gen	cebadores
	DN482_for, GTTGCTCAATATGAAATCCTTTGGAATGAAATCAATTATGATGACAAAGGAAAAG (SEC ID N°: 41) DN482_rev, CTTTTCC'PTTGTCATCATAATTGATTTTCATTCAAAGGATTTTCATATTGAGCAAC (SEC ID N°: 42)
SLO C530G marcada con His	Cebadores externos: 25F Nhel, GTGCGT <u>GCTAGCGAATCGAACAAACAAAACACTGC</u> (SEC ID N°: 34) 25revhis, GCATTCGATCCTCGAGCTTATAAGTAATCGAACCATATGGG (SEC ID N°: 38) Cebadores internos: CG530_for, CCGTATCATGGCTAGAGAGGGCACTGGCTTAGCTTGGGAATG (SEC ID N°: 43) CG530_rev, CATTCCAAGCTAAGCCAGTGCCCTCTCTAGCCATGATACGG (SEC ID N°: 44)
SLO P427L marcada con His	Cebadores externos: 25F Nhel, GTGCGT <u>GCTAGCGAATCGAACAAACAAAACACTGC</u> (SEC ID N°: 34) 25 revhis, GCATTCGATCCTCGAGCTTATAAGTAATCGAACCATATGGG (SEC ID N°: 38) Cebadores internos: PL427_for, GCTACCTTCAGTAGAAAAACCTAGCTTATCCTATTTTCATACACC (SEC ID N°: 36) PL427_rev, GGTGTATGAAATAGGATAAGCTAGGTTTTTTCTACTGAAGGTAGC (SEC ID N°: 37)
SLO P427L- W535F-CS35G sin marca	Cebadores externos: 25_F, GTGCGT <u>GCTAGCGAATCGAACAAACAAAAC</u> (SEC ID N°: 45) 25_stopR, GCGT <u>CTCGAGTCACTTATAAGTAATCGAACCATATA</u> (SEC ID N°: 46) Cebadores internos: W-C_for, CCGTATCATGGCTAGAGAGGGCACTGGCTTAGCTTTTTCGAATG (SEC ID N°: 47) W-C_rev, CATTGAAAGCTAAGCCAGTGCCCTCTCTAGCCATGATACGG (SEC ID N°: 48)
SLO P427L- W535F sin marca	Cebadores externos: 25_F, GTGCGT <u>GCTAGCGAATCGAACAAACAAAAC</u> (SEC ID N°: 45) 25_stopR, GCGT <u>CTCGAGTCACTTATAAGTAATCGAACCATATA</u> (SEC ID N°: 46) Cebadores internos: WF535_for, GAGTGCACTGGCTTAGCTTTTTCGAATGGTGGCGAAAAGTGATC (SEC ID N°: 39) WF535_rev, GATCACTTTTCGCCACCATTGAAAGCTAAGCCAGTGCACTC (SEC ID N°: 40)

ES 2 391 695 T3

(continuación)

gen	cebadores
SLO P427L-C530G sin marca	<p>Cebadores externos:</p> <p>25_F, GTGCGT<u>GCTAGC</u>GGAATCGAACAAACAAAAC (SEC ID N°: 45)</p> <p>25_stopR, GCGT<u>CTCGAG</u>TCACTTATAAGTAATCGAACCATATA (SEC ID N°: 46)</p> <p>Cebadores internos:</p> <p>CG530_for, CCGTATCATGGCTAGAGAGGGCACTGGCTTAGCTTGGGAATG (SEC ID N°: 43)</p> <p>CG530_rev, CATTCCCAAGCTAAGCCAGTGCCCTCTCTAGCCATGATACGG (SEC ID N°: 44)</p>
SLO Δ 248 marcada con His	<p>Cebadores externos:</p> <p>25F NheI, GTGCGT<u>GCTAGC</u>GGAATCGAACAAACAAAACACTGC (SEC ID N°: 34)</p> <p>25 revhis, GCATTGATC<u>CTCGAG</u>CTTATAAGTAATCGAACCATATGGG (SEC ID N°: 38)</p> <p>Cebadores internos:</p> <p>Δ248for, CTGGTGGTAATACGCTTCCTAGAACACAATATACTGAATCAATGG (SEC ID N°: 49)</p> <p>Δ248rev, CCATTGATTGATATATTGTGTTCTAGGAAGCGTATTACCACCAG (SEC ID N°: 50)</p>

Tabla 2.

Gen SLO	identificador de secuencia			
	aminoácido		nucleótido	
	sin marca	marcado con His	sin marca	marcado con His
natural	1-12	13		14
P427L	20	15	28	56
C530G	22	16		57
W535F	21	18		51
Δ 248	23	17		58
W535F + D482N	24	19		52
P427L + C530G	26	53	32	
P427L + W535F	25	54	31	
P427L + C530G + W535F	27	55	33	

5 Células competentes BL21(DE3) de *E. coli* (Novagen) se transformaron con la construcción correcta. Se añadió medio LBPTK y, después de la incubación durante 1 h a 37 °C, con agitación a 250 rpm, se sembraron bacterias sobre placas LBPTK que contenían 50 µg/ml de kanamicina. Células BL21(DE3) pet24b+ SLO natural sin marca se cultivaron a 25 °C y se indujeron con IPTG 1 mM. La expresión del clon se verificó por SDS-PAGE (sin marca, **FIGS. 8A y 8B**; marcadas con His, **FIG. 9**).

Ejemplo 2

Purificación de proteínas marcadas con His

Se suspendieron sedimentos de *E. coli* en tampón de lisis y se mezclaron durante 30-40 minutos a temperatura ambiente. Los lisados se centrifugaron a 30-40000 x g durante 20-25 minutos y los sobrenadantes se cargaron sobre columnas equilibradas con tampón de lavado A (Poli-Prep con 1 ml de resina Chelating Sepharose Fast Flow activada con Ni). La resina cargada se lavó tres veces con tampón de lavado A y tres veces con tampón de lavado B. Las proteínas se eluyeron con tampón de elución en tubos Eppendorf que contenían 2 mM final de DTT. Las proteínas de elución totales se cuantifican con reactivo de Bradford y luego se analizaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (**FIGS. 8 y 9**).

10 *Tampones*

Tampón de lisis:

10 ml de B-PER™ (reactivo de extracción de proteínas bacterianas, cat. Pierce 78266)
 concentración final de MgCl₂ de 0,1 mM
 ADNsa I (cat. Sigma D-4263) 100 unidades
 15 lisozima (cat. Sigma L-7651) concentración final de 1 mg/ml
tampón de lavado A: NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0
tampón de lavado B: imidazol 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0
tampón de elución: imidazol 250 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0

Ejemplo 3

20 *Purificación de proteínas sin marca*

Preparación de lisados

Aproximadamente 80-110 g de sedimento de cultivo de bacteriano se suspendieron en 200-280 ml de reactivo B-PER™ (Pierce) complementado con 6 comprimidos de inhibidor de proteasa COMPLETE®, 10 ml de EDTA 0,2 M a pH 7,5 (concentración final 5 mM), 10 ml de una disolución de 100 mg/ml de lisozima, 8 ml de una disolución de 10000 K unidades/ml de ADNsa I y 1 ml de disolución MgCl₂ 50 mM. La lisis bacteriana se logró agitando la suspensión bacteriana durante 60 minutos hasta que se obtuvo una suspensión homogénea.

Tras la centrifugación durante 60 minutos a 13000 rpm (25400 x g), el sobrenadante se filtró usando un filtro de 0,22 µm y se diluyó con H₂O hasta que se obtuvo una conductividad de 1,8-1,9 mS. El pH se ajustó a 8,0. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

30 *Cromatografía de intercambio aniónico*

El sobrenadante derivado del lisado tratado como se ha descrito anteriormente se cargó sobre una columna HP 50/10 Q Sepharose (-200 ml), previamente equilibrada con TRIS 30 mM, pH 8,0. Se recogió el flujo continuo. Las fracciones que contenían una proteína GAS25 se reunieron y se dializaron contra fosfato de Na 10 mM, pH 6,8. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

35 Tampón A: TRIS 30 mM, pH 8,0
 Tampón B: TRIS 30 mM, NaCl 1 M, pH 8,0
 Equilibrio y carga: 0 % de B
 Gradiente: 0-25 % de B en 5 VC - 25 % de B 2 VC
 Lavado: 100 % de B 2 VC + 3 VC
 40 Flujo: 20 ml/min
 Volumen de fracción: 14 ml

Cromatografía de hidroxilapatita

El conjunto previamente obtenido se cargó sobre una columna CHT20 previamente equilibrada con fosfato de Na 10 mM, pH 6,8. Se recogió el flujo continuo.

45 Tampón A: fosfato de Na 10 mM, pH 6,8
 Tampón B: fosfato de Na 500 mM, pH 6,8
 Lavado: 8 VC
 Lavado: 30 % de B 6 VC
 Gradiente: 30-100 % de B (10 VC)
 50 Lavado: 100 % de B
 Flujo: 5 ml/min
 Volumen de fracción: 5 ml

Se cargaron alícuotas de la fracción sobre 12 % de geles Criterion bajo condiciones reductoras y no reductoras. Las fracciones que contenían proteína GAS25 se reunieron y la concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

Cromatografía por filtración en gel

5 El conjunto recogido se concentró usando un filtro Amicon con el fin de conseguir un volumen < 10 ml. El material concentrado se cargó sobre HiLoad Superdex 200 26/60 equilibrada con al menos 3-4 volúmenes de columna de PBS.

10 Tampón: PBS
Elución: Isocrática
Flujo: 2,5 ml/min
Volumen de fracción: 5 ml

Las fracciones que contenían proteína GAS25 se reunieron y la concentración de proteína se determinó por Bradford. Una estimación adicional de la concentración de proteína se realizó por medición de UV considerando Abs al 0,1 % (=1 g/l) 1,119. La pureza de la proteína se analiza por electroforesis en gel de poliacrilamida (**FIG. 11**).

15 **Ejemplo 4**

Ensayos hemolíticos

Protocolo para el ensayo hemolítico cuantitativo

20 Se prepararon diluciones seriadas de toxina en placas de 96 pocillos con fondos con forma de U usando PBS + 0,5 % de BSA. Un ml de sangre de oveja se lavó tres veces en PBS (con centrifugación a 3000 x g) y los glóbulos sanguíneos se suspendieron en 5 ml de PBS. Se añadió un volumen de suspensión igual a 50 µl de cada dilución de toxina y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Se usó Triton (2 %) en agua para dar 100 % de hemólisis, y se usó PBS + 0,5 % de BSA como control negativo. Entonces, las placas se centrifugaron durante 5 min a 1.000 x g, y el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a placas de fondo plano de 96 pocillos. La absorbancia se leyó a 540 nm.

25 *Comparación de toxina que contiene SLO natural y mutante de SLO P427L*

30 El gen que codifica SLO P427L se amplificó usando PCR a partir del genoma de SF370 M1 y se clonó en el vector pET21b+, que mostró expresión en BL21DE3 de *E. coli* de la proteína marcada con His. Se usaron extractos solubles de *E. coli* que expresaban cantidades similares de las proteínas de estreptolisina O naturales y mutadas (véase la **FIG. 5**) para realizar un ensayo hemolítico para comparar las propiedades citolíticas de los dos antígenos. El resultado del ensayo se muestra en la **FIG. 2**, que demuestra que la proteína mutada es al menos 100 veces menos tóxica que la natural.

Comparación de SLO natural purificada y mutante de SLO P427L

35 El mutante SLO P427L se purificó según procedimientos convencionales de purificación para proteínas recombinantes marcadas con His (**FIG. 3**). Se usaron diferentes concentraciones de las proteínas naturales purificadas y mutadas para repetir el ensayo hemolítico, que confirmó la disminución de la actividad citolítica (**FIG. 4**).

Actividad hemolítica de extractos de E. coli que contienen SLO natural marcada con His y sin marca y el mutante de SLO P427L

40 Los inventores compararon la actividad hemolítica de lisados de *E. coli* transformados con SLO recombinante natural (rSLO) sin una marca de His (BL21 DE3, Novagen nº 71382- pET24) y rSLO mutante P427L sin una marca de His (BL21 DE3, Novagen nº 71382- pET24). Se usó BL21 DE3 de *E. coli* (Novagen, nº 71382) transformada con pET24 sin inserto como control negativo. El control positivo fue una disolución hipotónica que contenía Triton al 2 % en agua. El control negativo fue el tampón de dilución de proteína (PBS que contenía 0,5 % de BSA, pH 7,4).

45 La hemólisis se determinó midiendo la absorbancia a 540 nm (A_{540nm}) de los sobrenadantes. El título se calculó como la dilución con el 50 % de A_{540nm} máxima.

Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4 y en la **FIG. 6**. Estos datos demuestran que, bajo las mismas condiciones, P427L mutante es 1000 veces menos hemolítica que SLO natural.

Tabla 3.

<i>E. coli</i>	UFC/ml
control negativo	3,9 x 10 ⁸
rSLO natural (sin marca)	1,2 x 10 ⁹
rSLO P427L (sin marca)	1,03 x 10 ⁹

Tabla 4.

	rSLO natural sin marca	rSLOP427L sin marca
título (DO=50 % de hemólisis)	50.000	48
título natural/P427L	1042	

Comparación de SLO natural y diversos mutantes de SLO

- 5 La actividad hemolítica de SLO natural se comparó con la actividad hemolítica de varios mutantes de SLO diferentes. Los resultados se muestran en la **FIG. 13** y en la Tabla 5, más adelante. Una unidad hemolítica (UH) se define como la cantidad de toxina requerida para obtener el 50 % de lisis máxima obtenida tratando glóbulos sanguíneos con el 2 % de Triton.

Tabla5.

Proteína	UH/mg	UH/mg de SLO/mutantes
rSLO natural	22760	1
C530G	620	37
W535F	160	146
W535F-D482N	<< 20	>> 1000
P427L	aproximadamente 20	aproximadamente 1000
Δala248	<< 20	>> 1000
Control neg.	<< 20	>> 1000

- 10 Debido a diferencias en la pureza de proteínas, las unidades de hemólisis/mg de mutantes indicados en negrita están sobreestimadas; sin embargo, es evidente que (1) W535F mutante es menos hemolítica que el mutante C530G; (2) el mutante P427L es aproximadamente 1000 veces menos hemolítico que la natural y aproximadamente 6-25 veces menos hemolítico que otros dos mutantes W535F y C530G; y (3) el mutante ΔA248 es ciertamente menos hemolítico que la natural.

15 *Efecto del colesterol*

- 20 Diluciones seriadas de dos-cinco veces en PBS-BSA al 0,5 % de lisados de *E. coli* o lisado de *E. coli* con 200 mg/ml de colesterol obtenido después del crecimiento de células a 30 °C e inducción con IPTG 1 mM a 25 °C y DO_{600nm} aproximadamente 0,4-0,6 se ensayaron para su actividad hemolítica. Cincuenta microlitros de una disolución de eritrocitos de oveja al 2 % en PBS se trataron con un volumen igual de preparaciones de proteína obtenidas lisando bacterias, 3 horas después de inducción, con tampón de lisis (disolución B-PER-PIERCE- MgCl₂ 1 mM, 100K unidades/ml de ADNsa (Sigma) y lisozima (Sigma) durante 30-40 minutos. Entonces, la fracción insoluble se centrifugó (15 minutos, 21000 x g, 4 °C) y el sobrenadante (lisado de *E. coli*) se transfirió a un nuevo tubo de Eppendorf que contenía DTT a la concentración final de 5 mM.

- 25 Bajo esta condición, el colesterol no inhibió ni SLO natural ni mutante hasta que se usó un factor de dilución de 100 veces; por tanto, no hubo efecto sobre la lisis inducida por mutante. A diferencia, la lisis inducida por natural se redujo enormemente. La lisis inducida por el control negativo no estuvo influida por el colesterol, que sugiere que la inhibición inducida por colesterol es específica. Véase la Tabla 6 y **FIG. 7**.

Tabla 6

	rSLO natural sin marca	rSLO P427L sin marca
título (DO=50 % de hemólisis)	400	40
título natural/P427L	10	

Ejemplo 5

Inhibición de la hemólisis

Protocolo

5 Diluciones dobles seriadas de sueros de ratones inmunizados con proteínas SLO naturales o mutantes (sin adyuvantes o con alumbre o MF59™ como adyuvantes) se prepararon en placas de 96 pocillos con fondos con forma de U usando PBS + 0,5 % de BSA. Los sueros de ratones inmunizados con PBS o con adyuvante solo, según fuera apropiado, se usaron como controles negativos. Se añadió un volumen igual de una disolución de toxina de 50-100 ng/ml (3,5-7 UH) en PBS + 0,5 % de BSA y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos bajo agitación (800 rpm). Después de la incubación, 50 ml de esta disolución se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos, y se añadió un volumen igual de una suspensión de eritrocitos de oveja (lavada 3 x en PBS) y se incubó a 37 °C durante 30 min. Entonces, las placas se centrifugaron durante 1 min a 1.000 x g, el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a placas de fondo plano de 96 pocillos y la absorbancia se leyó a 540 nm. En los resultados descritos más adelante, el título de inhibición se expresa como la dilución de suero que redujo la hemólisis inducida por Triton al 50 %.

15 *Inhibición de la hemólisis de SLO por antisueros para SLO natural*

La inhibición de la hemólisis de SLO por antisueros anti-SLO natural se muestra en las **FIG. 14, FIG. 15, FIG. 16** y las Tablas 7-9. Los títulos de sueros anti-SLO están incluidos entre 1/7.000 y 1/14.000 (media aritmética, 1/12.167 ± 2.714). Los títulos del suero de control negativo (adyuvante de Freund) están incluidos entre 1/375 y 1/4.000 (media aritmética, 1/1.854 ± 1.384).

20 Tabla 7 (mostrada gráficamente en la **FIG. 15**).

media aritmética de sueros probados - % de hemólisis		
factor de dilución/suero	sueros anti-SLO	sueros de control negativo
125		9
250		10
500		19
1.000	2	38
2.000	2	69
4.000	2	84
8.000	19	93
16.000	78	97
32.000	99	
64.000	97	
128.000	100	

Tabla 8

sueros anti-SLO (adyuvante de Freund)		sueros de control negativo (adyuvante de Freund)	
suero	50 % de inhib. de la hemólisis	suero	50 % de inhib. de la hemólisis
A	14.000	1	4.000
B	7.000	2	1.500
C	12.000	3	375
D	12.000	4	3.000
E	14.000	5	1.500
F	14.000	6	750

Tabla 9 (mostrada gráficamente en la **FIG. 16**)

ng/ml de SLO	% de hemólisis
1,6	4
3,1	3
6,3	6
12,5	30
25	94
50	100
100	100
200	100

Valoración de la actividad hemolítica de SLO natural, SLO natural químicamente desintoxicada y mutantes de SLO

La valoración de la actividad hemolítica de SLO natural, SLO natural químicamente desintoxicada y mutantes de SLO (P427L; P427L + W535F) se muestra en las **FIGS. 17-19** y en la Tabla 10.

5

Tabla 10 (mostrada gráficamente en la **FIG. 18**).

proteína	UH/mg	UH/mg de SLO/mutantes
SLO natural sin marca	728.307	1
SLO P427L sin marca	711	1,024
SLO P427L + W535F sin marca	<22 (estim. 10)	>33.000
SLO natural sin marca	45.511	
SLO natural sin marca, desintoxicada	<<89	>>511

Inhibición de la hemólisis de SLO por antisuero contra proteínas SLO mutantes

La inhibición de la hemólisis de SLO por antisueros contra proteínas SLO mutantes se muestra en las **FIGS. 20-22** y las Tablas 11-13. Usando 50 ng/ml (3,5 UH) de toxina, la dilución del suero requerida para obtener el 50 % de la reducción de la actividad hemolítica de SLO para el mutante de SLO W535-P427L es 1/17.860 usando adyuvante de alumbre y 1/7991 usando el adyuvante MF59[™]. Los títulos de control negativo (adyuvante solo) son 1/1.000 (alumbre) y 1/125 (MF59[™]).

10

Tabla 11 (mostrada gráficamente en la **FIG. 20**).

50 ng/ml (3,5 UH) de SLO natural	
adyuvante	inhibición específica/inhibición no específica
alumbre	18
MF [™] 59	64

Tabla 12 (mostrada gráficamente en la **FIG. 21**)

100 ng/ml (37 UH) de SLO natural	
adyuvante	inhibición específica/inhibición no específica
alumbre	>227
MF [™] 59	>117

15

Tabla 13 (mostrada gráficamente en la FIG. 22)

ng/ml de SLO	% de hemólisis
1,6	3,5
3,1	5,8
6,3	13
12,5	42
25	86
50	100
100	100
200	100

5 Una comparación de las diluciones de sueros requeridas para obtener el 50 % de reducción de la actividad hemolítica de SLO para SLO natural y para el mutante W535-P427L, ambos usando el adyuvante de alumbre, se muestra en la FIG. 25. Usando 100 ng/ml (7 UH) de toxina, la dilución del suero requerida para obtener el 50 % de reducción de la actividad hemolítica de SLO para el mutante de SLO W535-P427L es 1/12000, en comparación con una dilución de suero de 1/8750 +/- 1500. La dilución de control negativo (adyuvante solo) es aproximadamente 1/50.

Ejemplo 6

Experimentos de protección in vivo

10 La proteína SLO P427L purificada, junto con adyuvante de Freund, se administró intraperitonealmente a 40 ratones. Entonces, los ratones se expusieron intranasalmente a la cepa 3348 M1 de GAS. La Tabla 14 informa de los datos obtenidos en 3 experimentos separados, que muestran que el 100 % de protección fue coherentemente lograda en todos los experimentos.

Tabla 14. Tasa de supervivencia a la infección de ratones

antígeno	% de ratones supervivientes		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
GAS25 Pro247Leu	100	100	100
contaminantes de <i>E. coli</i> (control negativo)	10	10	10
proteína M1 homóloga (control positivo)	100	90	90

15 Grupos de 10-20 ratones se inmunizaron con 20 µg de la proteína recombinante en los días 0, 21 y 35. Los ratones de grupos de control negativos se inmunizaron tanto con GST solo como con contaminantes de *E. coli*, dependiendo de la versión de la proteína recombinante de GAS usada. Dos semanas después de la tercera inmunización se tomaron muestras de sangre. Algunos días después, los ratones inmunizados se expusieron intranasalmente a 10⁸ ufc (50 µl) de las cepas M1 3348 de GAS. La supervivencia de ratones se monitorizó durante un periodo de 10-14 días. Los sueros inmunes obtenidos de los diferentes grupos se probaron para inmunogenicidad sobre la proteína recombinante SLO entera (análisis de transferencia Western). Los resultados se muestran en la Tablas 15 y 16.

Tabla 15

Proteína	nº de ratones	% de supervivencia	% de supervivencia de control negativo
GAS25_Pro247Leu His	10	90	30
GAS25_Pro247Leu His	10	100	20
GAS25_Pro247Leu His	10	80	30
GAS25_WT	20	95	15
GAS25_WT	10	100	40

Tabla 16

Proteína	nº de ratones	% de supervivencia	% de supervivencia de control negativo
rSLO natural marcada con His	20	100	45
C530G marcada con His	20	100	45
W535F marcada con His	20	100	45
W535F-D482N marcada con His	20	100	45
P427L marcada con His	20	95	45
Δala248 marcada con His	20	100	45

Protección contra la exposición intranasal a la cepa M1 de GAS por el mutante de SLO P427L-W535F

5 Treinta ratones se inmunizaron intraperitonealmente con el mutante de SLO P427L-W535F, con tanto alumbre como con MF59 como adyuvantes, y se expusieron intranasalmente a una cepa M1 de GAS. Los resultados se muestran en la **FIG. 26**. El sesenta y siete por ciento de los ratones inmunizados con el mutante de SLO P427L-W535F y alumbre se protegieron contra la exposición intranasal con una cepa M1 de GAS, como se compara con el 3 % de los ratones de control negativo (inmunizados con adyuvante solo). El noventa por ciento de los ratones inmunizados con el mutante de SLO P427L-W535F y MF59 se protegieron contra la exposición intranasal a una cepa M1 de GAS en comparación con el 10 % de ratones de control negativo (inmunizados con adyuvante solo). Estos niveles de protección son comparables a aquellos obtenidos inmunizando ratones con SLO natural.

Ejemplo 7

Protocolos

15 *Inyección intravenosa de SLO.* Una disolución de tanto SLO natural como mutante en PBS se diluye en una disolución de PBS + DTT 2 mM, luego se inyectan 100 µl en la vena de la cola de un ratón. Los ratones se observan durante 2-3 días. La inyección de SLO natural normalmente produce muerte en el plazo de algunos minutos.

20 *Ensayo de inhibición de la letalidad in vivo.* Para la inhibición de la letalidad mediada por sueros inmunes, 10 µg/ratón de SLO natural (una disolución de 100 µg/ml en PBS, DTT 2 mM) se incuban durante 20 minutos con rotación de "extremo a extremo" a temperatura ambiente con tanto suero anti-SLO como suero de control (obtenido de ratones inmunizados con adyuvante solo). Después de la incubación, las muestras se inoculan en los ratones mediante inyección intravenosa en la vena de la cola. Los ratones se observan durante 2-3 días.

Los resultados para SLO natural y SLO mutante P427L-W535F se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17.

SLO natural		P427L-W535F	
µg/ratón	muertos/tratados	µg/ratón	muertos/tratados
		100	0/4
50	4/4	50	0/4
10	8/8	10	0/8
2	0/4		
0,4	0/4		
0,04	0/4		

25 Se evaluó la toxicidad *in vivo* aguda usando una dosis de 10 µg/ratón de SLO natural como control positivo e inyección de adyuvante de Freund solo como control negativo. Se incubaron diez µg/ratón de SLO natural con tanto antisuero para SLO natural como con suero de control y se inocularon en ratones como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18.

SLO natural (10 µg/ratón)		
sueros	dilución del suero	muestrados/tratados
ninguno		8/8
SLO natural	1/5	0/4
SLO natural	1/10	0/4
SLO natural	1/20	4/4
SLO natural	1/50	4/4
SLO natural	1/100	4/4
control negativo	1/5	4/4

5 Los resultados de otro conjunto de experimentos realizados como se ha descrito anteriormente se muestran en las Tablas 19 y 20. Se evaluó la toxicidad *in vivo* aguda usando tanto 5 como 10 µg/ratón de SLO natural. En particular, 10 µg/ratón de SLO natural se incubaron previamente tanto con sueros de ratones inmunizados con GAS25 P427L-W535F como PBS solo (sin suero). Además, 5 µg/ratón de SLO natural se incubaron previamente tanto con sueros de ratones inmunizados con GAS25 P427L-W535F como sueros de ratones inmunizados con PBS más adyuvante (alumbre), como suero de control negativo.

10 Los resultados demuestran que las dosis mortales de SLO natural las neutralizan sueros anti-SLO P427L-W535F, pero no sueros de control negativo a la misma dilución.

Tabla 19.

SLO natural (10 µg/ratón)		
Sueros	dilución del suero	muestrados/tratados
ninguno	---	4/4
Anti-SLO P427L-W535F, adyuvante alumbre	1/5	0/4

Tabla 20.

SLO natural (5 µg/ratón)		
Suero	dilución del suero	muestrados/tratados
Anti-SLO P427L-W535F, alum adyuvante	1/5	0/4
control negativo (alumbre solo)	1/5	4/4

Ejemplo 8

15 *La inmunización con SLO P427L-W535F protege a los ratones contra inyección intravenosa de SLO natural*

20 Ratones de cinco semanas de edad se inmunizaron intraperitonealmente tres veces (día 0, día 21 y día 35) con tanto SLO natural como con el mutante de SLO P427L-W535F usando alumbre como adyuvante (20 µg de proteína en 2 mg/ml de hidróxido de aluminio). Los ratones inmunizados con adyuvante solo se usaron como control negativo. En el día 55, los ratones se inyectaron intravenosamente con diferentes concentraciones de una disolución de SLO natural en PBS, DTT 2 mM y se monitorizaron durante al menos 72 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21

	Dosis de SLO sin marca natural inyectada en la vena de la cola del ratón			
	2,5 µg/ratón	5 µg/ratón	10 µg/ratón	20 µg/ratón
	supervivencia (nº de ratones tratados)	supervivencia (nº de ratones tratados)	supervivencia (nº de ratones tratados)	supervivencia (nº de ratones tratados)
adyuvante (alumbre)	100 % (4)	0 % (12)	no probado	no probado
SLO natural sin marca	no probado	100 % (8)	100 % (4)	100 % (4)
SLO P427L-W535F sin marca	no probado	100 % (8)	100 % (4)	100 % (4)

5 Cinco µg/ratón de SLO natural es mortal para ratones inmunizados con adyuvante solo; estos ratones murieron en el plazo de algunos minutos después de la inyección de SLO. Sin embargo, incluso 20 µg/ratón de la misma preparación de SLO no mató a los ratones inmunizados con tanto SLO natural como con el mutante de SLO P427L-W535F.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Bensi, Giuliano
Margarit Y Ros, Immaculada
Chiarot, Emiliano
Grandi, Guido
Scarselli, Maria

15 <120> Formas mutantes de estreptolisina O

<130> P052158WO

20 <140> US 12/339.365

<141> 19-12-2008

<150> US 61/016.193

<151> 21-12-2007

25 <150> US 61/088.381

<151> 13-08-2008

<160> 59

30 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 571

<212> PRT

35 <213> S. pyogenes

<400> 1

ES 2 391 695 T3

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
1 5 10 15
Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
20 25 30
Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu
35 40 45
Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln
50 55 60
Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
65 70 75 80
Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
85 90 95
Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
100 105 110
Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
115 120 125
Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
130 135 140
Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
145 150 155 160
Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
165 170 175
Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
180 185 190
Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
195 200 205
Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn

```

    210                215                220
Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
225                230                235                240
Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
                245                250                255
Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
                260                265                270
Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
                275                280                285
Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
                290                295                300
Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
305                310                315                320
Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
                325                330                335
Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
                340                345                350
Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
                355                360                365
Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
                370                375                380
Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
385                390                395                400
His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
                405                410                415
Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
                420                425                430
Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
                435                440                445
Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
                450                455                460
Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
465                470                475                480
Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
                485                490                495
Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
                500                505                510
Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
                515                520                525
Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
530                535                540
Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
545                550                555                560
Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
                565                570

```

<210> 2
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 2

```

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
 1      5      10
Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
                20                25                30
Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu
                35                40                45
Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln
50                55                60

```

10

Lys Met Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
 65 70 75 80
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
 85 90 95
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
 100 105 110
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
 115 120 125
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
 130 135 140
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
 165 170 175
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
 180 185 190
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
 195 200 205
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
 210 215 220
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
 245 250 255
 Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
 260 265 270
 Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
 275 280 285
 Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
 290 295 300
 Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
 305 310 315 320
 Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
 325 330 335
 Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
 340 345 350
 Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
 355 360 365
 Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
 370 375 380
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
 385 390 395 400
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
 405 410 415
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
 420 425 430
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
 435 440 445
 Arg Ser Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
 450 455 460
 Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
 465 470 475 480
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
 485 490 495
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
 500 505 510
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
 515 520 525
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
 530 535 540
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 565 570

<210> 3
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 3

```

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
 1      5      10      15
Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
      20      25      30
Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu
      35      40      45
Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln
      50      55      60
Lys Met Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
      65      70      75      80
Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
      85      90      95
Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
      100      105      110
Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
      115      120      125
Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
      130      135      140
Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
      145      150      155      160
Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
      165      170      175
Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
      180      185      190
Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
      195      200      205
Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
      210      215      220
Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
      225      230      235      240
Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
      245      250      255
Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
      260      265      270
Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
      275      280      285
Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
      290      295      300
Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
      305      310      315      320
Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
      325      330      335
Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
      340      345      350
Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
      355      360      365
Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
      370      375      380
Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
      385      390      395      400
    
```


His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
 405 410 415
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
 420 425 430
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
 435 440 445
 Arg Ser Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
 450 455 460
 Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
 465 470 475 480
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
 485 490 495
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
 500 505 510
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
 515 520 525
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
 530 535 540
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 565 570

<210> 4
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 4

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
 20 25 30
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu
 35 40 45
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln
 50 55 60
 Lys Met Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
 65 70 75 80
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
 85 90 95
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
 100 105 110
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
 115 120 125
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
 130 135 140
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
 165 170 175
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
 180 185 190
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
 195 200 205
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
 210 215 220
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met

10

```

                245                250                255
Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
                260                265                270
Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
                275                280                285
Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
                290                295                300
Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
305                310                315                320
Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
                325                330                335
Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
                340                345                350
Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
                355                360                365
Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
                370                375                380
Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
385                390                395                400
His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
                405                410                415
Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
                420                425                430
Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
                435                440                445
Arg Ser Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
450                455                460
Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
465                470                475                480
Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
                485                490                495
Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
                500                505                510
Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
                515                520                525
Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
530                535                540
Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
545                550                555                560
Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
                565                570

```

<210> 5
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 5

```

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
1                5                10                15
Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
                20                25                30
Ser Asn Lys Gln Asn Thr Thr Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu
                35                40                45
Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Ile Glu Lys Ala Gly Gln
50                55                60
Lys Met Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
65                70                75                80
Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
                85                90                95

```

10

Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
 100 105 110
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
 115 120 125
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
 130 135 140
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Met Thr Tyr Pro Ala
 165 170 175
 Ala Leu Gln Leu Ala Asp Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
 180 185 190
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
 195 200 205
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
 210 215 220
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
 245 250 255
 Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
 260 265 270
 Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
 275 280 285
 Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
 290 295 300
 Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
 305 310 315 320
 Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
 325 330 335
 Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
 340 345 350
 Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
 355 360 365
 Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
 370 375 380
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
 385 390 395 400
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
 405 410 415
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
 420 425 430
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
 435 440 445
 Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
 450 455 460
 Ile Asn Leu Ser His Arg Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
 465 470 475 480
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
 485 490 495
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
 500 505 510
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
 515 520 525
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
 530 535 540
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 565 570

<210> 6
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

<400> 6

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
1 5 10 15
Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
20 25 30
Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu
35 40 45
Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Ile Glu Lys Ala Gly Gln
50 55 60
Lys Met Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
65 70 75 80
Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
85 90 95
Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
100 105 110
Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
115 120 125
Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
130 135 140
Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
145 150 155 160
Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Met Thr Tyr Pro Ala
165 170 175
Ala Leu Gln Leu Ala Asp Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
180 185 190
Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
195 200 205
Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
210 215 220
Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
225 230 235 240
Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
245 250 255
Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
260 265 270
Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
275 280 285
Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
290 295 300
Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
305 310 315 320
Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
325 330 335
Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
340 345 350
Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
355 360 365
Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
370 375 380
Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
385 390 395 400
His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
405 410 415
Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
420 425 430

Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
 435 440 445
 Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
 450 455 460
 Ile Asn Leu Ser His Arg Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
 465 470 475 480
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
 485 490 495
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
 500 505 510
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
 515 520 525
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
 530 535 540
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 565 570

<210> 7
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes
 <400> 7

5

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Thr Val Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
 20 25 30
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu
 35 40 45
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Ile Glu Lys Ala Gly Gln
 50 55 60
 Lys Met Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
 65 70 75 80
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
 85 90 95
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
 100 105 110
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
 115 120 125
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
 130 135 140
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
 165 170 175
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
 180 185 190
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
 195 200 205
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
 210 215 220
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
 245 250 255
 Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
 260 265 270
 Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly

10

```

                275                280                285
Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
 290                295                300
Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
305                310                315                320
Thr Phe Lys Asp Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
                325                330                335
Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
                340                345                350
Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
                355                360                365
Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
                370                375                380
Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
385                390                395                400
His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
                405                410                415
Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
                420                425                430
Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
                435                440                445
Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
                450                455                460
Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
465                470                475                480
Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
                485                490                495
Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
                500                505                510
Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
                515                520                525
Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
530                535                540
Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
545                550                555                560
Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
                565                570

```

<210> 8
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 8

```

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
 1                5                10                15
Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
                20                25                30
Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu
                35                40                45
Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln
50                55                60
Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
65                70                75                80
Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
                85                90                95
Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
                100                105                110
Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
115                120                125

```

10

Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
 130 135 140
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
 165 170 175
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
 180 185 190
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
 195 200 205
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
 210 215 220
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
 245 250 255
 Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
 260 265 270
 Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
 275 280 285
 Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
 290 295 300
 Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
 305 310 315 320
 Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
 325 330 335
 Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
 340 345 350
 Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
 355 360 365
 Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
 370 375 380
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
 385 390 395 400
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
 405 410 415
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
 420 425 430
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
 435 440 445
 Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
 450 455 460
 Ile Asn Leu Ser His Arg Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
 465 470 475 480
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
 485 490 495
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
 500 505 510
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
 515 520 525
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
 530 535 540
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 565 570

<210> 9
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 9

Met	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Phe	Lys	Lys	Tyr	Ser	Arg	Val	Ala	Gly	Leu
1				5					10					15	
Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Ile	Ile	Gly	Asn	Leu	Val	Thr	Ala	Asn	Ala	Glu
			20					25					30		
Ser	Asn	Lys	Gln	Asn	Thr	Ala	Ser	Thr	Glu	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu
		35					40						45		
Gln	Pro	Lys	Pro	Glu	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Thr	Glu	Lys	Ala	Gly	Gln
		50				55					60				
Lys	Thr	Asp	Asp	Met	Leu	Asn	Ser	Asn	Asp	Met	Ile	Lys	Leu	Ala	Pro
65					70					75					80
Lys	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Ser	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Lys	Lys	Ser	Glu
				85					90					95	
Asp	Lys	Lys	Lys	Ser	Glu	Glu	Asp	His	Thr	Glu	Glu	Ile	Asn	Asp	Lys
			100					105					110		
Ile	Tyr	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asn	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Ala	Lys	Asn	Gly
		115					120						125		
Glu	Thr	Ile	Glu	Asn	Phe	Val	Pro	Lys	Glu	Gly	Val	Lys	Lys	Ala	Asp
		130				135						140			
Lys	Phe	Ile	Val	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys	Lys	Asn	Ile	Asn	Thr	Thr	Pro
145					150					155					160
Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Arg	Thr	Tyr	Pro	Ala
				165					170					175	
Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Asn	Lys	Gly	Phe	Thr	Glu	Asn	Lys	Pro	Asp	Ala
			180					185					190		
Val	Val	Thr	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Lys	Ile	His	Ile	Asp	Leu	Pro	Gly
		195				200						205			
Met	Gly	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Glu	Val	Asn	Asp	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asn
	210				215						220				
Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Val	Asn	Gln	Trp	His	Asp	Asn	Tyr
225					230					235					240
Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Ala	Arg	Thr	Gln	Tyr	Thr	Glu	Ser	Met
				245					250					255	
Val	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Asn	Val	Asn	Ser	Lys
			260					265					270		
Ile	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Ser	Ile	Ser	Lys	Gly
		275					280					285			
Glu	Lys	Lys	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Lys	Gln	Ile	Phe	Tyr	Thr	Val
		290				295					300				
Ser	Ala	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Asp	Lys	Ser	Val
305					310					315					320
Thr	Phe	Lys	Asp	Leu	Gln	Arg	Lys	Gly	Val	Ser	Asn	Glu	Ala	Pro	Pro
				325					330					335	
Leu	Phe	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Thr	Val	Phe	Val	Lys	Leu
			340					345					350		
Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ser	Asn	Asp	Val	Glu	Ala	Ala	Phe	Ser	Ala	Ala
			355				360					365			
Leu	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Thr	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ser	Asp	Ile	Leu
		370				375					380				
Glu	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	Ala	Ala	Glu
385					390					395					400
His	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Lys	Asp	Phe	Asp	Val	Ile	Arg	Asn	Val	Ile
				405					410					415	
Lys	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Arg	Lys	Asn	Pro	Ala	Tyr	Pro	Ile	Ser
			420					425					430		
Tyr	Thr	Ser	Val	Phe	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Ile	Ala	Gly	Val	Asn	Asn
		435					440					445			
Arg	Thr	Glu	Tyr	Val	Glu	Thr	Ser	Thr	Glu	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	
		450				455						460			

ES 2 391 695 T3

Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
 465 470 475 480
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
 485 490 495
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
 500 505 510
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
 515 520 525
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
 530 535 540
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 565 570

<210> 10
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes
 <400> 10

5

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
 20 25 30
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu
 35 40 45
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln
 50 55 60
 Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
 65 70 75 80
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
 85 90 95
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
 100 105 110
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
 115 120 125
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
 130 135 140
 Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
 165 170 175
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
 180 185 190
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
 195 200 205
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
 210 215 220
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
 245 250 255
 Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
 260 265 270
 Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
 275 280 285
 Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
 290 295 300
 Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val

10

```

305          310          315          320
Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
          325          330          335
Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
          340          345          350
Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
          355          360          365
Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
          370          375          380
Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
385          390          395          400
His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
          405          410          415
Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
          420          425          430
Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
          435          440          445
Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
          450          455          460
Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
465          470          475          480
Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
          485          490          495
Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
          500          505          510
Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
          515          520          525
Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
530          535          540
Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
545          550          555          560
Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
          565          570

```

<210> 11
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 11

```

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
 1          5          10          15
Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
          20          25          30
Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu
          35          40          45
Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln
          50          55          60
Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
65          70          75          80
Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
          85          90          95
Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
          100          105          110
Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
          115          120          125
Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
          130          135          140
Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
145          150          155          160

```

10

Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
 165 170 175
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
 180 185 190
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
 195 200 205
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
 210 215 220
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
 245 250 255
 Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
 260 265 270
 Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
 275 280 285
 Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
 290 295 300
 Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
 305 310 315 320
 Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
 325 330 335
 Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
 340 345 350
 Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
 355 360 365
 Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
 370 375 380
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
 385 390 395 400
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
 405 410 415
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
 420 425 430
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
 435 440 445
 Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
 450 455 460
 Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
 465 470 475 480
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
 485 490 495
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
 500 505 510
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
 515 520 525
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
 530 535 540
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 565 570

<210> 12
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

<400> 12

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu

5

10

1				5					10				15		
Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Ile	Ile	Gly	Asn	Leu	Val	Thr	Ala	Asn	Ala	Glu
			20					25					30		
Ser	Asn	Lys	Gln	Asn	Thr	Ala	Ser	Thr	Glu	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu
		35					40					45			
Gln	Pro	Lys	Pro	Glu	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Thr	Glu	Lys	Ala	Gly	Gln
		50				55					60				
Lys	Thr	Asp	Asp	Met	Leu	Asn	Ser	Asn	Asp	Met	Ile	Lys	Leu	Ala	Pro
65				70						75					80
Lys	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Ser	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Lys	Lys	Ser	Glu
				85					90					95	
Asp	Lys	Lys	Lys	Ser	Glu	Glu	Asp	His	Thr	Glu	Glu	Ile	Asn	Asp	Lys
			100					105					110		
Ile	Tyr	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asn	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Ala	Lys	Asn	Gly
		115					120					125			
Glu	Thr	Ile	Glu	Asn	Phe	Ala	Pro	Lys	Glu	Gly	Val	Lys	Lys	Ala	Asp
		130				135					140				
Lys	Phe	Ile	Val	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys	Lys	Asn	Ile	Asn	Thr	Thr	Pro
145				150						155					160
Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Arg	Thr	Tyr	Pro	Ala
				165					170					175	
Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Asn	Lys	Gly	Phe	Thr	Glu	Asn	Lys	Pro	Asp	Ala
			180					185					190		
Val	Val	Thr	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Lys	Ile	His	Ile	Asp	Leu	Pro	Gly
		195					200					205			
Met	Gly	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Glu	Val	Asn	Asp	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asn
		210				215					220				
Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Ile	Asn	Gln	Trp	His	Asp	Asn	Tyr
225				230						235					240
Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Ala	Arg	Thr	Gln	Tyr	Thr	Glu	Ser	Met
				245					250					255	
Val	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Asn	Val	Asn	Ser	Lys
			260					265					270		
Ile	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Ser	Ile	Ser	Lys	Gly
		275				280						285			
Glu	Lys	Lys	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Lys	Gln	Ile	Phe	Tyr	Thr	Val
		290				295					300				
Ser	Ala	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Ala	Lys	Ser	Val
305					310					315					320
Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	Gly	Val	Ser	Asn	Glu	Ala	Pro	Pro
				325					330					335	
Leu	Phe	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Thr	Val	Phe	Val	Lys	Leu
			340					345					350		
Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ser	Asn	Asp	Val	Glu	Ala	Ala	Phe	Ser	Ala	Ala
		355					360					365			
Leu	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Thr	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ser	Asp	Ile	Leu
		370				375					380				
Glu	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	Ala	Ala	Glu
385				390						395					400
His	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Lys	Asp	Phe	Asp	Val	Ile	Arg	Asn	Val	Ile
				405					410					415	
Lys	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Arg	Lys	Asn	Pro	Ala	Tyr	Pro	Ile	Ser
			420					425					430		
Tyr	Thr	Ser	Val	Phe	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Ile	Ala	Gly	Val	Asn	Asn
		435					440					445			
Arg	Thr	Glu	Tyr	Val	Glu	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys
		450				455					460				
Ile	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Ala	Tyr	Val	Ala	Gln	Tyr	Glu	Ile	Leu
465				470						475					480
Trp	Asp	Glu	Ile	Asn	Tyr	Asp	Asp	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Ile	Thr	Lys
				485					490					495	

Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
 500 505 510
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
 515 520 525
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
 530 535 540
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 565 570

<210> 13
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes
 <400> 13

5

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1 5 10 15
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
 20 25 30
 Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
 35 40 45
 Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
 50 55 60
 Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
 65 70 75 80
 Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
 85 90 95
 Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
 100 105 110
 Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile
 115 120 125
 Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
 130 135 140
 Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn
 145 150 155 160
 Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
 165 170 175
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
 180 185 190
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
 195 200 205
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr
 210 215 220
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn
 225 230 235 240
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser
 245 250 255
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile
 260 265 270
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe
 275 280 285
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn
 290 295 300
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
 305 310 315 320
 Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
 325 330 335
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr

10

340 345 350
Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
355 360 365
Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
370 375 380
Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala
385 390 395 400
Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
405 410 415
Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
420 425 430
Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
435 440 445
Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu
450 455 460
Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser
465 470 475 480
Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg
485 490 495
Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys
500 505 510
Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
515 520 525
Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu
530 535 540
Glu His His His His His His
545 550

<210> 14
<211> 1656
<212> ADN
<213> S. pyogenes

5

<400> 14

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60
caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctgca 180
gaaaaagaag aaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggg 300
gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360
attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaaa 480
aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
atgggagaca aagcaacggt tgaggcaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtaatac gcttcctgcc 660
agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaagc agctcctaat 720
gttaatagca aaatcttaga tggtacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780
gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatttttt acaccgtatc agcaaacctt 840
cctaataatc ctgaggatgt gtttgataaa tcgggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900
gggtgcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactgtt 960
ttgtcaaac tagaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020
ctaaaaggaa cagatgtaa aactaatgga aatatctctg atatcttaga aaatagctca 1080
tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
tttgatgtta ttagaaacgt tatcaaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaaccagct 1200
tatcctattt catacaccag tgttttccct aaaaataata aaattgctgg tgtcaataac 1260
agaactgaat acgttgaaac aacatctacc gactacacta gtggaaaaat taacctgtct 1320
catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatctagac 1380
aaaggaaaag aagtgttac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500
gagtgactg gcttagcttg ggaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560

10

ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagccata tggttcgatt 1620
acttataagc tcgagcacca ccaccaccac cactga 1656

<210> 15
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 15

```

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1          5          10          15
Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
 20          25          30
Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
 35          40          45
Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
 50          55          60
Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
 65          70          75          80
Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
 85          90          95
Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
 100         105         110
Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile
 115         120         125
Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
 130         135         140
Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn
 145         150         155         160
Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
 165         170         175
Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
 180         185         190
Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
 195         200         205
His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr
 210         215         220
Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn
 225         230         235         240
Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser
 245         250         255
Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile
 260         265         270
Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe
 275         280         285
Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn
 290         295         300
Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
 305         310         315         320
Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
 325         330         335
Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr
 340         345         350
Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
 355         360         365
Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
 370         375         380
Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala
 385         390         395         400
Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
    
```

```

                405                410                415
Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
                420                425                430
Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
                435                440                445
Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu
                450                455                460
Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser
465                470                475                480
Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg
                485                490                495
Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys
                500                505                510
Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
                515                520                525
Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu
                530                535                540
Glu His His His His His His
545                550

```

<210> 16
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes
 <400> 16

5

```

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1                5                10                15
Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
                20                25                30
Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
                35                40                45
Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
                50                55                60
Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
65                70                75                80
Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
                85                90                95
Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
                100                105                110
Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile
                115                120                125
Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
                130                135                140
Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn
145                150                155                160
Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
                165                170                175
Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
                180                185                190
Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
                195                200                205
His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr
                210                215                220
Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn
225                230                235                240
Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser
                245                250                255
Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile
                260                265                270
Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe

```

10


```

                275                280                285
Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn
 290                295                300
Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
 305                310                315                320
Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
                325                330                335
Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr
                340                345                350
Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
                355                360                365
Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
 370                375                380
Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala
 385                390                395                400
Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
                405                410                415
Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
                420                425                430
Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
                435                440                445
Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu
 450                455                460
Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser
 465                470                475                480
Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg
                485                490                495
Ile Met Ala Arg Glu Gly Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys
                500                505                510
Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
                515                520                525
Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu
 530                535                540
Glu His His His His His
 545                550

```

<210> 17
 <211> 550
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 17

```

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1                5                10                15
Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
                20                25                30
Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
                35                40                45
Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
 50                55                60
Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
 65                70                75                80
Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
                85                90                95
Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
                100                105                110
Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile
 115                120                125
Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
 130                135                140
Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn

```

10

```

145          150          155          160
Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
          165          170          175
Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
          180          185          190
Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
          195          200          205
His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Arg Thr Gln Tyr Thr
          210          215          220
Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val
          225          230          235
Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile
          245          250          255
Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe
          260          265          270
Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp
          275          280          285
Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu
          290          295          300
Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe
          305          310          315
Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe
          325          330          335
Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser
          340          345          350
Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp
          355          360          365
Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg
          370          375          380
Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr
          385          390          395
Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly
          405          410          415
Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr
          420          425          430
Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr
          435          440          445
Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val
          450          455          460
Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro
          465          470          475
Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile
          485          490          495
Met Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val
          500          505          510
Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile
          515          520          525
Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu Glu
          530          535          540
His His His His His His
          545          550

```

<210> 18
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

<400> 18

```

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
  1          5          10          15
Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu

```

5

10

				20						25				30					
Lys	Ala	Gly	Gln	Lys	Thr	Asp	Asp	Met	Leu	Asn	Ser	Asn	Asp	Met	Ile				
		35						40					45						
Lys	Leu	Ala	Pro	Lys	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Ser	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu				
	50					55					60								
Lys	Lys	Ser	Glu	Asp	Lys	Lys	Lys	Ser	Glu	Glu	Asp	His	Thr	Glu	Glu				
	65				70					75				80					
Ile	Asn	Asp	Lys	Ile	Tyr	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asn	Glu	Leu	Glu	Val	Leu				
				85					90					95					
Ala	Lys	Asn	Gly	Glu	Thr	Ile	Glu	Asn	Phe	Val	Pro	Lys	Glu	Gly	Val				
			100					105						110					
Lys	Lys	Ala	Asp	Lys	Phe	Ile	Val	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys	Lys	Asn	Ile				
	115						120						125						
Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Arg				
	130					135					140								
Thr	Tyr	Pro	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Asn	Lys	Gly	Phe	Thr	Glu	Asn				
	145				150					155				160					
Lys	Pro	Asp	Ala	Val	Val	Thr	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Lys	Ile	His	Ile				
			165						170					175					
Asp	Leu	Pro	Gly	Met	Gly	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Glu	Val	Asn	Asp	Pro				
			180					185					190						
Thr	Tyr	Ala	Asn	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Val	Asn	Gln	Trp				
	195						200					205							
His	Asp	Asn	Tyr	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Ala	Arg	Thr	Gln	Tyr				
	210					215					220								
Thr	Glu	Ser	Met	Val	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Asn				
	225				230					235				240					
Val	Asn	Ser	Lys	Ile	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Ser				
			245						250				255						
Ile	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Lys	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Lys	Gln	Ile				
			260					265					270						
Phe	Tyr	Thr	Val	Ser	Ala	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Asp	Val	Phe				
	275						280					285							
Asp	Lys	Ser	Val	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	Gly	Val	Ser	Asn				
	290					295					300								
Glu	Ala	Pro	Pro	Leu	Phe	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Thr	Val				
	305				310					315				320					
Phe	Val	Lys	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ser	Asn	Asp	Val	Glu	Ala	Ala				
			325					330					335						
Phe	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Thr	Asn	Gly	Lys	Tyr				
			340					345					350						
Ser	Asp	Ile	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Leu	Gly	Gly				
	355						360						365						
Asp	Ala	Ala	Glu	His	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Lys	Asp	Phe	Asp	Val	Ile				
	370					375						380							
Arg	Asn	Val	Ile	Lys	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Arg	Lys	Asn	Pro	Ala				
	385				390					395				400					
Tyr	Pro	Ile	Ser	Tyr	Thr	Ser	Val	Phe	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Ile	Ala				
				405					410					415					
Gly	Val	Asn	Asn	Arg	Thr	Glu	Tyr	Val	Glu	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Tyr				
			420					425					430						
Thr	Ser	Gly	Lys	Ile	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Ala	Tyr	Val	Ala	Gln				
		435					440					445							
Tyr	Glu	Ile	Leu	Trp	Asp	Glu	Ile	Asn	Tyr	Asp	Asp	Lys	Gly	Lys	Glu				
	450					455					460								
Val	Ile	Thr	Lys	Arg	Arg	Trp	Asp	Asn	Asn	Trp	Tyr	Ser	Lys	Thr	Ser				
	465				470					475				480					
Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Ile	Pro	Leu	Gly	Ala	Asn	Ser	Arg	Asn	Ile	Arg				
				485					490					495					
Ile	Met	Ala	Arg	Glu	Cys	Thr	Gly	Leu	Ala	Phe	Glu	Trp	Trp	Arg	Lys				
			500					505						510					

Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
 515 520 525
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu
 530 535 540
 Glu His His His His His His
 545 550

<210> 19
 <211> 551
 5 <212> PRT
 <213> S. pyogenes
 <400> 19

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1 5 10 15
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
 20 25 30
 Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
 35 40 45
 Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
 50 55 60
 Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
 65 70 75 80
 Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
 85 90 95
 Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
 100 105 110
 Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Asn Ile
 115 120 125
 Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
 130 135 140
 Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn
 145 150 155 160
 Lys Pro Asp Ala Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
 165 170 175
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
 180 185 190
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
 195 200 205
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr
 210 215 220
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn
 225 230 235 240
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser
 245 250 255
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile
 260 265 270
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe
 275 280 285
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn
 290 295 300
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
 305 310 315 320
 Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
 325 330 335
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr
 340 345 350
 Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
 355 360 365
 Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
 370 375 380

Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala
 385 390 395 400
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
 405 410 415
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
 420 425 430
 Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
 435 440 445
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asn Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu
 450 455 460
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser
 465 470 475 480
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg
 485 490 495
 Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys
 500 505 510
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
 515 520 525
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu
 530 535 540
 Glu His His His His His His
 545 550

<210> 20
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 20

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1 5 10 15
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
 20 25 30
 Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
 35 40 45
 Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
 50 55 60
 Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
 65 70 75 80
 Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
 85 90 95
 Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
 100 105 110
 Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile
 115 120 125
 Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
 130 135 140
 Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn
 145 150 155 160
 Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
 165 170 175
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
 180 185 190
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
 195 200 205
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr
 210 215 220
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn
 225 230 235 240
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser
 245 250 255

10

Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile
 260 265 270
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe
 275 280 285
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn
 290 295 300
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
 305 310 315 320
 Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
 325 330 335
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr
 340 345 350
 Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
 355 360 365
 Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
 370 375 380
 Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala
 385 390 395 400
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
 405 410 415
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
 420 425 430
 Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
 435 440 445
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu
 450 455 460
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser
 465 470 475 480
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg
 485 490 495
 Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys
 500 505 510
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
 515 520 525
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 530 535 540

<210> 21
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 21

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
 20 25 30
 Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu
 35 40 45
 Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln
 50 55 60
 Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
 65 70 75 80
 Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
 85 90 95
 Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
 100 105 110
 Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
 115 120 125
 Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
 130 135 140

10

Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
 165 170 175
 Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
 180 185 190
 Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
 195 200 205
 Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
 210 215 220
 Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
 245 250 255
 Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
 260 265 270
 Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
 275 280 285
 Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
 290 295 300
 Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
 305 310 315 320
 Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
 325 330 335
 Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
 340 345 350
 Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
 355 360 365
 Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
 370 375 380
 Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
 385 390 395 400
 His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
 405 410 415
 Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
 420 425 430
 Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
 435 440 445
 Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
 450 455 460
 Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
 465 470 475 480
 Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
 485 490 495
 Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
 500 505 510
 Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
 515 520 525
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
 530 535 540
 Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 565 570

<210> 22
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 22

Met	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Phe	Lys	Lys	Tyr	Ser	Arg	Val	Ala	Gly	Leu
1				5					10					15	
Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Ile	Ile	Gly	Asn	Leu	Val	Thr	Ala	Asn	Ala	Glu
			20					25					30		
Ser	Asn	Lys	Gln	Asn	Thr	Ala	Ser	Thr	Glu	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu
		35					40						45		
Gln	Pro	Lys	Pro	Glu	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Thr	Glu	Lys	Ala	Gly	Gln
	50					55					60				
Lys	Thr	Asp	Asp	Met	Leu	Asn	Ser	Asn	Asp	Met	Ile	Lys	Leu	Ala	Pro
65					70					75					80
Lys	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Ser	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Lys	Lys	Ser	Glu
				85					90					95	
Asp	Lys	Lys	Lys	Ser	Glu	Glu	Asp	His	Thr	Glu	Glu	Ile	Asn	Asp	Lys
			100					105					110		
Ile	Tyr	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asn	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Ala	Lys	Asn	Gly
		115					120					125			
Glu	Thr	Ile	Glu	Asn	Phe	Val	Pro	Lys	Glu	Gly	Val	Lys	Lys	Ala	Asp
						135					140				
Lys	Phe	Ile	Val	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys	Lys	Asn	Ile	Asn	Thr	Thr	Pro
145					150					155					160
Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Arg	Thr	Tyr	Pro	Ala
				165					170					175	
Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Asn	Lys	Gly	Phe	Thr	Glu	Asn	Lys	Pro	Asp	Ala
			180					185					190		
Val	Val	Thr	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Lys	Ile	His	Ile	Asp	Leu	Pro	Gly
		195					200					205			
Met	Gly	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Glu	Val	Asn	Asp	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asn
						215					220				
Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Val	Asn	Gln	Trp	His	Asp	Asn	Tyr
225					230					235					240
Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Ala	Arg	Thr	Gln	Tyr	Thr	Glu	Ser	Met
				245					250					255	
Val	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Asn	Val	Asn	Ser	Lys
			260					265					270		
Ile	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Ser	Ile	Ser	Lys	Gly
		275				280						285			
Glu	Lys	Lys	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Lys	Gln	Ile	Phe	Tyr	Thr	Val
					295						300				
Ser	Ala	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Asp	Lys	Ser	Val
305					310					315					320
Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	Gly	Val	Ser	Asn	Glu	Ala	Pro	Pro
				325					330					335	
Leu	Phe	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Thr	Val	Phe	Val	Lys	Leu
			340					345					350		
Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ser	Asn	Asp	Val	Glu	Ala	Ala	Phe	Ser	Ala	Ala
		355					360					365			
Leu	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Thr	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ser	Asp	Ile	Leu
		370				375					380				
Glu	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	Ala	Ala	Glu
385					390					395					400
His	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Lys	Asp	Phe	Asp	Val	Ile	Arg	Asn	Val	Ile
				405					410					415	
Lys	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Arg	Lys	Asn	Pro	Ala	Tyr	Pro	Ile	Ser
			420					425					430		
Tyr	Thr	Ser	Val	Phe	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Ile	Ala	Gly	Val	Asn	Asn
		435					440					445			
Arg	Thr	Glu	Tyr	Val	Glu	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys
		450				455					460				
Ile	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Ala	Tyr	Val	Ala	Gln	Tyr	Glu	Ile	Leu
465					470					475					480
Trp	Asp	Glu	Ile	Asn	Tyr	Asp	Asp	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Ile	Thr	Lys

ES 2 391 695 T3

```

          485          490          495
Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
          500          505          510
Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
          515          520          525
Glu Gly Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
          530          535          540
Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
          545          550          555          560
Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
          565          570

```

<210> 23
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

 <400> 23

5

```

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
  1      5      10
Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
          20          25          30
Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu
          35          40          45
Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln
          50          55          60
Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
          65          70          75          80
Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
          85          90          95
Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
          100          105          110
Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
          115          120          125
Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
          130          135          140
Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
          145          150          155          160
Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
          165          170          175
Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
          180          185          190
Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly
          195          200          205
Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
          210          215          220
Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
          225          230          235          240
Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met Val
          245          250          255
Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys Ile
          260          265          270
Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly Glu
          275          280          285
Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val Ser
          290          295          300
Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val Thr
          305          310          315          320
Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro Leu
          325          330          335
Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu Glu

```

10

```

          340          345          350
Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala Leu
      355          360          365
Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu Glu
      370          375          380
Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu His
385          390          395          400
Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile Lys
      405          410          415
Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser Tyr
      420          425          430
Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn Arg
      435          440          445
Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys Ile
      450          455          460
Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu Trp
465          470          475          480
Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys Arg
      485          490          495
Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr Val
      500          505          510
Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg Glu
      515          520          525
Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu Arg
      530          535          540
Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser Thr
545          550          555          560
Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
      565          570

```

<210> 24
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 24

```

Met Ser Asn Lys Lys Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Arg Val Ala Gly Leu
 1          5          10          15
Leu Thr Ala Ala Leu Ile Ile Gly Asn Leu Val Thr Ala Asn Ala Glu
      20          25          30
Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Asn Glu
      35          40          45
Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu Lys Ala Gly Gln
      50          55          60
Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro
      65          70          75          80
Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu
      85          90          95
Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys
      100          105          110
Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly
      115          120          125
Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp
      130          135          140
Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro
      145          150          155          160
Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala
      165          170          175
Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala
      180          185          190
Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly

```

10

```

          195                200                205
Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn
  210                215                220
Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr
  225                230                235
Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met
          245                250                255
Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys
          260                265                270
Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly
          275                280                285
Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val
          290                295                300
Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val
  305                310                315
Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro
          325                330                335
Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu
          340                345                350
Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala
          355                360                365
Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu
          370                375                380
Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu
  385                390                395
His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile
          405                410                415
Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser
          420                425                430
Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn
          435                440                445
Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
          450                455                460
Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu
  465                470                475
Trp Asn Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys
          485                490                495
Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr
          500                505                510
Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg
          515                520                525
Glu Cys Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu
          530                535                540
Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser
  545                550                555
Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
          565                570

```

<210> 25
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 25

```

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
  1          5          10          15
Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
          20          25          30
Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
          35          40          45
Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu

```

10

50					55						60					
Lys	Lys	Ser	Glu	Asp	Lys	Lys	Lys	Ser	Glu	Glu	Asp	His	Thr	Glu	Glu	
65					70					75					80	
Ile	Asn	Asp	Lys	Ile	Tyr	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asn	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	
				85					90					95		
Ala	Lys	Asn	Gly	Glu	Thr	Ile	Glu	Asn	Phe	Val	Pro	Lys	Glu	Gly	Val	
			100					105					110			
Lys	Lys	Ala	Asp	Lys	Phe	Ile	Val	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys	Lys	Asn	Ile	
		115					120					125				
Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Arg	
	130					135					140					
Thr	Tyr	Pro	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Asn	Lys	Gly	Phe	Thr	Glu	Asn	
145					150					155					160	
Lys	Pro	Asp	Ala	Val	Val	Thr	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Lys	Ile	His	Ile	
				165					170					175		
Asp	Leu	Pro	Gly	Met	Gly	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Glu	Val	Asn	Asp	Pro	
			180					185					190			
Thr	Tyr	Ala	Asn	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Val	Asn	Gln	Trp	
	195						200					205				
His	Asp	Asn	Tyr	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Ala	Arg	Thr	Gln	Tyr	
	210					215					220					
Thr	Glu	Ser	Met	Val	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Asn	
225					230					235					240	
Val	Asn	Ser	Lys	Ile	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Ser	
			245						250					255		
Ile	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Lys	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Lys	Gln	Ile	
			260					265					270			
Phe	Tyr	Thr	Val	Ser	Ala	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	
	275						280					285				
Asp	Lys	Ser	Val	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	Gly	Val	Ser	Asn	
	290					295					300					
Glu	Ala	Pro	Pro	Leu	Phe	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Thr	Val	
305					310					315					320	
Phe	Val	Lys	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ser	Asn	Asp	Val	Glu	Ala	Ala	
			325						330					335		
Phe	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Thr	Asn	Gly	Lys	Tyr	
			340					345					350			
Ser	Asp	Ile	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Leu	Gly	Gly	
	355						360					365				
Asp	Ala	Ala	Glu	His	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Lys	Asp	Phe	Asp	Val	Ile	
	370					375					380					
Arg	Asn	Val	Ile	Lys	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Arg	Lys	Asn	Leu	Ala	
385					390					395					400	
Tyr	Pro	Ile	Ser	Tyr	Thr	Ser	Val	Phe	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Ile	Ala	
			405						410					415		
Gly	Val	Asn	Asn	Arg	Thr	Glu	Tyr	Val	Glu	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Tyr	
			420					425					430			
Thr	Ser	Gly	Lys	Ile	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Ala	Tyr	Val	Ala	Gln	
		435					440					445				
Tyr	Glu	Ile	Leu	Trp	Asp	Glu	Ile	Asn	Tyr	Asp	Asp	Lys	Gly	Lys	Glu	
	450					455					460					
Val	Ile	Thr	Lys	Arg	Arg	Trp	Asp	Asn	Asn	Trp	Tyr	Ser	Lys	Thr	Ser	
465					470					475					480	
Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Ile	Pro	Leu	Gly	Ala	Asn	Ser	Arg	Asn	Ile	Arg	
				485					490					495		
Ile	Met	Ala	Arg	Glu	Cys	Thr	Gly	Leu	Ala	Phe	Glu	Trp	Trp	Arg	Lys	
			500					505					510			
Val	Ile	Asp	Glu	Arg	Asp	Val	Lys	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Asn	Val	Asn	
		515					520					525				
Ile	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr	Lys		
		530					535					540				

<210> 26
 <211> 543
 <212> PRT

<213> S. pyogenes

<400> 26

```

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1      5      10      15
Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
 20      25      30
Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
 35      40      45
Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
 50      55      60
Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
 65      70      75      80
Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
 85      90      95
Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
100      105      110
Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile
115      120      125
Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
130      135      140
Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn
145      150      155      160
Lys Pro Asp Ala Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
165      170      175
Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
180      185      190
Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
195      200      205
His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr
210      215      220
Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn
225      230      235      240
Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser
245      250      255
Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile
260      265      270
Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe
275      280      285
Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn
290      295      300
Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
305      310      315      320
Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
325      330      335
Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr
340      345      350
Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
355      360      365
Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
370      375      380
Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala
385      390      395      400
Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
405      410      415
Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
420      425      430

```

Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
 435 440 445
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu
 450 455 460
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser
 465 470 475 480
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg
 485 490 495
 Ile Met Ala Arg Glu Gly Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys
 500 505 510
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
 515 520 525
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 530 535 540

<210> 27
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

5

<400> 27

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1 5 10 15
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
 20 25 30
 Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
 35 40 45
 Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
 50 55 60
 Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
 65 70 75 80
 Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
 85 90 95
 Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
 100 105 110
 Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile
 115 120 125
 Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
 130 135 140
 Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn
 145 150 155 160
 Lys Pro Asp Ala Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
 165 170 175
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
 180 185 190
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
 195 200 205
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr
 210 215 220
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn
 225 230 235 240
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser
 245 250 255
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile
 260 265 270
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe
 275 280 285
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn
 290 295 300
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
 305 310 315 320

10

Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
 325 330 335
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr
 340 345 350
 Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
 355 360 365
 Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
 370 375 380
 Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala
 385 390 395 400
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
 405 410 415
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
 420 425 430
 Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
 435 440 445
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu
 450 455 460
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser
 465 470 475 480
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg
 485 490 495
 Ile Met Ala Arg Glu Gly Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys
 500 505 510
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
 515 520 525
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys
 530 535 540

- <210> 28
- <211> 1632
- <212> ADN
- <213> S. pyogenes

- <400> 28

atggttagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtagac aaaccacaac gacaaatgag 60
 caaccaaacg cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
 atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctgca 180
 gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
 atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300
 gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgtaaga aagctgataa atttattgtc 360
 attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
 gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480
 aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga ttaccagggt 540
 atgggagaca aagcaacggt tgaggccaat gaccctacct atgccaatgt tcaacagct 600
 attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtaatac gcttcctgcc 660
 agaacacaa atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaggc agctctaaat 720
 gttaatagca aaatcttaga tggtacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaagggt 780
 gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatttttt acaccgtatc agcaaacctt 840
 cctaataatc ctgcggtatg gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900
 ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960
 tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgtagct 1020
 ctaaaaggaa cagatggtta aactaatgga aaatattctg atatcttaga aaatagctca 1080
 tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
 tttgatgta ttagaaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaacctagct 1200
 tatcctatct catacaccag tgttttcctt aaaaataata aaattgctgg tgcaataaac 1260
 agaactgaat acggtgaaac aacatctacc gagtacacta gtggaaaaat taacctgtct 1320
 catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380
 aaaggtaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
 ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgat catggctaga 1500
 gagtgactg gcttagcttg ggaatggtg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560

ctgtctaaag aaatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620
 acttataagt ag 1632

5

10

ES 2 391 695 T3

<210> 29
 <211> 1632
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes

5

<400> 29

```

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtagcag aaaccacaac gacaaatgag 60
caaccaaacg cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctgca 180
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300
gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgtaaga aagctgataa atttattgtc 360
attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480
aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
atgggagaca aagcaacggt tgaggtaaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggaatac gcttcctgcc 660
agaacacaaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaggc agctctaaat 720
gttaatagca aaatcttaga tggtagctta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780
gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatttttt acaccgtatc agcaaacctt 840
cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900
gggtgcagca atgaagctcc gccactctt gtgagtaacg tagcctatgg tccaactggt 960
tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020
ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aaatattctg atatcttaga aaatagctca 1080
tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
tttgatgtta ttagaaacgt tatcaaaagc aatgctacct tcagtagaaa aaacctagct 1200
tatcctattt catacaccag tgttttcctt aaaaataata aaattgctgg tgtcaataac 1260
agaactgaat acgttgaac aacatctacc gagtagacta gtggaaaaat taacctgtct 1320
catcaaggcg cgtatgttc tcaatataaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380
aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500
gagggcactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560
ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620
acttataagt ga 1632
    
```

10

<210> 30
 <211> 1632
 <212> ARN
 <213> S. pyogenes

15

<400> 30

ES 2 391 695 T3

```

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtagag aaaccacaac gacaaatgag 60
caaccaaaagc cagaaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctccaaaag aaatgccact agaactctga 180
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300
gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360
attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480
aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccagggt 540
atggggagaca aagcaacggt tgagggtcaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtaatcc gcttcctgcc 660
agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agatgaggc agctctaaat 720
gttaatagca aaatcttaga tggtacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaagg 780
gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatttttt acaccgtatc agcaaacctt 840
cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900
ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960
tttqtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgacgct 1020

```

```

ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aatattctg atatcttaga aaatagctca 1080
tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
tttgatgta ttagaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaacctagct 1200
tatcctattt catacaccag tgttttcctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260
agaactgaat acgttgaaac aacatctacc gagtacctta gtggaaaaat taacctgtct 1320
catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380
aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
ccatthagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500
gagggcactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560
ctgtctaaag aaatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620
acttataagt ga 1632

```

<210> 31
 <211> 1632
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes

<400> 31

5

ES 2 391 695 T3

```

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60
caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaatctgca 180
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300
gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360
attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480
aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
atgggagaca aagcaacggt tgaggccaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtaacac gcttctgcc 660
agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaggc agctctaat 720
gttaatagca aaatcttaga ttggtacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaagg 780
gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatttttt acaccgtatc agcaaacctt 840
cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900
ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960
tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020
ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aatattctg atatcttaga aaatagctca 1080
tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
tttgatgtta ttagaaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagttagaa aaacctagct 1200
tatcctatct catacaccag tgttttcctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260
agaactgaat acgttgaaac aacatctacc gagtacacta gtggaaaaaat taacctgtct 1320
catcaaggcg cgtatggtgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380
aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500
gagtgactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560
ctgtctaaag aaatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcagat 1620
acttataagt ag 1632

```

<210> 32
 <211> 1632
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes

 <400> 32

5

```

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60
caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaatctgca 180
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300
gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360
attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480

```

10

```

aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
atgggagaca aagcaacggt tgaggtcaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtaatag gcttcctgcc 660
agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaggc agctctaaat 720
gttaatagca aaatcttaga tggtaactta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780
gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatttttt acaccgtatc agcaaacctt 840
cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900
ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960
tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020
ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aaatattctg atatcttaga aaatagctca 1080
tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
tttgatgtta ttagaaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaacctagct 1200
tatcctatct catacaccag tgttttcctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260
agaactgaat acgttgaaac aacatctacc gagtacacta gtggaaaaat taacctgtct 1320
catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380
aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500
gagggcactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560
ctgtctaaag aaatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620
acttataagt ag                                     1632

```

<210> 33
 <211> 1632
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes

5

<400> 33

```

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtcag aaaccacaac gacaaatgag 60
caaccaaacg cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctgca 180
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
atcaatgaca agatttatct actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300
gaaaccattg aaaattttgt tcttaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360
attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
gtcactgata ggacctatcc agcagcctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480
aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
atgggagaca aagcaacggt tgaggtcaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtaatag gcttcctgcc 660
agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaggc agctctaaat 720
gttaatagca aaatcttaga tggtaactta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780
gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatttttt acaccgtatc agcaaacctt 840
cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900
ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960
tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020
ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aaatattctg atatcttaga aaatagctca 1080
tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
tttgatgtta ttagaaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaacctagct 1200
tatcctatct catacaccag tgttttcctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260
agaactgaat acgttgaaac aacatctacc gagtacacta gtggaaaaat taacctgtct 1320
catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380
aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500
gagggcactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560
ctgtctaaag aaatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620
acttataagt ga                                     1632

```

<210> 34
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes

10

<400> 34

15

ES 2 391 695 T3

```

gtcgcgtgcta gcgaatcgaa caaacaaaac actgc      35
<210> 35
<211> 42
5 <212> ADN
   <213> S. pyogenes

<400> 35
gcattcgatc ctcgagctac ttataagtaa tcgaaccata tg      42
10
<210> 36
<211> 45
<212> ADN
15 <213> S. pyogenes

<400> 36
gctaccttca gtgaaaaaaa cctagcttat cctatttcat acacc      45
20
<210> 37
<211> 45
<212> ADN
<213> S. pyogenes

<400> 37
25 ggtgatgaa ataggataag ctaggttttt tctactgaag gtagc      45

<210> 38
<211> 41
<212> ADN
30 <213> S. pyogenes

<400> 38
gcattcgatc ctcgagctta taagtaatcg aaccatattg g      41
35
<210> 39
<211> 42
<212> ADN
<213> S. pyogenes

40 <400> 39
gagtgcactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaagtga tc      42

<210> 40
<211> 42
45 <212> ADN
   <213> S. pyogenes

<400> 40
50 gatcactttt cgccaccatt cgaaagctaa gccagtgcac tc      42

<210> 41
<211> 55
<212> ADN
55 <213> S. pyogenes

<400> 41
gftgctcaat atgaaatcct ttggaatgaa atcaattatg atgacaaagg aaaag 55
60
<210> 42
<211> 55
<212> ADN
<213> S. pyogenes

65 <400> 42
cttttccttt gtcacataa ttgatttcat tccaaaggat tcatattga gcaac      55

```

ES 2 391 695 T3

<210> 43
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes
 5
 <400> 43
 ccgtatcatg gctagagagg gcactggctt agcttgggaa tg 42
 <210> 44
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes
 10
 <400> 44
 cattccaag ctaagccagt gcctctcta gccatgatac gg 42
 <210> 45
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes
 20
 <400> 45
 gtgcgtgcta gcgaatcgaa caaacaaaac 30
 <210> 46
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes
 25
 <400> 46
 gcgtctcgag tcactataa gtaatcgaa cata 34
 <210> 47
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes
 35
 <400> 47
 ccgtatcatg qctagagagg gcactggctt agcttfcgaa tg 42
 <210> 48
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes
 40
 <400> 48
 cattcgaag ctaagccagt gcctctcta gccatgatac gg 42
 <210> 49
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes
 45
 <400> 49
 ctggtgtaa tacgcttct agaacacaat atactgaatc aatgg 45
 <210> 50
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes
 50
 <400> 50
 ccattgattc agtatattgt gttctaggaa gcgtattacc accag 45
 <210> 51
 <211> 1656
 60
 65

ES 2 391 695 T3

<212> ADN
 <213> S. pyogenes

<400> 51

5

```

atggctagcg aatcgaaaca acaaaacact gctagtagag aaaccacaac gacaaatgag 60
caaccaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gtcccaaag aaatgccact agaactctgca 180
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300
gaaaccattg aaaaatttgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360
attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaagggtt taccgaaaac 480
aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
atgggagaca aagcaacggt tgaggccaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggaataac gcttctctgcc 660
agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaagc agctctaaat 720
gttaatagca aaatcttaga tggtaactta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780
gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatttttt acaccgtatc agcaaactt 840
cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcgggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaa 900
gggtgtagca atgaaactcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaaactggt 960
tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020
ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aatattctg atattctaga aatagctca 1080
tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
tttgatgtta ttagaaacgt tatcaagac aatgctacct tcagtagaaa aaaccagct 1200
tatcctattt catacaccag tgttttccct aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260
agaactgaat acgttgaaac aacatctacc gagtacacta gtggaaaaat taacctgtct 1320
catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380
aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500
gagtgcactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560
ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620
acttataagc tcgagcacca ccaccaccac cactga 1656
    
```

<210> 52
 <211> 1656
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes

10

<400> 52

ES 2 391 695 T3

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtagag aaaccacaac gacaaatgag 60
 caaccaaacg .cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
 atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctga 180
 gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
 atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300
 gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcggttaaga aagctgataa atttattgtc 360
 attgaaagaa agaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
 gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480
 aaaccagagc cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
 atgggagaca aagcaacggt tgaggccaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
 attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtataac gcttctctgc 660

agaacacaaat atactgaatc aatgggtatat tctaagtcac agattgaagc agctctaaat 720
 gttaatagca aaatcctaga tggtagcttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaagg 780
 gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatttttt acaccgtatc agcaaacctt 840
 cctaataatc ctgaggatgt gtttgataaa tcggtagacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900
 ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960
 tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatggtg aagcggcctt tagtgcagct 1020
 ctaaaaggaa cagatgtaa aactaatgga aaatattctg atatcttaga aaatagctca 1080
 tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
 tttgatgta ttagaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagttagaa aaaccagct 1200
 tatcctatct catacaccag tgttttcctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260
 agaactgaat acggtgaaac aacatctacc gagtacacta gtggaaaaat taacctgtct 1320
 catcaaggcg cgtatggtgc tcaatatgaa atcctttgga atgaaatcaa ttatgatgac 1380
 aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
 ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500
 gagtgcactg gcttagcttt cgaatggtgg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560
 ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcagatt 1620
 acttataagc tcgagcacca ccaccaccac cactga 1656

- <210> 53
- <211> 551
- <212> PRT
- <213> S. pyogenes

- <400> 53

5

ES 2 391 695 T3

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
1 5 10 15
Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
20 25 30
Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
35 40 45
Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
50 55 60
Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
65 70 75 80
Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
85 90 95
Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
100 105 110
Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Asn Ile
115 120 125
Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
130 135 140
Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn
145 150 155 160
Lys Pro Asp Ala Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
165 170 175
Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
180 185 190
Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
195 200 205
His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr
210 215 220
Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn
225 230 235 240
Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser
245 250 255
Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile
260 265 270
Thr Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe
275 280 285
Lys Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn


```

      290          295          300
Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
305          310          315
Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
          325          330          335
Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr
          340          345          350
Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
          355          360          365
Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
          370          375          380
Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala
          385          390          395          400
Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
          405          410          415
Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
          420          425          430
Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
          435          440          445
Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu
          450          455          460
Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser
          465          470          475          480
Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg
          485          490          495
Ile Met Ala Arg Glu Gly Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys
          500          505          510
Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
          515          520          525
Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu
          530          535          540
Glu His His His His His
          545          550

```

<210> 54
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

 <400> 54

5

```

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1          5          10          15
Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu
          20          25          30
Lys Ala Gly Gln Lys Thr Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile
          35          40          45
Lys Leu Ala Pro Lys Glu Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu
          50          55          60
Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu
          65          70          75          80
Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu
          85          90          95
Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val
          100          105          110
Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile
          115          120          125
Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg
          130          135          140
Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn
          145          150          155          160

```

10

Lys Pro Asp Ala Val Val Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile
 165 170 175
 Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro
 180 185 190
 Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp
 195 200 205
 His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr
 210 215 220
 Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn
 225 230 235 240
 Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser
 245 250 255
 Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile
 260 265 270
 Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe
 275 280 285
 Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys Glu Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn
 290 295 300
 Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val
 305 310 315 320
 Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala
 325 330 335
 Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr
 340 345 350
 Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
 355 360 365
 Asp Ala Ala Glu His Asn Lys Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile
 370 375 380
 Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Leu Ala
 385 390 395 400
 Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala
 405 410 415
 Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr
 420 425 430
 Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu Ser His Gln Gly Ala Tyr Val Ala Gln
 435 440 445
 Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu
 450 455 460
 Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser
 465 470 475 480
 Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg
 485 490 495
 Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala Phe Glu Trp Trp Arg Lys
 500 505 510
 Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
 515 520 525
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu
 530 535 540
 Glu His His His His His His
 545 550

<210> 55
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> S. pyogenes

<400> 55

Met Ala Ser Glu Ser Asn Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr
 1 5 10 15
 Thr Thr Asn Glu Gln Pro Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Thr Glu

5

10

			20					25				30			
Lys	Ala	Gly	Gln	Lys	Thr	Asp	Asp	Met	Leu	Asn	Ser	Asn	Asp	Met	Ile
		35					40					45			
Lys	Leu	Ala	Pro	Lys	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Ser	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu
	50					55					60				
Lys	Lys	Ser	Glu	Asp	Lys	Lys	Lys	Ser	Glu	Glu	Asp	His	Thr	Glu	Glu
65					70					75					80
Ile	Asn	Asp	Lys	Ile	Tyr	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asn	Glu	Leu	Glu	Val	Leu
				85					90						95
Ala	Lys	Asn	Gly	Glu	Thr	Ile	Glu	Asn	Phe	Val	Pro	Lys	Glu	Gly	Val
			100					105						110	
Lys	Lys	Ala	Asp	Lys	Phe	Ile	Val	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys	Lys	Asn	Ile
		115						120						125	
Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Ile	Asp	Ser	Val	Thr	Asp	Arg
	130					135						140			
Thr	Tyr	Pro	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Asn	Lys	Gly	Phe	Thr	Glu	Asn
145					150										160
Lys	Pro	Asp	Ala	Val	Val	Thr	Lys	Arg	Asn	Pro	Gln	Lys	Ile	His	Ile
				165					170						175
Asp	Leu	Pro	Gly	Met	Gly	Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Glu	Val	Asn	Asp	Pro
			180					185						190	
Thr	Tyr	Ala	Asn	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Val	Asn	Gln	Trp
	195							200						205	
His	Asp	Asn	Tyr	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Ala	Arg	Thr	Gln	Tyr
	210					215						220			
Thr	Glu	Ser	Met	Val	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Asn
225					230						235				240
Val	Asn	Ser	Lys	Ile	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Ser
				245					250						255
Ile	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Lys	Val	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr	Lys	Gln	Ile
			260					265							270
Phe	Tyr	Thr	Val	Ser	Ala	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Asp	Val	Phe
		275					280							285	
Asp	Lys	Ser	Val	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	Gly	Val	Ser	Asn
	290					295						300			
Glu	Ala	Pro	Pro	Leu	Phe	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Thr	Val
305					310						315				320
Phe	Val	Lys	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ser	Asn	Asp	Val	Glu	Ala	Ala
				325						330					335
Phe	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Lys	Thr	Asn	Gly	Lys	Tyr
			340					345							350
Ser	Asp	Ile	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Leu	Gly	Gly
		355						360							365
Asp	Ala	Ala	Glu	His	Asn	Lys	Val	Val	Thr	Lys	Asp	Phe	Asp	Val	Ile
	370					375						380			
Arg	Asn	Val	Ile	Lys	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Arg	Lys	Asn	Leu	Ala
385					390						395				400
Tyr	Pro	Ile	Ser	Tyr	Thr	Ser	Val	Phe	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Ile	Ala
				405					410						415
Gly	Val	Asn	Asn	Arg	Thr	Glu	Tyr	Val	Glu	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Tyr
				420					425						430
Thr	Ser	Gly	Lys	Ile	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Gly	Ala	Tyr	Val	Ala	Gln
		435						440							445
Tyr	Glu	Ile	Leu	Trp	Asp	Glu	Ile	Asn	Tyr	Asp	Asp	Lys	Gly	Lys	Glu
	450					455						460			
Val	Ile	Thr	Lys	Arg	Arg	Trp	Asp	Asn	Asn	Trp	Tyr	Ser	Lys	Thr	Ser
465					470						475				480
Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Ile	Pro	Leu	Gly	Ala	Asn	Ser	Arg	Asn	Ile	Arg
				485						490					495
Ile	Met	Ala	Arg	Glu	Gly	Thr	Gly	Leu	Ala	Phe	Glu	Trp	Trp	Arg	Lys
			500					505							510

ES 2 391 695 T3

Val Ile Asp Glu Arg Asp Val Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn
 515 520 525
 Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys Leu
 530 535 540
 Glu His His His His His His
 545 550

<210> 56
 <211> 1656
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes

5

<400> 56

```

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60
caaccaaacg cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctgca 180
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
atcaatgaca agatttatcc actaaattat aatgagcttg aagctactgc taaaaatggt 300
gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgtaaga aagctgataa atttattgtc 360
attgaaagaa agaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaagggtt taccgaaaac 480
aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
atgggagaca aagcaacggt tgaggtaaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggaatac gcttctgcc 660
agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaggc agctcctaat 720
gtaaatagca aaatcttaga tggacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaagggt 780
gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaattttt acaccgtatc agcaaacctt 840
cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900
gggtgcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960
tttgcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020
ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aaatattctg atatcttaga aaatagctca 1080
tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
tttgatgta ttagaacgt tatcaagac aatgctacct tcagtagaaa aaacctagct 1200
tatctatatt cataccag tgtttctctt aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260
agaactgaat acgttgaaac aacatctacc gagtacctg gtggaaaaat taacctgtct 1320
catcaaggcg cgtatgttc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380
aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
ccatttagca cagttatccc actagtagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500
gagtgactg gcttagcttg ggaatggtg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560
ctgtctaaag aaatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620
acttataagc tcgagcacca ccaccaccac cactga 1656
    
```

10

<210> 57
 <211> 1656
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes

15

<400> 57

```

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60
caaccaaacg cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctgca 180
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
atcaatgaca agatttatcc actaaattat aatgagcttg aagctactgc taaaaatggt 300
gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgtaaga aagctgataa atttattgtc 360
attgaaagaa agaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaagggtt taccgaaaac 480
aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
atgggagaca aagcaacggt tgaggtaaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggaatac gcttctgcc 660
agaacacaat atactgaatc aatggtatat tctaagtcac agattgaagc agctcctaat 720
    
```

ES 2 391 695 T3

```

gtaaatagca aatccttaga. tggacttta ggcattgatt tcaagtcgat ttcaaaaggt 780
gaaaagaagg tgatgattgc agcatacaag caaatttttt acaccgtatc agcaaaccct 840
cctaataatc ctgcggatgt gtttgataaa tcggtgacct ttaaagagtt gcaacgaaaa 900
ggtgtcagca atgaagctcc gccactcttt gtgagtaacg tagcctatgg tcgaactggt 960
tttgtcaaac tagaaacaag ttctaaaagt aatgatgttg aagcggcctt tagtgcagct 1020
ctaaaaggaa cagatgttaa aactaatgga aatattctg atatccttaga aaatagctca 1080
tttacagctg tcgttttagg aggagatgct gcagagcaca ataaggtagt cacaaaagac 1140
tttgatgtta ttgaaacgt tatcaaagac aatgctacct tcagtagaaa aaaccagct 1200
tacctatctt catacaccag tgttttccct aaaaataata aaattgcggg tgtcaataac 1260
agaactgaat acgttgaaac aacatctacc gagtactacta gtggaaaaat taacctgtct 1320
catcaaggcg cgtatgttgc tcaatatgaa atcctttggg atgaaatcaa ttatgatgac 1380
aaaggaaaag aagtgattac aaaacgacgt tgggacaaca actggtatag taagacatca 1440
ccatttagca cagttatccc actaggagct aattcacgaa atatccgtat catggctaga 1500
gagggcactg gcttagcttg ggaatgggtg cgaaaagtga tcgacgaaag agatgtgaaa 1560
ctgtctaaag aatcaatgt caatatctca ggatcaacct tgagcccata tggttcgatt 1620
acttataagc tcgagcacca ccaccaccac cactga 1656

```

<210> 58
 <211> 1653
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes
 <400> 58

5

```

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtcag aaaccacaac gacaaatgag 60
caaccaaacg cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aaatgccact agaactctgca 180
gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300
gaaaccattg aaaattttgt tcctaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360
attgaaagaa agaaaaaaa tatcaacact acaccagctg atatttccat tattgacct 420
gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaagttt taccgaaaac 480
aaaccagacg cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga tttaccaggt 540
atgggagaca aagcaacggt tgaggccaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggaatac gcttccctaga 660
acacaatata ctgaatcaat ggtatattct aagtcacaga ttgaagcagc tctaaatggt 720
aatagcaaaa tcttagatgg tacttttagc attgatttca agtcgatttc aaaaggtgaa 780
aagaaggtga tgattgcagc atacaagcaa attttttaca ccgtatcagc aaaccttct 840
aataatcctg cggatgtgtt tgataaatcg gtgacctta aagagttgca acgaaaaggt 900
gtcagcaatg aagctccgcc actctttgtg agtaacgtag cctatggtcg aactgtttt 960
gtcaaactag aaacaagttc taaaagtaat gatgttgaag cggcctttag tgcagctcta 1020
aaaggaaacg atgttaaac taatgaaaa tattctgata tcttagaaaa tagctcattt 1080
acagctgtcg ttttaggagg agatgctgca gagcacaata aggtagtcac aaaagacttt 1140
gatgttatta gaaacgttat caaagacaat gctaccttca gtagaaaaaa cccagcttat 1200
cctatttcat acaccagttt tttccttaa aataataaaa ttgcgggtgt caataacaga 1260
actgaatacg ttgaaacaac atctaccgag tactactagt gaaaaattaa cctgtctcat 1320
caaggcgcgt atgttgetca atatgaaatc ctttgggatg aatcaatta tgatgacaaa 1380
ggaaaagaag tgattacaaa acgacgttgg gacaacaact ggtatagtaa gacatoccca 1440
tttagcacag ttatcccact aggagctaat tcacgaaata tccgtatcat ggtagagag 1500
tgcactggct tagcttggga atggtggcga aaagtgatcg acgaaagaga tgtgaaactg 1560
tctaaagaaa tcaatgtcaa tatctcagga tcaaccttga gcccatatgg ttcgattact 1620
tataagctcg agcaccacca ccaccaccac tga 1653

```

10

<210> 59
 <211> 1653
 <212> ADN
 <213> S. pyogenes
 <400> 59

15

ES 2 391 695 T3

atggctagcg aatcgaacaa acaaaacact gctagtacag aaaccacaac gacaaatgag 60
 caaccaaaagc cagaaagtag tgagctaact actgaaaaag caggtcagaa aacggatgat 120
 atgcttaact ctaacgatat gattaagctt gctcccaaag aatgccact agaatctgca 180

gaaaaagaag aaaaaaagtc agaagacaaa aaaaagagcg aagaagatca cactgaagaa 240
 atcaatgaca agatttattc actaaattat aatgagcttg aagtacttgc taaaaatggt 300
 gaaaccattg aaaattttgt tcttaaagaa ggcgttaaga aagctgataa atttattgtc 360
 attgaaagaa agaaaaaaaa tatcaacact acaccagtcg atatttccat tattgactct 420
 gtcactgata ggacctatcc agcagccctt cagctggcta ataaaggttt taccgaaaac 480
 aaaccagacy cggtagtcac caagcgaaac ccacaaaaaa tccatattga ttaccaggt 540
 atgggagaca aagcaacggt tgaggtaaat gaccctacct atgccaatgt ttcaacagct 600
 attgataatc ttgttaacca atggcatgat aattattctg gtggtataac gcttcctaga 660
 acacaatata ctgaatcaat ggtatattct aagtcacaga ttgaagcagc tctaaatggt 720
 aatagcaaaa tcttagatgg tacttttaggc attgatttca agtcgatttc aaaagggtgaa 780
 aagaagggtga tgattgcagc atacaagcaa attttttaca ccgtatcagc aaaccttcct 840
 aataatcctg cggatgtgtt tgataaatcg gtgaccttta aagagttgca acgaaaagggt 900
 gtcagcaatg aagctccgcc actctttgtg agtaacgtag cctatggtcg aactgttttt 960
 gtcaaaactg aaacaagttc taaaagtaat gatgttgaag cggcctttag tgcagctcta 1020
 aaaggaacag atgttaaaac taatggaaaa tattctgata tcttagaaaa tagctcattt 1080
 acagctgtcg ttttaggagg agatgctgca gagcacaata aggtagtcac aaaagacttt 1140
 gatgttatta gaaacgttat caaagacaat gctaccttca gtgaaaaaa cccagcttat 1200
 cctatttcat acaccagtgt tttccttaaa aataataaaa ttgcgggtgt caataacaga 1260
 actgaatacy ttgaaacaac atctaccgag tacactagtg gaaaaattaa cctgtctcat 1320
 caaggcgcgt atgttgctca atatgaaatc ctttgggatg aatcaatta tgatgacaaa 1380
 ggaaaagaag tgattacaaa acgacgttgg gacaacaact ggtatagtaa gacatcacca 1440
 tttagcacag ttatcccact aggagctaat tcacgaaata tccgtatcat ggctagagag 1500
 tgcaactggct tagcttggga atgggtggcga aaagtgatcg acgaaagaga tgtgaaactg 1560
 tctaaagaaa tcaatgtcaa tatctcagga tcaaccttga gcccatatgg ttcgattact 1620
 tataagctcg agcaccacca ccaccaccac tga 1653

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada según SEC ID N^o: 1, en la que los aminoácidos en las posiciones P427 y W535 están sustituidos con otro aminoácido, y en la que la actividad hemolítica de la proteína SLO mutante se reduce al menos el 50 % con respecto a SLO natural.
- 5 2. Una proteína SLO mutante purificada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N^o: 25 y SEC ID N^o: 27.
3. La proteína SLO mutante purificada de la reivindicación 1 que se acopla a una proteína portadora.
4. La proteína SLO mutante purificada de la reivindicación 3, en la que la proteína portadora está seleccionada del grupo que consiste en una toxina bacteriana, un toxoide bacteriano, una proteína de la membrana externa de *N. meningitidis*, una proteína de choque térmico, una proteína de pertussis, proteína D de *H. influenzae*, una citocina, una linfocina, una hormona, un factor de crecimiento, toxina A de *C. difficile*, toxina B de *C. difficile* y una proteína de captación de hierro.
- 10 5. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína SLO mutante de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.
- 15 6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de secuencias codificantes mostradas en SEC ID N^o: 31 y SEC ID N^o: 33.
7. Una composición de vacuna que comprende:
 - (a) un agente activo seleccionado de:
 - 20 (i) proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada como se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2; y
 - (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada como se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2; y
 - (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La composición de vacuna de la reivindicación 7 que comprende además uno o más agentes activos seleccionados del grupo que consiste en:
 - 25 (iii) un antígeno de GAS;
 - (iv) una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de GAS;
 - (v) un agente activo que es útil en una vacuna pediátrica tal como un antígeno polipeptídico de un patógeno seleccionado del grupo que consiste en *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Moraxella catarrhalis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, virus respiratorio sincitial, virus de la poliomielitis, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubeola y antígenos polipeptídicos de rotavirus, o una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno polipeptídico; y
 - 30 (vi) un agente activo que es útil en una vacuna para ancianos o individuos inmunodeprimidos tal como un antígeno polipeptídico de un patógeno seleccionado del grupo que consiste en *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, antígenos polipeptídicos del virus de la gripe y del virus paragripal, o una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno polipeptídico.
9. Un procedimiento de preparación de una vacuna para la prevención o el tratamiento de infección por *Streptococcus pyogenes* que comprende combinar:
 - 40 (a) un agente activo seleccionado de:
 - (i) una proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada como se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2; y
 - (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada como se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2; y
 - 45 (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el agente activo es la proteína SLO mutante purificada y la proteína SLO mutante se prepara mediante un procedimiento que comprende:
 - (a) cultivar una célula huésped que comprende una construcción de expresión que codifica la proteína SLO mutante; y
 - 50 (b) recuperar la proteína SLO mutante.

11. El procedimiento de la reivindicación 9 que comprende además combinar con el vehículo farmacéuticamente aceptable uno o más agentes activos seleccionados del grupo que consiste en:

- (iii) un antígeno de GAS; y
- (iv) una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de GAS.

5 12. Uso de un agente activo en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir infección por *Streptococcus pyogenes*, en el que el agente activo está seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) una proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada como se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2; y
- (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de estreptolisina O (SLO) mutante purificada

10 como se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2.

13. Una proteína SLO mutante purificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6 para su uso como una vacuna.

14. Una proteína SLO mutante purificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, o una composición de vacuna de la reivindicación 7 o de la

15 reivindicación 8 para su uso en terapia.

15. Una proteína SLO mutante purificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, o una composición de vacuna de la reivindicación 7 o de la reivindicación 8 para tratar o prevenir infección por *Streptococcus pyogenes*.

FIGURA 1



FIGURA 2

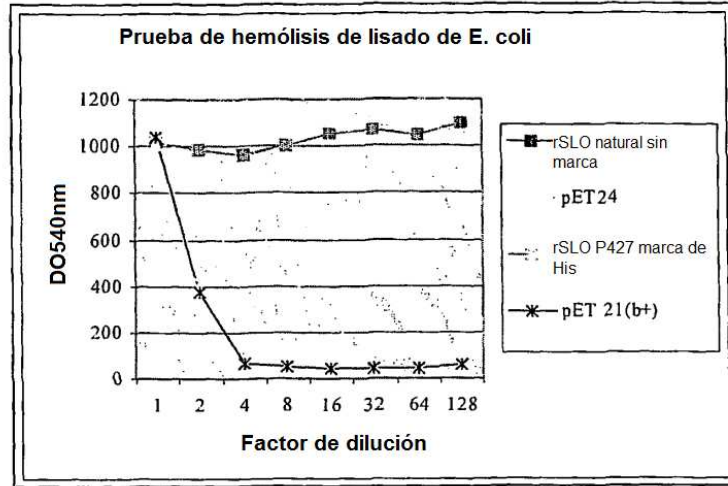


FIGURA 3



FIGURA 4

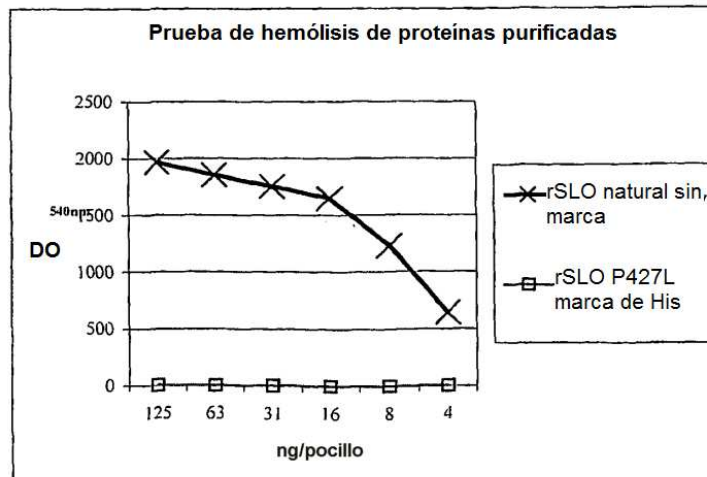
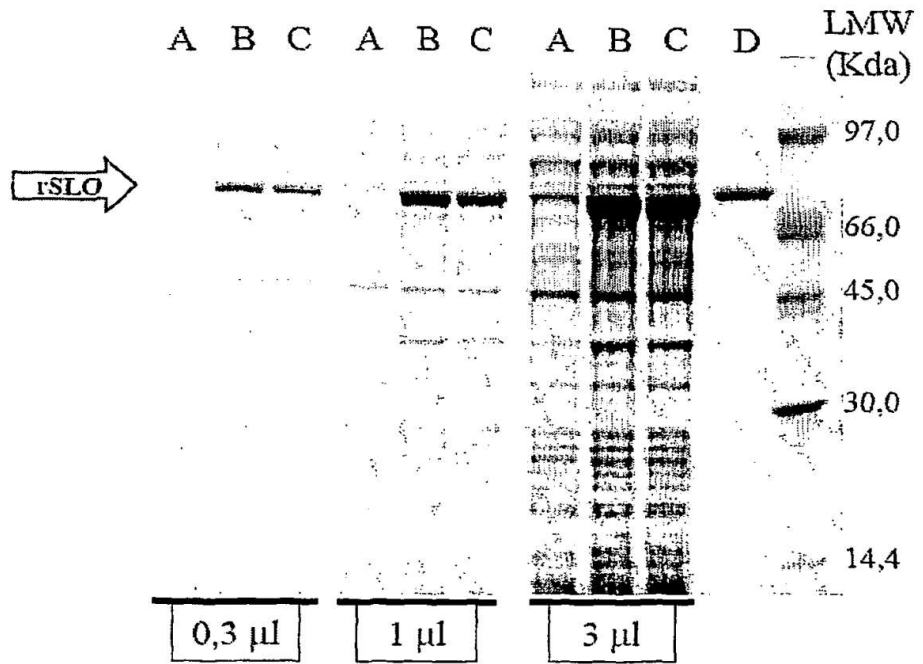


FIGURA 5



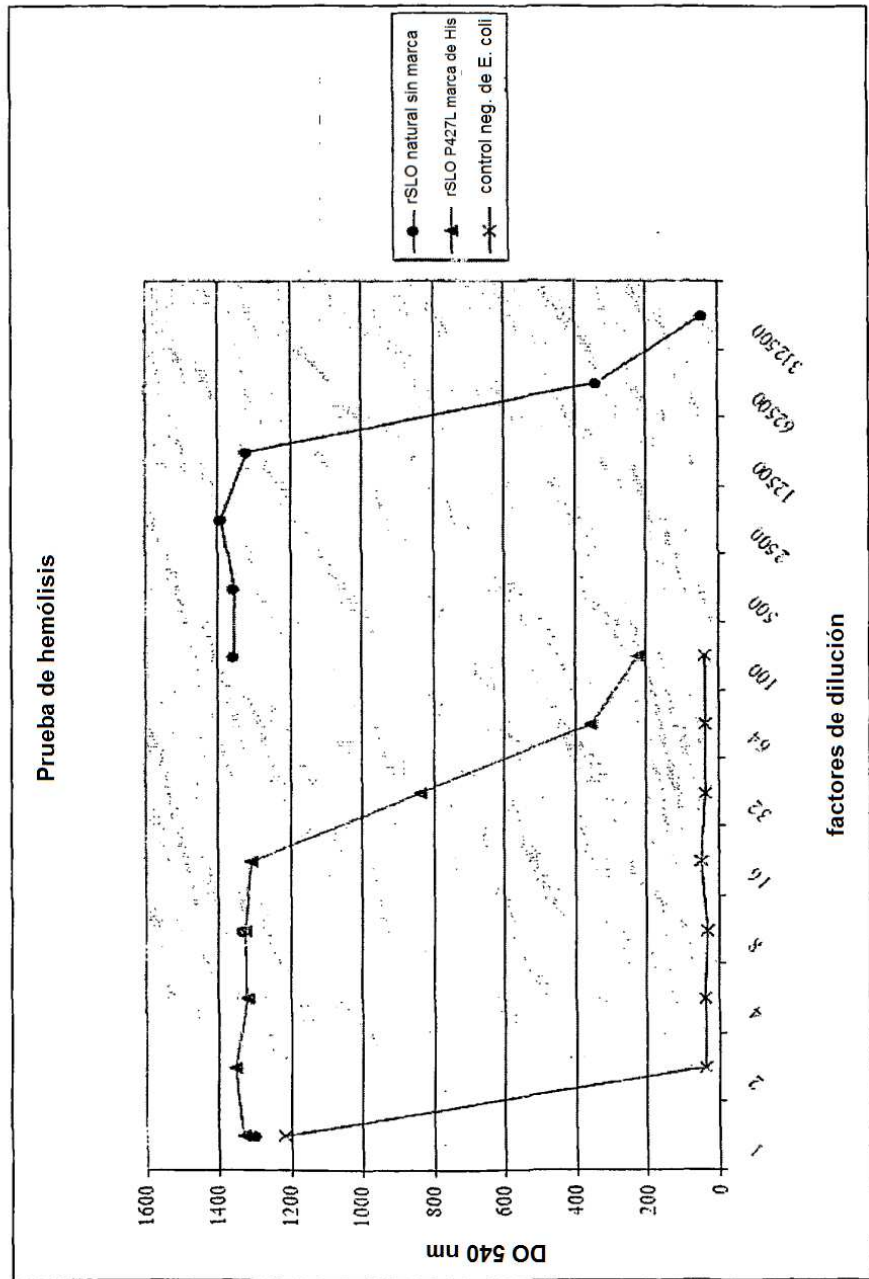


FIGURA 6

FIGURA 7

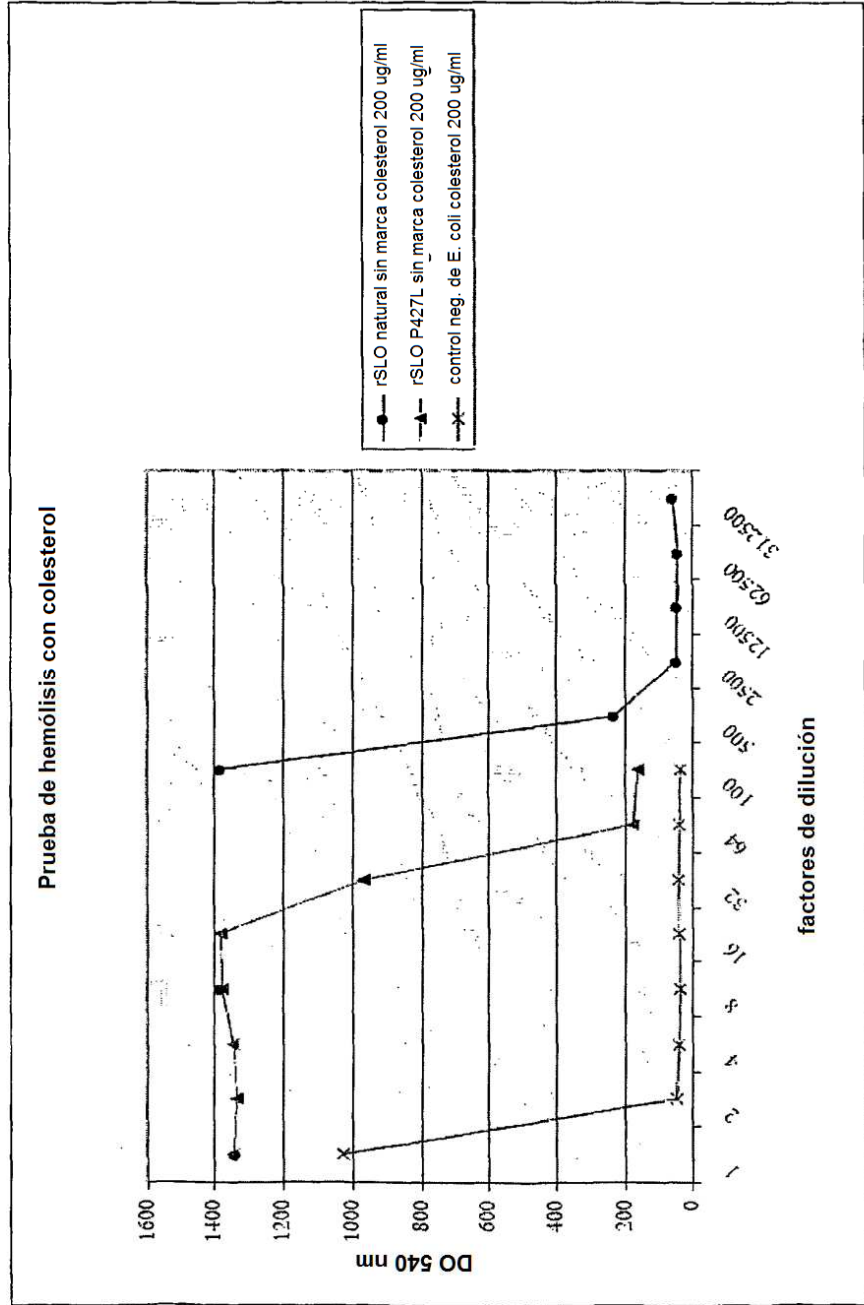


FIGURA 8A

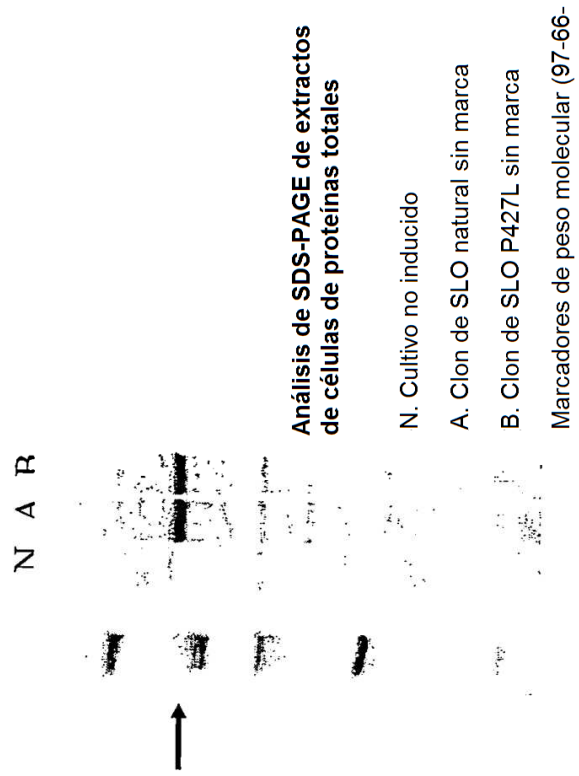


FIGURA 8B

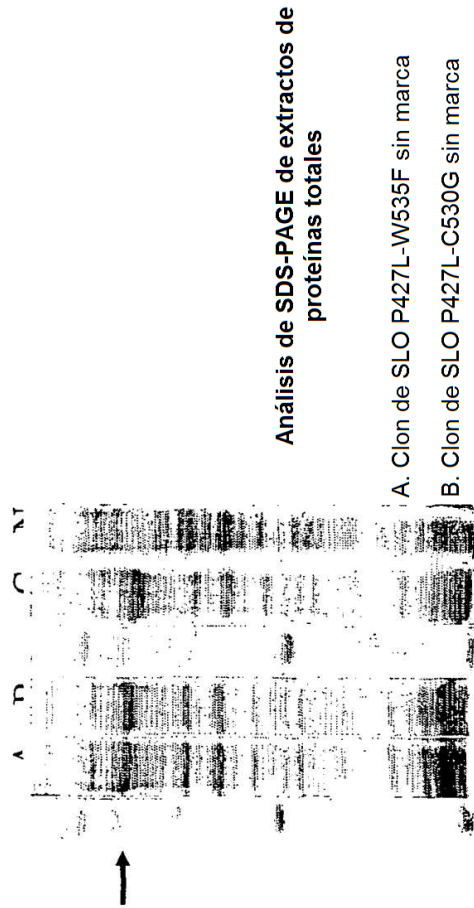


FIGURA 9

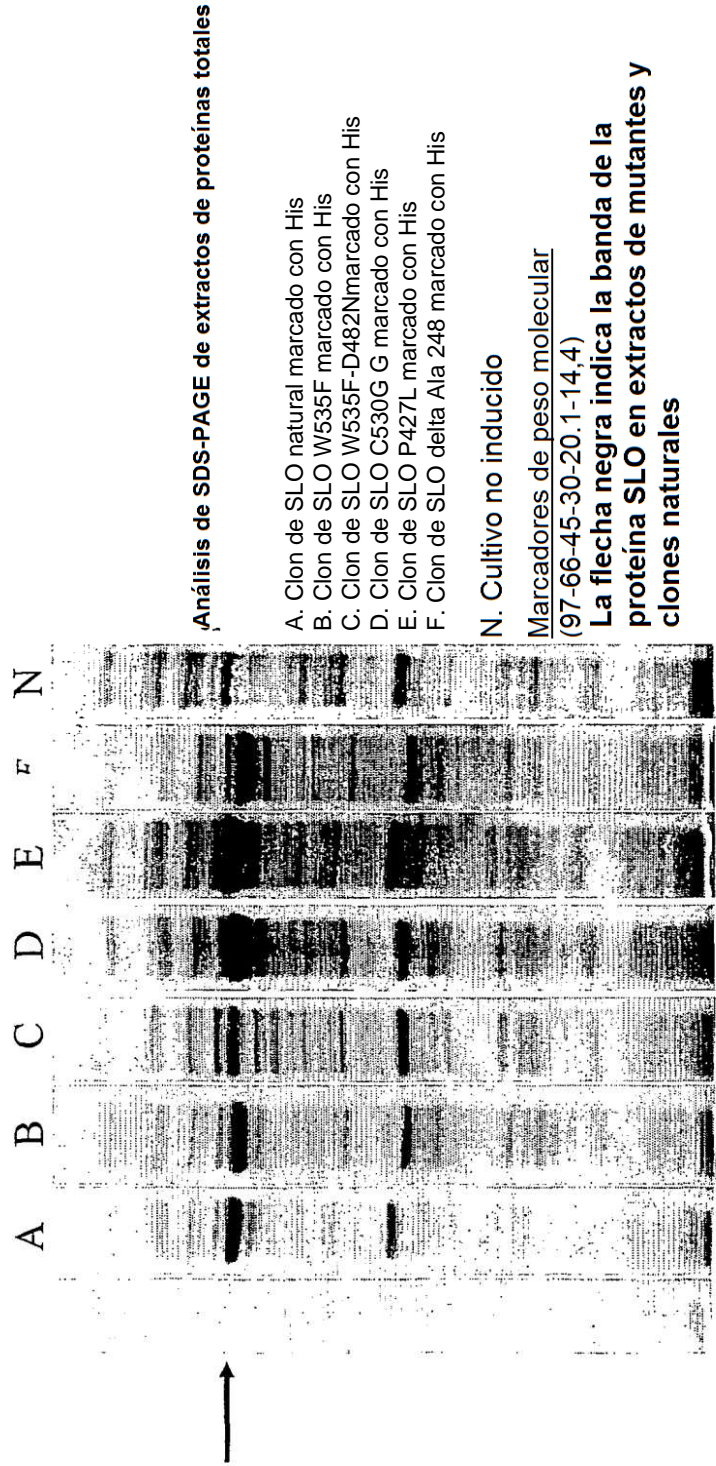
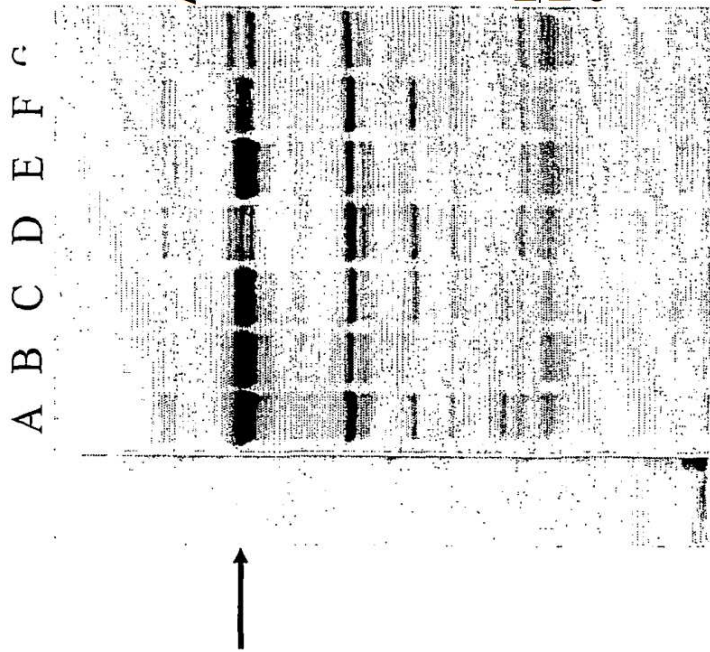


FIGURA 10



Análisis de SDS-PAGE de proteínas purificadas

- A. rSLO natural marcada con His (5 µg);
 - B. Mutante de rSLO C530G marcada con His (5 µg);
 - C. Mutante de rSLO W535F marcada con His (5 µg);
 - D. Mutante de rSLO W535F y D482N marcada con His (5 µg);
 - E. Mutante de rSLO P427L marcada con His (5 µg);
 - F. Mutante de rSLO Ala248 marcada con His (5 µg);
 - G. Contaminante de *E. coli* como control negativo (5 µg);
- Marcadores de peso molecular (97-66-45-30-20.1)

La flecha negra indica proteína SLO purificada de mutantes y clones naturales

A . R

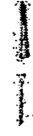


FIGURA 11A

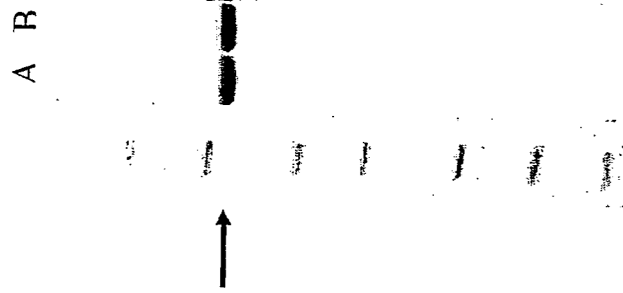


FIGURA 11B

FIGURA 12

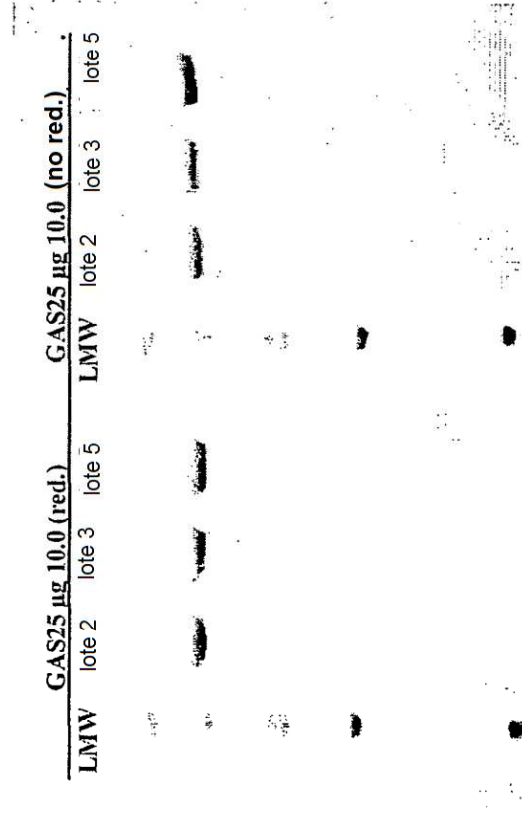


FIGURA 13

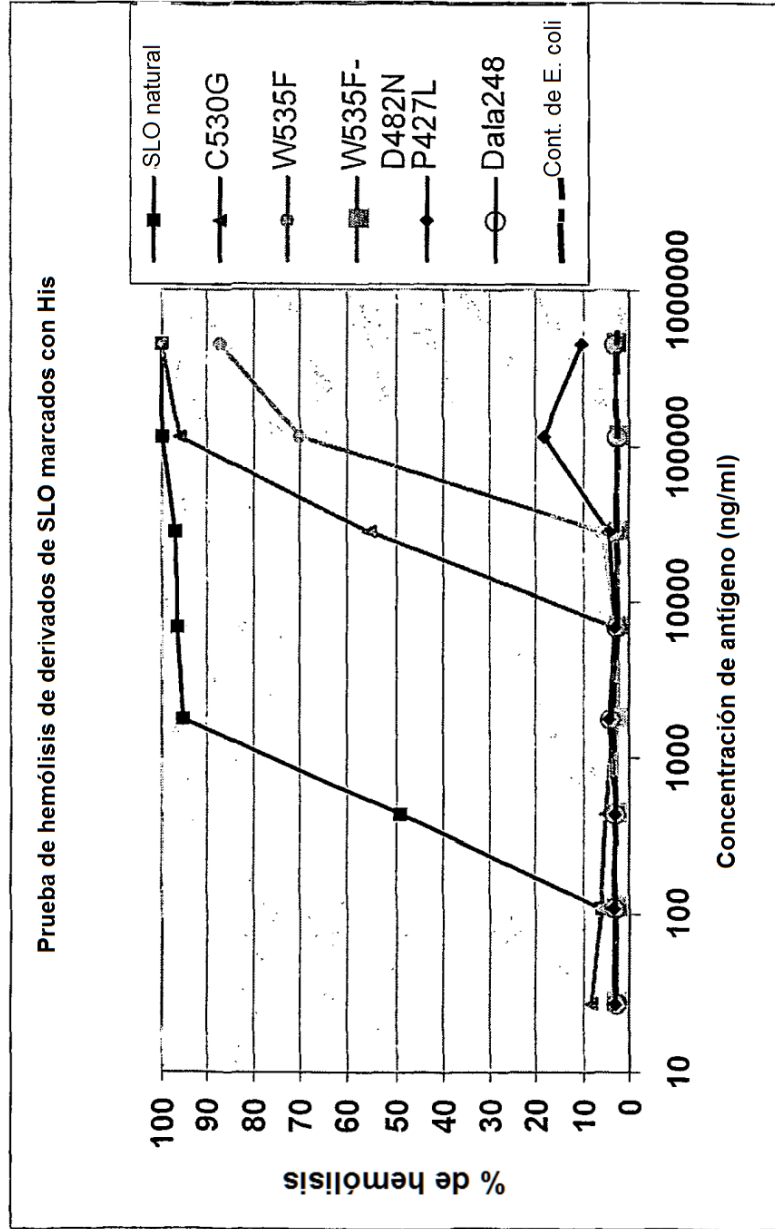


FIG. 14

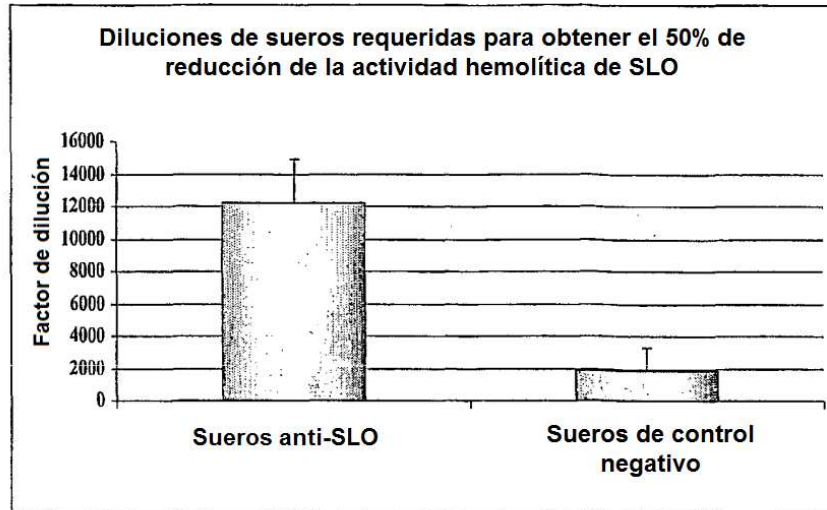


FIG. 15

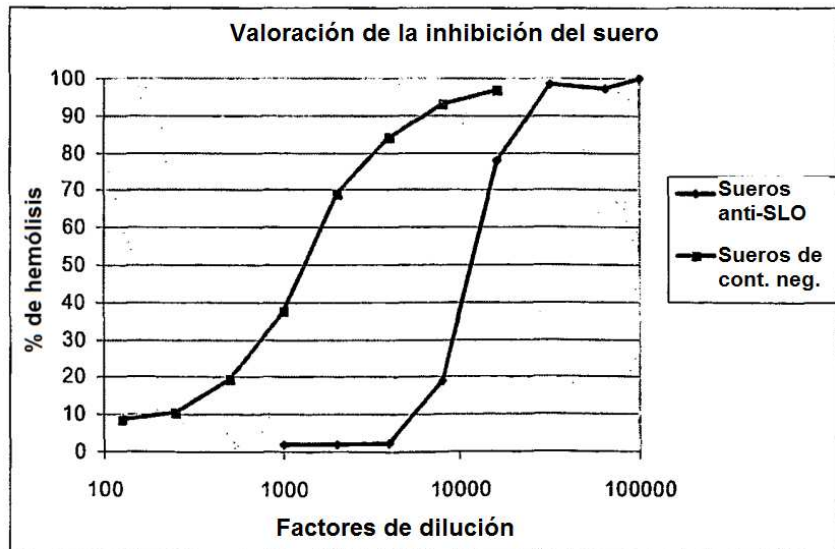


FIG. 16

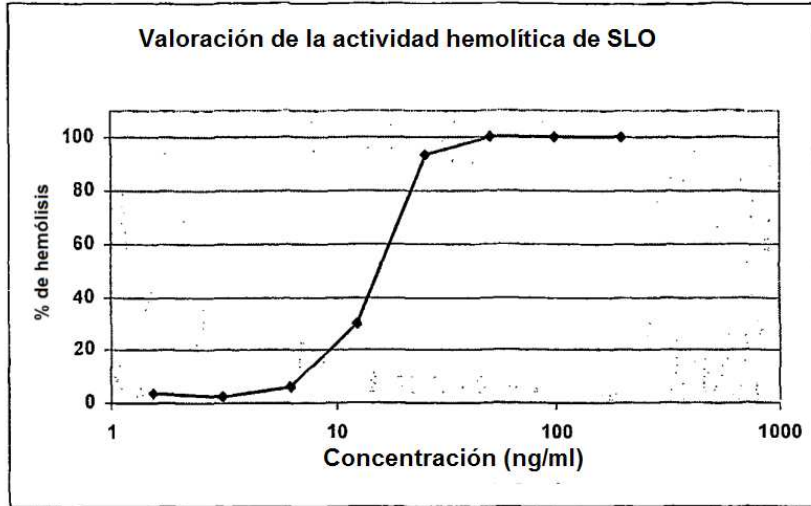


FIG. 17

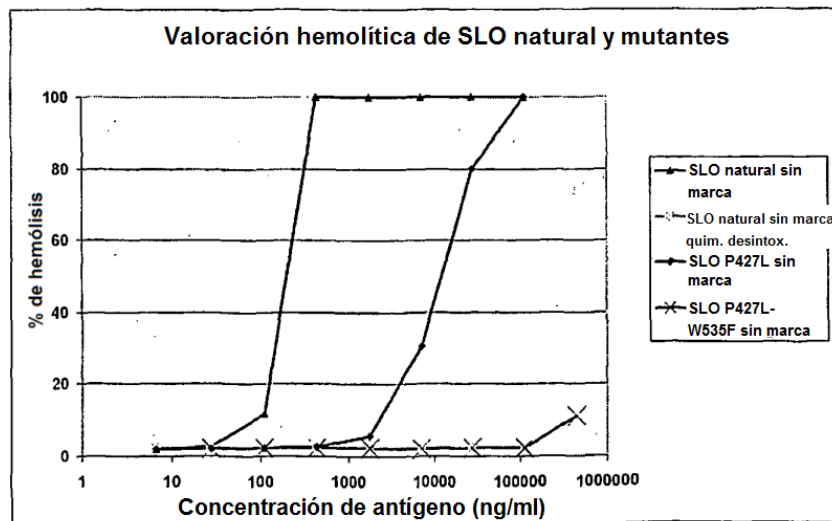


FIG. 18

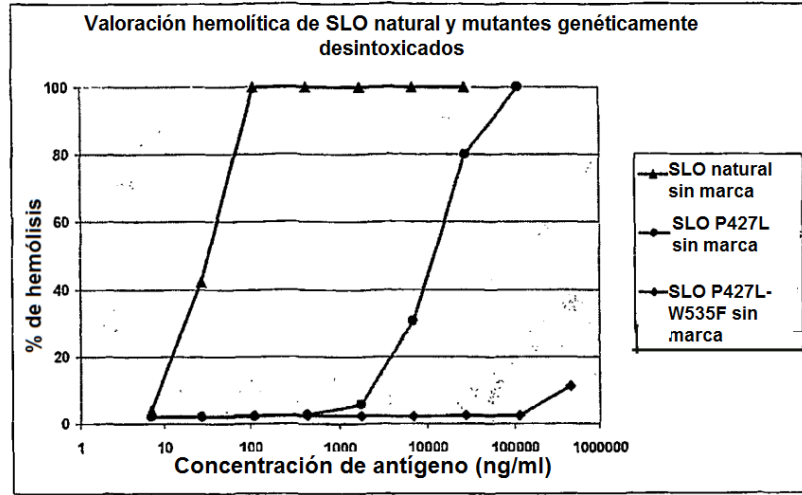


FIG. 19

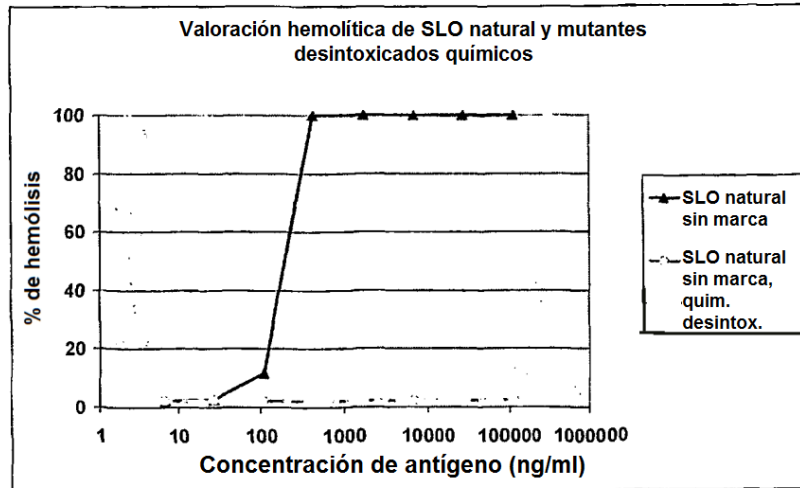


FIG. 20

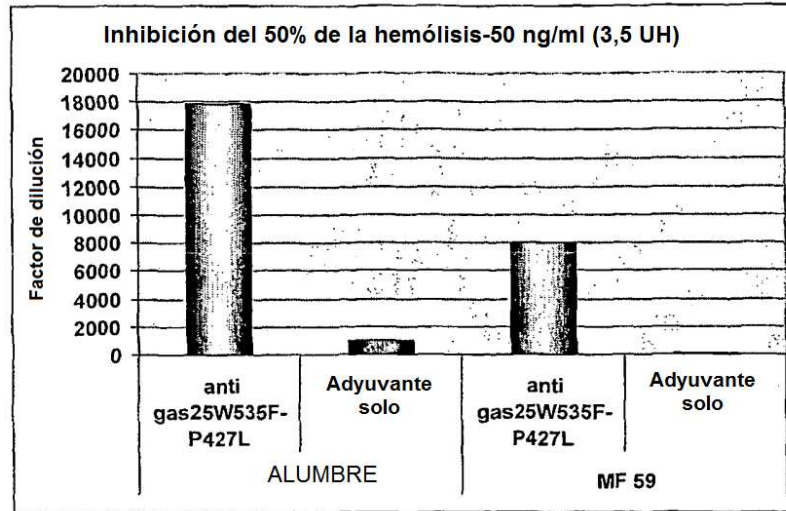


FIG. 21

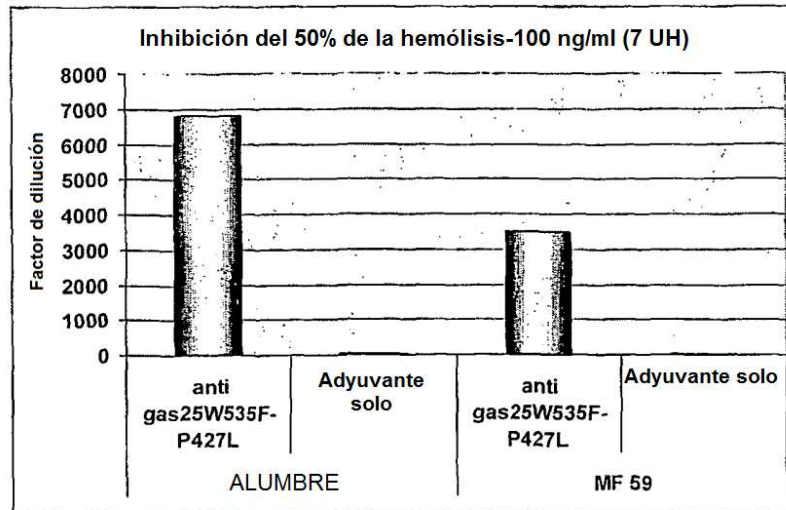


FIG. 22

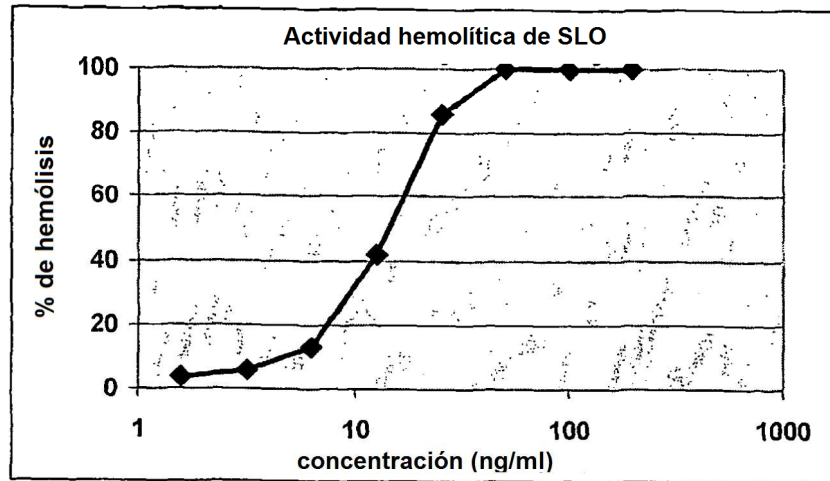


FIG. 23.

	1	50
GAS25_SF370	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALI IGNLVTANAESNKQNTASTETTTTNEQP
GAS25_M12_2096	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALI IGNLVTANAESNKQNTASTETTTTNEQP
GAS25_M12_9429	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALI IGNLVTANAESNKQNTASTETTTTNEQP
GAS25_M1_5005	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALI IGNLVTANAESNKQNTASTETTTTNEQP
GAS25_M2	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALI IGNLVTANAESNKQNTTSTETTTTNEQP
GAS25_M28	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALI IGNLVTANAESNKQNTASTETTTTNEQP
GAS25_M6	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTVALI IGNLVTANAESNKQNTASTETTTTNEQP
GAS25_M18	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALI IGNLVTANAESNKQNTASTETTTTNEQP
GAS25_M5	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALI IGNLVTANAESNKQNTASTETTTTNEQP
GAS25_M3	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALI IGNLVTANAESNKQNTASTETTTTNEQP
GAS25_M3_SSI	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALI IGNLVTANAESNKQNTASTETTTTNEQP
GAS25_M4	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLLTAALI IGNLVTANAESNKQNTASTETTTTNEQP
	51	100
GAS25_SF370	(51)	KPESELTTTEKAGQKTDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
GAS25_M12_2096	(51)	KPESELTTTEKAGQKMDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
GAS25_M12_9429	(51)	KPESELTTTEKAGQKMDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
GAS25_M1_5005	(51)	KPESELTTTEKAGQKMDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
GAS25_M2	(51)	KPESELTTIEKAGQKMDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
GAS25_M28	(51)	KPESELTTIEKAGQKMDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
GAS25_M6	(51)	KPESELTTIEKAGQKMDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
GAS25_M18	(51)	KPESELTTTEKAGQKTDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
GAS25_M5	(51)	KPESELTTTEKAGQKTDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
GAS25_M3	(51)	KPESELTTTEKAGQKTDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
GAS25_M3_SSI	(51)	KPESELTTTEKAGQKTDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
GAS25_M4	(51)	KPESELTTTEKAGQKTDMLNSNDMIKLAPKEMPLESAEKEEKKSEDKKK
	101	150
GAS25_SF370	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFVIE
GAS25_M12_2096	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFVIE
GAS25_M12_9429	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFVIE
GAS25_M1_5005	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFVIE
GAS25_M2	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFVIE
GAS25_M28	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFVIE
GAS25_M6	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFVIE
GAS25_M18	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFVIE
GAS25_M5	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFVIE
GAS25_M3	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFVIE
GAS25_M3_SSI	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFVPKEGVKKADKFVIE
GAS25_M4	(101)	SEEDHTEEINDKIYSLNYNELEVLAKNGETIENFAPKEGVKKADKFVIE
	151	200
GAS25_SF370	(151)	RKKKNINTTPVDISIIDSVTDRTPAALQLANKGFTEKPDVVTKRNPQ
GAS25_M12_2096	(151)	RKKKNINTTPVDISIIDSVTDRTPAALQLANKGFTEKPDVVTKRNPQ
GAS25_M12_9429	(151)	RKKKNINTTPVDISIIDSVTDRTPAALQLANKGFTEKPDVVTKRNPQ

ES 2 391 695 T3

GAS25_M1_5005 (151) RKKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQ
 GAS25_M2 (151) RKKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLADKGFENKPDVAVTKRNPQ
 GAS25_M28 (151) RKKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLADKGFENKPDVAVTKRNPQ
 GAS25_M6 (151) RKKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQ
 GAS25_M18 (151) RKKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQ
 GAS25_M5 (151) RKKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQ
 GAS25_M3 (151) RKKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQ
 GAS25_M3_SSI (151) RKKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQ
 GAS25_M4 (151) RKKKNINTTPVDISIIDSVDRTYPAALQLANKGFTENKPDVAVTKRNPQ
 201 250
 GAS25_SF370 (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 GAS25_M12_2096 (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 GAS25_M12_9429 (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 GAS25_M1_5005 (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 GAS25_M2 (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 GAS25_M28 (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 GAS25_M6 (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 GAS25_M18 (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 GAS25_M5 (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 GAS25_M3 (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 GAS25_M3_SSI (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 GAS25_M4 (201) KIHIDLPGMGDKATVEVNDPTYANVSTAIIDNLVQWHDNYSGGNTLPART
 251 300
 GAS25_SF370 (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 GAS25_M12_2096 (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 GAS25_M12_9429 (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 GAS25_M1_5005 (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 GAS25_M2 (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 GAS25_M28 (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 GAS25_M6 (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 GAS25_M18 (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 GAS25_M5 (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 GAS25_M3 (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 GAS25_M3_SSI (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 GAS25_M4 (251) QYTESMVYSKQSIEAALNVNSKILDGTLGIDFKSISKGEKKVMIAAYKQI
 301 350
 GAS25_SF370 (301) FYTVSANLPNNPADVDFKSVTFKELQRKQVSNEAPPLFVSNVAYGRTVFFV
 GAS25_M12_2096 (301) FYTVSANLPNNPADVDFKSVTFKELQRKQVSNEAPPLFVSNVAYGRTVFFV
 GAS25_M12_9429 (301) FYTVSANLPNNPADVDFKSVTFKELQRKQVSNEAPPLFVSNVAYGRTVFFV
 GAS25_M1_5005 (301) FYTVSANLPNNPADVDFKSVTFKELQRKQVSNEAPPLFVSNVAYGRTVFFV
 GAS25_M2 (301) FYTVSANLPNNPADVDFKSVTFKELQRKQVSNEAPPLFVSNVAYGRTVFFV
 GAS25_M28 (301) FYTVSANLPNNPADVDFKSVTFKELQRKQVSNEAPPLFVSNVAYGRTVFFV
 GAS25_M6 (301) FYTVSANLPNNPADVDFKSVTFKELQRKQVSNEAPPLFVSNVAYGRTVFFV
 GAS25_M18 (301) FYTVSANLPNNPADVDFKSVTFKELQRKQVSNEAPPLFVSNVAYGRTVFFV
 GAS25_M5 (301) FYTVSANLPNNPADVDFKSVTFKELQRKQVSNEAPPLFVSNVAYGRTVFFV
 GAS25_M3 (301) FYTVSANLPNNPADVDFKSVTFKELQRKQVSNEAPPLFVSNVAYGRTVFFV
 GAS25_M3_SSI (301) FYTVSANLPNNPADVDFKSVTFKELQRKQVSNEAPPLFVSNVAYGRTVFFV

ES 2 391 695 T3

GAS25_M4	(301)	FYTVSANLPNNPADVFAKSVTFKELQRKGVSN EAPPLFVSNVAYGRVTVFV 351	400
GAS25_SF370	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE	
GAS25_M12_2096	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE	
GAS25_M12_9429	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE	
GAS25_M1_5005	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE	
GAS25_M2	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE	
GAS25_M28	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE	
GAS25_M6	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE	
GAS25_M18	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE	
GAS25_M5	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE	
GAS25_M3	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE	
GAS25_M3_SSI	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE	
GAS25_M4	(351)	KLETSSKSNV EAAAFSAALKGTDVKTNGKYS DILENSSFTAVVLGGDAAE 401	450
GAS25_SF370	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT	
GAS25_M12_2096	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT	
GAS25_M12_9429	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT	
GAS25_M1_5005	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT	
GAS25_M2	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT	
GAS25_M28	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT	
GAS25_M6	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT	
GAS25_M18	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT	
GAS25_M5	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT	
GAS25_M3	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT	
GAS25_M3_SSI	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT	
GAS25_M4	(401)	HNKVVTKDFDVIRNVIKDNATFSRKNPAYPISYTSVFLKNNKIAGVNNRT 451	500
GAS25_SF370	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD	
GAS25_M12_2096	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD	
GAS25_M12_9429	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD	
GAS25_M1_5005	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD	
GAS25_M2	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD	
GAS25_M28	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD	
GAS25_M6	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD	
GAS25_M18	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD	
GAS25_M5	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD	
GAS25_M3	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD	
GAS25_M3_SSI	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD	
GAS25_M4	(451)	EYVETTSTEYTS GKINLSHQGAYVAQYEILWDEINYDDKGKEVITKRRWD 501	550
GAS25_SF370	(501)	NNWYSKTS PFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAW EWRKVIDERDVKLS	
GAS25_M12_2096	(501)	NNWYSKTS PFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAW EWRKVIDERDVKLS	
GAS25_M12_9429	(501)	NNWYSKTS PFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAW EWRKVIDERDVKLS	
GAS25_M1_5005	(501)	NNWYSKTS PFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAW EWRKVIDERDVKLS	
GAS25_M2	(501)	NNWYSKTS PFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAW EWRKVIDERDVKLS	
GAS25_M28	(501)	NNWYSKTS PFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAW EWRKVIDERDVKLS	

ES 2 391 695 T3

GAS25_M6	(501)	NNWYSKTSPFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAWEWRKVIDERDVKLS
GAS25_M18	(501)	NNWYSKTSPFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAWEWRKVIDERDVKLS
GAS25_M5	(501)	NNWYSKTSPFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAWEWRKVIDERDVKLS
GAS25_M3	(501)	NNWYSKTSPFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAWEWRKVIDERDVKLS
GAS25_M3_SSI	(501)	NNWYSKTSPFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAWEWRKVIDERDVKLS
GAS25_M4	(501)	NNWYSKTSPFSTVIPLGANSRNIRIMARECTGLAWEWRKVIDERDVKLS
		551 572
GAS25_SF370	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-
GAS25_M12_2096	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-
GAS25_M12_9429	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-
GAS25_M1_5005	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-
GAS25_M2	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-
GAS25_M28	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-
GAS25_M6	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-
GAS25_M18	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-
GAS25_M5	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-
GAS25_M3	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-
GAS25_M3_SSI	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-
GAS25_M4	(551)	KEINVNISGSTLSPYGSITYK-

Posiciones consenso: 99,8%

Posiciones de identidad: 97,7%

FIG. 24

		1	45
SLO M1strainSF370	(1)	MSNKKTFKKYSRVAGLTAALIGNLVTA	MSSESNKQNTASTETTT
SLO WT_histagged	(1)	-----	-----
SLOmut.P427L_histagged	(1)	-----	-----
SLOmut.C530G_histagged	(1)	-----	-----
SLOmut.DeltaA248_histagged	(1)	-----	-----
SLOmut.W535F_histagged	(1)	-----	-----
SLOmutW535F&D482N_histagged	(1)	-----	-----
		46	90
SLO M1strainSF370	(46)	TNEQKPFESSELTTEKAGQNTDMLNSNDMLKLAFFEMLESAAEK	
SLO WT_histagged	(18)	-----	-----
SLOmut.P427L_histagged	(18)	-----	-----
SLOmut.C530G_histagged	(18)	-----	-----
SLOmut.DeltaA248_histagged	(18)	-----	-----
SLOmut.W535F_histagged	(18)	-----	-----
SLOmutW535F&D482N_histagged	(18)	-----	-----
		91	135
SLO M1strainSF370	(91)	EEKNSDDKRSSEEDHTESINDRIYSLQWNELEWLAHQGETIENFY	
SLO WT_histagged	(63)	-----	-----
SLOmut.P427L_histagged	(63)	-----	-----
SLOmut.C530G_histagged	(63)	-----	-----
SLOmut.DeltaA248_histagged	(63)	-----	-----
SLOmut.W535F_histagged	(63)	-----	-----
SLOmutW535F&D482N_histagged	(63)	-----	-----
		136	180
SLO M1strainSF370	(136)	FREGVTKALRFIVIERAKKNIITTFVDSISIDSVTISRTYPAALQL	
SLO WT_histagged	(108)	-----	-----
SLOmut.P427L_histagged	(108)	-----	-----
SLOmut.C530G_histagged	(108)	-----	-----
SLOmut.DeltaA248_histagged	(108)	-----	-----
SLOmut.W535F_histagged	(108)	-----	-----
SLOmutW535F&D482N_histagged	(108)	-----	-----
		181	225
SLO M1strainSF370	(181)	AKKGFTEKSDAVVTRKSPQKHIDLPQGGKRAVETVDSQVAVF	
SLO WT_histagged	(153)	-----	-----
SLOmut.P427L_histagged	(153)	-----	-----
SLOmut.C530G_histagged	(153)	-----	-----
SLOmut.DeltaA248_histagged	(153)	-----	-----
SLOmut.W535F_histagged	(153)	-----	-----
SLOmutW535F&D482N_histagged	(153)	-----	-----
		226	270
SLO M1strainSF370	(226)	STAIQNLVWQHWNYSQNTLFAKQDTEISQVYSSSIEEALALNV	
SLO WT_histagged	(198)	-----	-----
SLOmut.P427L_histagged	(198)	-----	-----
SLOmut.C530G_histagged	(198)	-----	-----
SLOmut.DeltaA248_histagged	(198)	-----	-----
SLOmut.W535F_histagged	(198)	-----	-----
SLOmutW535F&D482N_histagged	(198)	-----	-----
		271	315
SLO M1strainSF370	(271)	SKLDELQLEIDFHSSEKGGKQVIAANVLIPTVTSKLEFNISALV	
SLO WT_histagged	(243)	-----	-----
SLOmut.P427L_histagged	(243)	-----	-----

SLOmut.C530G_histagged (243) SKLLDGLDPLDFFKSLKSGENKWHIAANKQIPIYTVSANDENNADYV
SLOmut.DeltaA248_histagged (242) SKLLDGLDPLDFFKSLKSGENKWHIAANKQIPIYTVSANDENNADYV
SLOmut.W535F_histagged (243) SKLLDGLDPLDFFKSLKSGENKWHIAANKQIPIYTVSANDENNADYV
SLOmutW535F&D482N_histagged (243) SKLLDGLDPLDFFKSLKSGENKWHIAANKQIPIYTVSANDENNADYV
316 360
SLO_M1strainsF370 (316) FDKSVTFKELDQARGVNEAAPPFLFVSNVAWGRTVFWKLETSKSNQ
SLO_NT_histagged (268) FDKSVTFKELDQARGVNEAAPPFLFVSNVAWGRTVFWKLETSKSNQ
SLOmut.P427L_histagged (268) FDKSVTFKELDQARGVNEAAPPFLFVSNVAWGRTVFWKLETSKSNQ
SLOmut.C530G_histagged (268) FDKSVTFKELDQARGVNEAAPPFLFVSNVAWGRTVFWKLETSKSNQ
SLOmut.DeltaA248_histagged (267) FDKSVTFKELDQARGVNEAAPPFLFVSNVAWGRTVFWKLETSKSNQ
SLOmut.W535F_histagged (268) FDKSVTFKELDQARGVNEAAPPFLFVSNVAWGRTVFWKLETSKSNQ
SLOmutW535F&D482N_histagged (288) FDKSVTFKELDQARGVNEAAPPFLFVSNVAWGRTVFWKLETSKSNQ
361 405
SLO_M1strainsF370 (361) VEAAFSAAALKGTQVWTKNGKYSDDLENSFFIAVVLGGQAAEHNKVV
SLO_NT_histagged (333) VEAAFSAAALKGTQVWTKNGKYSDDLENSFFIAVVLGGQAAEHNKVV
SLOmut.P427L_histagged (333) VEAAFSAAALKGTQVWTKNGKYSDDLENSFFIAVVLGGQAAEHNKVV
SLOmut.C530G_histagged (333) VEAAFSAAALKGTQVWTKNGKYSDDLENSFFIAVVLGGQAAEHNKVV
SLOmut.DeltaA248_histagged (332) VEAAFSAAALKGTQVWTKNGKYSDDLENSFFIAVVLGGQAAEHNKVV
SLOmut.W535F_histagged (333) VEAAFSAAALKGTQVWTKNGKYSDDLENSFFIAVVLGGQAAEHNKVV
SLOmutW535F&D482N_histagged (333) VEAAFSAAALKGTQVWTKNGKYSDDLENSFFIAVVLGGQAAEHNKVV
406 450
SLO_M1strainsF370 (406) TKDFVIRNVTIKDNATFSSRNPAPVFIISYTSVFLKNNKILAGVNNRE
SLO_NT_histagged (378) TKDFVIRNVTIKDNATFSSRNPAPVFIISYTSVFLKNNKILAGVNNRE
SLOmut.P427L_histagged (378) TKDFVIRNVTIKDNATFSSRNPAPVFIISYTSVFLKNNKILAGVNNRE
SLOmut.C530G_histagged (378) TKDFVIRNVTIKDNATFSSRNPAPVFIISYTSVFLKNNKILAGVNNRE
SLOmut.DeltaA248_histagged (377) TKDFVIRNVTIKDNATFSSRNPAPVFIISYTSVFLKNNKILAGVNNRE
SLOmut.W535F_histagged (378) TKDFVIRNVTIKDNATFSSRNPAPVFIISYTSVFLKNNKILAGVNNRE
SLOmutW535F&D482N_histagged (378) TKDFVIRNVTIKDNATFSSRNPAPVFIISYTSVFLKNNKILAGVNNRE
451 495
SLO_M1strainsF370 (451) EYVECTSTEYTSKKNLSSHQGATVAQVEILNDRININDRGGHEVIT
SLO_NT_histagged (423) EYVECTSTEYTSKKNLSSHQGATVAQVEILNDRININDRGGHEVIT
SLOmut.P427L_histagged (423) EYVECTSTEYTSKKNLSSHQGATVAQVEILNDRININDRGGHEVIT
SLOmut.C530G_histagged (423) EYVECTSTEYTSKKNLSSHQGATVAQVEILNDRININDRGGHEVIT
SLOmut.DeltaA248_histagged (422) EYVECTSTEYTSKKNLSSHQGATVAQVEILNDRININDRGGHEVIT
SLOmut.W535F_histagged (423) EYVECTSTEYTSKKNLSSHQGATVAQVEILNDRININDRGGHEVIT
SLOmutW535F&D482N_histagged (423) EYVECTSTEYTSKKNLSSHQGATVAQVEILNDRININDRGGHEVIT
496 540
SLO_M1strainsF370 (496) KRARMNNWYSKTSPPFSTVPLGANSRNIFIMARECTGLAWENWFK
SLO_NT_histagged (468) KRARMNNWYSKTSPPFSTVPLGANSRNIFIMARECTGLAWENWFK
SLOmut.P427L_histagged (468) KRARMNNWYSKTSPPFSTVPLGANSRNIFIMARECTGLAWENWFK
SLOmut.C530G_histagged (468) KRARMNNWYSKTSPPFSTVPLGANSRNIFIMARECTGLAWENWFK
SLOmut.DeltaA248_histagged (467) KRARMNNWYSKTSPPFSTVPLGANSRNIFIMARECTGLAWENWFK
SLOmut.W535F_histagged (468) KRARMNNWYSKTSPPFSTVPLGANSRNIFIMARECTGLAWENWFK
SLOmutW535F&D482N_histagged (468) KRARMNNWYSKTSPPFSTVPLGANSRNIFIMARECTGLAWENWFK
541 580
SLO_M1strainsF370 (541) WIDERRVWLSKKEINWNSGSLSPYGSITVYK-----
SLO_NT_histagged (513) WIDERRVWLSKKEINWNSGSLSPYGSITVYKLEHHHHHHH-
SLOmut.P427L_histagged (513) WIDERRVWLSKKEINWNSGSLSPYGSITVYKLEHHHHHHH-
SLOmut.C530G_histagged (513) WIDERRVWLSKKEINWNSGSLSPYGSITVYKLEHHHHHHH-
SLOmut.DeltaA248_histagged (512) WIDERRVWLSKKEINWNSGSLSPYGSITVYKLEHHHHHHH-
SLOmut.W535F_histagged (513) WIDERRVWLSKKEINWNSGSLSPYGSITVYKLEHHHHHHH-
SLOmutW535F&D482N_histagged (513) WIDERRVWLSKKEINWNSGSLSPYGSITVYKLEHHHHHHH-

FIG. 25

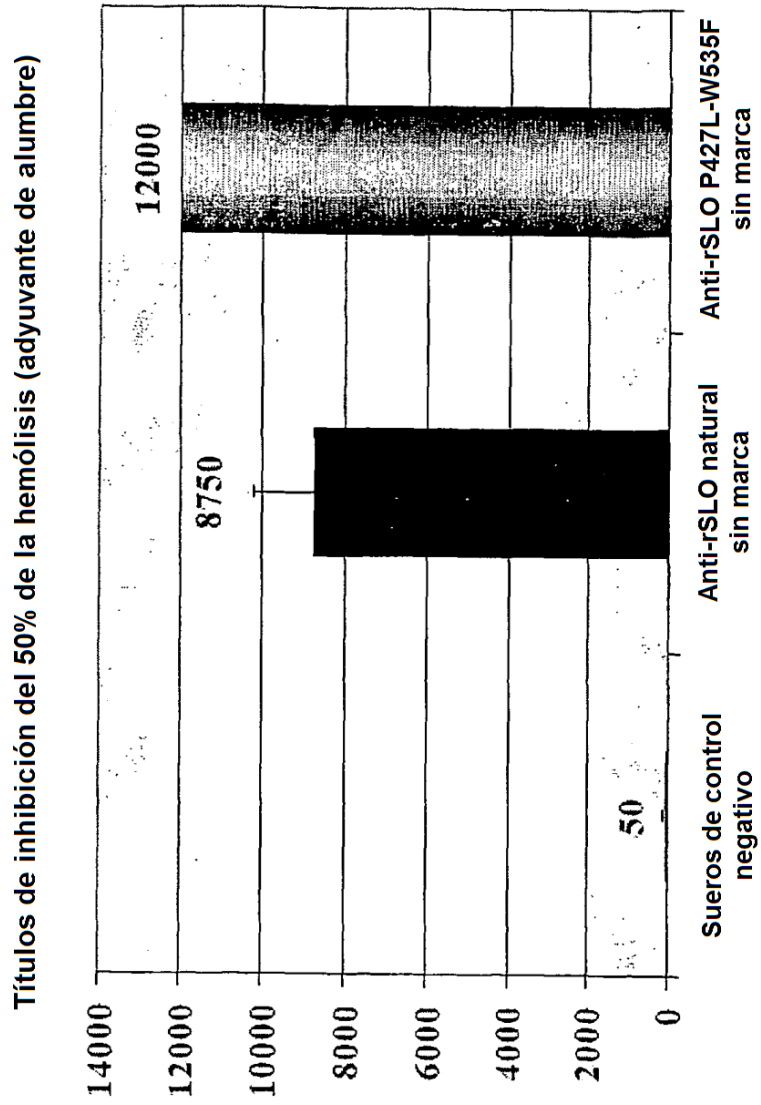


FIG. 26

