

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 998**

51 Int. Cl.:

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.1999 E 10185549 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2308981**

54 Título: **Vacuna de peptidasa C5a estreptococal**

30 Prioridad:

07.12.1998 US 206898

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

26.04.2013

73 Titular/es:

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
(100.0%)**

**Office for Technology Commercialization 1000
Westgate Drive Suite 160
St. Paul, Minnesota 55114-8658, US**

72 Inventor/es:

**CLEARY, PAUL y
STAFSLIEN, DEBORAH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 401 998 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

Vacuna de peptidasa C5a estreptococal

Antecedentes de la Invención

5 Existen varias especies estreptococales β -hemolíticas diferentes que han sido identificadas. El *Streptococcus pyogenes*, también denominado estreptococo de grupo A, es un patógeno bacteriano común en humanos. Principalmente una enfermedad de niños, provoca una variedad de infecciones que incluyen faringitis, impétigo y sepsis en humanos. Este patógeno también causa enfermedades agudas severas tales como la fiebre escarlata, la fascitis necrotizante y el choque tóxico.

10 El dolor de garganta provocado por estreptococos de grupo A, denominado comúnmente "amigdalitis", es el responsable de al menos el 16% de todas las llamadas oficiales en la práctica de la medicina general, dependiendo de la época del año. Hope-Simpson, E., "Streptococcus pyogenes in the throat: A study in a small population, 1962-1975", J. Hyg. Camb., 87: 109-129 (1981). Esta especie también es la causa del reciente resurgimiento en Norte América y otros cuatro continentes de choques tóxicos asociados a la fascitis necrotizante. Stevens, D. L., "Invasive group A streptococcus infections", Clin. Infect. Dis., 14: 2-13 (1992). Los grupos C y G de estreptococos también están implicados en la generación de dolor de garganta y, ocasionalmente, de choque tóxico. Hope-Simpson, E., "Streptococcus pyogenes in the throat: A study in a small population, 1962-1975", J. Hyg. Camb., 87: 109-129 (1981).

15 Los estreptococos de grupo B, también conocidos como *Streptococcus agalactiae*, son responsables de la sepsis neonatal y de la meningitis. T. R. Martin y col., "The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group B streptococci from the lung of infant and adult rats", J. Infect. Dis., 165: 306-314 (1992). Aunque frecuentemente es un miembro de la flora de la mucosa vaginal de las hembras adultas, entre 0,1 y 0,5/1000 recién nacidos desarrollan una enfermedad grave después de una infección durante el parto. A pesar de la elevada mortalidad de las infecciones de estreptococos de grupo B, los mecanismos de patogenicidad son poco comprendidos. Martin, T. R., y col., "The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group B streptococci from the lung of infant and adult rats", J. Infect. Dis., 165: 306-314 (1992).

20 Las infecciones estreptococales se tratan actualmente mediante terapia con antibióticos. Sin embargo, el 25-30% de los tratados presentan recurrencia de la enfermedad y/o se mudan del organismo en secreciones de mucosa. Actualmente no existe disponible ningún modo de prevenir las infecciones estreptococales. Históricamente, el desarrollo de una vacuna estreptococal se ha centrado en la proteína M de la superficie celular de la bacteria. Bessen, D., y col., "Influence of intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to conserved epitopes of M protein on mucosal colonization by group A streptococci", Infect. Immun., 56: 2666-2672 (1988); Bronze, M. S., y col., "Protective immunity evoked by locally administered group A streptococcal vaccines in mice", Journal of Immunology, 141: 2767-2770 (1988).

25 Dos problemas principales limitarán el uso, la comercialización y, posiblemente, la aprobación de la FDA, de una vacuna de proteína M. En primer lugar, existen más de 80 serotipos diferentes de M de *S. pyogenes* y continuamente aparecen nuevos serotipos. Fischetti, V. A., "Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior, Clin. Microbiol. Rev., 2: 285-314 (1989). Por tanto, la inoculación con una proteína M específica de un serotipo probablemente no será eficaz en la protección frente a otros serotipos de M. El segundo problema está relacionado con la seguridad de una vacuna de proteína M. Varias regiones de la proteína M contienen epitopos antigénicos que son inmunológicamente reactivos con tejidos humanos, particularmente con tejido cardíaco. Los extremos N de las proteínas M son altamente variables en su secuencia y en su especificidad antigénica. Se necesitaría la inclusión de más de 80 péptidos diferentes, que representan dicha secuencia variable, en una vacuna para lograr una amplia protección contra la infección por estreptococos de grupo A. Seguirían apareciendo nuevas proteínas M variantes, lo que requeriría un control continuo de la enfermedad estreptococal y cambios en la composición de la vacuna. Por el contrario, los extremos carboxilo de las proteínas M tienen una secuencia conservada. Esta región de la proteína M, sin embargo, contiene una secuencia de aminoácidos que es inmunológicamente reactiva con el tejido cardíaco humano. Se cree que esta propiedad de la proteína M es responsable del daño de válvula cardíaca asociado a la fiebre reumática. P. Fenderson y col., "Tropomyosinsharies immunologic epitopes with group A streptococcal M proteins", J. Immunol. 142: 2475-2481 (1989). En un ensayo anterior, niños que habían sido vacunados con proteína M en 1979 tuvieron una incidencia diez veces mayor de fiebre reumática y del daño de válvula cardíaca asociado. Massell, B. F., y col., "Rheumatic fever following streptococcal vaccination", JAMA, 207: 1115-1119 (1969).

30 Otras proteínas bajo consideración para el desarrollo de una vacuna son las toxinas eritrogénicas, la exotoxina A pirogénica estreptococal y la exotoxina B pirogénica estreptococal. Lee, P. K., y col., "Quantification and toxicity of group A streptococcal pyrogenic exotoxins in an animal model of toxic shock syndrome-like illness", J. Clin. Microb., 27: 1890-1892 (1989). La inmunidad a estas proteínas podría prevenir los síntomas mortales del choque tóxico, pero puede que no prevenga la colonización mediante estreptococos.

35 El documento WO 97/26008 describe vacunas para su uso frente a colonización de Estreptococos β -hemolíticos que comprende peptidasa C5a estreptococal o fragmentos o mutantes de la misma. Staflien y Cleary (Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology, 1998, Vol. 98, página 59) describen que se usó el método

de megacebador de mutagénesis dirigida a posición para introducir una mutación en el gen scpA49 que cambió el supuesto centro activo de serina de la proteasa por una alanina. Esta mutación no afectó a la capacidad de la proteína para unirse a anticuerpo policlonal, según se observó mediante transferencia Western y ELISA competitivo. Sin embargo, la mutación eliminó la capacidad de la enzima para romper C5a in vitro, según se determinó usando un ensayo de adherencia PMN.

Por tanto, sigue existiendo una necesidad de obtener un medio eficaz de prevenir o paliar las infecciones estreptococales. Más específicamente, existe una necesidad de desarrollar composiciones útiles en vacunas para prevenir o paliar la colonización por estreptococos de tejidos hospedantes, reduciendo con ello la incidencia de la amigdalitis y del impétigo. La eliminación de secuelas tales como la fiebre reumática, la glomerulonefritis aguda, la sepsis, el choque tóxico y la fascitis necrotizante sería una consecuencia directa de la reducción de la incidencia de la infección aguda y del transporte en el organismo. También existe la necesidad de desarrollar composiciones útiles en vacunas para prevenir o paliar infecciones causadas por las especies estreptococales β -hemolíticas, a saber, los grupos A, B, C y G.

Resumen de la Invención

La presente invención proporciona una vacuna, y métodos de vacunación, eficaces para inmunizar a un mamífero susceptible frente a *Streptococcus* β -hemolíticos. El mamífero susceptible podría ser un humano o un animal doméstico tal como un perro, una vaca, un cerdo o un caballo. Dicha inmunización prevendría, paliaría o reduciría la incidencia de la colonización de *Streptococcus* β -hemolíticos en el mamífero. La vacuna comprende una cantidad inmunogénica de un péptido aislado y purificado que comprende una Peptidasa C5a Estreptococal (SCP) enzimáticamente inactiva, cuya cantidad es eficaz para inmunizar a un mamífero susceptible frente a *Streptococcus* β -hemolíticos en combinación con un vehículo no tóxico fisiológicamente aceptable, en donde la SCP es una variante de la SCP natural que presenta al menos (i) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 193 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 260, 261, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (ii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 130 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 193, 260, 261, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (iii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 260 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (iv) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 261 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (v) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 262 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (vi) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 415 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 262, 295, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (vii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 416 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 262, 295, 415, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, o (viii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 417 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 262, 295, 415, 416, o 512 de la SEQ ID NO:1.

Una "variante" de SCP es un polipéptido u oligopéptido de SCP que no es completamente idéntico a la SCP nativa. Dicha variante de SCP se puede obtener alterando la secuencia de aminoácidos mediante inserción, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la proteína se modifica, mediante sustitución, para crear un polipéptido que tiene sustancialmente las mismas, o mejoradas, cualidades en comparación con el polipéptido nativo. La sustitución puede ser una sustitución conservada. Una "sustitución conservada" es una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Una sustitución conservada sería una sustitución por un aminoácido que introdujera el menor cambio posible en la carga del aminoácido o en el tamaño de la cadena lateral del aminoácido (de forma alternativa, en el tamaño, carga o tipo del grupo químico de la cadena lateral) de tal modo que el péptido global mantenga su conformación espacial pero tenga una actividad biológica alterada. Por ejemplo, los cambios conservados más comunes podrían ser Asp a Glu, Asn ó Gln; His a Lys, Arg ó Phe; Asn a Gln, Asp ó Glu; y Ser a Cys, Thr ó Gly. Normalmente se usa alanina para sustituir por otros aminoácidos. Los 20 aminoácidos esenciales se pueden agrupar de la siguiente manera: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina, que tienen cadenas laterales no polares; glicina, serina, treonina, cistina, tirosina, asparagina y glutamina, que tienen cadenas laterales polares no cargadas; aspartato y glutamato, que tienen cadenas laterales ácidas; y lisina, arginina e histidina, que tienen cadenas laterales básicas. L. Stryer, Biochemistry (2ª ed.) pág. 14-15; Lehninger, Biochemistry, pág. 73-75.

Los cambios de aminoácidos se consiguen cambiando los codones de la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos. Se sabe que dichos polipéptidos se pueden obtener en base a la sustitución de determinados aminoácidos por otros aminoácidos en la estructura del polipéptido con el fin de modificar o de mejorar la actividad antigénica o

inmunogénica. Por ejemplo, mediante la sustitución de aminoácidos alternativos, se pueden realizar pequeños cambios conformacionales en un polipéptido que dan como resultado un aumento en la actividad o en la respuesta inmune. De forma alternativa, se pueden usar sustituciones de aminoácidos en determinados polipéptidos para proporcionar residuos que a continuación pueden ligarse a otras moléculas para proporcionar conjugados péptido-molécula que retienen suficientes propiedades antigénicas del polipéptido de partida como para ser útiles para otros propósitos.

Se puede usar el índice hidropático de aminoácidos para conferir función biológica interactiva a un polipéptido, en donde se descubre que determinados aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tengan índices hidropáticos similares y mantener todavía una actividad biológica similar. Alternativamente, la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar en base a la hidrofiliidad, particularmente cuando la función biológica deseada en el polipéptido que se va a generar está destinada al uso en realizaciones inmunológicas. Cuanto mayor es la hidrofiliidad media local de una "proteína", regida por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, mayor es su inmunogenicidad. Patente de EE.UU. 4.554.101. Por consiguiente, cabe destacar que se pueden realizar sustituciones en base a la hidrofiliidad asignada a cada aminoácido.

Cuando se usa tanto el índice de hidrofiliidad como el índice hidropático, que asigna valores a cada aminoácido, se prefiere realizar sustituciones de aminoácidos en los que dichos valores sean ± 2 , siendo las de ± 1 particularmente preferidas, y siendo las de $\pm 0,5$ las sustituciones más preferidas.

La SCP variante comprende al menos siete residuos de aminoácido, preferiblemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.500 residuos, y más preferiblemente de aproximadamente 300 a aproximadamente 1.200 residuos, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.180 residuos, en donde la SCP variante tiene al menos un 50%, preferiblemente al menos aproximadamente un 80%, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 90%, pero menos del 100%, de homología o identidad de secuencia de aminoácidos contiguos con la secuencia de aminoácidos de una SCP nativa correspondiente.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de SCP variante corresponde esencialmente a la secuencia de aminoácidos de SCP nativa. Tal como se usa en la presente memoria, "corresponde esencialmente a" se refiere a una secuencia de polipéptido que provocará una respuesta inmunológica protectora sustancialmente igual que la respuesta generada por la SCP nativa. Dicha respuesta puede ser de al menos el 60% del nivel generado por la SCP nativa, e incluso puede ser de al menos el 80% del nivel generado por la SCP nativa. Una respuesta inmunológica a una composición o vacuna es el desarrollo en el hospedante de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos al polipéptido o vacuna de interés. Normalmente, dicha respuesta consiste en que el sujeto produce anticuerpos, células B, células T colaboradoras, células T supresoras y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés.

La SCP puede ser una variante de la SCP de *Streptococcus* de grupo A (SCPA), de *Streptococcus* de grupo B (SCPB), de *Streptococcus* de grupo C (SCPC) o de *Streptococcus* de grupo G (SCPG).

Una variante de la invención puede incluir residuos de aminoácido no presentes en la correspondiente SCP nativa o eliminaciones relativas a la correspondiente SCP nativa. Una variante también puede ser un fragmento "truncado" en comparación con la correspondiente SCP nativa, es decir, sólo una porción de una proteína de longitud completa. Por ejemplo, la SCP variante puede variar de la SCP nativa en que no contiene un injerto de pared celular. Las variantes de SCP también incluyen péptidos que tienen al menos un aminoácido D.

La SCP variante de la vacuna puede expresarse a partir de una secuencia de ADN aislado que codifica la SCP variante. Por ejemplo, la SCP variante puede variar de la SCP nativa en que no contiene una secuencia señal o un injerto de pared celular. El ADN puede codificar la hendidura de especificidad o el dominio catalítico. En particular, el ADN puede codificar el residuo de aminoácido 130, 193, 295 o 512 del dominio catalítico, o los residuos de aminoácido 260, 261, 262, 415, 416 ó 417 de la hendidura de especificidad, o codificar modificaciones en dichos residuos. En particular, el ADN puede codificar SCPA49P130A, SCPA49H193A, SCPA1D130A, SCPA1H193A, SCPBD130A, SCPBH193A. Para la lista anterior SCPA49H193, por ejemplo, significa una SCP de *Streptococcus* de grupo A serotipo 49, donde la His en el número de residuo 193 se sustituye con Ala. La SCP de la vacuna carece de actividad enzimática de C5asa o de peptidasa. La vacuna también puede contener un adyuvante inmunológico. La vacuna se puede usar para prevenir la infección por *Streptococcus* de grupo A, *Streptococcus* de grupo B, *Streptococcus* de grupo C o *Streptococcus* de grupo G. La vacuna también comprende la peptidasa C5a conjugada o ligada a un péptido inmunogénico o a un polisacárido inmunogénico. Se define "recombinante" como un péptido o ácido nucleico producido mediante procesos de ingeniería genética. Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente en la presente memoria.

La vacuna de peptidasa C5a estreptococal se puede administrar mediante inyección subcutánea o intramuscular. Alternativamente, la vacuna puede administrarse mediante ingestión oral o mediante inoculación intranasal.

En la solicitud también se describen otros péptidos de SCP aislados y purificados, en los que la SCP es una variante de la SCP natural, y otros polinucleótidos aislados y purificados que codifican una SCP variante. Dichas SCPs pueden incluir los residuos de aminoácido 130, 193, 295 ó 512 del dominio catalítico, o los residuos de aminoácido

260, 261, 262, 415, 416 ó 417 de la hendidura de especificidad. Dichas SCPs pueden ser SCPA49D130A, SCPA49H193A, SCPA49N295A, SCPA49S512A, SCPA1D130A, SCPA1H139A, SCPA1N295A, SCPA1S512A, SCPBD130A, SCPBH193A, SCPBN295A, SCPBS512A ó ΔSCPA49.

Breve Descripción de las Figuras

- 5 Figura 1. Arquitectura de peptidasa C5a de estreptococos β-hemolíticos. D indica un residuo de ácido aspártico; H indica histidina; S indica serina; L indica leucina; P indica prolina; T indica treonina; y N indica asparagina. R₁, R₂, R₃ y R₄ indican secuencias repetidas. Los números indican la posición del residuo de aminoácido en la peptidasa.

- 10 Figura 2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de SCP de estreptococos de grupo A serotipo 49 (SEQ ID NO: 1), de estreptococos de grupo A serotipo 12 (SEQ ID NO: 2), de estreptococos de grupo B (SEQ ID NO: 3) y de estreptococos de grupo A serotipo 1 (SEQ ID NO: 23). Las secuencias son idénticas excepto por las posiciones de aminoácidos indicadas. El triángulo (▽) indica el punto de ruptura predicho para la peptidasa señal. Los aminoácidos predichos para la posición de centro activo de la enzima están marcados con asteriscos. Las eliminaciones de la secuencia de aminoácidos están indicadas mediante puntos y están recuadradas. Los asteriscos (*) indican los residuos de aminoácido del dominio catalítico.

- 15 Figura 3. Construcción de mutantes de inserción y de eliminación de SCP. La caja negra indica una región eliminada.

Figura 4. Análisis FACS de color sencillo. Los datos de fluorescencia fueron analizados fijando la puerta sobre PMNs. Se fijó una segunda puerta para contabilizar las células de tinción superiores definidas por la primera puerta. Se inocularon sacos de aire con 1×10^6 CFU.

Figura 5. Persistencia de serotipo M49 natural y de tipo SCPA⁻ de estreptococos después de infección nasal.

- 20 Figura 6. Comparación de la capacidad de mutantes SCPA⁻ de serotipo M6 de estreptococos de Grupo A para colonizar ratones después de infección intranasal. Compara ratones BALB/c (diez en cada grupo experimental) inoculados con 2×10^7 CFU de M6 de estreptococos. Se cultivaron muestras de garganta cada día sobre placas de agar de sangre que contenían estreptomycin. Los ratones fueron considerados positivos cuando las placas contenían una colonia β-hemolítica. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el ensayo χ^2 .

- 25 Figura 7. Construcción de vacuna ΔSCPA49 y protocolo de inmunización.

- 30 Figura 8. El anticuerpo de conejo neutraliza la actividad de SCPA asociada a diferentes serotipos. La Barra 1 es un control positivo y contenían rhC5a que no había sido preincubado antes de la exposición a PMNs. La Barra 10 es un control que carece de rhC5a. Se incubaron con 20 μL de rhC5a 5 μM durante 45 minutos bacterias enteras intactas, preincubadas con suero normal de conejo (barra 2, M1 90-131; barra 4, M6 UAB200; barra 6, M12 CS24; barra 8, M49 CS101) o preincubadas con suero de conejo anti-SCPA49 (barra 3, M1 90-131; barra 5, M6 UAB200; barra 7, M12 CS24; barra 9, M49 CS101). El rhC5a residual se evaluó a través de su capacidad para activar PMNs para adherirse a pocillos de placas de microtitulación recubiertas con BSA. Los PMNs adherentes se tiñeron con violeta cristal.

- 35 Figura 9. Respuestas de IgG de suero y de IgA secretor después de inmunización intranasal de ratones con la proteína ΔSCPA49 purificada. Los niveles de IgG específico de SCPA49 en suero y en saliva fueron determinados mediante ELISA indirecto. Los sueros procedentes de cada ratón fueron diluidos a 1:2.560 en PBS; la saliva fue diluida 1:2 en PBS. La Figura 9A muestra los resultados experimentales de IgA; la Figura 9B muestra los resultados experimentales de IgG.

- 40 Figura 10. Comparación de la capacidad del serotipo M49 de estreptococo para colonizar ratones CD1 hembras inmunizados y no inmunizados. Cada grupo experimental contenía 13 ratones que fueron infectados intranasalmente (i.n.) con $2,0 \times 10^8$ CFU. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el ensayo χ^2 . Las Figuras 10A y 10B muestran los resultados del experimento repetido.

- 45 Figura 11. Comparación de ELISA competitivo de SCP natural y variante en la unión a anticuerpo policlonal. El antígeno de placa es SCPA49 natural recombinante (100 ng/pocillo). El antígeno competidor está indicado en la leyenda.

- 50 Figura 12. Comparación de ELISA competitivo de SCPA1, SCPA49 y SCPB en la unión a anticuerpo policlonal. El antígeno de placa es SCPA49 natural recombinante (100 ng/pocillo). El antígeno competidor está indicado en la leyenda. El SCPA1 y el SCPA49 usados en los experimentos presentados en esta Figura comprendían desde Asn³² hasta His¹¹³⁹. El SCPB usado en los experimentos presentados en esta Figura se fabricó de acuerdo con Chmouryguina, I. y col., "Conservation of the C5a Peptidase Gene in Group A and B Streptococci", Infect. Immun., 64: 2387-2390 (1996).

Descripción Detallada de la Invención

Una primera línea importante de defensa contra la infección provocada por muchos patógenos bacterianos es la acumulación de leucocitos polimorfonucleares fagocíticos (PMNs) y de células mononucleares en la zona de la

infección. La atracción de dichas células está mediada por estímulos quemoatácticos, tales como los factores del hospedante o los factores segregados por el organismo invasor. El quemoattractor C5a es básico en la estimulación de esta respuesta inflamatoria en mamíferos. El C5a es un glicopéptido de 74 residuos separado del quinto componente (C5) de complemento. Las células fagocíticas responden de un modo directo a un gradiente de C5a y se acumulan en la zona de la infección. El C5a puede ser el atractor más inmediato de fagocitos durante la inflamación. Cuando los PMNs se infiltran en una lesión inflamatoria segregan otras quemoquinas, tales como IL8, que intensifican aún más la respuesta inflamatoria.

La peptidasa C5a estreptococal (SCP) es una enzima proteolítica localizada sobre la superficie de estreptococos patogénicos donde destruye C5a, según se va produciendo localmente el C5a. La SCP ataca específicamente la quemoatrina C5a en la posición de unión de PMN (entre los residuos His⁶⁷ y Lys⁶⁸ del C5a) y elimina los siete residuos del extremo C del C5a. Esta eliminación de la posición de unión de PMN elimina la señal quemoatáctica. Cleary, P., y col., "Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase", *Infect. Immun.*, 60: 5219-5223 (1992); Wexler, D. E., y col., "Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 82: 8144-8148 (1985).

La SCP de estreptococos de grupo A es una serina proteasa de tipo subtilisina con un M_r de 124.814 da y con una estructura de anclaje a pared celular que es común muchas proteínas superficiales de bacterias Gram positivas. La arquitectura de peptidasa de C5a se presenta en la Figura 1. La secuencia completa de nucleótidos del gen de peptidasa de C5a estreptococal de *Streptococcus pyogenes* ha sido publicada. Chen, C., y Cleary, P., "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*", *J. Biol. Chem.*, 265: 3161-3167 (1990). Al contrario que las subtilisinas, la SCP presenta una especificidad de sustrato muy estrecha. Esta estrecha especificidad es sorprendente a la luz de las marcadas similitudes entre sus dominios catalíticos. Cleary, P., y col., "Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase", *Infect. Immun.*, 60: 5219-5223 (1992). Los residuos implicados en la transferencia de carga se conservan, así como los residuos a ambos lados del bolsillo de unión. Sin embargo, el resto de la secuencia de aminoácidos de la SCP no está relacionada con la de la subtilisinas. Se descubrió que más de 40 serotipos de estreptococos de Grupo A producen proteína SCP o alojan el gen. Cleary, P., y col., "A streptococcal inactivator of chemotaxis: a new virulence factor specific to group A streptococci", en *Recent Advances in Streptococci and Streptococcal Disease* pág. 179-180 (S. Komani y Y. Shiokawa, ed.; Reedbooks Ltd., Berkshire, Inglaterra.; 1984); Podbielski, A., y col., "The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes", *Infect. Immun.*, 63: 9-20 (1995).

El dominio catalítico o el centro activo de la SCP se componen del sistema de transferencia de carga y de la hendidura de especificidad. El sistema de transferencia de carga, que es parte del dominio catalítico, contiene los residuos Asp¹³⁰, His¹⁹³, Asn²⁹⁵ y Ser⁵¹² (Figuras 1 y 2). Cualquier modificación, es decir, una eliminación, inserción o sustitución, de uno cualquiera de estos aminoácidos desactivará la enzima. Por otro lado, se predice que la hendidura de especificidad está formada por Ser²⁶⁰, Phe²⁶¹, Gly²⁶², Ile⁴¹⁵, Tyr⁴¹⁶ y Asp⁴¹⁷. La modificación mediante sustitución de dichos aminoácidos podría cambiar la especificidad de sustrato de la enzima o eliminar a la vez la actividad proteolítica. La modificación mediante eliminación de dichos aminoácidos también desactivaría la enzima. El dominio catalítico depende de la estructura terciaria de la proteína que se crea cuando la enzima madura de pliega en sus estado activo. Este dominio no se forma a partir de un conjunto lineal contiguo de residuos de aminoácidos. Alternativamente, la modificación también puede reducir la unión de SCP variante con el sustrato. La unión se puede reducir en un 50%, un 70% o incluso un 80%.

También se ha identificado una enzima peptidasa de C5a asociada a estreptococos de grupo B. Hill, H. R., y col., "Group B streptococci inhibit the chemotactic activity of the fifth component of complement", *J. Immunol.* 141: 3551-3556 (1988). El mapeo de restricción y la finalización de la secuencia de nucleótidos *scpB* demostraron que *scpB* es similar en un 97-98% a *scpA*. Véase la Figura 2 para una comparación de la secuencia de aminoácidos de SCP procedente de estreptococos de grupo A de serotipo 49, de estreptococos de grupo A de serotipo 12, de estreptococos de grupo B y de estreptococos de grupo A de serotipo 1 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 23, respectivamente). Más de 30 cepas, que representan todos los serotipos de estreptococos de grupo B, portan el gen *scpB*. Cleary P. P., y col., "Similarity between the Group B and A streptococcal C5a Peptidase genes", *Infect. Immun.* 60: 4239-4244 (1992); Suvorov A. N., y col., "C5a peptidase gene from group B streptococci", en *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci y Enterococci*, pág. 230-232 (G. Dunny, P. Cleary y L. McKay (ed.); American Society for Microbiology, Washington, D.C.; 1991).

Los elementos aislados de estreptococos de los grupos G y C también alojan genes del tipo *scpA*. Se demostró que algunas cepas de grupo G expresan actividad de proteasa específica de C5a sobre su superficie. Cleary, P. P. y col., "Virulent human strains of group G streptococci express a C5a peptidase enzyme similar to that produced by group A streptococci", *Infect. Immun.*, 59: 2305-2310 (1991). Por lo tanto, todos los serotipos (>80) de estreptococos de grupo A, de estreptococos de grupo B, de estreptococos de grupo C y de estreptococos de grupo G producen la enzima SCP.

La SCP asiste a los estreptococos a colonizar una zona de infección potencial, tal como la mucosa nasofaríngea, mediante la inhibición del flujo de células blancas fagocíticas hacia la zona de infección. Esto impide la eliminación inicial de los estreptococos del hospedante. El impacto de la SCP en la inflamación, la quemoatris de leucocitos C5a y la virulencia estreptococal se examinaron usando cepas estreptococales con mutaciones bien definidas en el gen

estructural de proteasa. Las variantes de SCP se construyeron usando inserción de plásmido dirigida y reemplazamiento del gen natural por *scpA* que contiene una eliminación interna específica. Las variantes carecieron de actividad de proteasa C5a y no inhibieron la respuesta quimotáctica de PMNs de humano o de ratón *in vitro*.

5 Se usó un modelo de bolsa de aire de tejido conectivo de ratón para confirmar que la SCP retrasa el flujo de células fagocíticas y la eliminación de estreptococos de la zona de infección. Se genera una bolsa de aire de tejido conectivo inyectando una pequeña cantidad de aire y de PBS (con o sin estreptococos) con una aguja indicadora 25 bajo la piel en la espalda del ratón. Boyle, M. D. P. y col., "Measurement of leukocyte chemotaxis *in vivo*", *Meth. Enzymol.*, 162: 101-115 (1988). Al final del experimento, los ratones fueron sometidos a eutanasia mediante dislocación cervical, se diseccionaron las bolsas de aire y se homogeneizaron en tampón. Una ventaja del modelo de bolsa de aire es que la bolsa de aire permanece inflada durante varios días y libre de inflamación, a menos que se inyecte un irritante. De este modo, las bacterias inyectadas y la respuesta inflamatoria resultante permanecen localizadas en periodos cortos de la infección.

15 El modelo de bolsa de aire se modificó para comparar la eliminación de estreptococos SCP⁺ y SCP⁻ naturales (es decir, estreptococos de grupo A que portaban una forma de SCP variante no funcional), y para analizar el infiltrado celular en una etapa inicial de la infección. Se evaluaron suspensiones de tejido para determinar la presencia de estreptococos viables sobre placas de agar de sangre, y el infiltrado celular se analizó mediante clasificación celular fluorescente (FACS). En el análisis FACS, las células individuales en suspensión son marcadas con monoanticuerpos fluorescentes específicos. Se inyectan alícuotas de células marcadas en un flujocitómetro FAC-Scan, o clasificador de células fluorescentes, que contabiliza células en función de su fluorescencia característica. Los experimentos realizados usando el modelo de bolsa de aire indicaron que los estreptococos que eran SCP⁺ eran más virulentos que los estreptococos que eran SCP⁻.

25 Se realizó un estudio para medir la producción de anticuerpos humanos, tanto IgG como IgA, contra SCP en sueros y saliva humanos. O'Connor, S. P., y col., "The Human Antibody Response to Streptococcal C5a Peptidase", *J. Infect. Dis.* 163: 109-16 (1991). Generalmente, los sueros y la saliva de niños jóvenes no infectados carecían de anticuerpos contra la SCP. Por el contrario, la mayoría de los especímenes de suero y de saliva de adultos saludables presentaron niveles mensurables de IgG anti-SCP y de IgA secretor específico de SCP (slgA anti-SCP). Los sueros convalescentes y agudos emparejados de pacientes con faringitis estreptococal poseían niveles significativamente mayores de IgG anti-SCP que los sueros procedentes de individuos saludables. Los sueros que contenían altas concentraciones de inmunoglobulina anti-SCP fueron capaces de neutralizar la actividad de SCP. La detección de este anticuerpo en >90% de los especímenes de saliva obtenidos de niños que habían experimentado recientemente faringitis estreptococal demostró que los niños pueden producir una respuesta de anticuerpos.

35 Incluso aunque los sujetos humanos produjeron IgG e IgA contra SCP en respuesta a una infección estreptococal natural, no se sabía si la inmunoglobulina anti-SCP proporciona alguna protección contra la infección. Además, no se sabía si la proteína SCP podría actuar como una vacuna contra la colonización o la infección estreptococal β -hemolítica. En primer lugar, se realiza un estudio para examinar el papel de la SCP en la colonización de la nasofaringe. Después de la infección intranasal con estreptococos vivos de grupo A, se tomaron cultivos de garganta a diario durante hasta diez días. Se compararon los estreptococos naturales y los mutantes deficientes en SCP en términos de capacidad para persistir en la garganta a lo largo de dicho periodo de diez días. Como era de esperar, los estreptococos mutantes deficientes en SCP fueron eliminados de la nasofaringe más rápidamente.

45 Se usó el mismo modelo intranasal de ratón para evaluar la capacidad de SCP para inducir inmunidad que prevenga la colonización. Se clonó una forma variante del gen recombinante *scpA49* comenzando en el nucleótido que codifica Thr⁶³. Dicha variante se denomina Δ SCPA49, y tiene una longitud de 2908 pb (véase el Ejemplo 4 más adelante). La proteína SCP variante fue purificada a partir de un *E. coli* recombinante mediante cromatografía de afinidad. Los sueros de conejos vacunados intradermalmente con esta preparación de proteína neutralizaron la actividad de SCP *in vitro*. La proteína purificada (40 μ g) se administró intranasalmente a ratones a lo largo de un periodo de cinco semanas. Los ratones inmunizados eliminaron los estreptococos en 1-2 días; mientras que los cultivos de garganta de ratones no inmunizados permanecieron positivos hasta 10 días. El experimento se repitió con tres conjuntos de ratones, vacunados con tres preparaciones de proteína SCP separadas.

50 Se llevaron a cabo más experimentos para determinar si la inmunización de un animal con un único antígeno evitaría la colonización de varios serotipos. Se clonó el Δ SCPA49 en un vector de expresión y se expresó en *E. coli*. La proteína Δ SCPA49 variante purificada por afinidad demostró ser altamente inmunogénica en ratones y en conejos. Aunque el inmunógeno Δ SCPA49 variante purificado carecía de actividad enzimática, indujo elevados títulos de anticuerpos de conejo que fueron capaces de neutralizar la actividad de peptidasa asociada a estreptococos M1, M6, M12 y M49 *in vitro*. Esto confirmó que los anticuerpos anti-peptidasa carecen de especificidad de serotipo. A continuación se inmunizaron intranasalmente cuatro conjuntos de ratones con la Δ SCPA49 variante purificada y fueron expuestos a diferentes serotipos de estreptococos de grupo A. La inmunización de ratones con proteína Δ SCPA49 estimuló niveles significativos de anticuerpos slgA específicos de saliva y anticuerpos IgG de suero, y redujo el potencial de colonización de los estreptococos naturales M1, M2, M6, M11 y M49. Estos experimentos confirman que la inmunización con vacuna de peptidasa de C5a estreptococal es eficaz en la prevención de la colonización de la nasofaringe.

También se realizaron experimentos para desarrollar SCPs variantes a partir de una cepa OF⁻ de M1 y de una cepa OF⁺ de M49. Puesto que la SCP activa podría ser dañina para el hospedante, era importante que las proteínas variantes carecieran de actividad enzimática. Los aminoácidos requeridos para la actividad catalítica fueron reemplazados por aquellos de los que se esperaba que desactivaran la enzima.

5 Se evaluaron dos propiedades de las proteínas variantes. En primer lugar, se determinaron las actividades específicas de las proteínas naturales y variantes mediante el ensayo de adherencia de PMN. Estos experimentos indicaron que los aminoácidos sustituidos reducían la actividad enzimática en más del 90%. En segundo lugar, también se compararon las proteínas variantes con la proteína natural en cuanto a su capacidad para unirse a anticuerpos dirigidos contra la enzima natural. Se usaron ensayos ELISA competitivos para este propósito. Los resultados indicaron que las sustituciones de aminoácidos no alteraron la capacidad de los anticuerpos para unirse a las proteínas variantes.

10 Todos los estudios previos de protección se habían llevado a cabo administrando la proteína ΔSCPA49 purificada por afinidad intranasalmente sin adyuvante. Sin embargo, la inyección intramuscular o subcutánea (SQ) de antígenos es históricamente un método aceptado preferido para suministrar vacunas. Por tanto, se llevaron a cabo experimentos para evaluar si las inyecciones SQ de ΔSCPA con lípido de monofosforilo A (MPL) y con alumbre (AlPO₄) inducían una respuesta inmune protectora y si dicha respuesta reducía la colonización cuando la cepa de estreptococos de grupo A usada para la exposición difería en el serotipo con respecto a la fuente de vacuna SCPA. Se evaluó la capacidad de ratones inmunizados para eliminar los estreptococos de la mucosa oral-nasofaríngea mediante cultivos de garganta o tomando muestras de tejido nasal diseccionado.

15 El número de estreptococos asociados al tejido nasal disminuyó con el tiempo, tal como era de esperar, y el descenso fue más rápido y completo en los ratones inmunizados con antígeno de SCPA. Los resultados confirmaron que un único antígeno de SCPA induce protección contra serotipos heterólogos. La protección la proporciona un anticuerpo que neutraliza la actividad de peptidasa sobre la superficie bacteriana. Esto aumenta el flujo de fagocitos en las primeras horas desde el momento en que los estreptococos son depositados en el tejido mucoso. Se sospecha que la rápida eliminación de estreptococos por acción de los fagocitos evita la posterior multiplicación y persistencia de las bacterias. Por tanto, la inyección SQ de antígeno de SCPA con adyuvante indujo consistentemente una vigorosa respuesta inmune.

20 De este modo, la presente invención proporciona una vacuna para usarse para proteger mamíferos frente a la colonización o la infección de *Streptococcus* β-hemolíticos, comprendiendo dicha vacuna una cantidad inmunogénica de un péptido purificado y aislado que comprende una Peptidasa de C5a Estreptococal (SCP) desactivada enzimáticamente, cantidad que es eficaz para inmunizar a un mamífero susceptible frente a Estreptococos β-hemolíticos en combinación con un vehículo no tóxico fisiológicamente aceptable, en donde la SCP es una variante de la SCP natural que tiene al menos (i) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 193 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 260, 261, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (ii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 130 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 193, 260, 261, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (iii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 260 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 261, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (iv) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 261 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (v) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 262 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (vi) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 415 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 262, 295, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, (vii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 416 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, o (viii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 417 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 262, 295, 415, 416, o 512 de la SEQ ID NO: 1. Las vacunas de la presente invención también pueden incluir cantidades eficaces de adyuvantes inmunológicos, conocidos porque potencian la respuesta inmune.

25 La SCP se puede conjugar o ligar a otro péptido o a un polisacárido. Por ejemplo, se pueden emplear proteínas inmunogénicas bien conocidas en la técnica, también denominadas "vehículos". Las proteínas inmunogénicas útiles incluyen hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina, albúmina de suero humano, globulina gamma humana, inmunoglobulina G de pollo y globulina gamma bovina. Los polisacáridos inmunogénicos útiles incluyen polisacáridos Estreptococales de grupo A, polisacáridos C de Estreptococos de grupo B, o los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* o *Streptococci* B. Alternativamente, los polisacáridos o las proteínas de otros patógenos que se usan como vacunas se pueden conjugar, unir o mezclar con la SCP.

Se describe adicionalmente en la presente moléculas de ácido nucleico purificadas, por ejemplo, moléculas de ADN, que comprenden un segmento de ácido nucleico preseleccionado que codifica al menos una porción de un peptidasa de C5a Estreptococal, es decir, codifican SCP o una variante de la misma tal como se describe en la presente memoria, por ejemplo SCPA49S512A, SCPA49D130A, SCPA49N295A, SCPA1S512A, SCPA1D130A, SCPA1N295A, ΔSCPA49, SCPBS512A, SCPBD130A, SCPBH193A ó SCPBN295A, o cualquier combinación de dichas mutaciones. También se describe en la presente una casete de expresión que comprende un segmento de ADN preseleccionado que codifica una molécula de ARN que es sustancialmente idéntica (sentido) a todo o a una parte de un ARN mensajero (mARN "diana"), es decir, un mARN de SCP endógeno o "nativo". El segmento de ADN preseleccionado en la casete de expresión está ligado operativamente a un promotor. Tal como se emplea en el presente documento, "sustancialmente idéntico" en secuencia significa que dos secuencias de ácidos nucleicos presentan al menos aproximadamente un 65%, preferiblemente aproximadamente un 70%, más preferiblemente aproximadamente un 90%, e incluso más preferiblemente aproximadamente un 98%, de identidad de secuencia de nucleótidos contiguos una respecto a la otra. Preferiblemente, el segmento de ADN preseleccionado se hibrida en condiciones de hibridación, preferiblemente en condiciones de hibridación severas, con una molécula de ácido nucleico que codifica la correspondiente SCP nativa.

Tal como se usa en la presente memoria, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en base molar es más abundante que cualquier otra especie individual de la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente un 50 por ciento (en base molar) de todas las especies macromoleculares presentes.

Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% y aproximadamente el 99%. Lo más preferible es que la especie objeto esté purificada hasta homogeneidad esencial (que las especies contaminantes no puedan ser detectadas en la composición empleando métodos de detección convencionales), en donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico recombinante" o "ácido nucleico preseleccionado", por ejemplo, "secuencia o segmento de ADN recombinante" o "secuencia o segmento de ADN preseleccionado" se refiere a un ácido nucleico, por ejemplo a un ADN, que ha sido derivado o aislado a partir de cualquier fuente apropiada, que posteriormente puede ser alterado químicamente *in vitro*, de tal modo que su secuencia no existe de forma natural, o que corresponde a secuencias naturales que no se encuentran posicionadas del modo en que lo estarían en un genoma que no ha sido transformado con ADN exógeno. Un ejemplo de ADN preseleccionado "derivado" de una fuente sería una secuencia de ADN que se identifica como fragmento útil dentro de un organismo dado, y que a continuación puede sintetizarse químicamente en una forma esencialmente pura. Un ejemplo de dicho ADN "aislado" a partir de una fuente sería una secuencia de ADN útil que es separada o eliminada de dicha fuente empleando medios químicos, por ejemplo mediante el uso de endonucleasas de restricción, de tal modo que puede seguir siendo manipulada, por ejemplo, amplificada, para su uso en la invención, mediante la metodología de la ingeniería genética.

La recuperación o el aislamiento de un fragmento dado de ADN a partir de una digestión de restricción pueden emplear la separación de los elementos digeridos sobre gel de poliacrilamida o de agarosa mediante electroforesis, identificación del fragmento de interés mediante comparación de su movilidad frente a la fragmentos de ADN marcadores de peso molecular conocido, eliminación de la sección de gel que contiene el fragmento deseado y separación del gel y el ADN. Véase Lawn y col., *Nucleic Acids Res.*, 9, 6103 (1981), y Goeddel y col., *Nucleic Acids Res.*, 8, 4057 (1980). Por tanto, "ADN preseleccionado" incluye secuencias de ADN completamente sintéticas, secuencias de ADN semi-sintéticas, secuencias de ADN aisladas de fuentes biológicas, y secuencias de ADN derivadas de ARN, así como mezclas de las mismas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "derivado" con respecto a una molécula de ARN significa que la molécula de ARN tiene una identidad de secuencia complementaria con una molécula de ADN concreta.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos de una SCP se preparan usando una serie de métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a posición), mutagénesis PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante de la SCP.

Para inmunizar a un sujeto, la variante SCP se administra parenteralmente, normalmente mediante inyección intramuscular o subcutánea en un vehículo apropiado. Sin embargo, también son aceptables otros modos de administración tales como la administración oral o la intranasal. Las formulaciones de vacuna contendrán una cantidad eficaz del ingrediente activo en un vehículo. La cantidad eficaz es suficiente para prevenir, paliar o reducir la incidencia de una colonización de *Streptococcus* β-hemolítico en el mamífero objetivo. El especialista en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad eficaz. El ingrediente activo puede oscilar típicamente entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 95% (p/p) de la composición, o incluso más o menos si es apropiado.

La cantidad a administrar depende de factores tales como la edad, el peso y la condición física del animal o del sujeto humano considerado para la vacunación. La cantidad también depende de la capacidad del sistema inmune del animal para sintetizar anticuerpos, y del grado de protección deseado. El especialista en la técnica puede establecer fácilmente las dosis eficaces mediante ensayos rutinarios que establezcan las curvas dosis-respuesta. El sujeto se inmuniza mediante la administración de la SCP en una o más dosis. Se pueden administrar dosis múltiples si se requieren para mantener un estado de inmunidad frente a estreptococos.

Las formulaciones intranasales pueden incluir vehículos que no causan irritación en la mucosa nasal ni afectan significativamente a la función ciliar. Con la invención se pueden emplear diluyentes tales como agua, disolución salina acuosa u otras sustancias conocidas. Las formulaciones nasales también pueden contener conservantes tales como clorobutanol y cloruro de benzalconio, pero sin limitarse a ellos. Puede haber presente un tensioactivo para potenciar la absorción de las proteínas sujeto por la mucosa nasal.

Las preparaciones líquidas orales pueden encontrarse en la forma, por ejemplo, de suspensión, disolución, emulsión, jarabe o elixir, acuosos u oleaginosos, o puede presentarse en seco en forma de comprimido o como un producto para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsificantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), o conservantes.

Para preparar una vacuna, se puede aislar, liofilizar y estabilizar la SCP purificada. El péptido de SCP se puede ajustar a continuación hasta una concentración apropiada, combinado opcionalmente con un adyuvante de vacuna adecuado, y se puede empaquetar para su uso. Los adyuvantes adecuados incluyen, aunque sin limitación, tensioactivos, por ejemplo hexadecilamina, octadecilamina, lisolecitina, bromuro de dimetildioctadecilamonio, N,N-dioctadecil-N'-N-bis(2-hidroxietil-propano-di-amina), metoxihexadecil-glicerol, y polioles pluronic; polianiones, por ejemplo pirano, sulfato de dextrano, poli IC, ácido poliacrílico, carbopol; péptidos, por ejemplo dipéptido de muramilo, MPL, aimetilglicina, tuftsina, emulsiones en aceite, alumbre, y mezclas de los mismos. Otros adyuvantes potenciales incluyen las subunidades de péptido B de la toxina termolábil de *E. coli* o de la toxina del cólera. McGhee, J. R., y col., "On vaccine development", Sem. Hematol. 30: 3-15 (1993). Finalmente, el producto inmunogénico se puede incorporar en liposomas para su uso en una formulación de vacuna, o puede conjugarse con proteínas tales como la hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH) o la albúmina de suero humano (HSA) u otros polímeros.

La aplicación de SCP para la vacunación de un mamífero contra la colonización ofrece ventajas sobre otros candidatos a vacuna. La prevención de la colonización o de la infección mediante inoculación con una única proteína no sólo reducirá la incidencia de los problemas habituales del dolor de garganta y del impétigo, sino que también eliminará secuelas tales como la fiebre reumática, la glomerulonefritis aguda, la sepsis, el choque tóxico y la fascitis necrotizante.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención sin limitarla.

Ejemplo 1

Construcción y Análisis *In Vitro* de Mutantes de Inserción y de Eliminación en *scpA49* y *scpA6*

a) Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. La cepa CS101 de *S. pyogenes* es una cepa de serotipo M49, y de de opacidad de suero positiva (OF⁺). El CS159 es un elemento clínico aislado con una eliminación que se extiende a través del grupo del gen M y de *scpA*. Se seleccionó un derivado espontáneo resistente a estreptomina de la cepa CS101, denominado CS101Sm, mediante colocación en placa de estreptococos procedentes de un cultivo de fase estacionaria sobre agar de sangre de triptosa que contiene estreptomina (200 µg/mL). Las cepas estreptococales CS210 y CS463 son derivados espontáneos resistentes a estreptomina de cepas OF⁺, clase II, serotipo M2 y M11, respectivamente. Las cepas estreptococales 90-131 y UAB200 son derivados espontáneos resistentes a estreptomina de elementos aislados humanos OF⁻, clase I, serotipo M1 y M6 de estreptococos de grupo A, respectivamente.

La CS 101::pG⁺host5 es la cepa CS 101 con pG⁺host5 integrado en el cromosoma en una posición conocida, pero fuera de *scpA* y del grupo de genes *emm*. La cepa ER1821 de *Escherichia coli* (de New England Biolabs, Inc. Beverly, MA) se usó como receptor del vector suicida, el plásmido pG⁺host5. El plásmido pG⁺host5 se obtuvo en Appligene, Inc. Pleasanton, CA. Los estreptococos fueron cultivados en caldo de Todd-Hewitt suplementado con un 2% de neopeptona o con un 1% de extracto de levadura, o sobre placas de agar de triptosa con un 5% de sangre de oveja. La cepa ER1821 de *E. coli* que contiene el plásmido pG⁺host5 se cultivó en caldo LB con eritromicina (300 µg/mL). Los estreptococos con plásmido pG⁺host5 se cultivaron en caldo de Todd-Hewitt con un 1% de extracto de levadura (THY) que contiene 1 µg/mL de eritromicina (Erm).

SCP se refiere a peptidasa de C5a estreptococal de *Streptococcus* β-hemolítico generalmente. SCPA1, SCPA12, SCPA49 y SCPA6 son las peptidasas específicas de las cepas de *Streptococcus* de grupo A de serotipo M 1, 12, 49 y 6, respectivamente. El término *scpA* se refiere al gen que codifica SCP procedente de estreptococos de grupo A. *ScpA1*, *scpA12*, *scpA49* y *scpA6* son los genes que codifican las peptidasas SCPA1, SCPA12, SCPA49 y SCPA6. SCPB y *scpB* se refieren a la peptidasa y al gen procedentes de estreptococos de grupo B. Las secuencias de

aminoácido correspondientes a SCPA49 (SEQ ID NO: 1), a SCPA12 (SEQ ID NO: 2), a SCPA1 (SEQ ID NO: 23) y a SCPB (SEQ ID NO: 3) se muestran en la Figura 2.

b) Construcción del mutante de inserción scpA49. Se construyeron mutantes de inserción bien definida de scpA49 usando métodos de inserción de plásmidos y de sustitución de genes. Un fragmento interno de *scpA49 BgIII* – *BamHI*, la diana de inserción, se ligó en el vector lanzadera termosensible pG⁺host5 para formar el plásmido pG::scpA1.2 y se transformó en *E. coli* ER1821 (Figura 3). El vector pG⁺host5 contiene un origen de replicación de *E. coli* que es activo a 39°C, un origen de replicación Gram positivo sensible a la temperatura (activo a 30°C e inactivo a 39°C en los estreptococos), y un gen de resistencia a eritromicina para selección. Las temperaturas elevadas fuerzan al plásmido a integrarse en el ADN cromosomal de estreptococos de grupo A mediante recombinación homóloga a frecuencias que varían entre 10⁻² y 10⁻³.

El ADN de plásmido recombinante pG::scpA1.2 se sometió a electroporación en células receptoras CS101. Los transformantes fueron seleccionados en placas de agar-THY que contenían 1 µg/mL de eritromicina a 30°C. Los integrantes cromosomales resultantes de la recombinación entre el injerto de plásmido y el *scpA49* cromosomal fueron seleccionados por su resistencia a eritromicina a 39°C. Se analizaron dos mutantes de inserción, M14 y M16. Los revertidos de EmrS de las cepas M14 y M16 fueron obtenidos haciéndolos pasar por THY sin antibióticos a 30°C, y finalmente fueron llevados a placa a 37°C sin selección Erm. Las colonias que habían perdido el plásmido fueron aisladas para confirmar que el fenotipo mutante resultó de la inserción del plásmido en *scpA49*, en lugar de una mutación simultánea no relacionada.

c) Construcción de los mutantes de inserción de scpA6. El mutante de inserción de *scpA6* AK1.4 se construyó tal como se ha descrito en la anterior sección (b). El ADN plásmido recombinante, pG::scpA1.2, contiene un fragmento interno *BgIII-BindIII* de gen *scpA*. Este plásmido se sometió a electroporesis en células receptoras UAB200 y se seleccionaron los transformantes sobre placas de agar THY que contenían eritromicina a 30°C. Se seleccionó un integrante cromosomal de pG::scpA1.2, cepa AK1.4, que resultó de la recombinación entre el injerto de plásmido y el *scpA6* cromosomal, mediante crecimiento sobre medio de agar que contenía eritromicina a 39°C. La inserción en *scpA6* se confirmó mediante transferencia Southern usando *scpA* como sonda, y PCR con un cebador universal M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') (SEQ ID NO: 6), específico del plásmido, y un cebador For835 de *scpA* (5'-AAGGACGACACATTGCGTA-3') (SEQ ID NO: 7), específico del *scpA* cromosomal de GAS.

d) Introducción de una eliminación definida en scpA (Figura 3). Se construyó una cepa mutante con una eliminación definida interna a *scpA49* para eliminar la posibilidad de que las inserciones en *scpA49* pudieran ser polares y reducir la expresión por debajo de los genes, genes desconocidos que también podrían contribuir a la virulencia del organismo. En primer lugar, se produjo una eliminación definida en fragmento *BgIII-HindIII* mediante PCR de dentro a fuera con el cebador 1 (5'-GGGGGGGAATTCGTAGCGGGTATCATGGGAC-3'), SEQ ID NO: 4, y el cebador 2 (5'-GGGGGGGAATTCGGGTGCTGCAATATCTGGC-3'), SEQ ID NO: 5. Los nucleótidos subrayados corresponden a secuencias de *scpA* con las coordenadas 2398 y 2322, respectivamente, y los nucleótidos en negrita corresponden a una posición de reconocimiento *EcoRI*. Los cebadores fueron seleccionados para producir una eliminación en marco en el gen *scpA*. Dichos cebadores copian ADN plásmido en direcciones opuestas y definen las fronteras de la eliminación. Innis, M.A., y col., eds., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Academic Press, 1990). Como molde se usó plásmido de ADN de pG::scpA1.2.

El producto amplificado fue digerido con *EcoRI* y ligado a plásmido pG⁺host5. El plásmido resultante pG::Δ*scpA*1.1 contenía una eliminación de 76 pb dentro del *scpA*. Esta eliminación en marco eliminó 25 aminoácidos, que incluyen la serina que forma parte del centro catalítico predicho de las serina proteasas. Chen, C., y Cleary, P., "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*", J. Biol. Chem., 265: 3161-3167 (1990). Se creó una posición *EcoRV* en el punto de eliminación. Se secuenció el ADN que solapa con la eliminación para confirmar las fronteras de la eliminación.

El plásmido pG::Δ*scpA*1.1, que contiene la eliminación, se transformó en ER1821 de *E. coli*. Se seleccionaron colonias para ErmR y a continuación se escrutaron para buscar la eliminación de *scpA* apropiada usando una minipreparación de ADN plásmido restringido mediante *EcoRI*. Las fronteras precisas de la eliminación fueron confirmadas mediante secuenciamiento de ADN.

e) Efectos in vitro de las mutaciones de SCP. El impacto de inserciones y eliminaciones sobre la expresión de antígeno de SCP y sobre la actividad de peptidasa se determinó mediante ensayo de transferencia Western y ensayos de adherencia de PMNs. Los estreptococos fueron incubados en 100 mL de THY a 37°C durante una noche. La partícula de cultivo fue lavada dos veces en 5 mL de Acetato de Na 0,2 M frío (pH 5,2), a continuación se suspendió en 1 mL de tampón de TE-sacarosa (20% de sacarosa, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) y 40 µL de Mutanolisina. La mezcla se rotó a 37°C durante 2 h, y continuación se centrifugó 5 minutos a 4.500 rpm. Los sobrenadantes contenían el inhibidor de proteasa, fluoruro de sulfonilo de fenilmetilo 100 mM (PMSF). Los métodos de electroforesis y de transferencia Western se llevaron a cabo tal como se describe en Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature 227: 680-685 (1970). El antisuero primario usado para detectar proteína SCP en las manchas Western y de colonia se preparó mediante inmunización de un conejo con proteína SCP recombinante purificada. La unión se detectó mediante conjugado de fosfatasa alcalina y anticuerpo anti-conejo.

Se midió la actividad de peptidasa C5a usando un ensayo de adherencia de PMN. Booth, S.A. y col., "Dapsone suppresses integrin-mediated neutrophil adherent function", J. Invest. Dermatol. 98: 135-140 (1992). Tras la incubación de C5a (Sigma, St. Louis, MO) con extractos estreptococales o con proteasa purificada, la C5a residual puede activar PMNs para que se hagan adherentes a los pocillos recubiertos con BSA. En primer lugar, los pocillos de microtitulación fueron recubiertos con BSA al 0,5% en PBS e incubados durante 1 h a 37°C. Se aislaron PMNs humanas mediante centrifugación en Ficoll Hypaque (Sigma, St. Louis, MO). Se incubaron 40 µL de estreptococos intactos o de extractos de proteína con 20 µL de C5a 5 µM en 340 µL de PBS con un 1% de glucosa y un 0,1% de CaCl₂ a 37°C durante 45 minutos. Los pocillos recubiertos con BSA fueron lavados con PBS, y se añadieron a los pocillos PMNs resuspendidas y C5a residual. La mezcla se incubó durante 45 minutos a 37°C en un 7% de CO₂. Finalmente, se lavaron los pocillos para eliminar las PMNs no adherentes. Las PMNs adherentes fueron teñidas con violeta de cristal y se leyó la DO_{570nm} en un lector ELISA. La densidad óptica es proporcional a la cantidad de C5a residual, o inversamente proporcional a la cantidad de actividad de SCP.

Se analizaron los extractos de mutanolisina de proteínas de la superficie celular y de cultivos mutantes mediante transferencia Western usando un suero específico de SCPA. Se confirmó que los mutantes carecían de SCPA. Los extractos de SCPA-mutantes AK1.4 y MJ3-15 no reaccionaron con suero anti-SCPA. Se observaron proteínas SCPA del tamaño esperado en los extractos procedentes de las cepas naturales CS101 y UAB200. La incapacidad de las cepas mutantes AK1.4 y MJ3-15 para producir actividad de peptidasa C5a se verificó comparando su capacidad para destruir rhC5a. La exposición de PMNs aisladas a rhC5a las indujo a volverse adherentes a pocillos de microtitulación recubiertos con BSA. La incubación con estreptococos o con SCPA purificada produjo la ruptura específica de rhC5a y alteró su potencial para activar PMNs. Las PMNs que respondieron al rhC5a residual y se unieron a los pocillos recubiertos con BSA fueron teñidas, y a continuación fueron evaluadas espectrofotométricamente. La incubación de rhC5a con cultivos parentales de UAB200 y CS101 destruyó la rhC5a, lo que inhibió la adherencia de PMN en un 58,8% y en un 54,5%, respectivamente. Al contrario que los mutantes SCPA⁻, el AK1.4 y el MJ3-15 no alteraron la rhC5a o la adherencia de las PMNs a los pocillos recubiertos con BSA (Tabla 1). Este experimento confirmó los ensayos de transferencia Western y demostró que los cultivos de SCPA⁻ carecen de otras proteasas que puedan degradar rhC5a.

Tabla 1. Ensayo de fagocitosis y ensayo de adherencia de PMN de cepas naturales y mutantes.

Cepa	Descripción	Unidades formadoras de colonia (cfu)/mL		Tasa de incremento en cfu/mL	Porcentaje de inhibición de C5a inducida por adherencia de PMN*
		Tiempo = 0h	Tiempo = 3h		
UAB200	M6 ⁺ , SCPA ⁺	1,8 x 10 ³	7,2 x 10 ⁴	40	58,8
AK1.4	M6 ⁺ , SCPA ⁻	1,2 x 10 ³	4,5 x 10 ⁴	37,5	0
CS101	M49 ⁺ , SCPA ⁺	1,0 x 10 ⁴	4,9 x 10 ⁵	49	54,5
MJ3-15	M49 ⁺ , SCPA ⁻	1,5 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁵	14	0

*Porcentaje de inhibición = [(DO_{570nm} de PMNs activadas sólo con C5a – DO_{570nm} de PMNs activadas con C5a preincubada con bacterias / DO_{570nm} de PMNs activadas sólo con C5a)] x 100 %

Aunque no se esperaba que la expresión de proteína M estuviera influenciada por las mutaciones en *scpA*, se realizaron ensayos para determinar si los estreptococos mutantes SCPA- todavía expresaban proteína M y tenían la capacidad de resistir fagocitosis. El crecimiento de estreptococos en sangre humana fresca durante 3 horas de incubación es indicativo de proteína M antifagocítica sobre su superficie. R. C., Lancefield, "Differentiation of Group A Streptococci with a Common R Antigen into Three Serological Types, with Special Reference to Bactericidal Test", J. Exp. Med., 106, pág. 525-685 (1957). Tal como era de esperar, los estreptococos parentales UAB200 y CS101 aumentaron su número en 40 y 49 veces, respectivamente (Tabla 1). Los cultivos M⁺SCPA⁺, las cepas AK1.4 y MJ3-15, aumentaron 37,5 y 14 veces, respectivamente, confirmando que las mutaciones de *scpA* tenían poco efecto sobre la expresión de proteína M o sobre la resistencia a la fagocitosis en sangre humana entera. El crecimiento algo menor de ambas cepas mutantes en sangre rotada fue reproducible e inesperado. Las tasas de crecimiento de los cultivos mutantes y parentales en plasma humano fueron indistinguibles. Es posible que la activación de SCPA permitiera que la C5a se acumulara en la sangre rotada, lo que a su vez activaría PMNs. Las PMNs activadas son más fagocíticas y más capaces de eliminar estreptococos M⁺. Los extractos de proteína superficial contienen antígeno M6 y M49, cuando se analizan mediante transferencia Western usando antisueros anti-M49 y anti-M6, lo que confirma que las mutaciones de SCPA no alteraron la expresión de proteína M.

Ejemplo 2

Reclutamiento de retrasos SCP de Fagocitos y Eliminación de Estreptococos de Posiciones Subdermales de Infección

Con el fin de verificar que la SCP era responsable de la desactivación de C5a, se construyeron los mutantes de inserción y de eliminación de *scpA49* tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior, y se evaluó su actividad. Cuando se introdujeron inserciones o eliminaciones en el *scpA49*, la SCP variante no fue capaz de destruir la adherencia de las PMNs a las placas de microtitulación activada por C5a.

Se evaluó el impacto de las mutaciones en el *scpA49* sobre la virulencia usando un modelo animal en el que los estreptococos permanecían localizados, y en el que pudiera analizarse el influjo de células inflamatorias. Para evaluar la hipótesis de que la SCP actúa rápidamente para retardar la eliminación inicial del organismo, se comparó el destino de estreptococos SCP⁺ y SCP⁻ 4 horas después de la inoculación de sacos de aire de tejido conectivo. Además, también se determinó la diseminación de estreptococos a los nodos y bazo linfáticos después de este corto periodo de tiempo.

Para todos los experimentos se usaron ratones criados CD 1 machos (25 g) obtenidos del Charles River Breeding Laboratory, Wilmington, MA. Se generó un saco de aire de tejido conectivo inyectando 0,9 mL de aire y 0,1 mL de estreptococos de grupo A diluidos en PBS con una aguja de medida 25 bajo la piel del dorso del ratón. En algunos experimentos se usó el SCP⁺ CS101 :: pG⁺host5 como control positivo. En otros experimentos se usó la cepa CS101Sm como control positivo. Los ratones fueron sometidos a eutanasia mediante dislocación cervical 4 horas después de la infección. En donde se indica, en los cuatro nodos linfáticos inguinales, el bazo y el saco de aire fueron diseccionados de los animales y homogeneizados en PBS. Se evaluaron las unidades de formación de colonia (CFU) viables de las suspensiones de tejido en placas de agar sanguíneo que contenían 1 µg/mL de eritromicina o 200 µg/mL de estreptomina.

En un experimento preliminar se fijaron los sacos de aire sobre portaobjetos, se tiñeron con tinte de Wright y se examinaron microscópicamente. Aunque el conteo de granulocitos con este método no es fiable, parecía haber significativamente menos SCP⁻ residuales que estreptococos naturales en el tejido fijado. Se llevaron a cabo experimentos adicionales en un intento de medir esta diferencia. Las poblaciones celulares dispersas de los sacos de aire se prepararon moliendo el saco de aire en PBS y haciéndolos pasar a través de tamiz de monofilamento de Nylon (TETKO Co. Nueva York).

Las células fueron paletizadas mediante centrifugación durante 5 minutos a 300 x g, y resuspendidas a 5×10^6 /mL en tampón FACS (disolución salina equilibrada de Hank sin rojo de fenol, NaN₃ al 0,1%, fracción V de BSA al 1,0%). Las células ($1,0 \times 10^6$) fueron teñidas directamente con 1 µg de FITC anti-ratón Mac-1, o indirectamente con 1 µg de Biotina conjugada anti-ratón Gr-1 seguida de 1 µg de Estreptavidina marcada con fluorescencia o con FITC. Los anticuerpos monoclonales, Mac-1 y Gr-1, se obtuvieron de Pharmingen, Inc. CA. Las células marcadas se fijaron en paraformaldehído al 1,0%. Se generaron los perfiles de fluorescencia usando un flujocitómetro FAC-Scan y software Consort (Becton Dickinson). Se purificaron PMNs de ratón a partir de sangre entera mediante centrifugación de gradiente de densidad Ficoll Hypaque y se usaron como patrón para PMNs definidas en poblaciones mixtas. Para la medida de células marcadas específicamente, se determinó la fluorescencia media de cada marcador de anticuerpo y se fijaron puercas para reflejar células intensamente marcadas. Los controles incluyeron células no teñidas y células expuestas únicamente a FITC de estreptavidina.

Se realizaron dos experimentos. El primero comparó el mutante M16 de inserción del *scpA49* con su cultivo SCP⁺ parental, la cepa CS101. El segundo comparó el mutante MJ3-15 de eliminación del *scpA49* con el original, la cepa CS101Sm. (Tabla 2). En ambos experimentos los sacos de aire de ratones inoculados con estreptococos de SCP contenían un menor número de estreptococos después de 4 horas que los sacos de aire inoculados con estreptococos naturales. El primer experimento presentó una reducción a la mitad y el segundo presentó una reducción a un cuarto. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas a $P < 0,05$ y $P < 0,001$, respectivamente, usando un ensayo t no emparejado. También se observó que había estreptococos SCP⁺ naturales en homogenatos de bazo en 7 de 8 ratones y en 6 de 8 ratones; mientras que raramente se encuentran mutantes SCP⁻ en el bazo. Para los homogenatos de nodos linfáticos se obtiene el resultado opuesto. Los nodos de 10 de 16 ratones infectados con estreptococos SCP⁻ alojaron estreptococos viables; mientras que sólo 4 de 16 nodos de ratones infectados con estreptococos naturales contenían bacterias viables. Se determinó que esta diferencia era estadísticamente significativa a $P < 0,05$ usando el ensayo exacto de Fisher.

Tabla 2. Distribución de estreptococos SCP⁺ y SCP⁻ 4 horas después de la infección de sacos de aire.

Cepas	Nº de ratones ^a	Nº de cultivos positivos		Saco de Aire Homogeneizado ^c
		bazo ^b	nodo linfático	
CS101pG (SCP ⁺)	8	7	2	$1,3 \times 10^8 \pm 2,2 \times 10^7$

Cepas	Nº de ratones ^a	Nº de cultivos positivos		Saco de Aire Homogeneizado ^c
		bazo ^b	nodo linfático	
M16 (SCP ⁻)	8	0	5	$6,0 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^7$
CS101Sm (SCP ⁺)	8	6	2	$1,6 \times 10^8 \pm 2,6 \times 10^7$
MJ3-15 (SCP ⁻)	8	1	5	$3,7 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$

^a Cada ratón fue inoculado con 3×10^8 CFU de estreptococos en fase estacionaria.

^b La diferencia en la frecuencia de aislamiento de estreptococos SCP⁺ procedentes de bazos referida a estreptococos SCP⁻ fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$) para cada experimento mediante el ensayo exacto de Fisher.

^c Las diferencias en CFU aislados a partir de sacos de aire homogeneizados (media \pm SEM) fueron significativas, cepas CS101pG (SCP⁺) y M16 (SCP⁻) y MJ3-15 (SCP⁻) ($P < 0,001$) para cada experimento mediante ensayo t no emparejado.

La eliminación más rápida de estreptococos de sacos de aire se obtuvo en el reclutamiento más intenso de PMNs. Se comparó la población total de células en sacos de aire, el porcentaje de granulocitos Mac-1 positivos (Springer, G. y col., "Mac-1: macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody", Eur. J. Immunol. 9: 301-306 (1979)), y el porcentaje de PMN Gr-1 positivo (Brummer, E. y col., "Immunological activation of polymorphonuclear neutrophils for fungal killing: Studies with murine cells and blastomyces dermatitidis in vitro", L. Leuko. Bio, 36: 505-520 (1984)) mediante análisis FACS de color sencillo. Clark, J. M., "A new method for quantification of cell-mediated immunity in the mouse", J. Reticuloendothel. Soc. 25: 255-267 (1979). En resumen, en un análisis FACS, se marcan células individuales en suspensión con monoanticuerpos fluorescentes específicos. Se inyectan alícuotas de células marcadas en un flujocitómetro FAC-Scan o en un clasificador de células fluorescentes que contabiliza las células en base a su fluorescencia característica.

Los sacos de aire infectados con el mutante de eliminación SCP⁻ contenían el doble de células inflamatorias que los inoculados con estreptococos SCP⁺ (Figura 4). Un aumento de 100 veces en el tamaño del inóculo no alteró esta diferencia. Los sacos de aire infectados con 1×10^6 células SCP⁻, cepa MJ3-15, contenían tres veces más células Gr-1 positivas que aquellos inoculados con el cultivo de SCP⁺. En los sacos de aire inoculados con estreptococos SCP⁺ aproximadamente el 6% de las células eran PMNs y el 21% eran otros tipos de granulocitos Mac-1⁺, incluyendo PMNs. Por el contrario, los sacos de aire inoculados con estreptococos SCP⁻ contenían predominantemente PMNs. Las células Gr-1 positivas estaban presentes en números iguales o superiores a los de las células Mac-1 positivas. Se fijaron las puertas de citómetro de flujo para medir únicamente granulocitos de alta tinción. El resto de células no teñidas con ningún anticuerpo, el 70-80%, eran probablemente granulocitos de baja tinción, células sanguíneas rojas o linfocitos. Microscópicamente se observaron grandes números de linfocitos en preparaciones de sacos de aire sometidos a tinción Wright.

Las colonias SCP⁺ de estreptococos que emergieron de homogenatos de bazo eran altamente encapsuladas, asemejándose a gotas de agua. Por el contrario, las pocas colonias SCP⁻ que surgieron de nodos linfáticos fueron más parecidas al inóculo. Eran mezclas de colonias no mucoides y moderadamente mucoides. Estos datos sugieren que los estreptococos M⁺SCP⁺ encapsulados se pueden adaptar, multiplicar e invadir la corriente sanguínea en las 4 horas siguientes a la infección. La base de las diferencias en el tráfico de estreptococos mutantes y naturales puede ser el influjo más vigoroso de células fagocíticas en respuesta a bacterias SCP⁻. Los macrófagos y/o las células dendríticas pueden atrapar más rápidamente estreptococos SCP⁻ y llevarlos a los nodos linfáticos. La reducción de estreptococos mutantes en relación a los naturales es un descubrimiento inesperado, debido a que los estreptococos SCP⁻ son M⁺ y resistentes a la fagocitosis por neutrófilos humanos in vitro.

Ejemplo 3

Se Requiere SCP para la Colonización de la Nasofaringe de Ratón

Se inocularon ratones intranasalmente para evaluar la capacidad relativa de estreptococos naturales (SCP⁺) y SCP⁻ para colonizar la nasofaringe. En estos experimentos se usaron la cepa de M49 resistente a estreptomycin, CS101, y el mutante de eliminación MJ3-15. Los cultivos no se expusieron a ratones con el fin de evitar la selección de variantes que pudieran ser virulentas únicamente para ratones, pero que ya no dependieran de la proteína M y/o de SCP para su persistencia en el animal.

Se administraron intranasalmente cultivos de dieciséis horas de exposición a cepas estreptococales ($1 \times 10^8 - 9 \times 10^8$ CFU), cultivados en caldo de Todd-Hewitt que contiene un 20% de suero de conejo normal y resuspendidos en 10 μ L de PBS, a CD1 hembra de 25 g (Charles River Breeding Laboratories, Inc., Wilmington, MA) o a ratones BALB/c (Sasco, Omaha NE). Los conteos viables se determinaron llevando diluciones de los cultivos a placas de agar sanguíneo. Se tomaron diariamente muestras de garganta de ratones anestesiados durante de 6 a 10 días después

de la inoculación y se llevaron a placas de agar sanguíneo que contenían 200 µg/mL de estreptomina. Tras una incubación de una noche a 37°C, se contabilizó el número de colonias β-hemolíticas en las placas. Todas las cepas de exposición fueron marcadas mediante resistencia a estreptomina para distinguirlas de las bacterias β-hemolíticas que pueden persistir en la flora normal. Se cultivaron muestras de garganta sobre agar sanguíneo que contenía estreptomina. La presencia de una colonia β-hemolítica se consideró un cultivo positivo.

Ratones CD1 criados fueron inoculados intranasalmente con 2×10^8 CFU de fase estacionaria. Se tomaron muestras diarias de las nasofaringes de los ratones anestesiados durante 8-10 días y se llevaron a agar sanguíneo que contenía estreptomina. Las diferencias entre SCP⁺ y SCP⁻ fueron evidentes en el día 1, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas hasta los días 3 y 4 (Figura 5). Para el cuarto día, 9/18 ratones infectados con estreptococos M⁺SCP⁺ produjeron cultivos de garganta positivos, mientras que únicamente 2/18 ratones infectados con la cepa M⁺SCP⁻ retuvieron estreptococos en sus gargantas. Cuatro de 18 ratones murieron como consecuencia de la infección con estreptococos SCP⁺. Ninguno de los ratones sometidos a infección con bacterias SCP⁻ sucumbieron a la infección. El número de colonias en las placas de agar sanguíneo también fue consistente con una eliminación más rápida de estreptococos SCP⁻. Por ejemplo, al tercer día los cultivos de siete ratones contenían > 100 CFU de SCP⁺, mientras que sólo un ratón inoculado con estreptococos SCP⁻ contenía > 100 CFU.

Debido a que los estreptococos M49 se asocian más a menudo a infecciones de la piel, los anteriores experimentos se repitieron con una cepa M6, un serotipo asociado más a menudo a infecciones de garganta. Se construyó un mutante de inserción, la cepa AK1.4, usando la UAB200 de cepa M6 y la estrategia descrita previamente en el Ejemplo 1. La cepa AK1.4 también se eliminó más rápidamente de la nasofaringe que el cultivo natural de M6. (Figura 6). Los anteriores experimentos confirman que los estreptococos de grupo A dependen de SCP para su persistencia en la nasofaringe de ratones. Todas las variantes SCP⁻ usadas en los anteriores experimentos fueron M⁺, es decir, resistieron la fagocitosis por sangre humana fresca. Aún así, fueron eliminados de la mucosa nasofaríngea.

Ejemplo 4

Inmunización Intranasal de Ratones con Bloques de SCPA49 Recombinante Purificada. Colonización tras Exposición Intranasal

a) Construcción de vacuna recombinante ΔSCPA49 que codifica de Thr⁶³ hasta His¹⁰³¹ (Figuras 2 y 7). Se clonó un fragmento PCR que corresponde a una forma truncada del gen *scpA49* a partir de estreptococos CS101 M49 de grupo A (ΔSCPA49). Este fragmento se amplificó mediante PCR usando un cebador delantero que comienza en el nucleótido 1033 y un cebador inverso que empieza en el nucleótido 3941 (numeración correspondiente a la de Chen, C., y Cleary, P., "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of Streptococcus pyogenes", L Biol. Chem., 265: 3161-3167 (1990)). El fragmento se ligó a la posición de unión de trombina del gen de glutatona transferasa sobre el vector de alta expresión pGex-4T-1 de Pharmacia Inc. El plásmido que contenía el fragmento *scpA* recombinante, designado pJC6, ha sido depositado en la American Type Culture Collection, Rockville, MD, bajo las condiciones del Tratado de Budapest, y se le ha asignado el número de acceso ATCC 98225.

El ΔSCPA49, un fragmento de 2908 pb del *scpA49*, se amplificó mediante PCR usando un cebador delantero de *scpA49* que contiene una secuencia de reconocimiento *Bam*HI (5'-GAGTGGCCCTCCAATAGC-3') (SEQ ID NO: 9). Las secuencias que codifican las regiones de péptido señal y de anclaje de membrana de la proteína SCPA fueron eliminadas del producto PCR resultante. Los productos PCR fueron digeridos con *Bam*HI y ligados a posiciones de restricción de *Bam*HI y de *Sma*I en la zona de reconocimiento de trombina del gen de glutatona S-transferasa del vector de alta expresión pGEX-4T-1 de Pharmacia Inc. (Piscataway, NJ). El plásmido recombinante se transformó en DH5α de *E. coli*. La proteína de fusión ΔSCPA49 de un transformante, *E. coli* (pJC6), se purificó mediante cromatografía de afinidad en una columna de glutatona Sepharose 4B. Todos los métodos han sido descritos por el fabricante (Pharmacia). El ΔSCPA49 fue separado de la proteína híbrida mediante digestión de trombina. La trombina fue eliminada de la SCP eluida mediante cromatografía en una columna de benzamida Sepharose 6B (Pharmacia). Después de la digestión con trombina, se eliminó la trombina mediante cromatografía en una columna Sepharose 6B de benzamida. Los métodos de expresión y de purificación han sido descritos por el fabricante. Se confirmó que la proteína purificada por afinidad era ΔSCPA49 mediante SDS-PAGE y mediante ensayo de transferencia Western. Esta proteína ΔSCPA49 truncada, purificada por afinidad, carecía de actividad de peptidasa cuando se evaluó mediante el ensayo de adherencia de PMN (descrito en el anterior Ejemplo 1). Se preparó antisuero hiperinmune, dirigido contra ΔSCPA49 purificada, en conejos.

b) Protocolo de inmunización y de exposición. Se inmunizaron ratones CD1 criados hembra de cuatro semanas de edad mediante administración de 20 µg de ΔSCPA49 purificada por afinidad en 10 µL de PBS en cada fosa nasal. Los ratones fueron inmunizados 3 veces en días alternativos y estimulados de nuevo tres veces después de la tercera inmunización. Tras un descanso de dos semanas, los ratones fueron estimulados otra vez. D. Bessen y col., "Influence of Intranasal Immunization with Synthetic Peptides Corresponding to Conserved Epitopes of M Protein on Mucosal Colonization by Group A Streptococci", Infect. Immun., 56, pág. 2666-2672 (1988). Los ratones de control únicamente recibieron PBS. Antes de la infección, se determinó mediante ELISA que todos los ratones que fueron inmunizados con proteína ΔSCPA49 tenían títulos elevados de anticuerpos contra antígeno ΔSCPA49 en su suero y saliva. Se usaron estreptococos de grupo A, cepa CS101 ($2,0 \times 10^8$ CFU), CS210 ($3,6 \times 10^8$ CFU), CS463 ($7,8 \times 10^8$

CFU), 90-131 ($3,4 \times 10^8$ CFU) y UAB200 ($9,6 \times 10^8$ CFU) para exponer nasalmente a los ratones 7 días después de la estimulación de la última vacuna. Los estudios con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las guías de los Institutos Nacionales de Salud.

5 **c) Toma de muestra y ELISA.** Se tomaron muestras de sangre y de saliva de los ratones anestesiados después de la inmunización. En todos los sueros se evaluó la presencia de anticuerpos SCPA49 mediante ELISA, tal como se ha descrito previamente. S. P. O'Connor y col., "The Human Antibody Response to Streptococcal C5a Peptidase", J. Infect. Dis., 163, pág. 109-116 (1990). Se unió proteína SCPA49 purificada a pocillos de microtitulación mediante adición de 500 ng de proteína purificada en tampón de bicarbonato 0,05 M (pH 9,6). Después de una incubación de una noche a 4°C los pocillos fueron lavados, y entonces bloqueados con BSA al 0,5% en PBS durante 1 hora. Se estimuló la salivación en los ratones mediante inyección de 100 µL de una disolución de pilocarpina al 0,1% (Sigma) subcutáneamente. Se tomaron muestras de saliva y se giraron a 14.000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Se evaluó la presencia en los sobrenadantes de proteína ΔSCPA49 contra IgA secretora mediante ELISA. Los títulos de ELISA representan la mayor dilución de suero y saliva de individuo que presentaba una $OD_{405} \geq 0,1$.

15 **d) Evaluación de la Respuesta de Anticuerpos a ΔSCPA49**

Se evaluó la inmunogenicidad de la vacuna de subunidad ΔSCPA49. Se inmunizaron conejos con ΔSCPA49 purificada. Los conejos desarrollaron niveles elevados de anticuerpos contra proteína ΔSCPA49, determinados mediante ELISA. Aunque el inmunógeno ΔSCPA49 purificado carecía de actividad funcional, el antisuero de conejo hiperinmune pudo neutralizar la actividad de peptidasa de enzima SCPA49 natural purificada *in vitro*. Además, el antisuero de conejo sin diluir contra proteína ΔSCPA49 fue capaz de neutralizar la actividad de peptidasa C5a asociada a diferentes serotipos (Figura 8). La actividad de peptidasa C5a asociada a estreptococos M1, M6 y M12 intactos fue inhibida por este antisuero, confirmando que el anticuerpo contra proteína ΔSCPA49 carece de especificidad de serotipo.

25 Asimismo, se obtuvieron muestras de suero y de saliva de diez ratones inmunizados y de diez ratones de control para determinar la inmunogenicidad de la proteína ΔSCPA49 cuando se administra a través de la ruta intranasal sin adyuvantes. Los ratones que estaban inmunizados con proteína ΔSCPA49 purificada desarrollaron títulos elevados de IgG específico de ΔSCPA49 en sus sueros, en comparación con los ratones de control inmunizados con PBS (Figura 9). Los títulos de IgG en suero dirigido contra ΔSCPA49 oscilaron entre 1:10.240 y 1:20.480. Por el contrario, el título de IgG específico de ΔSCPA49 de los ratones de control no fue detectable en suero. Los ratones inmunizados con proteína ΔSCPA49 purificada también mostraron un aumento significativo en el sIgA salivar específico de ΔSCPA49 comparados con los ratones de control. Los títulos de sIgA específicos en saliva de los ratones inmunizados fueron mayores de 1:16. Por el contrario, el sIgA dirigido contra ΔSCPA49 en la saliva de los ratones de control no era detectable. Las concentraciones relativas de IgG y de sIgA en suero diluido 1/2560 y en saliva diluida 1/2, respectivamente, se muestran en la Figura 9. Estos resultados demuestran que la proteína ΔSCPA49 purificada es un inmunógeno eficaz para la inducción de respuestas sistémicas específicas y de segregación de anticuerpos en ratones cuando se administra intranasalmente.

35 **e) Impacto de la vacuna de ΔSCPA49 sobre la Eliminación de Estreptococos de Ratones Infeccionados**

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si la inmunización con la peptidasa C5a potenciaría la eliminación de estreptococos de la nasofaringe. Los sueros humano y de conejo hiperinmunes que contienen ambos altos niveles de anticuerpos anti-SCPA pueden neutralizar la actividad de SCPA *in vitro*. S. P. O'Connor y col., "The Human Antibody Response to Streptococcal C5a Peptidase", J. Infect. Dis., 163, pág. 109-116 (1990). El hecho de que la SCPA facilite significativamente la colonización de la mucosa oral sugiere que la inmunización de ratones con ΔSCPA49 purificada podría reducir la capacidad de los estreptococos para colonizar la nasofaringe. Los ratones fueron inmunizados intranasalmente con SCPA purificada por afinidad, desactivada genéticamente, para evaluar esta posibilidad. La proteína troncada, ΔSCPA49, fue administrada intranasalmente sin adyuvantes o vehículos. La colonización faríngea de los ratones vacunados por los estreptococos naturales $M^+ SCPA^+$ difirió significativamente de los inmunizados con PBS en tres experimentos independientes usando ratones vacunados con dos preparaciones diferentes de proteína ΔSCPA49 purificada (Tablas 3 y 4; Figura 10). Únicamente uno de los 13 ratones inmunizados con proteína ΔSCPA49 dio positivo en el cultivo de estreptococos diez días después de la inoculación (Tabla 4; Figura 10). Por el contrario, el 30-58% de los controles no vacunados permaneció con cultivos positivos durante seis días, y algunos todavía daban positivo diez días después de la infección. El número de coloniza β-hemolíticas, resistentes a estreptomina sobre placas de agar sanguíneo también mostró una diferencia significativa entre los ratones vacunados con ΔSCPA49 y los de control. Diferentes grupos de ratones inmunizados eliminaron los estreptococos de serotipo M49 significativamente más rápidamente de sus nasofaringes que los ratones de control no inmunizados.

Tabla 3: Cultivos de garganta para estreptococos después de exposición intranasal de ratones vacunados intranasalmente con PBS o con SCP expresada en DH5α de *E. coli* (CFU después de la vacuna)

Ratones	Días después de la exposición									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBSCT-II										
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	77	>200	150	4	11	3	0	51	97	53
4	9	>200	>200	3	11	3	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	4	6	45	47	3	>200	29	>200	83	70
7	15	194	>200	9	172	10	5	3	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	32	4	4	0	0	0	0	0	0
10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	127	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº de positivos	8	6	5	5	4	4	2	3	2	2
SCPAD-II										
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº de positivos	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Tabla 4: Cultivos de garganta para estreptococos después de exposición intranasal de ratones vacunados intranasalmente con PBS o con SCP expresada en DH5α de *E. coli* (CFU después de la vacuna)

Ratones*	Días después de la exposición									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBSCT-I										
1	112	143	85	16	0	0	0	0	0	0
2	127	27	18	89	3	7	7	7	70	3
3	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	108	>200	66
4	31	200	4	2	0	0	0	0	0	0
5	4	0	0	3	3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	>200	>200	120	125	91	145	>200	>200	>200	166
8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	37	>200	194	16	>200	47	>200	101	>200	>200
Nº de positivos	8	6	6	7	5	4	4	4	4	4
SCPAD-I										
1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	105	41	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	9	0	11	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	19	0	0	5	57	0	0	21	91
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	7	0	0	21	0	0	0	0	0	0
Nº de positivos	7	2	1	0	1	1	0	0	1	1

* Los ratones fueron inoculados dos veces debido a que la dosis de bacterias era demasiado baja en la primera inoculación.

5 Por último, se examinó si la SCP de un serotipo vacunaría a los animales contra la infección de otros serotipos. Existen más de 80 serotipos diferentes de estreptococos de grupo A. Una vacuna eficaz debería prevenir la infección de más de un serotipo estreptococal. Se produjo una protección cruzada frente a la colonización por los serotipos estreptococales OF⁺ M2 y M11, y frente a los serotipos OF⁻ M1 y M6. El hecho de que el suero de conejo dirigido contra proteína ΔSCPA49 procedente de estreptococos de serotipo M49 neutralizase la actividad de peptidasa asociada a varios serotipos sugirió que la inmunización intranasal con una vacuna de subunidad sencilla podría reducir o eliminar la colonización faríngea de esos serotipos. Para explorar esta posibilidad se inmunizaron cuatro grupos de veinte ratones mediante inoculación intranasal con proteína ΔSCPA49 purificada mediante afinidad tal como se ha descrito anteriormente. Los ratones de control recibieron PBS. Antes de ser expuestos a estreptococos, se evaluó la presencia de anticuerpos anti-SCPA en muestras de suero y de saliva de ratones inmunizados y de

10

control seleccionados aleatoriamente. Todos los ratones inmunizados evaluados habían desarrollado una fuerte respuesta de suero y de anticuerpos mensurables en saliva. La colonización faríngea de ratones inmunizados con proteína ΔSCPA49 por cepas de los cuatro serotipos se redujo en relación a los controles no inmunizados. Las diferencias fueron más significativas en los días 3 y 5 después de la inoculación (Tabla 5).

5

Tabla 5. La protección inmune depende del serotipo

	Día 3 después de la inoculación				Día 5 después de la inoculación			
	No inmune		Inmune		No inmune		Inmune	
	(+/total)	%	(+/total)	%	(+/total)	%	(+/total)	%
M2	10/19	52,6	2/19*	10,5	3/19	15,8	1/19	5,2
M11	17/20	85	11/20*	55	8/20	40	2/20*	10
M1	16/19	84,2	11/19	57,9	7/19	37	2/19*	10,5
M6	14/20	70	12/19	63,2	8/20	40	4/19	21,1

+ significa ratones con cultivo positivo. * Las diferencias entre ratones inmunizados y no inmunizados son estadísticamente significativas (P<0,05). Los valores P se calcularon mediante análisis X².

10

15

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones inmunizados y los de control inoculados con las cepas de serotipos M2, M11 y M1. Sin embargo, los serotipos OF⁺ M2 y M11 fueron eliminados más eficazmente por los ratones inmunizados que las cepas OF⁻, M1 y M6. La colonización de estreptococos M1 de ratones inmunizados se vio significativamente reducida en comparación con los ratones de control. Únicamente el 10,5% de los ratones inmunizados dieron cultivos positivos en el día 5 después de la infección. Por el contrario, el 37% de los ratones de control dieron cultivos positivos con esta cepa. Aunque los ratones inmunizados parecían eliminar más rápidamente los estreptococos M6, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Como en experimentos previos, el número de colonias estreptococales β-hemolíticas sobre placas de agar sanguíneo fue significativamente menor en las muestras tomadas de ratones vacunados que en las tomadas de los animales de control. Por tanto, la proteína ΔSCPA49 fue una vacuna eficaz que proporcionó una protección cruzada contra otros serotipos estreptococales.

Ejemplo 5

Mutagénesis de SCPA49 dirigida a posición

20

25

Los serotipos estreptococales de grupo A pueden dividirse en dos grupos principales, las cepas OF⁺ y las OF⁻. Las últimas se asocian más a menudo a fiebre reumática y a choque tóxico, mientras que las cepas OF⁺ son una causa común de impétigo y de glomerulonefritis aguda. Aunque las proteínas SCPA de estos grupos son idénticas en un 95-98%, es posible que la respuesta inmune contra ellas pueda ser algo diferente. Esta incertidumbre hizo que se dedicaran esfuerzos a desarrollar SCPAs variantes definidas a partir de una cepa M1 OF⁻ y a partir de una cepa M49 OF⁺ en paralelo. Los aminoácidos requeridos para la actividad catalítica fueron sustituidos por otros que se esperaba desactivaran la enzima (Figura 1). Las fronteras de aminoácidos N y C-terminales de la SCPA49, expresaron los subclones pGEX-4T-1, fueron Asn³² e His¹¹³⁹, respectivamente (Figuras 1 y 8). Ser⁵¹² (SCPA49SS12A), Asn²⁹⁵ (SCPA49N295A) y Asp¹³⁰ (SCPA49D130D) en la proteína SCPA49 fueron sustituidos por Ala, y Asn²⁹⁵ (SCPA49N295R) fue sustituido por Arg (Deborah Staflien, M. S. Tesis, Universidad de Minnesota).

30

35

40

El método usado para introducir mutaciones en el gen *scpA49* de la cepa CS101 de *Streptococcus* fue el método de "megacebador" de mutagénesis dirigida a posición. Barik, S., "Site directed mutagenesis in vitro megaprimer PCR", en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 57: *In Vitro Mutagenesis Protocols*, Humana Press, Inc. Totowa, NJ (1996). La mutación de serina se introdujo usando los cebadores *scpFor940* (5'-CCCCCGGATCCAATACTGTGACAGAAGACACTCC-3'), SEQ ID NO: 10, y *scpmutrev1883* (5'-TTTCTGGAAGTAGTATGTCTGCGCC-3'), SEQ ID NO: 11, para amplificar un producto de PCR de doble cadena de 1450 pb. Este primer producto de PCR, un "megacebador", fue purificado usando el Kit de Extracción de Gel Qiagen Qiaquick, usado a continuación en una segunda reacción PCR asimétrica para amplificar el gen *scpA49* de 3,3 kb que contiene la mutación deseada. Se llevaron a cabo cinco ciclos de desnaturalización (93°C, 1 minuto) y de extensión (72°C, 5 minutos) antes de la adición del cebador inverso *scpRev4263*, (3'-CCCCCCTCGAGATGTAACGATTTGTATCCTTGTCCATTAG-3'), SEQ ID NO: 12. Durante el quinto ciclo a 72°C, se añadió el cebador inverso a una concentración de 1 mM. Se completó la amplificación usando 25 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 58°C durante 2 minutos y 72°C durante 2-3,5 minutos. Las concentraciones de reactivos fueron las mismas descritas en la sección previa, excepto que no se añadió un cebador delantero y que el megacebador se añadió en una concentración de 4-6 µg por cada 100 µL de reacción. Este proceso dio lugar a una proteína variante SCPA49S512A (véase la Tabla 6 mostrada a continuación).

Las variantes de aspartato y de asparagina se construyeron aproximadamente del mismo modo, usando los cebadores inversos *scpmutrev717* (5'-CAGTGATTGATG-CTGGTTTGGATAA-3') SEQ ID NO: 13 y *scpmutrev1214* (5'-AGCTACTATCAGCAC-CAG-3') SEQ ID NO: 14 para construir megacebadores de 311 pb y de 805 pb, respectivamente. El cebador *scpmutrev717* se usó para generar la proteína variante SCPA49D130A, y el cebador *scpmutrev1214* se usó para generar la proteína variante SCPA49N295A (véase la Tabla 6 mostrada a continuación). Tras purificación con Qiaquick, sin embargo, el megacebador fue tratado con 0,1 U de nucleasa de soja verde (por cada 4 µg de ADN) e incubado a 30°C durante 10 minutos. Se eliminó la nucleasa mediante extracción con fenol/cloroformo, y el megacebador se recuperó en la fase acuosa mediante precipitación con etanol. Se resuspendió la partícula en 80 µL agua esterilizada destilada doblemente, y se usaron 37 µL de ésta en cada 100 µL de reacción PCR asimétrica. A continuación se clonó el gen mutado en pGEX 4T-1 como se ha descrito previamente. Se llevó a cabo el secuenciamiento de las variantes usando dATP marcado con ³⁵S y el kit Sequenase (Stratagene), o usando secuenciamiento fluorescente en la Instalación Microquímica de la Universidad de Minnesota.

Tabla 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos de proteínas variantes

	127	132	291	297	508	514	876	883
SCPA49 natural	AVIDAG		TSAGNDS		LSGTSGT		STLGSRF	
SCP S512A49	AVIDAG		TSAGNDS		LSGTAGT		STLGSRF	
SCP D130A49	AVIAAG		TSAGNDS		LSGTSGT		STLGSRF	
SCP N295A49	AVIDAG		TSAGADS		LSGTSGT		STLGSRF	

El vector de expresión de *E. coli* pGEX 4T-1 se usó para sobreexpresar SCPA variantes como proteínas de fusión GST. Se purificó SCPA variante de acuerdo con el protocolo proporcionado en el GST Gene Fusion System Handbook (Pharmacia), anterior a este trabajo. El antígeno de proteína SCPA se purificó mediante cromatografía de afinidad tal como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 6

Construcción de las Variantes SCPA1 y SCPB

Se amplificó el gen natural *scpA1* mediante PCR a partir del serotipo M1 de *S. pyogenes* (cepa 90-226) de la siguiente manera. Se diseñaron cebadores de tal modo que sólo un fragmento del gen completo fuera expresado. Este fragmento corresponde al inicio de la proteína madura y termina justo antes del dominio asociado a la pared celular, del residuo Asn³² al Asp¹⁰³⁸ (Figura 2). El cebador delantero 5'-CCCCCGAATTCATTACTGTGACAGAAGACACTCCTGC-3' (SEQ ID NO: 15) se templa comenzando en el número de base 940 (numeración correspondiente a la de Chen, C., y Cleary, P., "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*", J. Biol. Chem., 265: 3161-3167 (1990). El opuesto, el cebador de PCR inversa, 5'-CCCCCGGATCCCTTATTGTTCTGGTTTATT-AGA GTGGCC-3' (SEQ ID NO: 16) se templa en el número de base 3954 justo por encima de una región de repeticiones de ADN. Se predice que esta región de repetición de la proteína es la parte que pasa y se une al peptidoglicano de la pared celular. La región en cursiva de cada cebador es secuencia adicional que se ha añadido a la secuencia de *S. pyogenes* para permitir el proceso de clonación. La región subrayada del cebador delantero incorpora una posición de restricción *EcoRI*, y la porción subrayada del cebador inverso una posición *BamHI*. El cebador inverso también incorpora un codón de parada (TAA) en la estructura del gen que termina la traducción.

El producto PCR resultante correspondiente a las bases 940-3954 se clonó en un vector intermedio pCR2.1 (Invitrogen, Inc.) y se transformó en células Top10F de *E. coli* (Invitrogen, Inc.). Se restringió con *EcoRI* y *BamHI* ADN de plásmido procedente de un transformante apropiado. El fragmento de 3018 bases, que contiene el fragmento de *scpA1*, fue purificado en gel siguiendo procedimientos estándar y fue ligado en el vector de expresión pTrc99a (Pharmacia) restringido con las mismas enzimas. Dicha ligación se transformó en células DH5α de *E. coli* y se seleccionó un transformante que contenía la construcción de plásmido deseada. El plásmido resultante coloca al fragmento de PCR de *scpA1* detrás de una secuencia Shine-Dalgarno y de la posición de inicio ATG, y está bajo el control transcripcional del Promotor *trc*, que es inducible con el análogo IPTG de alolactosa.

Las variantes genéticas específicas de posición del *scpA1* natural fueron construidas siguiendo un procedimiento descrito por C. L. Fisher y G. K. Pei, "Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method", BioTechniques, 23: 570-574 (1997). Se predijeron los residuos de aminoácido apropiados dentro de SCPA1 que son importantes para la actividad de proteasa mediante comparaciones de secuencia con la familia de serina proteasas de tipo subtilisina. Siezen, R. J. y col., "Homology modeling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases", Protein Engineering, 4: 719-737 (1991); Chen, C. y Cleary, P., "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*", J. Biol. Chem., 265: 3161-3167 (1990). Tres residuos, conservados en esta familia, están implicados en la formación del centro activo. En la SCPA1, corresponden a Asp¹³⁰, His¹⁹³ y Ser⁵¹². Se designaron tres conjuntos de oligonucleótidos no solapados para su uso en PCR para alterar cada uno de estos residuos de aminoácido. Dichos oligonucleótidos fueron diseñados

para amplificarse por separado en cepas opuestas de ADN. En cada conjunto, el extremo 5' de uno de los cebadores contendría el codón que codifica uno de estos aminoácidos para la mutación, y dicho codón sería alterado para codificar una alanina. Estos tres conjuntos de cebadores se enumeran a continuación; los codones cambiados se presentan en cursiva.

5 **D130A:**

Delantero (SEQ ID NO: 17)

5' – ATT *GCT* GCT GGT TTT GAT AAA AAT CAT GAA GCG – 3'

El cambio de codón GAT por GCT corresponde a un cambio de aminoácido de aspartato por alanina.

Inverso (SEQ ID NO: 18)

10 5' – CAC TGC AAC AAC AGT CCC – 3'

H193A:

Delantero (SEQ ID NO: 19)

5' – GAG GCC GGC ACA CAC GTG – 3'

El cambio de codón CAC por GCC corresponde a un cambio de aminoácido de histidina por alanina.

15 Inverso (SEQ ID NO: 20)

5' – TTG ATC GAC AGC GGT TTT ACC – 3'

S512A:

Delantero (SEQ ID NO: 21)

5' – ACT *GCT* ATG TCT GCT CCA TTA G – 3'

20 El cambio de codón ACT por GCT corresponde a un cambio de aminoácido de serina por alanina.

Inverso (SEQ ID NO: 22)

5' – TCC AGA AAG TTT GGC ATA CTT GTT GTT AGC C

25 Estos conjuntos de cebadores PCR fueron usados en tres reacciones separadas. El ADN de molde fue pLP605, que contenía la secuencia de *scpA1* natural. Los productos PCR fueron auto-ligados posteriormente y transformados en la cepa de *E. coli* Top10F' (Invitrogen, Inc.). Se escrutó los transformantes para encontrar el tamaño y el patrón de restricción apropiados. El cambio de secuencia en la variante S512A destruye una posición de restricción *SpeI* única de tal modo que esta mutación podría ser identificada directamente mediante análisis de restricción. Todas las variantes potenciales fueron confirmadas mediante secuenciamiento de ADN. Posteriormente, la mutación D130A se combinó con la mutación S512A para formar una variante doble utilizando una posición *PstI* única entre estas dos regiones de la proteína. La alteración final fue cambiar la selección antibiótica de ampicilina a canamicina moviendo los genes de *scpA 1* variantes a un vector pTRC99a alterado previamente (Pharmacia, Inc.) que contiene el gen de canamicina.

30 Se construyó una variante de la proteína SCPB usando el método antes descrito para los mutantes de SCPA1. El gen SCPB natural se clonó a partir de estreptococos de grupo B 78-471 (Tipo II^{at}).

35 **Ejemplo 7**

Análisis de Proteínas Variantes

Se analizaron las proteínas expresadas a partir de cada una de las construcciones variantes mediante electroforesis de gel de poliacrilamida SDS. El tamaño esperado para la proteína es de 121 kD, sin embargo, el dominio rico en prolina que se extiende por la pared celular en el extremo carboxi de la enzima provoca que la proteína avance ligeramente más despacio durante el análisis SDS-PAGE. Por lo tanto, el peso molecular aparente es de 130 kD cuando se determina con SDS-PAGE. Puesto que la SCP activa podría ser dañina para el hospedante, era importante que las proteínas variantes carecieran de actividad enzimática. Se evaluaron dos propiedades de las proteínas variantes. Las actividades específicas de las proteínas naturales y variantes, determinadas mediante el ensayo de adherencia de PMN, se comparan en la Tabla 7. Estos experimentos indicaron que los aminoácidos sustituidos redujeron la actividad enzimática en más de un 90%.

Tabla 7. Determinación de la actividad de proteasa variante mediante el ensayo de adherencia PMN

Proteína	Actividad (U/mg·10 ⁻³)
Natural	170
SCPA49D130A	<20
SCPA49N295A	<20
SCPA49S512A	<20

Las proteínas variantes también se compararon con la proteína natural en cuanto a su capacidad para unirse a anticuerpos dirigidos contra la enzima natural. Se usaron ensayos competitivos ELISA para este fin. Los ELISAs competitivos midieron la inhibición de anticuerpos que se unen a antígeno inmovilizado mediante antígeno soluble. Se unió una cantidad constante de antígeno natural a los pocillos de la placa de microtitulación. Se añade una cantidad constante de anticuerpos al mismo tiempo con cantidades variables de antígeno soluble competitivo. La pendiente de las curvas de inhibición porcentual frente a concentración de antígeno estima la afinidad de unión relativa del antígeno soluble por el anticuerpo. Aunque las constantes de unión no pueden calcularse sin conocer la concentración exacta de anti-SCPA en el antisuero, se compararon las afinidades de unión relativas de varias proteínas (Figura 11). Puesto que las pendientes de las curvas de inhibición porcentual frente a concentración son iguales para las proteínas naturales y variantes, se concluyó que la sustitución de aminoácidos no alteró la capacidad del anticuerpo para unirse a las proteínas variantes.

También se determinó que las proteínas SCPA1, SCPA49 y SCPB se unen igual de bien a anticuerpos anti-SCPA (Figura 12). En este experimento el antígeno de placa fue SCPA49 y el anticuerpo fue anti-SCPA49 de conejo. Las afinidades relativas de este anticuerpo por estos antígenos, indicadas por la pendiente de las curvas, son muy similares. Estos resultados demuestran que la proteína SCPA de *Streptococcus* de grupo A M49 OF⁺ y OF⁻, y de *Streptococcus* de grupo B, son equivalentes respecto al reconocimiento de anticuerpos y pueden usarse indistintamente en una preparación de vacuna.

Ejemplo 8

La Administración Subcutánea (SQ) de Antígeno de SCPA Induce Protección en Ratones

Todos los anteriores estudios de protección fueron realizados administrando intranasalmente sin adyuvante proteína SCPA49 purificada por afinidad. Históricamente, la inyección intramuscular o SQ de antígenos es un método preferido y más aceptado de administración de vacunas. Por tanto, se realizaron experimentos para evaluar si las inyecciones SQ de SCPA con MPL/alumbre inducían una respuesta inmune protectora y si dicha respuesta reducía la colonización cuando se exponía a una cepa de *Streptococcus* de grupo A de serotipo diferente al de la fuente de SCPA de la vacuna. Se evaluó la capacidad de ratones inmunizados para eliminar *Streptococcus* de la mucosa faríngea oral-nasal mediante cultivos de garganta o tomando muestras de tejido nasal diseccionado. Los datos de cultivos de garganta más representativos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Vacunación subcutánea de ratones

Vacuna ^a	Bacteria de exposición ^b	Porcentaje Colonizado ^c	
		Ratones de Control	Ratones Inmunizados con SCPA
SCPA49S512A	OF ⁺ M49	64% (3)	36%
ΔSCPA49	OF ⁺ M49	64% (3)	20%
ΔSCPA49	OF ⁻ M1	33% (5)	8%
SCPA1S512A	OF ⁻ M49	23% (5)	8%

^a Las vacunas contenían 10 µg de los antígenos indicados mezclados con adyuvantes, MPL y alumbre. Los grupos experimentales contenían 13-20 ratones. Los ratones de control fueron inmunizados con toxoide de tétanos mezclado con el mismo adyuvante.

^b Los ratones fueron infectados mediante inoculación intranasal.

^c La colonización se determinó mediante cultivos de garganta. El número entre paréntesis indica el día en el que se tomaron los cultivos.

Los ratones inmunizados mediante inyección SQ de cada una de las tres formas diferentes de antígeno de SCPA indujeron una protección moderada. La inmunización con ΔSCPA49 protegió simultáneamente contra las cepas M1 OF⁻ y M49 OF⁺. Para el siguiente estudio se seleccionaron la SCPA49S512A y la SCPA1S512A.

También se determinó la persistencia de los estreptococos después de la exposición intranasal mediante un ensayo más cuantitativo. Este método implicó el sacrificio de grupos de ratones a diferentes tiempos después de la infección, y la disección del tejido nasal (NT), que a continuación fue evaluado para determinar los estreptococos viables (CFU). Se homogeneizaron cantidades estándar de NT en un tampón y se determinó el número de CFU/mg de tejido mediante conteo viable.

Se inmunizaron SQ tres grupos de ratones con SCPA49S512A, con SCPA1S512A o con toxoide del tétanos. Todas las vacunas se mezclaron con adyuvantes de MPL/alumbre como anteriormente. Los ratones recibieron cuatro inyecciones de 5 µg de antígeno de proteína y entonces fueron expuestos a infección dos semanas después de la última inyección. Se recolectó el tejido nasal 16 horas después de la exposición a la cepa CS101 de M49 OF⁺. En la Tabla 9 se muestran las medias geométricas de CFU/mg de tejido.

Tabla 9: Medias geométricas de CFU/mg de tejido nasal

Antígeno de Vacuna	16 horas ^a
Tétanos	5,71 ^b
SCPA49S512A	2,27
SCPA1S512A	1,60

^a El tiempo al que se tomó el NT después de la infección intranasal de los ratones.

^b Los valores son valores logarítmicos.

El número de estreptococos asociado a tejido nasal disminuyó con el tiempo, tal como era de esperar, y el descenso fue más rápido y completo en los ratones inmunizados con antígeno de SCPA. Todos los grupos de ratones que habían sido inmunizados con SCPA retuvieron menos estreptococos que los ratones de control. En este experimento, la inmunización con SCPA1S512A fue la más eficaz e indujo una respuesta de protección cruzada, ya que la cepa de exposición CS101 es M49 OF⁺ y la fuente de proteína de la vacuna es SCPA1S512A procedente de una cepa M1 OF⁻. Estos resultados confirman que un único antígeno de SCPA puede inducir protección contra serotipos heterólogos. La protección la proporcionan los anticuerpos que neutralizan la actividad de peptidasa sobre la superficie bacteriana. Esto incrementa el flujo de fagocitos en unas pocas horas a partir del momento en que se depositan los estreptococos sobre el tejido mucosal. Se supone que la rápida eliminación de estreptococos por acción de fagocitos evita la posterior multiplicación y persistencia de las bacterias. Los ratones presentaron uniformemente títulos en suero de IgG de 1:32.000 o superiores cuando se evaluaron mediante ELISA, lo que indica que la inyección SQ de antígeno de SCPA con adyuvante indujo consistentemente una vigorosa respuesta de anticuerpos.

Ejemplo 9

La Peptidasa C5a de Estreptococos de Grupo B es Prácticamente Idéntica en Secuencia a la de los Estreptococos de Grupo A M12 y M49

Se clonó el gen de peptidasa C5a de estreptococos de grupo B (SCP_B), se secuenció y se comparó con el de los estreptococos de grupo A, M12 y M49. El gen *scp_B* completo se amplificó mediante PCR usando cebadores que correspondían a las porciones de la secuencia de *scp_{A12}* usando el método descrito antes. El gen SCP_B codifica un marco de lectura abierto (ORF, del inglés "open reading frame") de 3450 pb, que especifica una proteína de 1150 aminoácidos con Mr de 126.237 Da. La secuencia de aminoácidos de SCP_B se muestra en la Figura 2. La comparación del nucleótido de *scp_B* y de la secuencia de aminoácidos deducida para los de estreptococos de grupo A M12 y M49 mostró grandes similitudes, del 98% y del 97%, respectivamente. El *scp_B* contenía una eliminación de 50 pb que solapaba con dos de las repeticiones C-terminales, y que presentaba otras varias diferencias menores en relación a los genes *scp_A*. El alineamiento de las secuencias demostró que el *scp_{A12}* en realidad está más próximo filogenéticamente al *scp_B* que al *scp_{A49}*. Treinta cepas, que representan los serotipos III, III/R, II, Ia/c, NT/c, NT/c/R1, portan una copia de *scp_B*.

La SCP recombinante se expresó en *E. coli* usando el vector plásmido de expresión pGEX-4T-1 (número de acceso ATCC 98225) y se demostró que es idéntica a la enzima extraída de la cepa 78-471 estreptococal parenteral de grupo B (Tipo II a+ b). El análisis de transferencia Western sugirió que la SCP recombinante es idéntica a la enzima C5asa purificada previamente a partir de estreptococos de grupo B.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regents of the University of Minnesota et al.

<120> Vacuna de Peptidasa de C5a Estreptococal

<130> 600.450WO1

5 <150> US 09/206,898
<151> 1998-12-07

<150> US 08/589,756
<151> 1996-01-22

<160> 23

10 <170> FastSEQ para Version de Windows 3.0

<210> 1

<211> 1164

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

15 <400> 1

```

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

ES 2 401 998 T3

Ile Asp Ala Gly Phe Asp Lys Asn His Glu Ala Trp Arg Leu Thr Asp
 130 135 140

Lys Ala Lys Ala Arg Tyr Gln Ser Lys Glu Asp Leu Glu Lys Ala Lys
 145 150 155 160

Lys Glu His Gly Ile Thr Tyr Gly Glu Trp Val Asn Asp Lys Val Ala
 165 170 175

Tyr Tyr His Asp Tyr Ser Lys Asp Gly Lys Thr Ala Val Asp Gln Glu
 180 185 190

His Gly Thr His Val Ser Gly Ile Leu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Glu
 195 200 205

Thr Lys Glu Pro Tyr Arg Leu Glu Gly Ala Met Pro Glu Ala Gln Leu
 210 215 220

Leu Leu Met Arg Val Glu Ile Val Asn Gly Leu Ala Asp Tyr Ala Arg
 225 230 235 240

Asn Tyr Ala Gln Ala Ile Arg Asp Ala Val Asn Leu Gly Ala Lys Val
 245 250 255

Ile Asn Met Ser Phe Gly Asn Ala Ala Leu Ala Tyr Ala Asn Leu Pro
 260 265 270

Asp Glu Thr Lys Lys Pro Phe Val Tyr Ala Lys Ser Lys Gly Val Arg
 275 280 285

Ile Val Thr Thr Ala Gly Asn Asp Ser Ser Phe Gly Gly Lys Thr Arg
 290 295 300

Leu Pro Leu Ala Asp His Pro Asp Tyr Gly Val Val Gly Thr Pro Ala
 305 310 315 320

Ala Ala Asp Ser Thr Leu Thr Val Ala Ser Tyr Ser Pro Asp Asn Gln
 325 330 335

Leu Thr Glu Thr Ala Met Val Lys Thr Asp Asp Gln Gln Asp Lys Glu
 340 345 350

Met Pro Val Leu Ser Thr Asn Arg Phe Glu Pro Asn Lys Ala Tyr Asp
 355 360 365

Tyr Ala Tyr Ala Asn Arg Gly Met Lys Glu Asp Asp Phe Lys Asp Val
 370 375 380

Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Ser Asp Ile Asp Phe Thr Asp
 385 390 395 400

Lys Ile Ala Asn Ala Lys Lys Ala Gly Ala Val Gly Val Leu Ile Tyr
 405 410 415

Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe Pro Ile Glu Leu Pro Asn Val Asp Gln
 420 425 430

Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser Arg Lys Asp Gly Leu Leu Leu Lys Asp
 435 440 445

ES 2 401 998 T3

Asn Ser Gln Lys Thr Ile Thr Phe Asn Ala Thr Pro Lys Val Leu Pro
 450 455 460
 Thr Ala Ser Gly Thr Lys Leu Ser Arg Phe Ser Ser Trp Gly Leu Thr
 465 470 475 480
 Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro Asp Ile Ala Ala Pro Gly Gln Asp Ile
 485 490 495
 Leu Ser Ser Ala Ala Asn Asn Lys Tyr Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser
 500 505 510
 Met Ser Ala Pro Leu Val Ala Val Ile Met Gly Leu Leu Gln Lys Gln
 515 520 525
 Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp Met Thr Gln Ser Glu Arg Leu Asp Leu
 530 535 540
 Ala Lys Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Asp Glu Asp
 545 550 555 560
 Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp
 565 570 575
 Ala Lys Lys Ala Ser Glu Ala Thr Met Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn
 580 585 590
 Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn Val Ser Asp Lys Phe Glu Val
 595 600 605
 Thr Val Thr Val His Asn Lys Ser Asp Lys Pro His Glu Leu Tyr Tyr
 610 615 620
 Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val Asp Gly Lys His Phe Ala Leu
 625 630 635 640
 Ala Pro Lys Ala Leu Ile Glu Thr Ser Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro
 645 650 655
 Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Ile Pro Ile Asp Ile Ser Gln Phe
 660 665 670
 Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln Met Lys Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly
 675 680 685
 Phe Val Arg Ile Lys Gln Asp Pro Thr Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile
 690 695 700
 Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe Gly Asn Leu Ser Ala Leu Glu
 705 710 715 720
 Lys Pro Leu Tyr Asp Ser Lys Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr His Glu Glu
 725 730 735
 Ile Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr
 740 745 750
 Ala Leu Lys Asn Asp Phe Thr Ala Leu Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp
 755 760 765

ES 2 401 998 T3

Thr Ile Ile Asn Val Val Lys Glu Gly Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile
 770 775 780
 Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile Phe Ala Gly Thr Phe Ala Lys
 785 790 795 800
 Gln Asp Asp Asp Arg His Tyr Tyr Ile His Arg His Ala Asn Gly Lys
 805 810 815
 Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val
 820 825 830
 Gln Phe His Gly Thr Phe Leu Arg Asn Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu
 835 840 845
 Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu
 850 855 860
 Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser
 865 870 875 880
 Thr Arg Phe Glu Ile Ser Arg Trp Asp Gly Lys Asp Lys Asp Ala Lys
 885 890 895
 Val Val Ala Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile
 900 905 910
 Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr Asp Phe Asp Val Ile Val Asp
 915 920 925
 Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp
 930 935 940
 Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro Gln Thr Ser Gln Pro Val Tyr
 945 950 955 960
 Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr
 965 970 975
 Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu
 980 985 990
 Ala Glu Thr Met Glu Gly Ala Thr Val Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe
 995 1000 1005
 Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val
 1010 1015 1020
 Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser Asn Lys Pro Glu Gln Asp Gly Ser
 1025 1030 1035 1040
 Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu Gln Asp Gly
 1045 1050 1055
 Ser Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Gly Gln Asp
 1060 1065 1070
 Gly Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu Lys
 1075 1080 1085

ES 2 401 998 T3

Asp Ser Ser Gly Gln Thr Pro Gly Lys Thr Pro Gln Lys Gly Gln Pro
 1090 1095 1100
 Ser Arg Thr Leu Glu Lys Arg Ser Ser Lys Arg Ala Leu Ala Thr Lys
 1105 1110 1115 1120
 Ala Ser Thr Arg Asp Gln Leu Pro Thr Thr Asn Asp Lys Asp Thr Asn
 1125 1130 1135
 Arg Leu His Leu Leu Lys Leu Val Met Thr Thr Phe Phe Leu Gly Leu
 1140 1145 1150
 Val Ala His Ile Phe Lys Thr Lys Arg Thr Glu Asp
 1155 1160

<210> 2

<211> 1167

<212> PRT

5 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 2

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

ES 2 401 998 T3

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

ES 2 401 998 T3

Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp
 565 570 575
 Ala Lys Lys Ala Ser Ala Ala Thr Met Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn
 580 585 590
 Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn Val Ser Asp Lys Phe Glu Val
 595 600 605
 Thr Val Asn Val His Asn Lys Ser Asp Lys Pro Gln Glu Leu Tyr Tyr
 610 615 620
 Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val Asp Gly Lys His Phe Ala Leu
 625 630 635 640
 Ala Pro Lys Val Leu Tyr Glu Ala Ser Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro
 645 650 655
 Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Val Pro Ile Asp Ala Ser Arg Phe
 660 665 670
 Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln Met Lys Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly
 675 680 685
 Phe Val Arg Phe Lys Gln Asp Pro Lys Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile
 690 695 700
 Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe Gly Asn Leu Ser Ala Leu Glu
 705 710 715 720
 Lys Pro Ile Tyr Asp Ser Lys Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr His Glu Ala
 725 730 735
 Asn Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr
 740 745 750
 Ala Leu Lys Asn Asn Phe Thr Ala Leu Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp
 755 760 765
 Thr Ile Ile Lys Ala Val Lys Glu Gly Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile
 770 775 780
 Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile Leu Ala Gly Thr Phe Ala Lys
 785 790 795 800
 Gln Asp Asp Asp Ser His Tyr Tyr Ile His Arg His Ala Asn Gly Lys
 805 810 815
 Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val
 820 825 830
 Gln Phe Gln Gly Thr Phe Leu Arg Asn Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu
 835 840 845
 Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu
 850 855 860
 Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser
 865 870 875 880

ES 2 401 998 T3

Thr Arg Phe Glu Lys Thr Arg Trp Asp Gly Lys Asp Lys Asp Gly Lys
 885 890 895
 Val Val Ala Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile
 900 905 910
 Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr Asp Phe Asp Val Ile Val Asp
 915 920 925
 Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp
 930 935 940
 Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro Lys Thr Ser Gln Pro Val Tyr
 945 950 955 960
 Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr
 965 970 975
 Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu
 980 985 990
 Ala Glu Thr Thr Glu Gly Ala Thr Val Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe
 995 1000 1005
 Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val
 1010 1015 1020
 Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser Asn Lys Pro Glu Gln Asp Gly Ser
 1025 1030 1035 1040
 Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Ala Lys Pro Glu Gln Asp Gly
 1045 1050 1055
 Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Thr Glu Thr Lys Pro Glu Lys Asp
 1060 1065 1070
 Ser Ser Gly Gln Thr Pro Gly Lys Thr Pro Gln Lys Gly Gln Pro Ser
 1075 1080 1085
 Arg Thr Leu Glu Lys Arg Ser Ser Lys Arg Ala Leu Ala Thr Lys Ala
 1090 1095 1100
 Ser Thr Arg Asp Gln Leu Pro Thr Thr Asn Asp Lys Asp Thr Asn Arg
 1105 1110 1115 1120
 Leu His Leu Leu Lys Leu Val Met Thr Thr Phe Phe Leu Gly Leu Val
 1125 1130 1135
 Ala His Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gln Lys Glu Thr Lys Lys
 1140 1145 1150

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

5 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 4

gggggggaat tcgtagcggg tatcatggga c

31

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

10

<213> Streptococcus pyogenes
 <400> 5
 gggggggaat tcgggtgctg caatatctgg c 31
 <210> 6
 5 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 6
 gtaaaacgac ggccagt 17
 10 <210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 7
 15 aaggacgaca cattgcgta 19
 <210> 8
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pyogenes
 20 <400> 8
 cccccggat ccacaaaac cccacaaact c 31
 <210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 25 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 9
 ggtggccct ccaatagc 18
 <210> 10
 <211> 35
 30 <212> DNA
 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 10
 cccccggat ccaatactgt gacagaagac actcc 35
 <210> 11
 35 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 11
 tttctggaac tagtatgtct gcgcc 25
 40 <210> 12
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 12
 45 cccccctcg agatgtaaac gattgtatc cttgtcatta g 41
 <210> 13

ES 2 401 998 T3

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 13

5 cagtgattga tgctggttt gataa 25
 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pyogenes

10 <400> 14
 agctactatc agcaccag 18
 <210> 15
 <211> 38
 <212> DNA

15 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 15
 cccccgaat tcattactgt gacagaagac actcctgc 38
 <210> 16
 <211> 39
 <212> DNA

20 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 16
 cccccgat cctattgtt ctggtttatt agagtggc 39
 <210> 17
 <211> 33
 <212> DNA

25 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 17
 attgctgctg gtttgataa aaatcatgaa gcg 33
 <210> 18
 <211> 18
 <212> DNA

30 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 18

35 cactgcaaca acagtccc 18
 <210> 19
 <211> 18
 <212> DNA

40 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 19
 gaggccggca cacacgtg 18
 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA

45 <213> Streptococcus pyogenes
 <400> 20
 ttgatcgaca gcggtttac c 21

ES 2 401 998 T3

<210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pyogenes

5 <400> 21
 actgctatgt ctgctccatt ag 22

<210> 22
 <211> 31
 <212> DNA
 10 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 22
 tccagaaagt ttggcatact tgttgtagc c 31

<210> 23
 <211> 1181
 15 <212> PRT
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 23

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

ES 2 401 998 T3

50						55						60					
Thr	Pro	Gln	Thr	Pro	Asp	Asp	Ala	Glu	Glu	Thr	Ile	Ala	Asp	Asp	Ala		
65					70					75				80			
Asn	Asp	Leu	Ala	Pro	Gln	Ala	Pro	Ala	Lys	Thr	Ala	Asp	Thr	Pro	Ala		
				85					90				95				
Thr	Ser	Lys	Ala	Thr	Ile	Arg	Asp	Leu	Asn	Asp	Pro	Ser	Gln	Val	Lys		
			100					105					110				
Thr	Leu	Gln	Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Val	Val	Ala	Val		
			115					120					125				
Ile	Asp	Ala	Gly	Phe	Asp	Lys	Asn	His	Glu	Ala	Trp	Arg	Leu	Thr	Asp		
			130					135				140					
Lys	Thr	Lys	Ala	Arg	Tyr	Gln	Ser	Lys	Glu	Asp	Leu	Glu	Lys	Ala	Lys		
				150						155					160		
Lys	Glu	His	Gly	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Trp	Val	Asn	Asp	Lys	Val	Ala		
				165						170					175		
Tyr	Tyr	His	Asp	Tyr	Ser	Lys	Asp	Gly	Lys	Thr	Ala	Val	Asp	Gln	Glu		
				180						185				190			
His	Gly	Thr	His	Val	Ser	Gly	Ile	Leu	Ser	Gly	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu		
				195						200				205			
Thr	Lys	Glu	Pro	Tyr	Arg	Leu	Glu	Gly	Ala	Met	Pro	Glu	Ala	Gln	Leu		
										215				220			
Leu	Leu	Met	Arg	Val	Glu	Ile	Val	Asn	Gly	Leu	Ala	Asp	Tyr	Ala	Arg		
										235				240			
Asn	Tyr	Ala	Gln	Ala	Ile	Ile	Asp	Ala	Val	Asn	Leu	Gly	Ala	Lys	Val		
										250				255			
Ile	Asn	Met	Ser	Phe	Gly	Asn	Ala	Ala	Leu	Ala	Tyr	Ala	Asn	Leu	Pro		
										265				270			
Asp	Glu	Thr	Lys	Lys	Ala	Phe	Asp	Tyr	Ala	Lys	Ser	Lys	Gly	Val	Ser		
										280				285			
Ile	Val	Thr	Ser	Ala	Gly	Asn	Asp	Ser	Ser	Phe	Gly	Gly	Lys	Thr	Arg		
										295				300			
Leu	Pro	Leu	Ala	Asp	His	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Val	Gly	Thr	Pro	Ala		
														315		320	
Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Leu	Thr	Val	Ala	Ser	Tyr	Ser	Pro	Asp	Lys	Gln		
														325		335	
Leu	Thr	Glu	Thr	Ala	Thr	Val	Lys	Thr	Ala	Asp	Gln	Gln	Asp	Lys	Glu		
										345				350			
Met	Pro	Val	Leu	Ser	Thr	Asn	Arg	Phe	Glu	Pro	Asn	Lys	Ala	Tyr	Asp		
														355		365	
Tyr	Ala	Tyr	Ala	Asn	Arg	Gly	Met	Lys	Glu	Asp	Asp	Phe	Lys	Asp	Val		

ES 2 401 998 T3

370		375		380
Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Gly Asp Ile Asp Phe Lys Asp				
385		390		395
Lys Ile Ala Asn Ala Lys Lys Ala Gly Ala Val Gly Val Leu Ile Tyr				
	405		410	415
Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe Pro Ile Glu Leu Pro Asn Val Asp Gln				
	420		425	430
Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser Arg Lys Asp Gly Leu Leu Leu Lys Glu				
	435		440	445
Asn Pro Gln Lys Thr Ile Thr Phe Asn Ala Thr Pro Lys Val Leu Pro				
	450		455	460
Thr Ala Ser Gly Thr Lys Leu Ser Arg Phe Ser Ser Trp Gly Leu Thr				
465		470		475
Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro Asp Ile Ala Ala Pro Gly Gln Asp Ile				
	485		490	495
Leu Ser Ser Val Ala Asn Asn Lys Tyr Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser				
	500		505	510
Met Ser Ala Pro Leu Val Ala Gly Ile Met Gly Leu Leu Gln Lys Gln				
	515		520	525
Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp Met Thr Pro Ser Glu Arg Leu Asp Leu				
	530		535	540
Ala Lys Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Asp Glu Asp				
545		550		555
Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp				
	565		570	575
Ala Lys Lys Ala Ser Ala Ala Thr Met Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn				
	580		585	590
Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn Val Ser Asp Lys Phe Glu Val				
	595		600	605
Thr Val Thr Val His Asn Lys Ser Asp Lys Pro Gln Glu Leu Tyr Tyr				
	610		615	620
Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val Asp Gly Lys Leu Phe Ala Leu				
625		630		635
Ala Pro Lys Ala Leu Tyr Glu Ala Ser Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro				
	645		650	655
Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Ile Pro Ile Asp Val Ser Gln Phe				
	660		665	670
Ser Lys Asp Leu Leu Ala Pro Met Lys Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly				
	675		680	685
Phe Val Arg Phe Lys Gln Asp Pro Thr Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile				

ES 2 401 998 T3

690	695	700
Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe Gly Asn Leu Ser Ala Leu Glu		
705	710	715
Lys Pro Ile Tyr Asp Ser Lys Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr His Glu Ala		
	725	730
Asn Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr		
	740	745
Ala Leu Lys Asn Asn Phe Thr Ala Leu Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp		
	755	760
Thr Ile Ile Lys Ala Val Lys Glu Gly Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile		
770	775	780
Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile Phe Ala Gly Thr Phe Ala Lys		
785	790	795
Gln Asp Asp Asp Ser His Tyr Tyr Ile His Arg His Ala Asn Gly Lys		
	805	810
Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val		
	820	825
Gln Phe Gln Gly Thr Phe Leu Arg Asn Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu		
	835	840
Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu		
	850	855
Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser		
865	870	875
Thr Arg Phe Glu Lys Thr Arg Trp Asp Gly Lys Asp Lys Asp Gly Lys		
	885	890
Val Val Ala Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile		
	900	905
Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr Asp Phe Asp Val Ile Val Asp		
	915	920
Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp		
	930	935
Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro Lys Thr Ser Gln Pro Val Tyr		
945	950	955
Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr		
	965	970
Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu		
	980	985
Ala Glu Thr Met Glu Gly Ala Thr Val Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe		
	995	1000
Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val		

ES 2 401 998 T3

1010		1015		1020
Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser Asn Lys Pro Glu Gln Asp Gly Ser				
1025		1030		1035
Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu Gln Asp Gly				
	1045		1050	1055
Ser Gly Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu Gln Asp				
	1060		1065	1070
Gly Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu Gln				
	1075		1080	1085
Asp Gly Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu				
	1090		1095	1100
Lys Asp Ser Ser Gly Gln Thr Pro Gly Lys Thr Pro Gln Lys Gly Gln				
1105		1110		1115
Pro Ser Arg Thr Leu Glu Lys Arg Ser Ser Lys Arg Ala Leu Ala Thr				
	1125		1130	1135
Lys Ala Ser Thr Arg Asp Gln Leu Pro Thr Thr Asn Asp Lys Asp Thr				
	1140		1145	1150
Asn Arg Leu His Leu Leu Lys Leu Val Met Thr Thr Phe Phe Leu Gly				
	1155		1160	1165
Leu Val Ala His Ile Phe Lys Thr Lys Arg Thr Lys Lys				
	1170		1175	1180

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende una cantidad inmunogénica de un péptido aislado y purificado que comprende una Peptidasa C5a Estreptococal (SCP) enzimáticamente inactiva, cuya cantidad es eficaz para inmunizar a un mamífero susceptible frente a Estreptococos β -hemolíticos en combinación con un vehículo no tóxico fisiológicamente aceptable, en donde la SCP es una variante de SCP natural en la que la SCP variante presenta al menos
- 5 (i) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 193 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 260, 261, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1,
- 10 (ii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 130 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 193, 260, 261, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1,
- (iii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 260 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 261, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1,
- 15 (iv) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 261 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 262, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1,
- (v) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 262 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 295, 415, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1,
- 20 (vi) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 415 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 262, 295, 416, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1,
- (vii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 416 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 262, 295, 415, 417 o 512 de la SEQ ID NO: 1, o
- 25 (viii) una sustitución en un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido 417 de la SEQ ID NO: 1 y opcionalmente una sustitución adicional en uno o más de los residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos 130, 193, 260, 261, 262, 295, 415, 416, o 512 de la SEQ ID NO: 1.
- 30 2. La vacuna de la reivindicación 1, en la que la SCP se expresa a partir de una secuencia de ADN aislada que codifica SCP.
3. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la SCP presenta una cavidad de especificidad de residuos de aminoácido contiguos correspondiente aproximadamente a los residuos entre el residuo 260 y el residuo 417 de la SEQ ID NO: 1, o un dominio catalítico de residuos de aminoácido contiguos correspondiente aproximadamente a los residuos entre el residuo 130 y el residuo 512 de la SEQ ID NO: 1.
- 35 4. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la sustitución es una sustitución conservada.
5. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la SCP variante varía adicionalmente de la SCP natural en que no contiene una secuencia señal y/o un injerto de pared celular.
6. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la SCP es una variante de SCP procedente de Estreptococos de grupo A, de Estreptococos de grupo B, de Estreptococos de grupo C o de Estreptococos de grupo G.
- 40 7. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que además comprende una cantidad eficaz de un adyuvante inmunológico.
8. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el mamífero es humano, perro, bovino, porcino o equino.
- 45 9. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el Estreptococo β -hemolítico es un Estreptococo de grupo A, un Estreptococo de grupo B, un Estreptococo de grupo C o un Estreptococo de grupo G.
10. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la SCP se conjuga o se une a un péptido o a un polisacárido.

11. La vacuna de la reivindicación 10, en la que el péptido o polisacárido conjugado o unido a la SCP es de otro patógeno.

5 12. La vacuna de la reivindicación 11, en la que el polisacárido de otro patógeno es un polisacárido estreptococal de grupo A, un polisacárido-C de *Streptococcus* de grupo B o un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* o de *Streptococcus* de grupo B.

13. Uso de la vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en la fabricación de un medicamento para la protección contra la colonización o la infección de *Streptococcus* β -hemolíticos.

14. Una vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para usar como un medicamento para la protección contra la colonización o la infección de *Streptococcus* β -hemolíticos.

10

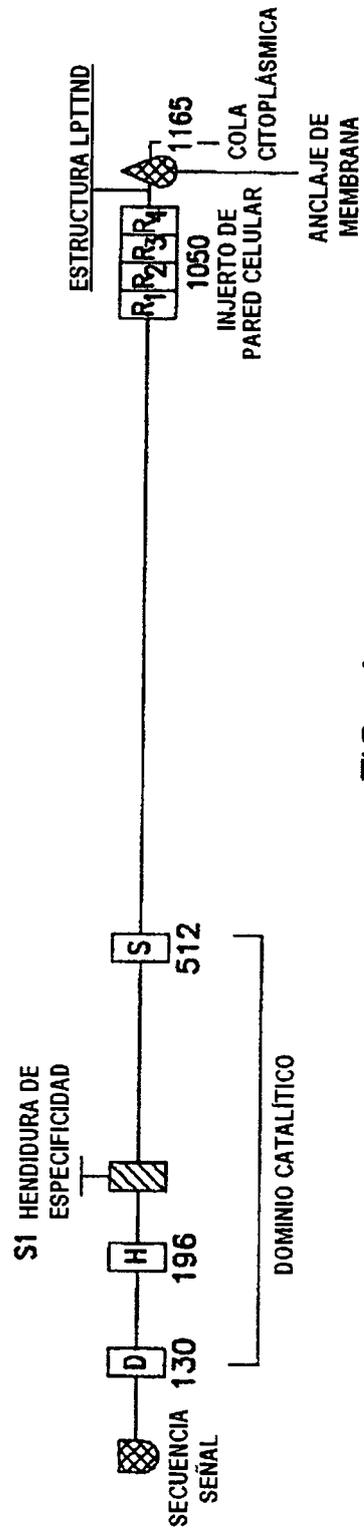
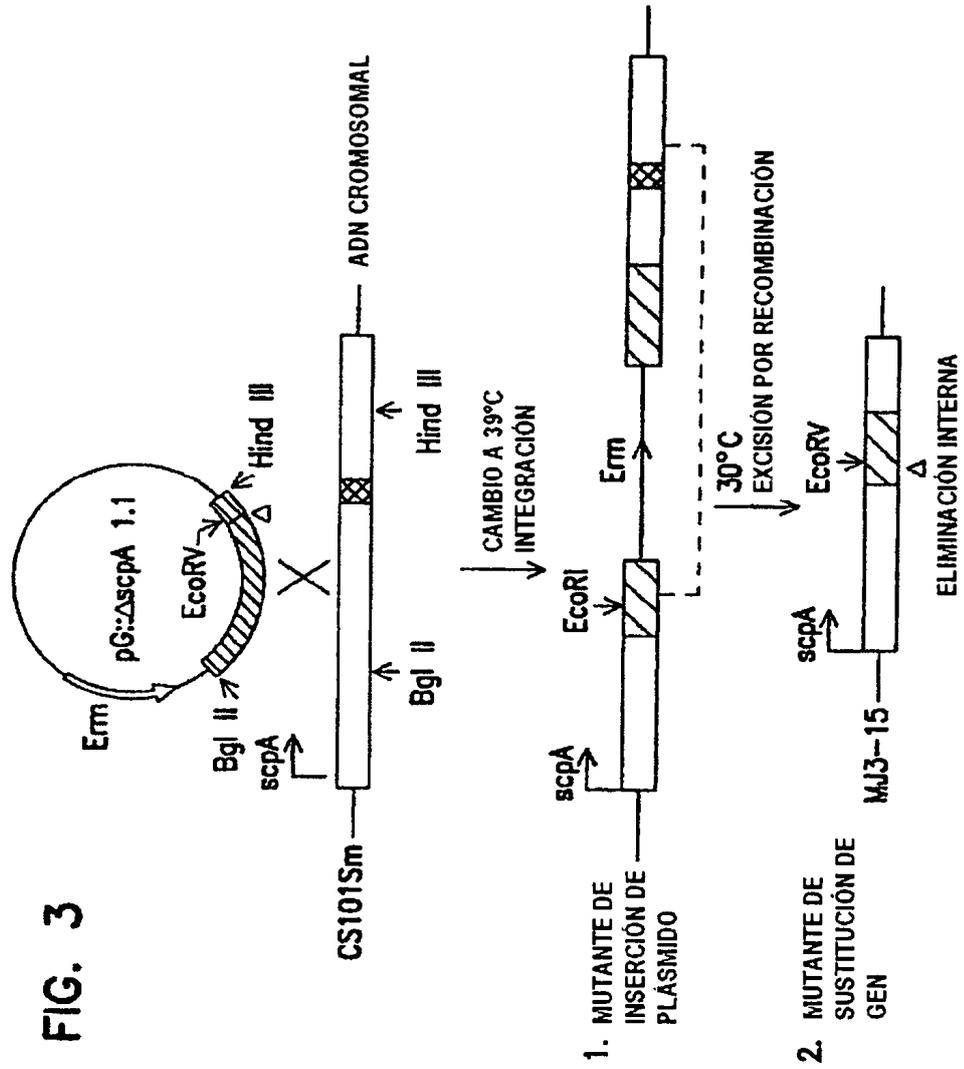


FIG. 1

1
 SCFA19 LKCKQLPFDKLAIALMSTSI LLNAQSDIKANTVTEOTPATEQAVEIPQPTITVSEVPSS
 SCFA12 -----V-----A-----
 SCFB -----T-----A-----A-----
 61
 KETKTPQTPDDAEEVADDANDLAPQAPAKTPTDSATSKATIRDLNDPFSQVKTLQEKAGK
 -----I-----A--P-----
 -----S--G-----A--P-----
 121
 GAGTVVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKAKARYOSKEDLEIQAKKEHCITYGENVNDKVAYYHD
 -----T-----
 -----T-----
 181
 YSKDQKTAVDQEHGTHVSGILSGMAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLHRVEIVNGLADYAR

 241
 NYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGHAALAYANLPDETKKPFVYAKSKGVRIVITAGNDSSEFG
 -----A--D-----S--S-----
 -----I-----A--D-----S--S-----
 301
 QKTRPLADHPDYGVVGTFAAADSTLTVASYSFDHQLTETAMVICDDQDQKEMPVLSHNR
 -----K-----
 -----K-----VR--A-----
 361
 FEPNKAYDYANRGGKEDDFKDVKGIKALIERSDIDFKIANAKIAGAVGVLIYDQDQ
 -----G--X--V-----
 -----T-----G--X--X-----
 421
 KGFPIELPHVDQHPAAFISRKDGLLKNNSQKTIITFNATFKVLPTASGTLERFSSWGLT
 -----P-----
 -----P-----
 481
 ADGNIKPDIAPGQDILSSAANNICYAKLSGTSRSHAPLVAVYIMGLLQKQYETQYFDHTQSE
 -----V-----G-----P--
 -----V-----G-----P--
 541
 RIDLAKKVLMSATALYDEDEKAYPSFRQQGAGAVDAKKASEATHYVIDKDNISSKVRLN
 -----A-----
 -----A-----
 601
 NVSDKFEVIVIVHESKDKPHELYQATVQIDKVDGKHFALAPKALIEYSWQKITIPANSS
 -----Q-----V--Y--A-----
 -----N-----Q-----V--Y--A-----
 661
 KQVTYIPIDISQFSKDLAQMGNGYFLEGFVRKQDPKIBELHSIPIYIFRGDFGRLSALE
 -----V--A--R-----F-----V-----
 -----V--A--R-----F-----K-----
 721
 KFLYDSKDGSSYYHEEISDARDQLDGDGLQFZALKNDFTALITESNFTIINVVKSGVEN
 -----I-----AN-----N-----KA-----
 -----I-----AN-----N-----KA-----
 781
 IEDIESSEYITETIFAGTFAKQDDDRHYIHRHANGKPYAALSFNEDGNRDYVQFRGTFLR
 -----S-----E-----Q-----
 -----L-----S-----Q-----
 841
 NAKNLVAEVLKKEGVVVKISEVIHQVVKVYRNDLASTLGSTRPEISRHDGKDKDAKVVAN
 -----KT-----G-----
 -----K-----G-----
 901
 GTTYRVRYPYIPSSGAKPQHTDFDVIVDNITPEVATSATPSIEDRRLTLASKPQISQPVY
 -----K-----
 -----K-----
 961
 KERIATTYMDEDLPTIEYISFNEDGTFTLPEEAETMSGATVPLKMSDFYVVEDMAGHIT
 -----T-----
 -----T-----
 1021
 YTPVVKLLSGHSHKPEQDGSQAAPDKKPEYPEQDGSQAAPDKKPEYPCODGSGGQT PDK
 -----G--T-----A-----A--E-----
 -----G--T-----A-----A--E-----
 1081
 KPETKPEKDSGGQTPGKTPQIGQPSRTLEKRSKRALATKASTEDQLPTINDKOTNRLHL
 -----T-----
 -----T-----
 1141
 LKLVHTTFFLGLVAHIFKTKS...TED
 -----F-----QKE--KK
 -----F-----QKE--KK

FIG. 2



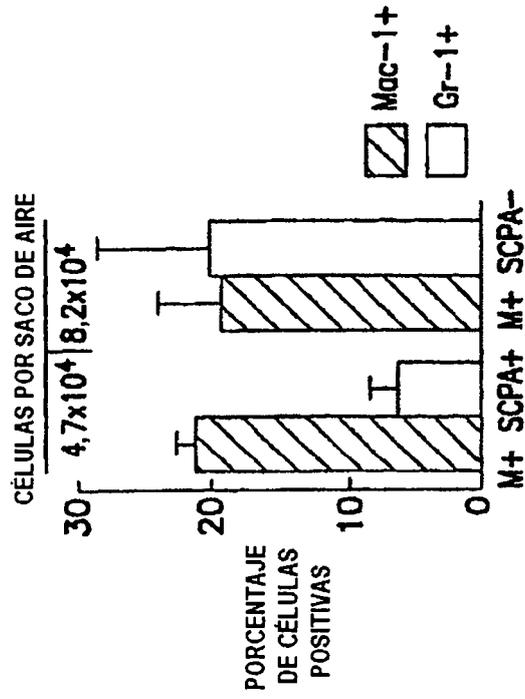
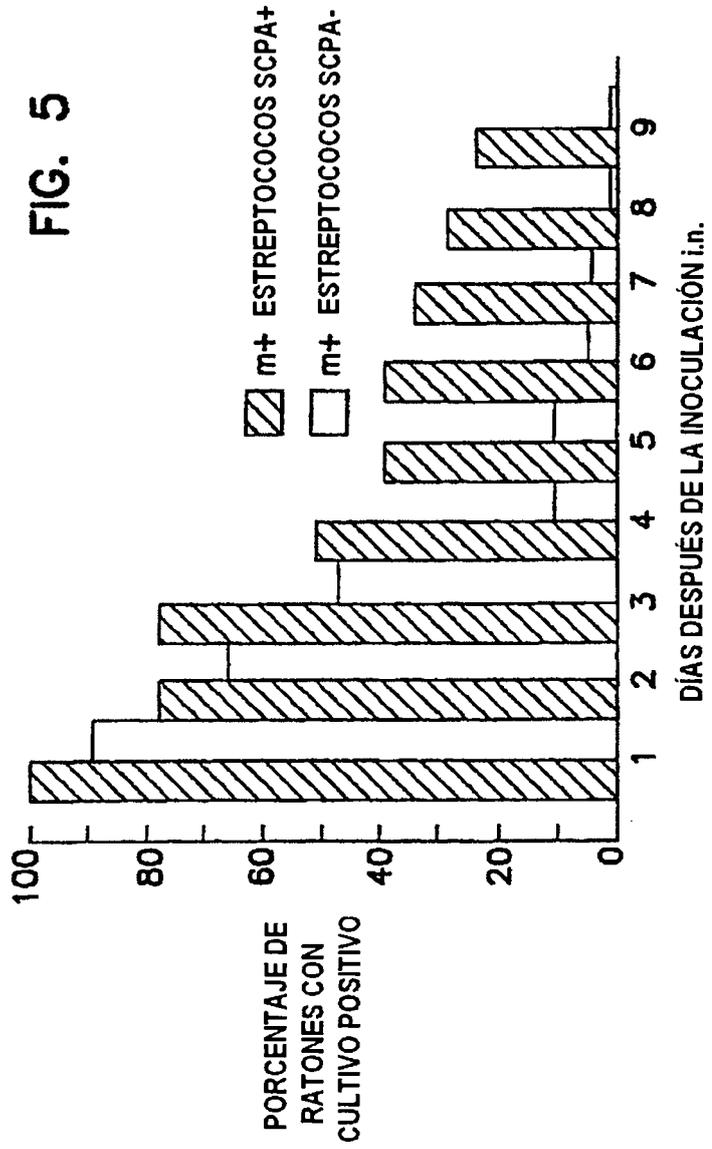


FIG. 4

FIG. 5



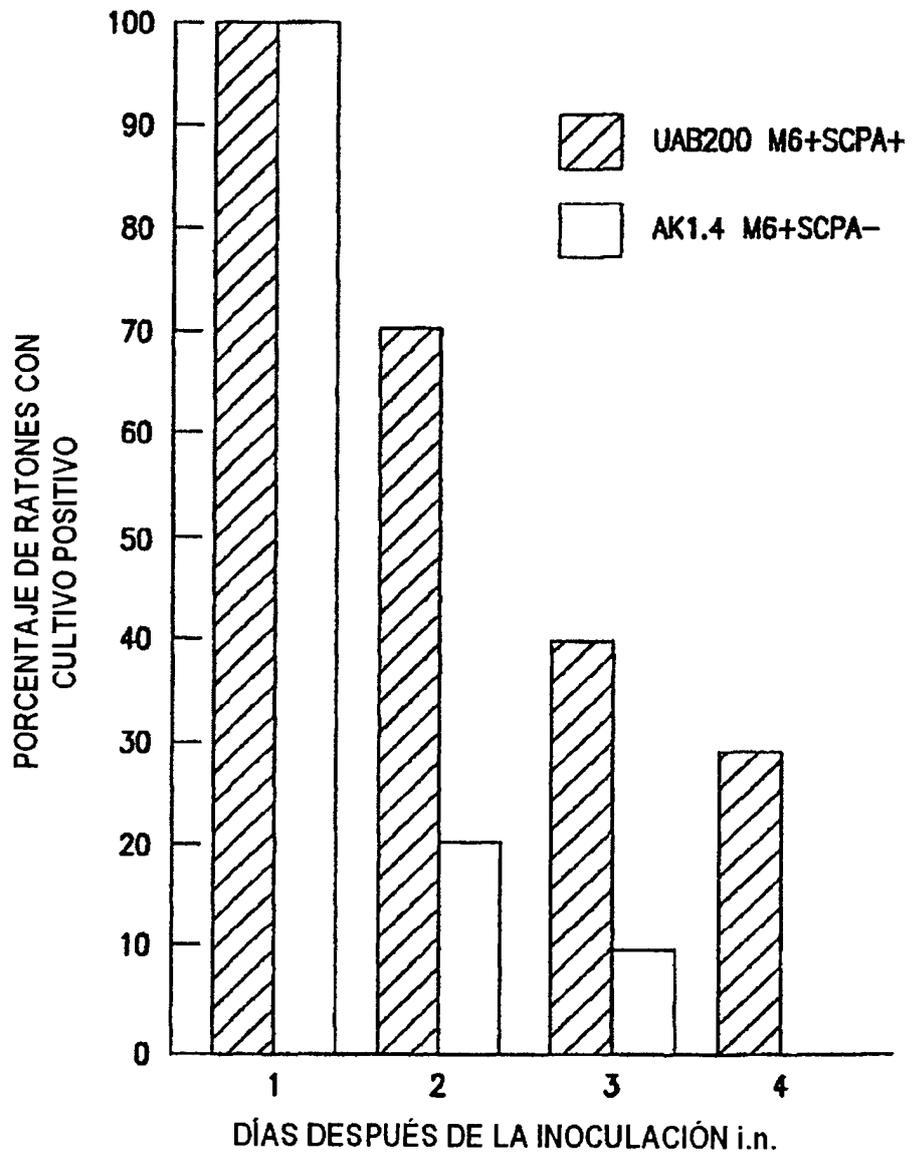


FIG. 6

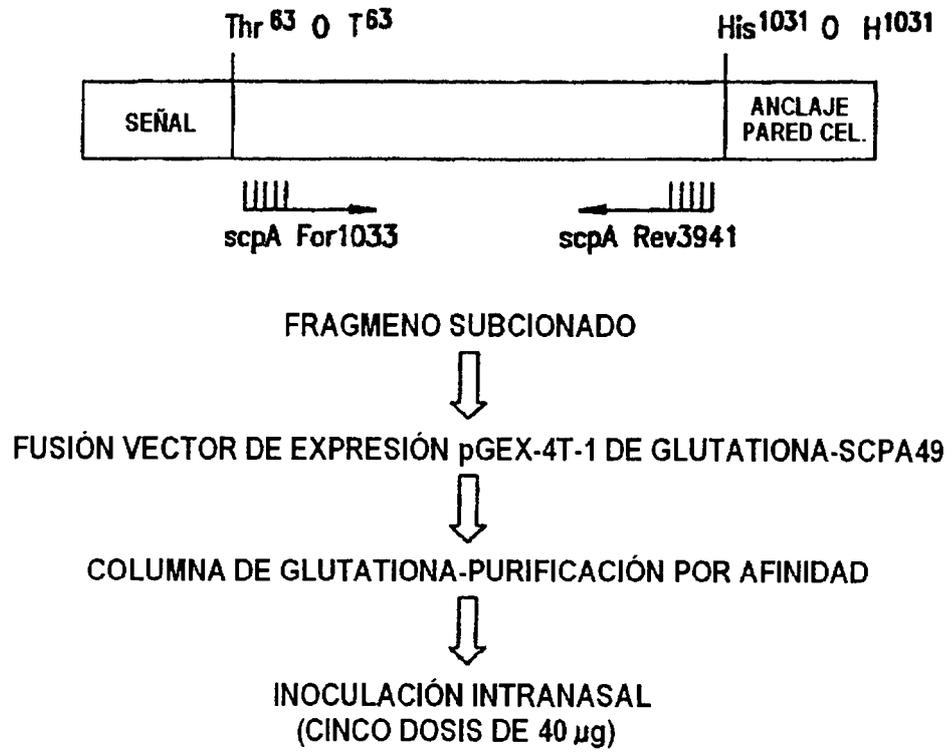


FIG. 7

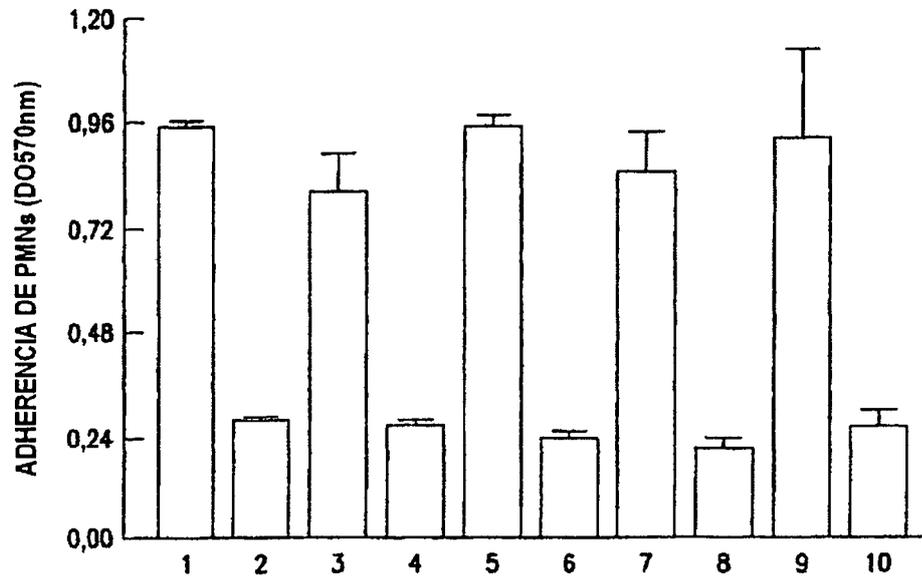


FIG. 8

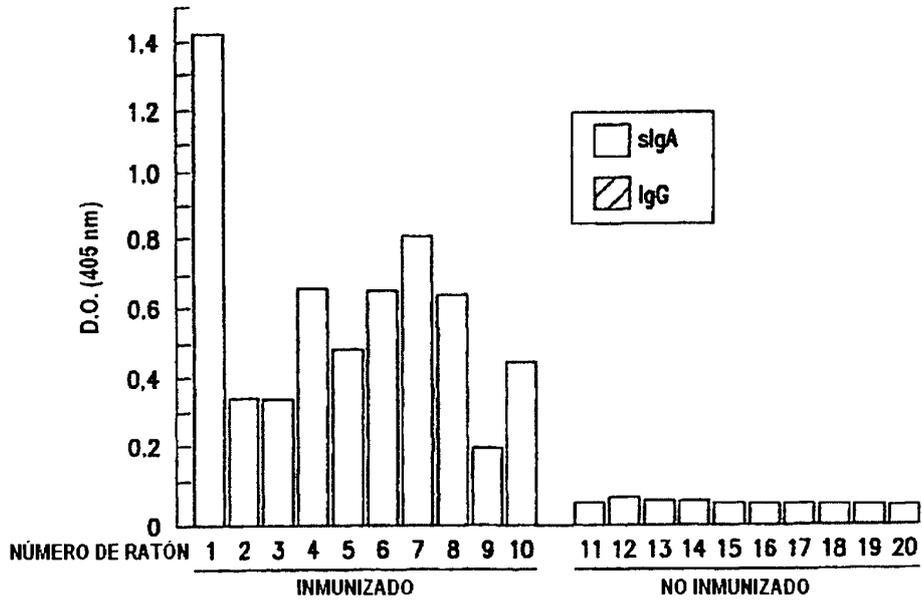


FIG. 9A

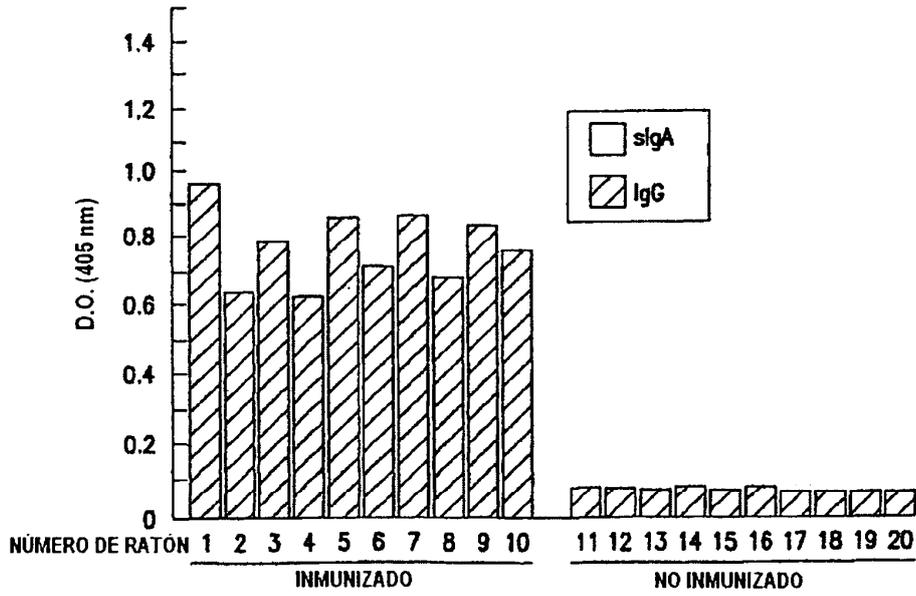


FIG. 9B

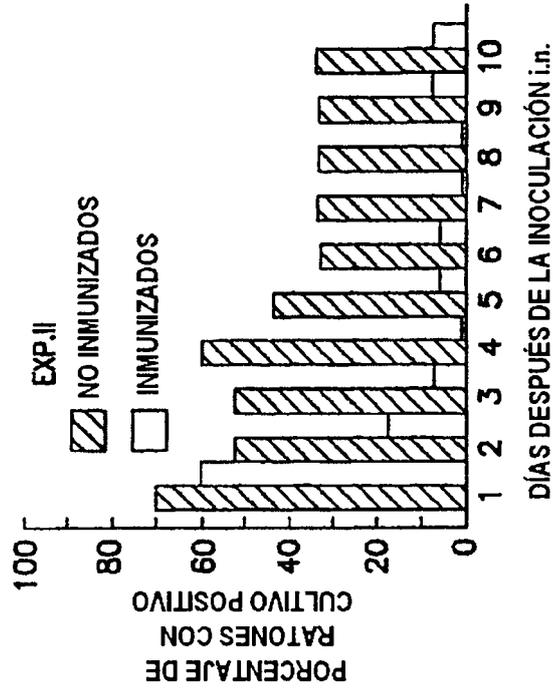


FIG. 10B

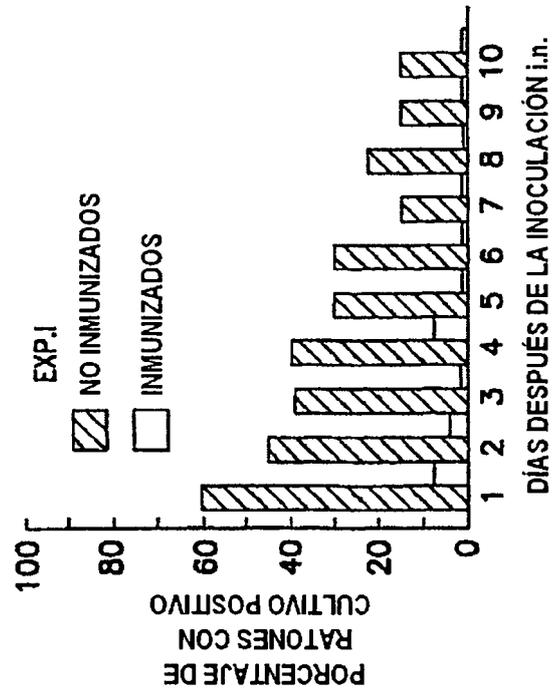


FIG. 10A

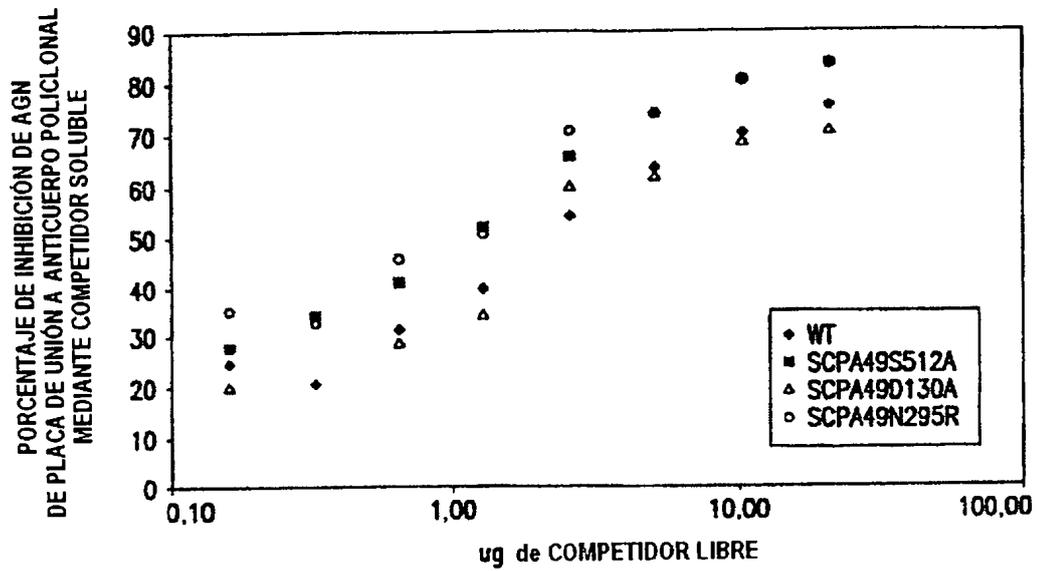


FIG. 11

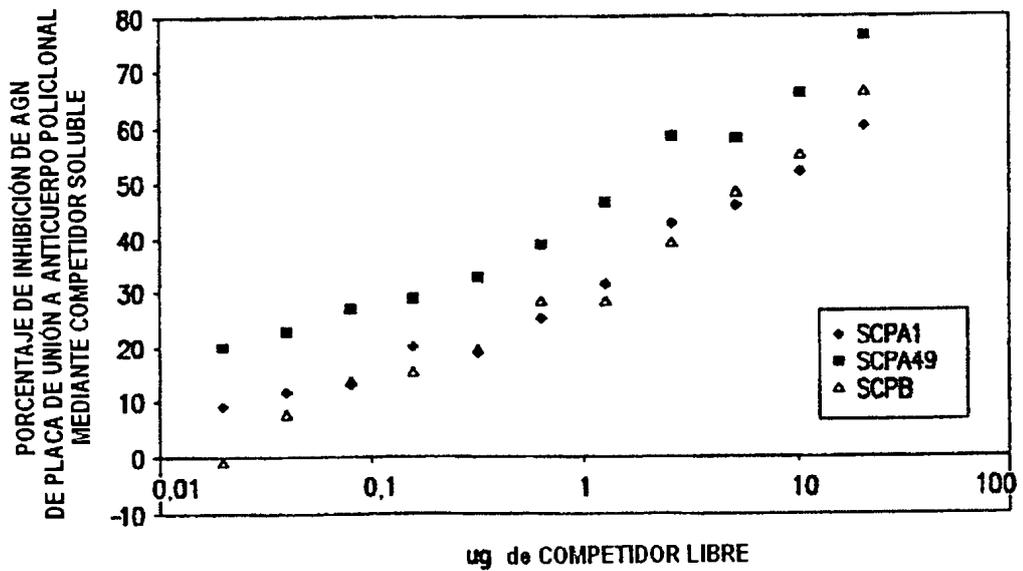


FIG. 12