

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 231**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2009 PCT/US2009/063268**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO10053986**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2009 E 09752598 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2356135**

54 Título: **Composición inmunogénica de múltiples componentes para la prevención de la enfermedad por estreptococos beta hemolíticos (EBH)**

30 Prioridad:

05.11.2008 US 111485 P

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

29.12.2017

73 Titular/es:

**WYETH LLC (50.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US y
REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**DODGE, INGRID LEA;
ANDERSON, ANNALIESA SYBIL;
HAGEN, MICHAEL;
OLMSTED, STEPHEN BRUCE y
CLEARY, PATRICK P.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 648 231 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

Composición inmunogénica de múltiples componentes para la prevención de la enfermedad por estreptococos beta hemolíticos (EBH)

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al uso de polipéptidos y polinucleótidos estreptocócicos β hemolíticos (EBH), en particular polipéptidos y polinucleótidos de *Streptococcus pyogenes*, en composiciones inmunogénicas de múltiples componentes para prevenir la enfermedad por EBH. De forma más concreta, la invención se refiere al uso de polipéptidos de *Streptococcus pyogenes* que se emplazan en superficie. Además, la invención se refiere en general a composiciones inmunogénicas para la inmunización frente a y la reducción de la infección por estreptococo beta hemolítico.

Antecedentes de la invención

Los criterios fenotípicos tradicionales para la clasificación de los estreptococos incluyen tanto las reacciones hemolíticas como los agrupamientos serológicos de Lancefield. Sin embargo, con los avances taxonómicos, se sabe ahora que especies no relacionadas de estreptococos β hemolíticos (EBH) (definido como la lisis completa de eritrocitos de oveja en placas de agar) pueden producir antígenos de Lancefield idénticos y que cepas genéticamente relacionadas a nivel de especies pueden tener antígenos de Lancefield heterogéneos. A pesar de estas excepciones a las reglas tradicionales de la taxonomía de los estreptococos, las reacciones hemolíticas y las pruebas serológicas de Lancefield pueden utilizarse aún para dividir a los estreptococos en categorías amplias como una primera etapa en la identificación de los aislados clínicos. Ruoff, K. L., R. A. Whiley y D. Beighton. 1999. Streptococcus. En P. R. Murray, E.J. Barón, M. A. Pfaller, F. C. Tenover y R. H. Tenover (eds.), Manual of Clinical Microbiology. American Society of Microbiology Press, Washington D. C.

Los aislados β hemolíticos con antígeno de grupo de Lancefield A, C o G pueden subdividirse en dos grupos: los formadores de colonia grande ($> 0,5$ mm de diámetro) y de colonia pequeña ($< 0,5$ mm de diámetro). Las cepas de los grupos A (*Streptococcus pyogenes*), C y G formadoras de colonia grande son estreptococos "piogénicos" repletos de una diversidad de mecanismos de virulencia eficaces. *Streptococcus agalactiae* (grupo B) aún se identifica como confiable por su producción de antígeno de Lancefield del grupo B y otros rasgos fenotípicos.

Las similitudes entre las especies de EBH incluyen no solo los factores de virulencia sino también las manifestaciones de la enfermedad. Están incluidas en las últimas la neumonía, la artritis, los abscesos, la rinofaringitis, la metritis, la sepsis puerperal, la septicemia neonatal, las infecciones de heridas, la meningitis, la peritonitis, la celulitis, la piodermia, la fascitis necrosante, el síndrome del choque tóxico, la septicemia, la endocarditis infecciosa, la pericarditis, la glomerulonefritis y la osteomielitis.

Los *Streptococcus pyogenes* son diplococos Grampositivos que colonizan la faringe y la piel de los seres humanos, sitios que después sirven como reservorio principal de este organismo. Parásito obligado, esta bacteria se transmite ya sea por contacto directo con secreciones respiratorias o de la mano a la boca. La mayoría de las infecciones por *Streptococcus pyogenes* son enfermedades relativamente leves, tales como la faringitis o el impétigo. Actualmente, hay entre veinte y treinta y cinco millones de casos de faringitis solo en los Estados Unidos, con un coste de aproximadamente 2.000 millones de dólares por visitas al médico y otros gastos relacionados. De forma adicional, las secuelas no supurativas tales como la fiebre reumática, la escarlatina y la glomerulonefritis son el resultado de las infecciones por *Streptococcus pyogenes*. A escala mundial, la fiebre reumática aguda (FRA) es la causa más común de cardiopatía pediátrica (1997. Definiciones de casos para afecciones infecciosas bajo la vigilancia de la sanidad pública, CDC).

Desde los puntos de entrada iniciales, la faringe y la piel, el *Streptococcus pyogenes* puede diseminarse a otras partes del cuerpo en donde la bacteria no se encuentra habitualmente, tal como la sangre, el músculo profundo y el tejido graso, o los pulmones, y puede provocar infecciones invasivas. Dos de las formas más graves pero menos comunes de la enfermedad invasiva por *Streptococcus pyogenes* son la fascitis necrosante y el síndrome del choque tóxico estreptocócico (SCTE). La fascitis necrosante (descrita en los medios como "bacterias comedora de carne") es una infección destructiva del tejido muscular y graso. La SCTE es una infección que progresa rápidamente provocando choque y lesión en los órganos internos tales como los riñones, el hígado y los pulmones. Gran parte de este daño se debe a una toxemia más que a un daño localizado debido al crecimiento bacteriano.

En 1995, las infecciones invasivas por *Streptococcus pyogenes* y la SCTE se hicieron enfermedades que se deben informar de forma obligatoria. A diferencia de los millones de personas que adquieren faringitis e impétigo, el informe de casos obligatorio del Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) de los Estados Unidos indica que en 1997 hubo desde 15.000 a 20.000 casos de enfermedad invasiva por *Streptococcus pyogenes* en los Estados Unidos, dando como resultado más de 2.000 muertes (1997. Definiciones de casos para afecciones infecciosas bajo la vigilancia de la sanidad pública. CDC). Otros informes estiman que la enfermedad invasiva es tan alta como 10-20 casos cada 100.000 individuos por año (Stevens, D. L. 1995. Streptococcal toxic-shock syndrome:

spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis.* 1: 69-78). De forma más concreta, de los 15.000 a 20.000 casos de enfermedad invasiva, 1.100 a 1.500 son casos de fascitis necrotizante y 1.000 a 1400 son casos de SCTE, con una tasa de mortalidad del 20 % y el 60 %, respectivamente. También están incluidos en enfermedad invasiva grave los casos de miositis, que portan una tasa de fatalidad del 80 % al 100 %.

Un adicional del 10 % al 15 % de individuos muere de otras formas de enfermedad invasiva por estreptococos del grupo A. Estas cifras han aumentado desde que el informe de casos se inició en 1995 y reflejan una tendencia general que se ha producido durante las pasadas dos décadas. De forma adicional, se está de acuerdo en que la rigurosidad en las definiciones de los casos da como resultado cifras inferiores y, por lo tanto, engañosas, y en que muchos casos se resuelven de forma satisfactoria debido al diagnóstico precoz y al tratamiento antes de que la definición se haya satisfecho.

Aunque *Streptococcus pyogenes* sigue siendo sensible a la penicilina y a sus derivados, el tratamiento no necesariamente erradica al organismo. Aproximadamente del 5 % al 20 % de la población humana son portadores, dependiendo de la estación (Stevens, D. L. 1995. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis.* 1: 69-78), a pesar de la terapia con antibióticos. Las razones de esto no son totalmente claras y pueden implicar una diversidad de mecanismos. En los casos de infecciones invasivas graves, el tratamiento a menudo requiere la intervención quirúrgica agresiva. Para los casos que implican SCTE o una enfermedad relacionada, la clindamicina (un inhibidor de la síntesis de proteínas) es el antibiótico preferente dado que penetra bien los tejidos y previene la producción de endotoxinas. Existen informes de algo de resistencia a la tetraciclina, las sulfamidas y más recientemente a la eritromicina. Claramente, sigue habiendo una necesidad de composiciones para prevenir y tratar la infección β hemolítica.

Se han identificado numerosos factores de virulencia para *Streptococcus pyogenes*, algunos secretados y algunos emplazados en superficie. Aunque está encapsulado, la cápsula está compuesta de ácido hialurónico y no es adecuada como antígeno candidato para la inclusión en composiciones inmunogénicas, dado que habitualmente se expresa en células de mamífero y no es inmunogénico (Dale, J. B., R. G. Washburn, M. B. Marques y M. R. Wessels. 1996. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect. Immun.* 64: 1495-501). Otros candidatos son el antígeno T y el Carbohidrato de Grupo, pero también pueden suscitar anticuerpos que reaccionan de forma cruzada contra tejido cardíaco. El ácido lipoteicoico está presente en la superficie de *Streptococcus pyogenes*, pero genera inquietud con respecto a la seguridad, de forma similar que el LPS.

Las proteínas de superficie más abundantes están incluidas en la familia de proteínas denominadas como M o proteínas "similares a M" debido a su similitud estructural. Aunque los miembros de esta clase tienen papeles biológicos similares en la inhibición de la fagocitosis, cada uno tiene propiedades de unión a sustrato exclusivas. La proteína mejor caracterizada de esta familia es la proteína M helicoidal. Se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra cepas M homólogas son opsónicos y protectores (Dale, J. B., R. W. Baird, H. S. Courtney, D. L. Hasty y M. S. Bronze. 1994. Passive protection of mice against group A streptococcal pharyngeal infection by lipoteichoic acid. *J Infect Dis.* 169:319-23, Dale, J. B., M. Simmons, E. C. Chiang y E. Y. Chiang. 1996. Recombinant, Ellen, R. P. y R. J. Gibbons. 1972. M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect Immun.* 5: 826-830.). Complicando el uso de la proteína M como un antígeno candidato está el hecho de que se han identificado aproximadamente 100 serotipos de proteína M distintos, con varios más sin tipificar. Normalmente, los serotipos M de Clase I, ejemplificados por los serotipos M1, M3, M6, M12 y M18, están asociados con faringitis, escarlatina y fiebre reumática, y no expresan proteínas de unión a inmunoglobulina. Los serotipos M de Clase II, tales como M2 y M49, están asociados con las infecciones cutáneas localizadas más comunes y la glomerulonefritis que aparece como secuela, y expresan proteínas de unión a inmunoglobulina (Podbielski, A., A. Flosdorff y J. Weber-Heynemann. 1995. The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes. *Infect Immun.* 63: 9-20). Es importante advertir que existe poca o ninguna reactividad cruzada heteróloga de los anticuerpos frente a los serotipos M. Igualmente importante es el papel que estos anticuerpos desempeñan en la fiebre reumática. Regiones específicas de la proteína M suscitan anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con el tejido cardíaco del hospedador, provocando, o al menos correlacionándose, con daño celular (Cunningham, M. W. y A. Quina 1997. Immunological crossreactivity between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. *Adv Exp Med Biol.* 418: 887-921, Quinn, A., K. Ward, V. A. Fischetti, M. Hemric y M. W. Cunningham. 1998. Immunological relationship between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. *Infect Immun.* 66: 4418-24.).

Las proteínas M y similares a M pertenecen a una familia grande de proteínas emplazadas en superficie que están definidas por el motivo LPXTG dirigido a sortasa (Mazmanian, S. K., G. Liu, H. Ton-That y O. Schneewind. 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science.* 285: 760-3, Ton-That, H., G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull y O. Schneewind. 1999. Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 12424-12429). Este motivo, emplazado cerca del extremo carboxilo de la proteína, se escinde en primer lugar mediante la sortasa, entre los restos treonina y glicina del motivo LPXTG. Una vez escindida, la proteína se une de forma covalente a través del carboxilo de la treonina a un grupo amida libre del puente cruzado de aminoácidos en el peptidoglucano, uniendo así la proteína de forma permanente a la superficie de la célula bacteriana. Incluidas en

esta familia de proteínas dirigidas a sortasa están la peptidasa C5a (Chen, C. C y P. P. Cleary. 1989. Cloning and expression of the streptococcal C5a peptidase gene in *Escherichia coli*: linkage to the type 12 M protein gene. *Infect. Immun.* 57: 1740-1745, Chmouryguña. I., A. Suvorov, P. Ferrieri y P. P. Cleary. 1996. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. *Infect. Immun.* 64: 2387-2390), las adhesinas para fibronectina (Courtney, H. S., Y. Li, J. B. Dale y D. L. Hasty. 1994. Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. *Infect Immun.* 62: 3937-46, Fogg, G. C y M. G. Caparon. 1997. Constitutive expression of fibronectin binding in *Streptococcus pyogenes* as a result of anaerobic activation of *rofA*. *J Bacteriol.* 179: 6172-80, Hanski, E. y M. Caparon. 1992. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesion of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci., USA.* 89: 6172-76, Hanski, E., P. A. Horwitz y M. G. Caparon. 1992. Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* 60: 5119-5125), la vitronectina y el colágeno de tipo IV, y otras proteínas de tipo M que se unen a plasminógeno, la IgA, la IgG y la albúmina (Kihlberg, B. M., M. Collin, A. Olsen y L. Bjorck. 1999. Protein H, an antiphagocytic surface protein in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* 67: 1708-14).

Se han descrito numerosas proteínas secretadas, varias de las cuales se consideran toxinas. La mayoría de los aislados de *Streptococcus pyogenes* procedentes de casos de enfermedad invasiva grave y de síndrome de choque tóxico estreptocócico (SCTE) producen las exotoxinas piogénicas estreptocócicas (EPE) A y C (Cockerill, F. R., 3ª, R. L. Thompson, J. M. Musser, P. M. Schlievert, J. Talbot, K. E. Holley, W. S. Harmsen, D. M. Ilstrup, P. C. Kohner, M. H. Kim, B. Frankfort, J. M. Manahan, J. M. Steckelberg, F. Roberson y W. R. Wilson. 1998. Molecular, serological and clinical features of 16 consecutive cases of invasive streptococcal disease. Southeastern Minnesota Streptococcal Working Group. *Clin Infect Dis.* 26: 1448-58). También se han identificado otras exotoxinas piogénicas en la secuencia genómica de *Streptococcus pyogenes* completada en la Universidad de Oklahoma y enviada al GenBank, a la que asignó el número de registro AE004092, y ha sido caracterizada (Proft, T., S. Louise Moffatt, C. J. Berkahn y J. D. Fraser. 1999. Identification and Characterization of Novel Superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J Exp Med.* 189: 89-102). Otras toxinas tales como la toxina del Síndrome Similar al Choque Tóxico, el Superantígeno Estreptocócico (Reda, K. B., V. Kapur, D. Goela, J. G. Lamphear, J. M. Musser y R. R. Rich. 1996. Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of *ssa* within *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* 64: 1161-5) y el Factor Mitogénico (Yutsudo, T., K. Okumura, M. Iwasaki, A. Hara, S. Kamitani, W. Minamide, H. Igarashi y Y. Hinuma, 1994. The gene encoding a new mitogenic factor in A *Streptococcus pyogenes* strain is distributed only in group A streptococci. *Infection and Immunity.* 62: 4000-4004) desempeñan papeles menos definidos en la enfermedad. La estreptolisina O podría también considerarse un posible antígeno candidato, debido a que provoca la liberación de IL- β . Además, se ha identificado una diversidad de enzimas secretadas que incluyen la proteasa de cisteína (Lukomski, S., C. A. Montgomery, J. Rurangirwa, R. S. Geske, J. P. Barrish, G. J. Adams y J. M. Musser. 1999. Extracellular cysteine protease produced by *Streptococcus pyogenes* participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice. *Infect. Immun.* 67:1779-88, Matsuka, Y. V., S. Pillai, S. Gubba, J. M. Musser y S. B. Olmsted. 1999. Fibrinogen cleavage by the *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease and generation of antibodies that inhibit enzyme proteolytic activity. *Infect Immun.* 67: 4326-33), la estreptoquinasa (Huang, T. T., H. Malke y J. J. Ferretti. 1989. The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in *Escherichia coli*, and sequence analysis. *Mol Microbiol.* 3: 197-205, Nordstrand, A., W. M. McShan, J. J. Ferretti, S. E. Holm y M. Norgren. 2000. Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131. *Infect Immun.* 68: 1019-25) y la hialuronidasa (Hynes, W. L., A. R. Dixon, S. L. Walton y L. J. Aridgides. 2000. The extracellular hyaluronidase gene (*hyla*) of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* 184:109-12, Hynes, W. L., L. Hancock y J. J. Ferretti. 1995. Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. *Infect Immun.* 63: 3015-20).

Dada la cantidad de factores de virulencia conocidos producidos por *Streptococcus pyogenes*, está claro que una característica importante de la composición inmunogénica estreptocócica β hemolítica satisfactoria sería su capacidad de estimular una respuesta que previniese o limitase la colonización temprana en los procesos infecciosos. Esta respuesta protectora bloquearía la adherencia y/o potenciaría la eliminación de células a través de opsonofagocitosis. Se ha descubierto que los anticuerpos frente a la proteína M son opsónicos y proporcionan un mecanismo para superar las propiedades antifagocíticas de las proteínas (Jones, K. F. y V. A. Fischetti. 1988. The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 streptococci. *J Exp Med.* 167: 1114-23), en gran parte del mismo modo en que los anticuerpos anti serotipo capsular B han demostrado protección frente a la enfermedad provocada por *Haemophilus influenzae* B (Madore, D. V. 1998. Characterization of immune response as an indicator or *Haemophilus influenzae* type b vaccine efficacy. *Pediatr Infect Dis J.* 17: S207-10). Además, se ha descubierto que los anticuerpos específicos frente a la Proteína F bloquean la adherencia e internalización por células en cultivo (Molinari, G., S. R. Talay, P. Valentin-Weigand, M. Rohde y G. S. Chhatwal. 1997. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect. Immun.* 65: 1357-63). El documento WO 2004/078907 divulga moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un antígeno reactivo con suero hiperinmune o un fragmento del mismo, así como antígenos reactivos con suero hiperinmune o fragmentos de los mismos de *S. pyogenes*, métodos de aislamiento de tales antígenos y usos específicos de los mismos.

Cheng, Q., *et al.*, *Infect. Immun.*, 2002, vol. 70 (11), 6409-6415, enseñan que la inmunización con las vacunas de peptidasa de C5a o conjugadas de peptidasa-polisacárido de tipo III potencia la eliminación de los estreptococos del grupo B de los pulmones de ratones infectados.

El documento US 6355255 divulga vacunas para su uso frente a la colonización y la infección por *Streptococcus* beta hemolítico o que contienen una cantidad inmunogénica de una variante de la peptidasa de C5a estreptocócica (PCE). También se divulga un método de protección de un mamífero susceptible frente a la colonización o infección por *Streptococcus* beta hemolítico administrando tal vacuna. Adicionalmente, se divulgan la PCE enzimáticamente inactiva y los polinucleótidos que codifican estas proteínas PCE.

Maione, D., *et al.*, *Science*, 2005, vol. 309 (5731), 148-150, divulgan la identificación de una vacuna universal para *Streptococcus* del grupo B mediante exploración genómica múltiple.

Dale J. B., *et al.*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1997, vol. 418, 863-868, revisan ensayos clínicos en fase I de vacunas conjugadas con polisacáridos del grupo B y el desarrollo de vacunas estreptocócicas del grupo A.

McMillan, D. J., *et al.*, *Vaccine*, 2004, Vol. 22 (21-22), 2783-2790, enseñan la identificación y evaluación de nuevas candidatos para vacuna para infecciones estreptocócicas del grupo A.

El documento WO 2006/042027 divulga antígenos estreptocócicos del grupo A (EGA) útiles para proporcionar inmunidad frente a la infección por *pyogenes*.

Sigue habiendo una necesidad de desarrollar composiciones inmunogénicas y métodos para prevenir o mejorar las infecciones provocadas por estreptococos β hemolíticos, incluyendo de los grupos A, B, C y G. También sigue habiendo una necesidad de proporcionar composiciones inmunogénicas que proporcionen inmunidad frente a una amplia diversidad de bacterias EBH.

Sumario de la invención

En el presente documento se describen composiciones inmunogénicas para la protección de mamíferos susceptibles frente a la colonización o infección por estreptococos β hemolíticos, incluyendo estreptococos del Grupo A, B, C y/o D, incluyendo los de *Streptococcus pyogenes*. Estas composiciones inmunogénicas comprenden una mezcla de dos o más polipéptidos como se describe más ampliamente a continuación. También se describen métodos para prevenir o mejorar tal colonización en un mamífero susceptible, administrando una cantidad eficaz de la composición inmunogénica para generar anticuerpos frente a los polipéptidos específicos contenidos en la composición inmunogénica. Además se describen polipéptidos y polinucleótidos de *Streptococcus pyogenes*, materiales recombinantes y métodos para su producción. Aun más, se describen métodos para usar tales polipéptidos y polinucleótidos de *Streptococcus pyogenes*. Los polipéptidos y polinucleótidos también pueden utilizarse en la fabricación de un medicamento para prevenir o mejorar una infección provocada por estreptococos β hemolíticos.

De forma más concreta, la invención proporciona una composición inmunogénica, comprendiendo dicha composición una mezcla de:

- (a) un polipéptido de PCE que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2);
- (b) un polipéptido de peptidilpropil isomerasa que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 4 (SEQ ID NO: 4); y
- (c) un supuesto polipéptido de adhesión que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 8 (SEQ ID NO: 8).

La composición inmunogénica de la invención puede ser de uso como un medicamento.

La composición inmunogénica de la invención puede ser de uso en un método de protección de un mamífero susceptible, frente a la colonización o infección por estreptococos β hemolíticos.

Los polipéptidos que pueden utilizarse en las composiciones inmunogénicas de la invención pueden por lo tanto incluir, en la medida en que se definen en las reivindicaciones, polipéptidos aislados que comprenden al menos una de una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las Fig. 2, 4, 6, 8 o 10. Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden incluir secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 90 % de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores, y polipéptidos maduros de estas. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden incluir además fragmentos inmunogénicos y equivalentes biológicos de estos polipéptidos. También se describen anticuerpos que se unen de forma inmunoespecífica a los polipéptidos de uso de la invención.

Los polinucleótidos descritos en el presente documento incluyen polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de uso en la invención. Estos polinucleótidos incluyen polinucleótidos aislados que comprenden al menos una de una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las Fig. 1, 3, 5, 7 o 9, y también incluyen otras secuencias de nucleótidos que, como resultado de la degeneración del código genético, también codifican un polipéptido de uso en la invención. También se describen polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de uso en la invención, y polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con cualquiera de las secuencias de nucleótidos anteriores. Además, los polinucleótidos aislados descritos en el presente documento incluyen secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de uso en la invención, secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las secuencias anteriores y secuencias de nucleótidos que son totalmente complementarias con estos polinucleótidos. También se describen vectores de expresión y células hospedadoras que comprenden estos polinucleótidos.

Además se describen en el presente documento composiciones inmunogénicas que comprenden una cantidad inmunogénica de al menos dos o más componentes (seleccionados de PCE (Figura 2 (SEQ ID NO: 2) y los péptidos codificados por la ORF 554 (peptidilpropil isomerasa (Figura 4 (SEQ ID NO: 4)), ORF 1218 (proteína hipotética (Figura 6 (SEQ ID NO: 6)), ORF 1358 (supuesta proteína de adhesión (Figura 8 (SEQ ID NO: 8)) y ORF 2459 (lipoproteína de superficie (Figura 10 (SEQ ID NO: 10))), cada una de las cuales comprende a dichos polipéptidos en una cantidad eficaz para prevenir o mejorar una colonización o infección por estreptococos β hemolíticos en un mamífero susceptible. Cada componente puede comprender el propio polipéptido o puede comprender el polipéptido y cualquier otra sustancia (por ejemplo, uno o más agentes químicos, proteínas, etc.) que pueda ayudar en la prevención y/o mejora de la colonización o infección por estreptococos β hemolíticos. Estas composiciones inmunogénicas pueden comprender además al menos una porción del polipéptido, opcionalmente conjugado o unido a un péptido, polipéptido o proteína, o a un polisacárido.

También se describen métodos de protección de un mamífero susceptible frente a la colonización o infección por estreptococos β hemolíticos. En uno de tales métodos, el método comprende administrar a un mamífero una cantidad eficaz de dos o más composiciones inmunogénicas que comprenden una cantidad inmunogénica de un polipéptido como se describe en el presente documento, cuya cantidad es eficaz para prevenir o mejorar la colonización o infección por estreptococos β hemolíticos en el mamífero susceptible. Se ha descubierto que tales combinaciones de componentes son eficaces para proporcionar tal protección frente a una amplia diversidad de grupos y en general proporcionan una respuesta inmunitaria mayor que los componentes individuales administrados de forma separada.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía convencional, por ejemplo por inyección subcutánea o intramuscular, ingestión oral o por vía intranasal.

También se describen composiciones inmunogénicas que comprenden al menos un polinucleótido como se define en el presente documento.

Debe entenderse que la anterior descripción general y la siguiente descripción detallada son ejemplares, pero no restrictivas, de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 presenta la secuencia de ácido nucleico que codifica la peptidasa de C5a ("PCE", SEQ ID NO: 1).

La Fig. 2 presenta la secuencia de aminoácidos de la PCE (SEQ ID NO: 2).

La Fig. 3 presenta la secuencia de ácido nucleico de la ORF 554, que codifica la peptidilpropil isomerasa (SEQ ID NO: 3).

La Fig. 4 presenta la secuencia de aminoácidos de la peptidilpropil isomerasa (SEQ ID NO: 4).

La Fig. 5 presenta la secuencia de ácido nucleico de la ORF 1218, que codifica una proteína hipotética (SEQ ID NO: 5).

La Fig. 6 presenta la secuencia de aminoácidos de una proteína hipotética (SEQ ID NO: 6).

La Fig. 7 presenta la secuencia de ácido nucleico de la ORF 1358, que codifica una supuesta proteína de adhesión (SEQ ID NO: 7).

La Fig. 8 presenta la secuencia de aminoácidos de una supuesta proteína de adhesión (SEQ ID NO: 8).

La Fig. 9 presenta la secuencia de ácido nucleico de la ORF 2459, que codifica una lipoproteína de superficie (SEQ ID NO: 9).

La Fig. 10 presenta la secuencia de aminoácidos de una lipoproteína de superficie (SEQ ID NO: 10).

La Fig. 11 presenta de forma gráfica el porcentaje de destrucción, en comparación con el medio, de las composiciones inmunogénicas de tres componentes ("Trivax" = PCE, peptidilpropil isomerasa (ORF 554) y supuesta proteína de adhesión (ORF 1358)) y de un componente ("554" = peptidilpropil isomerasa (ORF 554)), examinadas en el Ejemplo 2.

Las Fig. 12-16 demuestran de forma gráfica los resultados de transferencia de inmunidad pasiva del Ejemplo 3. UFC = unidades formadoras de colonias.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una composición inmunogénica, comprendiendo dicha composición una mezcla de:

- (a) un polipéptido de PCE que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2);
- (b) un polipéptido de peptidilpropil isomerasa que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 4 (SEQ ID NO: 4); y
- (c) un supuesto polipéptido de adhesión que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 8 (SEQ ID NO: 8).

La composición inmunogénica de la invención puede ser de uso como un medicamento.

La composición inmunogénica de la invención puede ser de uso en un método de protección de un mamífero susceptible, frente a la colonización o infección por estreptococos β hemolíticos.

La composición inmunogénica de la invención puede ser también de uso para prevenir o mejorar infecciones provocadas por estreptococos β hemolíticos, incluyendo los grupos A, B, C y G.

También se describe una composición inmunogénica que comprende una mezcla de dos o más polipéptidos, estando cada polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 90 % de identidad con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) peptidasa de C5a ("PCE") (Figura 1 (SEQ ID NO: 1));
- (b) fase de lectura abierta ("ORF") 554 (Figura 3 (SEQ ID NO: 3));
- (c) ORF 1218 (Figura 5 (SEQ ID NO: 5));
- (d) ORF 1358 (Figura 7 (SEQ ID NO: 7)); y
- (e) ORF 2459 (Figura 9 (SEQ ID NO: 9)).

También se describe una composición inmunogénica que comprende una mezcla de dos o más polipéptidos, teniendo cada polipéptido al menos el 90 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) PCE (Figura 2 (SEQ ID NO: 2));
- (b) peptidilpropil isomerasa (Figura 4 (SEQ ID NO: 4));
- (c) proteína hipotética (Figura 6 (SEQ ID NO: 6));
- (d) supuesta proteína de adhesión (Figura 8 (SEQ ID NO: 8)); y
- (e) lipoproteína de superficie (Figura 10 (SEQ ID NO: 10)).

También se describe una composición inmunogénica que comprende una mezcla de:

- (a) un polipéptido de PCE codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1);

(b) un polipéptido de peptidilpropil isomerasa codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de ácido nucleico de la Figura 3 (SEQ ID NO: 3); y

(c) al menos un otro polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 90 % de identidad con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en (i) la Figura 5 (SEQ ID NO: 5); (ii) la Figura 7 (SEQ ID NO: 7); y (iii) la Figura 9 (SEQ ID NO: 9).

También se describe una composición inmunogénica que comprende una mezcla de:

(a) un polipéptido de PCE que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2);

(b) un polipéptido de peptidilpropil isomerasa que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 4 (SEQ ID NO: 4); y

(c) al menos un otro polipéptido que tiene al menos el 90 % de identidad con una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en (i) la Figura 6 (SEQ ID NO: 6); (ii) la Figura 8 (SEQ ID NO: 8); y (iii) la Figura 10 (SEQ ID NO: 10).

Las expresiones “polinucleótido”, “ácido nucleico” y “fragmento de ácido nucleico” se utilizan en el presente documento de forma indistinta. Estas expresiones abarcan nucleótidos conectados por uniones fosfodiéster. Un “polinucleótido” puede ser un polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) que es mono- o bicatenario, y de forma opcional contiene bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o modificadas. Un polinucleótido en forma de un polímero de ADN puede comprender uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico, ADN sintético o mezclas de los mismos. Las bases nucleotídicas se indican en el presente documento mediante el código de una letra: adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C), inosina (I) y uracilo (U).

Los polinucleótidos estreptocócicos descritos en el presente documento pueden obtenerse utilizando técnicas de clonación y exploración convencionales. Estos polinucleótidos pueden obtenerse, por ejemplo, de ADN genómico, a de una genoteca de ADNc obtenida de ARNm, de una biblioteca de ADN genómico o pueden sintetizarse utilizando técnicas conocidas y disponibles en el mercado, tales como, por ejemplo, mediante PCR a partir de una genoteca de ADNc o a través de RT-PCR (transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa).

Existen varios métodos disponibles y son bien conocidos para los expertos en la materia para obtener los ADNc de longitud completa o para extender los ADNc cortos, tales como por ejemplo los basados en el método de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE, forma siglada del inglés *rapid amplification of cDNA ends*). Véase Frohman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002, 1988. Recientes modificaciones de la técnica, ejemplificadas por ejemplo por la tecnología MARATHON™ (Clontech Laboratories Inc.), han simplificado significativamente la búsqueda de ADNc más largos. En la tecnología MARATHON™, los ADNc se han preparado a partir de ARNm extraído de un tejido escogido y se ha ligado una secuencia “adaptadora” en cada uno de los extremos. Después, se lleva a cabo la amplificación de ácidos nucleicos (PCR) para amplificar el extremo 5’ “perdido” del ADNc utilizando una combinación de cebadores oligonucleotídicos específicos de gen y específicos de adaptador. Después se repite la reacción de PCR utilizando cebadores “anidados”, es decir, cebadores diseñados para aparearse dentro del producto amplificado (normalmente un cebador específico adaptador que se aparee más allá del 3’ en la secuencia adaptadora y un cebador específico de gen que se aparee más allá del 5’ en la secuencia génica conocida). Los productos de esta reacción pueden analizarse después mediante secuenciación de ADN y un ADNc de longitud completa construido ya sea uniendo el producto de forma directa al ADNc existente para proporcionar una secuencia completa o llevando a cabo una PCR de longitud completa distinta utilizando la información de la secuencia nueva para el diseño del cebador 5’.

El término “recombinante” significa, por ejemplo, que un polinucleótido se fabrica mediante una combinación artificial de dos o más segmentos de polinucleótidos separados de algún modo, por ejemplo por síntesis química o por la manipulación de polinucleótidos aislados utilizando técnicas de ingeniería genética. Una “construcción de ADN recombinante” comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados de la presente invención unidos operativamente a al menos un elemento regulador.

Los ortólogos y las variantes alélicas de los polinucleótidos estreptocócicos pueden identificarse fácilmente utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Las variantes alélicas y ortólogos de los polinucleótidos pueden comprender una secuencia de nucleótidos que es normalmente de al menos aproximadamente el 90-95 % o más idéntica a una cualquiera o más de las secuencias de nucleótidos mostradas en las figuras 1-9 impares (las SEQ ID NO: 1-9 impares), o fragmentos de las mismas. Las variantes alélicas y ortólogos de estos polinucleótidos pueden codificar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera o más de las Figuras 2-10 pares (las SEQ ID NO: 2-10 impares). Tales polinucleótidos pueden identificarse fácilmente como que tienen la capacidad de hibridar en condiciones rigurosas, con uno cualquiera o más de los polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos expuesta en las Figuras 1-9 (las SEQ ID NO: 1-9 impares) o fragmentos de las mismas.

Un experto en la materia entiende bien que son útiles muchos niveles de identidad de secuencia en la identificación de secuencias de polinucleótidos y de polipéptidos relacionadas. Los alineamientos de secuencia y los cálculos del porcentaje de identidad se pueden realizar utilizando el programa MEGALIGN™ del paquete de programas de computación bioinformático LASERGENE™ (DNASTAR Inc., Madison, WI). Utilizando el método de alineamiento Clustal pueden realizarse alineamientos de múltiples secuencias (Higgins y Sharp, *Gene*, 73 (1): 237-44, 1988) con los parámetros predeterminados, por ejemplo, PENALIZACIÓN de HUECO = 10 y PENALIZACIÓN DE LONGITUD DE HUECO = 10. Los parámetros predeterminados para los alineamientos en pares utilizando el método Clustal pueden ser, por ejemplo, KTUPLA 1, PENALIZACIÓN DE HUECO = 3, VENTANA = 5 y DIAGONALES GUARDADAS = 5.

Una secuencia de polipéptido de uso en la invención puede ser idéntica a la secuencia recitada, es decir, el 100 % idéntica o, en la medida en que se describe en las reivindicaciones, puede incluir hasta un determinado número entero de modificaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia, de forma que el % de identidad es menor que el 100 %. Tales alteraciones incluyen al menos una delección, sustitución, incluyendo una sustitución conservativa o no conservativa, o inserción de aminoácido. Las modificaciones pueden producirse en las posiciones amino o carboxilo terminal de la secuencia de polipéptido de referencia, o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea de forma individual entre los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de referencia o en uno o más grupos continuos dentro de la secuencia de aminoácidos de referencia.

Por lo tanto, en la medida en que se define en las reivindicaciones, la invención también proporciona el uso de polipéptidos aislados que tienen identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos contenidas en las secuencias recitadas. Dependiendo de la secuencia particular, el grado de identidad de secuencia es preferentemente mayor que el 90 % (por ejemplo, el 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o más). Estas proteínas homólogas incluyen mutantes y variantes alélicas.

“Identidad”, como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptido o dos o más secuencias de polinucleótido, determinada mediante la comparación de las secuencias. En la técnica, “identidad” también significa el grado de relación de secuencia entre las secuencias de polipéptido o polinucleótido, según pueda ser el caso, determinado por la coincidencia entre las hebras de tales secuencias. La “identidad” y la “similitud” pueden calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo pero sin limitación los descritos en (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A. M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987 y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H. y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los métodos preferentes para determinar la identidad se diseñan para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas de computación disponibles de forma pública. Los métodos de programa de computación preferentes para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.* 1984, BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, SF, *et al.*, 1990. El programa BLASTX está disponible de forma pública en el NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., *et al.*, 1990). Para determinar la identidad también puede utilizarse el bien conocido algoritmo de Smith Waterman.

Por ejemplo, el número de modificaciones de aminoácidos para una dada identidad % puede determinarse multiplicando el número total de aminoácidos de una de las figuras 2-10 numeradas par (las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10) por el porcentaje numérico de la respectiva identidad porcentual (dividido por 100) y después restando ese producto de dicho número total de aminoácidos en la una de las Figuras 2-10 numeradas par (las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10), o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

en la que n_a es el número de modificaciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos en la una de las figuras 2-10 numeradas par (las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10) e y es, por ejemplo, 0,90 para 90 %, 0,95 para 95 %, 0,97 para 97 % etc., y en la que cualquier producto de x_a e y que no sea un número entero se redondea al número entero inferior más cercano antes de restarlo de x_a .

En la medida en que se definen en las reivindicaciones, la presente invención también contempla el uso de polipéptidos aislados que están sustancialmente conservados entre las cepas de estreptococos β hemolíticos.

Además, también se contempla en la presente invención el uso de polipéptidos aislados que están sustancialmente conservados entre las cepas de estreptococos β hemolíticos y que son eficaces en la prevención y la mejora de la colonización o infección por estreptococos β hemolíticos en un sujeto susceptible. Como se usa en el presente documento, el término “conservado” se refiere a, por ejemplo, el número de aminoácidos que no experimenta inserciones, sustitución y/o delecciones como un porcentaje del número total de aminoácidos en una proteína. Por ejemplo, si una proteína está al 90 % conservada y tiene, por ejemplo, 263 aminoácidos, entonces existen 237

posiciones de aminoácido en la proteína en las que los aminoácidos no experimentan sustitución. Así mismo, si una proteína está al 95 % conservada y tiene, por ejemplo, aproximadamente 280 aminoácidos, entonces hay 14 posiciones de aminoácido en las que los aminoácidos pueden experimentar sustitución y 266 (es decir, 280 menos 14) posiciones de aminoácido en las que los aminoácidos no experimentan sustitución. De acuerdo con una realización de la presente invención, un polipéptido aislado utilizado en ella está preferentemente al menos aproximadamente el 90 % conservado entre las cepas de estreptococos β hemolíticos, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % conservado entre las cepas, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 97 % conservado entre las cepas y muy preferentemente al menos aproximadamente el 99 % conservado entre las cepas, sin limitación.

Pueden realizarse modificaciones y cambios en la estructura de los polipéptidos y aún obtener polipéptidos que tengan actividad y/o antigenicidad de estreptococos β hemolíticos y/o de *Streptococcus pyogenes*. Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una secuencia sin una pérdida apreciable de actividad y/o antigenicidad. Debido a que es esta capacidad interactiva y la naturaleza de un polipéptido lo que define la actividad biológica funcional del polipéptido, pueden realizarse en una secuencia de polipéptido determinadas sustituciones en la secuencia de aminoácidos (o, por supuesto, su secuencia de ADN codificante subyacente) y, no obstante, obtener un polipéptido con propiedades similares.

En la medida en que se define en las reivindicaciones, la invención incluye el uso de cualquiera de los polipéptidos aislados que son equivalentes biológicos de los polipéptidos indicados de forma concreta, que proporcionan la reactividad deseada según se describe en el presente documento. La expresión "reactividad deseada" se refiere a la reactividad que reconocería un experto en la materia como un resultado útil para los fines de la invención. Se describen en el presente documento ejemplos de reactividad deseada, incluyendo, pero sin limitación, los niveles deseados de protección, los títulos de anticuerpos deseados, la actividad opsonofagocítica deseada y/o la reactividad cruzada deseada, tal como reconocería un experto en la materia como útil para los fines de la presente invención. La actividad opsonofagocítica deseada está indicada por un porcentaje de destrucción de bacterias según se mide por la disminución de unidades formadoras de colonias (UFC) en un EOF (ensayo opsonofagocítico) frente a un control negativo. Sin limitarse a ello, la actividad opsonofagocítica deseada es preferentemente al menos aproximadamente del 15 %, más preferentemente al menos aproximadamente del 20 %, aún más preferentemente al menos aproximadamente del 40 %, aún más preferentemente al menos aproximadamente del 50 % y muy preferentemente al menos aproximadamente del 60 %.

En la medida en que se define en las reivindicaciones, la invención incluye el uso de polipéptidos que son variantes de los polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de las figuras 2-10 numeradas par (las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10). "Variante", como el término que se usa en el presente documento, incluye un polipéptido que difiere de un polipéptido de referencia pero conserva propiedades esenciales. En general, las diferencias están limitadas de forma que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante son estrechamente similares de forma general y, en muchas regiones, idénticas (es decir, biológicamente equivalentes). Un polipéptido variante y de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones o deleciones, en cualquier combinación. Un resto de aminoácido sustituido o insertado puede estar codificado o no por el código genético. Una variante de un polipéptido puede ser de origen natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe si es de origen natural. Las variantes de los polipéptidos que no son de origen natural pueden fabricarse por síntesis directa o por técnicas de mutagénesis.

En la realización de tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en el otorgamiento de una función biológica interactiva a un polipéptido se entiende de forma general en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se sabe que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tengan un índice o puntuación hidropática similar y aún dar como resultado un polipéptido con una actividad biológica similar. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático a base de su hidrofobicidad y características de carga. Los índices se enumeran en paréntesis detrás de cada aminoácido como sigue: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparragina (-3,5); lisina (-3,9) y arginina (-4,5).

Se cree que el carácter hidropático relativo del resto de aminoácido determina las estructuras secundaria y terciaria del péptido resultante, lo que a su vez define la interacción del polipéptido con otras moléculas, tal como enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos y similares. Se sabe en la técnica que un aminoácido puede sustituirse por otro aminoácido que tenga un índice hidropático similar y aún obtener un polipéptido funcionalmente equivalente. En tales cambios, es preferente la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están entre +/- 2, los que están entre +/- 1 son particularmente preferentes y los que están entre +/- 0,5 son aún más particularmente preferentes.

La sustitución de aminoácidos similares también puede realizarse a base de la hidrofiliidad, en particular cuando el polipéptido o péptido equivalente biológico funcional creado de ese modo está destinado a su uso en realizaciones inmunológicas. La Patente de Estados Unidos número 4.554.101, incorporada en el presente documento como referencia, indica que una mayor hidrofiliidad promedio local de un polipéptido, regida por la hidrofiliidad de sus

aminoácidos adyacentes, correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica del polipéptido.

Como se detalla en la Patente de Estados Unidos número 4.554.101, incorporada en el presente documento como referencia, se han asignado a los restos de aminoácido los siguientes valores de hidrofobicidad: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparragina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); prolina (-0,5 ± 1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor de hidrofobicidad similar y aún obtener un polipéptido biológicamente equivalente y, en particular, uno inmunológicamente equivalente. En tales cambios, es preferentemente la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofobicidad están entre ± 2, los que están entre ± 1 son particularmente preferentes y los que están entre ± 0,5 son aún más particularmente preferentes.

Como se describe anteriormente, en general las sustituciones de aminoácido son, por lo tanto, a base de la similitud relativa de los sustituyentes de cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofobicidad, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que toman diversas de las características anteriores en consideración son bien conocidas para los expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparragina, y valina, leucina e isoleucina. Como se muestra en la Tabla I a continuación, las sustituciones de aminoácido adecuadas incluyen las siguientes:

TABLA 1:

Resto original	Sustitución de resto ejemplar
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg
Met	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Por lo tanto, en la medida en que se define en las reivindicaciones, la invención incluye equivalentes funcionales o biológicos de los polipéptidos de las secuencias en las Figuras 2-10 numeradas par (las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10) que contienen una o más sustituciones de aminoácido.

Los equivalentes biológicos o funcionales de un polipéptido también pueden prepararse utilizando mutagénesis dirigida. La mutagénesis dirigida es una técnica útil en la preparación de polipéptidos de segunda generación, o de polipéptidos biológica y funcionalmente equivalentes obtenidos de las secuencias de los mismos, a través de mutagénesis específicas del ADN subyacente. Como se indica anteriormente, tales cambios pueden ser convenientes cuando son convenientes las sustituciones de aminoácido. La técnica proporciona además una capacidad a punto para preparar y probar variantes de secuencia, por ejemplo, incorporando una o más de las consideraciones anteriores, introduciendo en el ADN uno o más cambios de secuencia de nucleótidos. La mutagénesis dirigida permite la producción de mutantes a través del uso de secuencias de oligonucleótido específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador del tamaño suficiente y una complejidad de secuencia para formar un dúplex estable a ambos lados de la unión de la delección que se atraviesa. Normalmente,

es preferentemente un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud, con aproximadamente 5 a 10 restos a ambos lados de la unión de la secuencia que se está modificando.

En general, la técnica de mutagénesis dirigida es bien conocida en la técnica. Como se apreciará, normalmente la técnica emplea un vector de fago que puede existir tanto en forma monocatenaria como bicatenaria. Normalmente, la mutagénesis dirigida en conformidad con el presente documento se realiza obteniendo en primer lugar un vector monocatenario que incluye dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifica toda o una parte de la secuencia de polipéptido seleccionada de *Streptococcus pyogenes*. Se prepara un cebador de oligonucleótido que porta la secuencia mutada deseada, por ejemplo mediante técnicas bien conocidas (por ejemplo, de forma sintética).

Después se aparea este cebador con el vector monocatenario y se extiende mediante el uso de enzimas, tales como el fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. coli*, para completar la síntesis de la cadena que porta la mutación. Por lo tanto, se forma un heterodúplex en el que una cadena codifica la secuencia original no mutada y la segunda cadena porta la mutación deseada. Este vector heterodúplex se utiliza después para transformar células apropiadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que portan la mutación. Kits disponibles en el mercado proporcionan los reactivos necesarios.

En la medida en que se definen en las reivindicaciones, se entiende que los polipéptidos y antígenos de polipéptido de uso en la invención incluyen cualquier polipéptido que comprende una similitud de secuencia sustancial, una similitud estructural y/o una similitud funcional con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las Figuras 2-10 numeradas par (las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10). Además, un polipéptido o antígeno de polipéptido de uso en la invención no está limitado a una fuente particular. Por lo tanto, se contempla la detección y aislamiento general de los polipéptidos a partir de una diversidad de fuentes.

Los polipéptidos de uso en la invención pueden estar en forma de proteína "madura" o pueden ser parte de una proteína más grande tal como una proteína de fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contenga, por ejemplo, secuencias secretoras o líder, prosecuencias, secuencias que puedan ayudar en la purificación tales como múltiples restos de histidina, o una secuencia adicional para estabilidad durante la producción recombinante.

La expresión "composición inmunogénica" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tipo de agente biológico en una forma administrable que tiene la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto al que se le inoculó la composición inmunogénica. Una respuesta inmunitaria puede incluir la inducción de anticuerpos y/o la inducción de una respuesta de linfocitos T. El término "protección", cuando se utiliza en referencia a una composición inmunogénica, se refiere en el presente documento a la mejora (ya sea parcial o completa) de cualquiera de los síntomas asociados con la enfermedad o afección en cuestión. Por lo tanto, la protección de sujetos frente a la infección por una especie de *Streptococcus* tal como *S. dysgalactiae* (incluyendo las subespecies *Dysgalactiae* y *Equisimilis*) mediante las presentes composiciones inmunogénicas en general da como resultado una reducción del crecimiento bacteriano y/o de uno o más de los síntomas clínicos asociados con la infección producida por estreptococos, incluyendo artritis, endocarditis, meningitis, poliserositis, bronconeumonía, meningitis, hipoacusia permanente y choque séptico.

Los métodos divulgados en el presente documento pueden incluir la inducción de una respuesta inmunitaria frente a uno o más patógenos, que incluyen una especie de *Streptococcus* (por ejemplo, *Streptococcus dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* sub. *Equisimilis*, *S. dysgalactiae* sub. *Dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. equisimilis* y *S. intermedius*). Por ejemplo, los métodos pueden incluir la inducción de la producción de anticuerpos policlonales frente a uno o más patógenos estreptocócicos tales como, por ejemplo, *S. dysgalactiae* sub. *Equisimilis*.

Para preparar las composiciones inmunogénicas de la invención, los polipéptidos constituyentes se ajustan a una concentración apropiada y pueden formularse con cualquier adyuvante, diluyente, transportador farmacéuticamente aceptable convenientes, o cualquier combinación de los mismos. Como se usa en el presente documento la frase "transportador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos o retardantes de la absorción, excipientes y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para principios farmacéuticamente activos es bien conocido en la técnica. Pueden utilizarse como transportadores y/o diluyentes los vehículos fisiológicamente aceptables. Un vehículo farmacéuticamente aceptable se entiende que designa a un compuesto o a una combinación de compuestos incorporados en una composición farmacéutica o inmunogénica, que no provoca efectos secundarios y que hace posible, por ejemplo, facilitar la administración del compuesto activo, aumentar su vida y/o su eficacia en el cuerpo, aumentar su solubilidad en solución o, como alternativa, potenciar su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y los expertos en la materia los adaptarán de acuerdo con la naturaleza y el modo de administración del compuesto activo escogido. Estos incluyen, pero sin limitación, agua, solución de Ringer, un medio isotónico apropiado, glicerol, etanol y otros disolventes convencionales, solución salina tamponada con fosfato y similares.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles, y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o de una dispersión inyectable estéril.

Para la administración intravenosa, los transportadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N. J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe estar estéril y debería ser fluida hasta el punto que exista una jeringabilidad fácil.

Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y deben conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada por ejemplo mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y similares. En muchos casos, los agentes isotónicos están incluidos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y/o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede efectuarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando los polipéptidos en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con una o más combinaciones de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son secado por vacío y liofilización, lo que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado, a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Las composiciones inmunogénicas como se describe en el presente documento también comprenden, en determinadas realizaciones, uno o más adyuvantes. Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Se ha observado que varias citocinas o linfocinas tienen actividad inmunomoduladora y que, por lo tanto, son útiles como adyuvantes, incluyendo, pero sin limitación, las interleucinas 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 10, 12 (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes); los interferones α , β y γ ; el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.078.996 y el Número de Registro de la ATCC 39900); el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF); el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y los factores de necrosis tumoral α y β . Aún otros adyuvantes que son útiles con las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento incluyen quimiocinas, que incluyen pero sin limitación, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES; moléculas de adhesión, tales como selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina; moléculas similares a mucina, por ejemplo, CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1; un miembro de la familia de las integrinas tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95; un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas tales como PECAM, las ICAM, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3; moléculas coestimuladoras tales como CD40 y CD40L; factores de crecimiento que incluyen el factor de crecimiento vascular, el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico, B7.2, PDGF, BL-1 y el factor de crecimiento endotelial vascular; moléculas receptoras que incluyen Fas, el receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6; y Caspasa (ICE)

Los adyuvantes adecuados utilizados para potenciar una respuesta inmunitaria incluyen además, pero sin limitación, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacetilado, Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 4.912.094. También son adecuados para su uso como adyuvantes los análogos sintéticos de lípido A o los compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (FAG), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles de Corixa (Hamilton, MT) y que se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 6.113.918. Uno de tales AFG es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranosido, que también es conocido como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa (FA) o como una emulsión estable (EE).

Aún otros adyuvantes incluyen muramil péptidos, tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2-(1'-2' dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (MTP-PE); emulsiones de aceite en agua, tales como MF59 (Patente de Estados Unidos n.º 6.299.884) (que contienen escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (opcionalmente que contengan diversas cantidades de MTP-PE) formuladas en partículas submicrométricas utilizando un microfluidificador tal como el microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA)), y SAF (que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero L121 bloqueado con pluronic al 5 % y thr-MDP, ya sea microfluidificado en una emulsión submicrométrica o sometido a agitación vorticial para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande); sales de aluminio (alumbre), tal como

hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio; Amfigen; Avridina; L121/escualeno; D-lactida-polilactida/glucósido; polioles de pluronic; Bordetella destruida; saponinas, tal como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA), descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 5.057.540, ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 5.254.339 y complejos inmunoestimuladores (ISCOMS); *Mycobacterium tuberculosis*; lipopolisacáridos bacterianos; polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 6.207.646); IC-31 (Intercell AG, Viena, Austria), descrito en las Patentes Europeas n.º 1.296.713 y 1.326.634; una toxina pertussis (TP) o un mutante de la misma, una toxina colérica o un mutante de la misma (por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 7.285.281, 7.332.174, 7.361.355 y 7.384.640); o una toxina termolábil (TL) de *E. coli* o un mutante de la misma, en particular LT-K63, LT-R72 (por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 6.149.919, 7.115.730 y 7.291.588).

Los polipéptidos de uso en la invención también pueden conjugarse o unirse a un péptido, polipéptido o proteína, o a un polisacárido. También se prevé que las composiciones inmunogénicas puedan contener otros componentes, tales como polisacáridos, solos o conjugados con proteínas que pueden suscitar una respuesta inmunitaria.

Se utilizan diversas pruebas para evaluar la inmunogenicidad *in vitro* de los polipéptidos de las composiciones inmunogénicas de la invención. Por ejemplo, se realiza un ensayo de opsonización *in vitro* incubando juntos una mezcla de células de *Streptococcus* sp., suero inactivado con calor que contiene anticuerpos específicos frente al polipéptido en cuestión y una fuente exógena de complemento. Durante la incubación de los linfocitos polimorfonucleares (los PMN) aislados recientemente con la mezcla de anticuerpo/complemento/células de *Streptococcus* sp. tiene lugar la opsonofagocitosis. Las células bacterianas que están recubiertas con anticuerpo y complemento se destruyen durante la opsonofagocitosis. Se determinan mediante plaqueo de la mezcla de ensayo las unidades formadoras de colonias (ufc) de las bacterias supervivientes que escapan de la opsonofagocitosis. Los títulos se informan como el inverso de la dilución más alta que proporciona ≥ 50 % de destrucción bacteriana, según se determina mediante la comparación con los controles del ensayo. Se notifica que las muestras de ensayo que muestran menos del 50 % de destrucción a la dilución de suero más baja analizada (1:8), tienen un título de anticuerpo de opsonofagocitosis (AOF) de 4. El método descrito anteriormente es una modificación del método de Gray (Gray, Conjugate Vaccines Supplement, pág. 694-697, 1990).

Se incluye para cada suero individual un control del suero de prueba, el cual contiene suero de prueba más células bacterianas y complemento inactivado por calor. Este control se utiliza para evaluar si la presencia de antibióticos o de otros componentes del suero tienen la capacidad de destruir la cepa bacteriana de forma directa (es decir, en ausencia de complemento o de los PMN). Se utiliza un suero humano con título de opsonización conocido como un control positivo de suero humano. El título de anticuerpos opsonizantes de cada suero desconocido se calcula como el inverso de la dilución inicial de suero que proporciona el 50 % de reducción de ufc en comparación con el control sin suero.

Para evaluar la inmunogenicidad *in vitro* y la exposición en superficie del antígeno polipeptídico también puede utilizarse un ensayo de ELISA de células enteras, en el que la cepa bacteriana de interés se recubre en la placa, tal como una placa de 96 pocillos, y se hace reaccionar con las células bacterianas un suero de prueba de un animal inmunizado. Puede detectarse mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia si algún anticuerpo específico para el antígeno polipeptídico de prueba es reactivo con un epítipo expuesto en la superficie del antígeno polipeptídico. Una estrategia similar es controlar el antígeno en la superficie celular utilizando citometría de flujo y anticuerpos específicos para el antígeno.

Después puede analizarse en un modelo animal de exposición *in vivo* cualquier polipéptido que demuestre la actividad deseada *in vitro*. En algunas realizaciones las composiciones inmunogénicas se utilizan en la inmunización de un animal (por ejemplo, un ratón) mediante métodos y vías de inmunización conocidas para los expertos en la materia (por ejemplo, intranasal, parenteral, intramuscular, oral, rectal, vaginal, transdérmica, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, etc.). Después de la inmunización del animal con una composición inmunogénica estreptocócica, el animal se expone a una o más especies estreptocócicas y se ensaya la resistencia a la infección por *Streptococcus* spp.

La composición inmunogénica de la invención puede combinarse con uno o más polipéptidos conocidos de *Streptococcus pyogenes* incluyendo, pero sin limitación, las proteínas M, adhesinas y similares.

Una vez formuladas, las composiciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse de forma directa al sujeto, suministrarse *ex vivo* a las células obtenidas del sujeto o *in vitro* para la expresión de proteínas recombinantes. Para el suministro directo al sujeto, la administración puede ser mediante cualquier forma convencional, tal como por vía intranasal, vía parenteral, vía oral, vía intraperitoneal, vía intravenosa, vía subcutánea o vía tópica, aplicada a cualquier superficie mucosa, tal como intranasal, oral, del ojo, del pulmón, vaginal o la superficie del recto, tal como mediante una pulverización en aerosol.

Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en una forma de dosificación unitaria, para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a

tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico requerido. La especificación de la forma de dosificación unitaria de la invención está estipulada por y depende de forma directa de las características exclusivas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de formulación magistral de tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se formulan de acuerdo con la técnica conocida, utilizando agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol.

Para la administración parenteral, las composiciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse como dosificaciones inyectables en un diluyente fisiológicamente aceptable, con un transportador farmacéuticamente aceptable que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. De forma adicional, pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponadoras de pH y similares. Otros compuestos pueden incluir los que tienen origen en el petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como el propilenglicol o el polietilenglicol son transportadores lipídicos preferentes, en particular para las soluciones inyectables.

Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como poliláctido, poliglicólido o copolímero, para un efecto adyuvante potenciado, como se discute anteriormente (véase Langer, *Science* 249: 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: 97 (1997)). Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden administrarse en forma de una inyección de liberación prolongada o de preparación de implante, que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o intermitente del principio activo.

En general los sujetos son seres humanos. Para suscitar una respuesta inmunitaria se administra al sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunogénica en una cantidad apropiada de dosis. Cantidad inmunológicamente eficaz, como se utiliza en el presente documento, significa la administración de la cantidad a un hospedador mamífero (preferentemente un ser humano), ya sea en una dosis única o como parte de una serie de dosis, suficiente para al menos provocar que el sistema inmunitario del sujeto tratado genere una respuesta inmunitaria que reduzca el impacto clínico de la infección bacteriana. La expresión "respuesta inmunitaria" o "respuesta inmunológica" incluye el desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpos) y/o una celular (mediada por linfocitos T específicos de antígeno o sus productos de secreción). La protección puede conferirse mediante una única dosis de la composición inmunogénica o puede requerir la administración de varias dosis, además de las dosis de refuerzo a tiempos posteriores para mantener la protección. Esta puede variar de una mínima disminución de la carga bacteriana a la prevención de la infección. Idealmente, el individuo tratado no presentará las manifestaciones clínicas más graves de la infección por estreptococos β hemolíticos. La cantidad de la dosificación puede variar, dependiendo de condiciones concretas del individuo, tales como la edad y el peso. Esta cantidad puede determinarse en ensayos de rutina mediante medios conocidos por los expertos en la materia.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones inmunogénicas se administran a un sujeto susceptible de, o que de algún modo está en riesgo de, una infección por estreptococos beta hemolíticos, en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, atenuar la gravedad o retrasar el comienzo de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad asociados con la infección, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que se sospecha o ya padece tal enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos detener de forma parcial los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad.

Se ha observado que no existe una secuencia de péptido única que proporcione protección para todas las cepas de EBH, incluyendo los grupos A, B, C y G. Como se muestra a continuación en la Tabla II (presentada a continuación en el Ejemplo 1), cada antígeno proporciona una respuesta inmunitaria frente a un subconjunto de estos grupos.

En general, se esperará que cualquier combinación de dos o más antígenos de EBH expresados en superficie proporcione la respuesta inmuno potenciada descrita anteriormente. Eso podría incluir a los antígenos discutidos anteriormente antígenos capsulares de EBH, proteína M, transportador ABC o cualquier otro antígeno de superficie expuesto. Sin embargo, se ha descubierto que los siguientes antígenos presentan propiedades particularmente beneficiosas para la producción de composiciones inmunogénicas:

PCE (Peptidasa C5a)

peptidilpropil isomerasa (codificada por la ORF 554)

supuesta proteína de adhesión (codificada por la ORF 1358)
lipoproteína de superficie (codificada por la ORF 2459)

proteína hipotética (codificada por la ORF 1218)

Las combinaciones de dos o más de estos antígenos en una única composición inmunogénica de múltiples componentes proporcionan protección potenciada frente a uno o más grupos de EBH y producen una respuesta inmunitaria potenciada frente a los mismos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no se pretende que la presente invención se limite a ellos.

EJEMPLO 1-UNIÓN DE ANTICUERPOS

La unión de anticuerpos a las bacterias, un proceso conocido como opsonización, puede conducir a la captación y destrucción de las bacterias por las células fagocíticas. La exploración de tales anticuerpos se utiliza para determinar la eficacia de los anticuerpos producidos frente a serotipos particulares en la destrucción de bacterias que expresan o no expresan el serotipo en la superficie.

Para cada serotipo explorado se produjeron en ratones anticuerpos frente a los anticuerpos que codifica la ORF indicada. Después, los anticuerpos se exploraron frente a diversas cepas de EBH. La exploración de los anticuerpos se realizó mediante separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Brevemente, se incubaron estreptococos destruidos con calor con un anticuerpo indicado, en hielo durante 45 minutos, seguido de dos lavados. Después, los estreptococos se incubaron durante 30 minutos en hielo con un anticuerpo de cabra anti Alexa 488 de ratón (Molecular Probes, Eugene, OR), seguido de dos lavados. Las células así tratadas se procesaron en una máquina de FACS (por ejemplo, véase DeMaster *et al.*, *Infect. Immun.*, 70 (1): 350-359, 2002). Los resultados se resumen en la Tabla 2.

En el transcurso de la exploración de los antisueros anti estreptococo beta hemolítico y los anticuerpos monoclonales frente a diversas cepas de estreptococos beta hemolíticos (EBH), se observó que algunos antisueros y anticuerpos tenían reactividad cruzada frente a muchas cepas de EBH, incluyendo los miembros de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) y estreptococos del grupo C y el grupo G (que incluyen las especies estreptocócicas *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus dysgalactiae* sub. *Equisimilis* y *Streptococcus dysgalactiae* sub. *Dysgalactiae*). Esta reactividad cruzada también significa que los polipéptidos indicados o que codifica la ORF de interés, pueden utilizarse en una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmunitaria eficaz para proteger frente a la infección por *Streptococcus* del Grupo A o Grupo B, así como por *Streptococcus* del Grupo C o Grupo G.

En la Tabla 2, el símbolo "+" significa que los anticuerpos reaccionan con el antígeno al menos tres veces por encima del fondo, el símbolo "+/-" significa que los anticuerpos reaccionan con el antígeno entre dos y tres veces por encima del fondo, y el símbolo "-" significa que la detección de la señal del anticuerpo está en o por debajo del fondo.

N.º de cepa	Género/Especie	pre	554	1224	1358	1818	2459	PCE	1218	IgG1r	C5a-1484-16	C5a-1522-13
GAR 1165	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 1199	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 1251	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-	-
GAR 1278	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+/-
GAR 1362	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 1439	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 1530	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-	+/-
GAR 1566	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+
GAR 1672	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 1839	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+
GAR 1923	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+
GAR 2107	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 2330	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-	+
GAR 2646	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 2650	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+/-
GAR 2869	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 3104	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 3549	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 3784	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 4029	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+/-	+	+	-	+	-
GAR 4030	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+/-
GAR 4230	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 4773	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 4983	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+/-	-	+	+
GAR 4987	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 5861	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+/-	-	+	+
GAR 5991	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 6084	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+
GAR 7055	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+
GS20	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
GS21	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+/-	NT	NT	NT
GS22	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS23	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS24	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT

N.º de cepa	Género/Especie	pre	554	1224	1358	1818	2459	PCE	1218	IgG1r	C5a-1484-16	C5a-1522-13
GS25	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS26	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS29	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS30	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS31	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	-	NT	NT	NT
GS32	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS33	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS34	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS35	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS36	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	-	NT	NT	NT
GS37	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS38	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS39	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+/-	NT	NT	NT
GS40	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS41	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	-	+	+	+	+	+/-	NT	NT	NT
GS42	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+/-	+	+	NT	NT	NT
GS43	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS44	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS45	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS46	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS47	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS48	<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	NT	NT	NT
GS49	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS50	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS51	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS52	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS53	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS54	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+	NT	NT	NT
GS55	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+/-	NT	NT	NT
GS56	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS57	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS58	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS59	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT

N.º de cepa	Género/Especie	pre	554	1224	1358	1818	2459	PCE	1218	IgG1r	C5a-1484-16	C5a-1522-13
GS60	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS61	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+/-	+	+	NT	NT	NT
GS62	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS63	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS64	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS65	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS66	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+/-	+	+	+/-	+	+	NT	NT	NT
GAR 1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	+	+	+	+	+	+	+/-	-	-	-
GAR 1012	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+/-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GAR 1023	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 1049	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 10895	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
GAR 1192	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	-	-	-	-
GAR 127	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	+/-	-	+	-	-	-	-
GAR 12790	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 1305	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 131	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 1355	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 1446	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-
GAR 1494	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	+/-	-	+	+/-	-	-	-
GAR 154	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-
GAR 176	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GAR 18	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-
GAR 1844	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-
GAR 1931	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
GAR 2369	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	+/-	+/-	+	-	-	-	-
GAR 252	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 2533	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 2682	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GAR 2717	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 2723	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
GAR 2724	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-
GAR 2842	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-

N.º de cepa	Género/Especie	pre	554	1224	1358	1818	2459	PCE	1218	IgG1r	C5a-1484-16	C5a-1522-13
GAR 287	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	+/-	-	+	-	-	-	-
GAR 3003	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 3751	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	+/-	-
GAR 381	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 3830	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
GAR 4131	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
GAR 4293	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+/-	-	+/-	+	+/-	+	+	-	-	-
GAR 4398	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GAR 462	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 4837	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
GAR 54	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+/-	-
GAR 562	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+	+/-	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-
GAR 6016	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	-	-	-	-
GAR 614	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+	+	+/-	+	+	+	+/-	-	-	-
GAR 63	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
GAR 6332	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-	-	+	+/-
GAR 6387	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	-	-	-
GAR 6505	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	-	+/-	+
GAR 67	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
GAR 864	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	-
GAR 967	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GS19	EGG	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	-	NT	NT	NT
GS27	EGG	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+	NT	NT	NT
ATCC 33397	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 33397	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 10823	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
GAR 1272	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GAR 1370	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 1425	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 1592	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 1595	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 2044	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 2523	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-

N.º de cepa	Género/Especie	pre	554	1224	1358	1818	2459	PCE	1218	IgG1r	C5a-1484-16	C5a-1522-13
GAR 2565	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-
GAR 2697	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
GAR 2822	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-
GAR 3091	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 3560	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-	-
GAR 3576	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 3858	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
GAR 3938	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
GAR 4133	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	+/-	-	+	+/-	-	-	-
GAR 4158	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+	-	+	+/-	+	+/-	-	-	-	-
GAR 4234	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
GAR 4426	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	-	+	+/-	+	+	+	-	-	-
GAR 4680	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	-	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	-
GAR 4834	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 4896	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+	+/-	+	+	+/-	+	-	-	-	-
GAR 5093	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	+	-	+	+/-	+/-	-	-	-
GAR 5094	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-
GAR 5675	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 5776	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	-
GAR 5831	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	-	-	-
GAR 6187	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	-
GAR 6590	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
GAR 7000	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	-	-	-	-
GAR 7023	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-
GAR 7190	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 7214	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	-	-	-
GAR 7468	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	-	+	-	+/-	-	-	NT	-
GAR 7818	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+/-	-	NT	-
GAR 8620	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
GAR 8693	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
GAR 8722	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	-	+/-	-	-	+	-	-	-	-
GAR 8736	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
GAR 8954	<i>Streptococcus anginosus</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-

N.º de cepa	Género/Especie	pre	554	1224	1358	1818	2459	PCE	1218	IgG1r	C5a-1484-16	C5a-1522-13
ATCC 27823	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 1235	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 1384	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+	-	+/-	+/-	+/-	-	+	-	-	-
GAR 1811	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
GAR 2421	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
GAR 3145	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
GAR 3355	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 4048	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 4083	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+/-	-	+	+/-	+	+/-	-	-	-	-
GAR 4861	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+	+/-	+	+	+	+/-	-	-	-	-
GAR 4870	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+/-	-	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-
GAR 5757	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	-	-	+/-	+	-	+	-	-	-	+/-
GAR 6129	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
GAR 6147	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
GAR 6258	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+/-	+/-	+	+	+	+	-	-	-	-
GAR 7224	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+	+/-	+	+	+/-	+	+/-	-	-	-
GAR 7369	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-
ATCC 12394	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+	+	+	+	+/-	+	-	-	+	+
ATCC 12394	<i>Streptococcus constellatus</i>	-	+	+	+	+	+/-	+	-	-	+	+
ATCC 43078	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	+	+	+	+	+/-	+	-	-	+	+/-
ATCC 43078	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 43078	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 3868	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAR 4272	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	-	-	-
ATCC 35666	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
BAA-338	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> sub. <i>equisimilis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
GAR 3015	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> sub. <i>equisimilis</i>	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	-	-	-
ATCC 27335	<i>Streptococcus equisimilis</i>	-	+	+/-	+	+/-	+/-	+	+	-	+	+
ATCC 27335	<i>Streptococcus intermedius</i>	-	+	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	-	-	-
GAR 2407	<i>Streptococcus intermedius</i>	-	+	+/-	+	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-
GS28	desconocido	-	+/-	+/-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
GS67	EGG/EGC	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS68	EGG/EGC	-	+/-	+	+	+	+/-	+	+	NT	NT	NT
GS69	EGG/EGC	-	+/-	-	+/-	-	+/-	+	+/-	NT	NT	NT
		-	+/-	+/-	-	-	-	+	+	NT	NT	NT

N.º de cepa	Género/Especie	pre	554	1224	1358	1818	2459	PCE	1218	IgG1r	C5a-1484-16	C5a-1522-13
GS70	EGG/EGC	-	+/-				+/-	+/-	+/-	NT	NT	NT
GS71	EGG/EGC	-	+	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS72	EGG/EGC	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS73	EGG/EGC	-	+/-	-	-	-	-	+/-	+/-	NT	NT	NT
GS74	EGG/EGC	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
GS75	EGG/EGC	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	NT	NT	NT
GS77	EGG/EGC	-	+	ND	+	+/-	+/-	+	+	NT	NT	NT
GS78	EGG/EGC	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	NT	NT	NT
GS79	EGG/EGC	-	+/-	-	+/-	+/-	-	+	-	NT	NT	NT
GS80	EGG/EGC	-	-	-	-	-	+/-	+	+	NT	NT	NT
GS81	EGG/EGC	-	+	+	+/-	+	+	+	+/-	NT	NT	NT
GS82	EGG/EGC	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	NT	NT	NT
GS83	EGG/EGC	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS84	EGG/EGC	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
GS85	EGG/EGC	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	NT	NT	NT
GS86	EGG/EGC	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	NT	NT	NT
GS88	EGG/EGC	-	+	+/-	+	+	+	+/-	+	NT	NT	NT
GS89	EGG/EGC	-	+/-	+/-	-	-	-	+	+	NT	NT	NT
GS90	EGG/EGC	-	-	+/-	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS91	EGG/EGC	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+	NT	NT	NT
GS92	EGG/EGC	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	NT	NT	NT
GS93	EGG/EGC	-	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	NT
GS94	EGG/EGC	-	+	+	+	+/-	+	+	+	NT	NT	NT

EJEMPLO 2- USO DE UNA COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA DE TRES COMPONENTES PARA PRODUCIR SUEROS INMUNES

Se preparó una composición inmunogénica trivalente que consistía en PCE, el polipéptido que codifica la ORF 554 y el polipéptido que codifica la ORF 1358, adyuvada con fosfato de aluminio, y la composición inmunogénica se utilizó para producir suero hiperinmune de conejo mediante tres inoculaciones subcutáneas separadas por 2-4 semanas, seguido de desangrado; como control se utilizó una composición inmunogénica monovalente que consistía en el polipéptido que codifica la ORF 554, adyuvado de forma similar. Se exploró la actividad opsonofagocítica (AOF) de los sueros frente a *S. pyogenes* SF370 a diversas diluciones. Brevemente, las bacterias se incubaron con 10 ul de los sueros durante una hora en presencia de complemento (complemento de cría de conejo), y después se diluyeron 1:10 y se sembraron en placas de agar sangre. Los resultados se presentan en la Figura 11.

Como se muestra, puede observarse que la Trivax suscita una mayor actividad opsonofagocítica que la composición inmunogénica 554, lo que es indicativo de una destrucción de las bacterias mucho mejor.

EJEMPLO 3-TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA

Se produjeron anticuerpos frente a cada uno de los siguientes antígenos como se describe anteriormente: PCE y los polipéptidos que codifican las ORF 554, 1358, 2459 y 1218. Después, estos anticuerpos se inyectaron en ratas lactantes sin sistemas inmunitarios completamente funcionales. Después, las ratas tratadas se expusieron posteriormente a *S. pyogenes* y las bacterias recuperadas se recontaron cuatro horas posexposición. El control negativo era PBS y el control humano positivo era el suero 385.

Los resultados se muestran en las Figuras 12-16. Brevemente, los resultados demostraron que los anticuerpos suscitados por cada uno de los antígenos redujeron significativamente la bacteremia en las ratas lactantes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wyeth DODGE, Ingrid ROJAS, Eduardo ANDERSON, Annaliesa HAGEN, Michael SINGH, Guy

<120> Composición inmunogénica de múltiples componentes para la prevención de la enfermedad por estreptococos beta hemolíticos (EBH)

<130> AM103175

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 3505

<212> ADN

<213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 1

ES 2 648 231 T3

ttgcgtaaaa	aacaaaaatt	accatttgat	aaacttgcca	ttgcgctcat	gtctacgagc	60
atcttgctca	atgcacaatc	agacattaaa	gcaaatactg	tgacagaaga	cactcctgct	120
accgaacaag	ctgtagaaac	cccacaacca	acagcggttt	ctgaggaagc	accatcatca	180
aaggaaacca	aaaccccaca	aactcctgat	gacgcagaag	aaacaatagc	agatgacgct	240
aatgatctag	cccctcaagc	tcctgctaaa	actgctgata	caccagcaac	ctcaaaaagcg	300
actattaggg	atgtgaacga	cccttctcag	gtcaaaaacc	tgcaggaaaa	agcaggcaaa	360
ggagctggga	ctgttggtgc	agtgattgat	gctggttttg	ataaaaatca	tgaagcgtgg	420
cgcttaacag	acaaaaocaa	agcacgttac	caatcaaaaag	aagatottga	aaaagctaaa	480
aaagagcacg	gtattaocct	tggcgagtgg	gtcaatgata	aggttgctta	ttaccacgac	540
tatagtaaag	atggtaaaac	cgctgtcgat	caagagcacg	gcacacacgt	gtcagggatc	600
ttgtcaggaa	atgctccatc	tgaaacgaaa	gaaccttacc	gcctagaagg	tgcgatgcct	660
gaggctcaat	tgcttttgat	gcgtgtcgaa	attgtaaatg	gactagcaga	ctatgctcgt	720
aactacgctc	aagctatcat	agatgctgtc	aacttgggag	ctaaggtgat	taatatgagc	780
tttggtaatg	ctgcactagc	ctatgccaac	cttccagacg	aaaccaaaaa	agcctttgac	840
tatgccaaat	caaaaggtgt	tagcattgtg	acctcagctg	gtaatgatag	tagctttggg	900
ggcaagacc	gtctacctct	agcagatcat	cctgattatg	gggtggttgg	gacacctgca	960
gcggcagact	caacattgac	agttgcttct	tacagcccag	ataaacagct	cactgaaact	1020
gctacgggtca	aaacagccga	tcagcaagat	aaagaaatgc	ctgttctttc	aacaaaccgt	1080
tttgagccaa	acaaggotta	cgactatgct	tatgctaatc	gtgggatgaa	agaggatgat	1140
tttaaggatg	tcaaaggtaa	gattgccott	attgaacgtg	gcgatattga	tttcaaagat	1200

ES 2 648 231 T3

aagattgcaa acgctaaaaa agctggtgct gtaggagtct tgatctatga caatcaggac 1260
aagggcttcc cgattgaatt gccaaatggt gatcagatgc ctgcggcott tatcagtcga 1320
aaagatggtc tcttattaaa agagaatccc caaaaaacca tcaccttcaa tgcgacacct 1380
aaggtattgc caacagcaag tggcacccaaa ctaagccgct totcaagctg gggctotgaca 1440
gctgacggca atattaagcc agatattgca gcacccggcc aagatatttt gtcacagctg 1500
gctaacaaca agtatgccaa actttctgga actagtatgt ctgcgccatt agtagcgggt 1560
atcatgggac tgttgcaaaa gcaatatgag acacagtatc ctgatatgac accatcagag 1620
cgtcttgatt tagctaaaaa agtattgatg agctcagcaa ctgcottata tgatgaagat 1680
gaaaaagctt attttctcc tcgccaacaa ggagcaggag cagtcgatgc taaaaagct 1740
tcagcagcaa cgatgtatgt gacagataag gataatacct caagcaaggt tcacctgaac 1800
aatgtttctg ataaatttga agtaacagta acagttcaca acaaactctga taaacctcaa 1860
gagttgtatt accaagcaac tgttcaaaaa gataaagtag atggaaaact ctttgccctg 1920
gctcctaaag cattgtatga gacatcatgg caaaaaatca caattccagc caatagcagc 1980
aaacaagtca ccattccaat cgatgttagt caatttagca aggacttgc tgcaccaatg 2040
aaaaatggct atttcttaga aggttttgtt cgtttcaaac aagatcctac aaaagaagag 2100
cttatgagta tccctatat tggtttccga ggtgattttg gcaatctgtc agccttagaa 2160
aaaccaatct atgatagcaa agacggtagc agctactatc atgaagcaaa tagtgatgcc 2220
aaagaccaat tagatggtga tggattacag ttttacgctc tgaaaaataa ctttacagca 2280
cttactacag agtctaacc atggacgatt attaaagctg tcaaagaagg ggttgaaaac 2340
atagaggata tcgaatcttc agagatcaca gaaaccattt ttgcaggtac ttttgcaaaa 2400
caagacgatg atagccacta ctatatccac cgtcacgcta atggcaagcc atatgctgcg 2460
atctctcaa atggggacgg taacagagat tatgtccaat tccaaggtac tttcttgcgt 2520
aatgctaaaa accttgtggc tgaagtcttg gacaaagaag gaaatgttgt ttggacaagt 2580
gaggtaacgg agcaagttgt taaaaactac aacaatgact tggcaagcac acttggttca 2640
accggttttg aaaaaacgog ttgggacggt aaagataaag acggcaaagt tggtgctaac 2700
ggaacataca cctatcgtgt tcgctacact ccgattagct caggtgcaaa agaacaacac 2760
actgattttg atgtgattgt agacaatacg acacctgaag tcgcaacatc ggcaacattc 2820
tcaacagaag atcgtcgttt gacacttgca tctaaaccaa aaaccagcca accggtttac 2880
cgtgagcgtat ttgcttacac ttatatggat gaggatctgc caacaacaga gtatatttct 2940
ccaatgaag atggtacctt tactcttctt gaagaggctg aaacaatgga aggcgctact 3000
gtccattga aatgtcaga ctttacttat gttgttgaag atatggctgg taacatcact 3060

ES 2 648 231 T3

tatacaccag	tgactaagct	attggaaggc	cactctaata	aaccagaaca	agacggttca	3120
gatcaagcac	cagacaaaaa	accagaaact	aaaccagaac	aagacggttc	aggtcaagca	3180
ccagataaaa	aaccagaaac	taaaccagaa	caagacggtt	caggtcaaac	accagacaaa	3240
aaaccagaaa	ctaaaccaga	acaagacggt	tcaggtcaaa	caccagataa	aaaaccagaa	3300
actaaaccag	aaaaagatag	ttcaggtcaa	acaccaggta	aaactcctca	aaaaggtcaa	3360
ccttctcgta	ctctagagaa	acgatcttct	aagcgtgctt	tagctacaaa	agcatcaaca	3420
aaagatcagt	taoccacgac	taatgacaag	gatacaaatc	gtttacatct	ccttaagtta	3480
gttatgacca	ctttcttctt	gggat				3505

<210> 2

<211> 1181

<212> PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 2

ES 2 648 231 T3

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
 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

ES 2 648 231 T3

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

ES 2 648 231 T3

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
 465 470 475 480

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

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
 625 630 635 640

Ala Pro Lys Ala Leu Tyr 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 Val Ser Gln Phe

ES 2 648 231 T3

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 Met Glu Gly Ala Thr Val Pro Leu Lys Met Ser Asp Pt
 995 1000 1005

Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr Pro
 1010 1015 1020

Val Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser Asn Lys Pro Glu Gln Asp
 1025 1030 1035

Gly Ser Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu
 1040 1045 1050

Gln Asp Gly Ser Gly Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys
 1055 1060 1065

Pro Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Pro Glu
 1070 1075 1080

Thr Lys Pro Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys
 1085 1090 1095

Pro Glu Thr Lys Pro Glu Lys Asp Ser Ser Gly Gln Thr Pro Gly
 1100 1105 1110

Lys Thr Pro Gln Lys Gly Gln Pro Ser Arg Thr Leu Glu Lys Arg
 1115 1120 1125

Ser Ser Lys Arg Ala Leu Ala Thr Lys Ala Ser Thr Lys Asp Gln
 1130 1135 1140

Leu Pro Thr Thr Asn Asp Lys Asp Thr Asn Arg Leu His Leu Leu
 1145 1150 1155

ES 2 648 231 T3

Lys Leu Val Met Thr Thr Phe Phe Leu Gly Leu Val Ala His Ile
 1160 1165 1170

Phe Lys Thr Lys Arg Thr Glu Asp
 1175 1180

<210> 3
 <211> 1056
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 3

```

atgaaaaact caaataaact cattgctagt gttgtgacat tggcctcagt gatggcttta      60
gcagcttgtc aatcaactaa tgacaatact aaggttatatt cgatgaaagg tgatacaatt      120
agcgtagtg atttttacaa tgaacaacaaa aacacagaag tatcgcaaaa agcgatgcta      180
aatctggtaa ttagtcgtgt ttttgaagct caatatggtg ataaggtttc aaaaaagaa      240
gttgaaaagg cgtatcataa aacagctgaa cagtatggcg ottcattctc tgctgctttg      300
gcacaatcaa gcttgacacc tgagactttt aagcgtcaga tccgctcttc aaaattagta      360
gaatatgagg ttaaagaagc agctaaaaaa gaattgacaa cacaagaata taagaaagca      420
tatgaatctt atactccaac aatggcagtc gaaatgatta ctttagataa tgaagagaca      480
gctaaatcag tcttagagga actaaaagcc gaaggcgcag actttacagc tattgctaaa      540
gaaaaaaca caacacctga gaaaaaagtg acctataaat ttgattcagg tgcgacaaat      600
gtaccgactg atgtcgtaaa agcggcttca agtttgaatg aggggtggcat atcagacggt      660
atctcggttt tagatccaac ttcttatcaa aagaagtttt acattgttaa ggtgactaaa      720
aaagcagaaa aaaaatcaga ttggcaagaa tataagaaac gtttgaaagc tatcattata      780
gctgaaaaat caaaagatat gaatttccaa aacaaggtta ttgcaaatgc attggataaa      840
gctaatgtaa aaattaaaga caaagctttt gctaataattt tggcgcaata tgcaaatctt      900
ggtcaaaaaa ctaaagctgc aagtgaaagt tcaacaacoc gogaatcatc aaaagctgca      960
gaagagaacc catcagaatc agagcaaaca cagacatcat cagctgaaga accaactgag     1020
actgaggctc agacgcaaga gccagctgca caataa                                     1056
    
```

<210> 4
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 4

Met Lys Asn Ser Asn Lys Leu Ile Ala Ser Val Val Thr Leu Ala Ser
 1 5 10 15

ES 2 648 231 T3

Val Met Ala Leu Ala Ala Cys Gln Ser Thr Asn Asp Asn Thr Lys Val
 20 25 30

Ile Ser Met Lys Gly Asp Thr Ile Ser Val Ser Asp Phe Tyr Asn Glu
 35 40 45

Thr Lys Asn Thr Glu Val Ser Gln Lys Ala Met Leu Asn Leu Val Ile
 50 55 60

Ser Arg Val Phe Glu Ala Gln Tyr Gly Asp Lys Val Ser Lys Lys Glu
 65 70 75 80

Val Glu Lys Ala Tyr His Lys Thr Ala Glu Gln Tyr Gly Ala Ser Phe
 85 90 95

Ser Ala Ala Leu Ala Gln Ser Ser Leu Thr Pro Glu Thr Phe Lys Arg
 100 105 110

Gln Ile Arg Ser Ser Lys Leu Val Glu Tyr Ala Val Lys Glu Ala Ala
 115 120 125

Lys Lys Glu Leu Thr Thr Gln Glu Tyr Lys Lys Ala Tyr Glu Ser Tyr
 130 135 140

Thr Pro Thr Met Ala Val Glu Met Ile Thr Leu Asp Asn Glu Glu Thr
 145 150 155 160

Ala Lys Ser Val Leu Glu Glu Leu Lys Ala Glu Gly Ala Asp Phe Thr
 165 170 175

Ala Ile Ala Lys Glu Lys Thr Thr Thr Pro Glu Lys Lys Val Thr Tyr
 180 185 190

Lys Phe Asp Ser Gly Ala Thr Asn Val Pro Thr Asp Val Val Lys Ala
 195 200 205

Ala Ser Ser Leu Asn Glu Gly Gly Ile Ser Asp Val Ile Ser Val Leu
 210 215 220

Asp Pro Thr Ser Tyr Gln Lys Lys Phe Tyr Ile Val Lys Val Thr Lys
 225 230 235 240

Lys Ala Glu Lys Lys Ser Asp Trp Gln Glu Tyr Lys Lys Arg Leu Lys
 245 250 255

Ala Ile Ile Ile Ala Glu Lys Ser Lys Asp Met Asn Phe Gln Asn Lys
 260 265 270

ES 2 648 231 T3

Val Ile Ala Asn Ala Leu Asp Lys Ala Asn Val Lys Ile Lys Asp Lys
275 280 285

Ala Phe Ala Asn Ile Leu Ala Gln Tyr Ala Asn Leu Gly Gln Lys Thr
290 295 300

Lys Ala Ala Ser Glu Ser Ser Thr Thr Ser Glu Ser Ser Lys Ala Ala
305 310 315 320

Glu Glu Asn Pro Ser Glu Ser Glu Gln Thr Gln Thr Ser Ser Ala Glu
325 330 335

Glu Pro Thr Glu Thr Glu Ala Gln Thr Gln Glu Pro Ala Ala Gln
340 345 350

- <210> 5
- <211> 3027
- <212> ADN
- <213> *Streptococcus pyogenes*
- <400> 5

ES 2 648 231 T3

atgaagaaac atcttaaaac agttgccttg accctcacta cagtatcggg agtcacccac	60
aatcaggaag tttttagttt agtcaaagag ccaattctta aacaaactca agctttcttca	120
tcgattttctg gcgctgacta cgcagaaagt agcggtaaaa gcaagttaaa gattaatgaa	180
acttctggcc ctggtgatga tacagtcact gacttatttt cggataaacg tactactcct	240
gaaaaaataa aagataatct tgctaaaggt cgcagagAAC aagagttaaa ggcagtaaca	300
gagaatacag aatcagaaaa gcagatcact tctggatctc aactagaaca atcaaaagag	360
tctctttctt taaataaaac agtgccatca acgtctaatt gggagatttg tgattttatt	420
actaagggga atacccttgt tggcttttca aaatcaggtg ttgaaaagtt atctcaaact	480
gatcatctcg tattgcctag tcaagcagca gatggaactc aattgataca agtagctagt	540
tttgctttta ctccagataa aaagacggca attgcagaat ataccagtag ggctggagaa	600
aatggggaaa taagccaact agatgtggat ggaaaagaaa ttattaacga aggtgaggtt	660
tttaattctt atctactaaa gaaggtaaca atcccaactg gttataaaca tattggtcaa	720
gatgcttttg tggacaataa gaatattgct gaggttaatc ttctgaaag cctcgagact	780
atttctgact atgcttttgc tcacctagct ttgaaacaga tcgatttgcc agataattta	840
aaagcgattg gagaattagc tttttttgat aatcaaatta caggtaaact ttctttgcca	900
cgtcagttaa tgcgattagc agaacgtgct tttaaatcaa accatatcaa aacaattgag	960
tttagaggaa atagtctaaa agtgataggg gaagctagtt ttcaagataa tgatctgagt	1020
caactaatgc tacctgacgg tcttgaaaaa atagaatcag aagctttttac aggaaatcca	1080

ES 2 648 231 T3

ggagatgatc actacaataa cCGTgTtGtT ttgtggacaa aatctggaaa aaatccttct 1140
 ggtcttgcta ctgaaaatac ctatgttaat cctgataagt cactatggca ggaaagtcct 1200
 gagattgatt atactaaatg gttagaggaa gattttacct atcaaaaaaa tagtgttaca 1260
 ggTTTTtcaa ataaaggctt acaaaaagta aaacgtaata aaaacttaga aattccaaaa 1320
 cagcacaatg gtgttactat tactgaaatt ggtgataatg cttttcgcaa tgttgatttt 1380
 caaaataaaa ctttacgtaa atatgatttg gaagaagtaa agcttcctc aactattcgg 1440
 aaaataggTg cttttgcttt tcaatcta at aacttgaaat cttttgaagc aagtgcgat 1500
 ttagaagaga ttaaagaggg agcctttatg aataatcgta ttgaaacctt ggaattaaaa 1560
 gataaattag ttactattgg tgatgCGgct ttccatatta atcatattta tgccattgTt 1620
 ctccagaat ctgtacaaga aatagggcgt tcagcatttc ggcaaaatgg tgcaataat 1680
 cttattttta tgggaagtaa ggttaagacc ttaggTgaga tggcattttt atcaaataga 1740
 cttgaacatc tggatctttc tgagcaaaaa cagttaacag agattcctgt tcaagccttt 1800
 tcagacaatg ccttgaaaga agtattatta ccagcatcac tgaaaacgat tcgagaagaa 1860
 gccttcaaaa agaatcattt aaaacaactg gaagtggcat ctgccttgtc ccatattgct 1920
 tttaatgctt tagatgataa tgatggTgat gaacaatttg ataataaagt ggttgTtaaa 1980
 acgcatcata attoctacgc actagcagat ggtgagcatt ttatcgttga tccagataag 2040
 ttatcttcta caatagtaga ccttgaaaag attttaaaac taatcgaagg tttagattat 2100
 tctacattac gtcagactac tcaactcag tttagagaca tgactactgc aggtaaagcg 2160
 ttgttgTcaa aatctaact cGgacaagga gaaaaacaaa aattccttca agaagcacia 2220
 tttttccttg gcCGgTtga tttggataaa gccatagcta aagctgagaa ggctttagTg 2280
 accaagaagG caacaaagaa tggTcagTtG cttgaaagaa gtattaacaa agcggTatta 2340
 gcttataata atagcGctat taaaaaagct aatgttaagc gcttgGaaaa agagTtagac 2400
 ttgctaacag gattagTtga gggaaaagga ccattagcgc aagctacaat ggtacaagga 2460
 gttattttat taaagacgcc tttgCattg ccagaatatt atatcggatt gaacgTttat 2520
 tttgacaagt ctggaaaatt gatttatgca cttgatatga gtgatactat tggcgaggga 2580
 caaaaagacg cttatggTaa tcctatatta aatgttgacg aggataatga aggttatcat 2640
 gccttggcag ttgCacttt agctgattat gaggggctcg acatcaaac aattttaaat 2700
 agtaagctta gtcaattaac atctattcgt caggtaccga ctgcagccta tcatagagcc 2760
 ggtattttcc aagctatcca aaatgcagcg gcagaagcag agcagttatt gcctaaacca 2820
 ggtacgcact ctgagaagtc aagctcaagt gaatctgcta actctaaga tagaggattg 2880
 caatcaaac caaaaacgaa tagaggacga cactctgcaa tattgcctag gacagggTca 2940
 aaaggcagct ttgtctatgg aatcttaggt tacactagcg ttgctttact gtcaactaata 3000

actgctataa aaaagaaaa atattaa

3027

<210> 6
 <211> 1008
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogenes*
 <400> 6

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

ES 2 648 231 T3

Val Asp Gly Lys Glu Ile Ile Asn Glu Gly Glu Val Phe Asn Ser Tyr
 210 215 220

Leu Leu Lys Lys Val Thr Ile Pro Thr Gly Tyr Lys His Ile Gly Gln
 225 230 235 240

Asp Ala Phe Val Asp Asn Lys Asn Ile Ala Glu Val Asn Leu Pro Glu
 245 250 255

Ser Leu Glu Thr Ile Ser Asp Tyr Ala Phe Ala His Leu Ala Leu Lys
 260 265 270

Gln Ile Asp Leu Pro Asp Asn Leu Lys Ala Ile Gly Glu Leu Ala Phe
 275 280 285

Phe Asp Asn Gln Ile Thr Gly Lys Leu Ser Leu Pro Arg Gln Leu Met
 290 295 300

Arg Leu Ala Glu Arg Ala Phe Lys Ser Asn His Ile Lys Thr Ile Glu
 305 310 315 320

Phe Arg Gly Asn Ser Leu Lys Val Ile Gly Glu Ala Ser Phe Gln Asp
 325 330 335

Asn Asp Leu Ser Gln Leu Met Leu Pro Asp Gly Leu Glu Lys Ile Glu
 340 345 350

Ser Glu Ala Phe Thr Gly Asn Pro Gly Asp Asp His Tyr Asn Asn Arg
 355 360 365

Val Val Leu Trp Thr Lys Ser Gly Lys Asn Pro Ser Gly Leu Ala Thr
 370 375 380

Glu Asn Thr Tyr Val Asn Pro Asp Lys Ser Leu Trp Gln Glu Ser Pro
 385 390 395 400

Glu Ile Asp Tyr Thr Lys Trp Leu Glu Glu Asp Phe Thr Tyr Gln Lys
 405 410 415

Asn Ser Val Thr Gly Phe Ser Asn Lys Gly Leu Gln Lys Val Lys Arg
 420 425 430

Asn Lys Asn Leu Glu Ile Pro Lys Gln His Asn Gly Val Thr Ile Thr
 435 440 445

Glu Ile Gly Asp Asn Ala Phe Arg Asn Val Asp Phe Gln Asn Lys Thr
 450 455 460

ES 2 648 231 T3

Leu Arg Lys Tyr Asp Leu Glu Glu Val Lys Leu Pro Ser Thr Ile Arg
 465 470 475 480

 Lys Ile Gly Ala Phe Ala Phe Gln Ser Asn Asn Leu Lys Ser Phe Glu
 485 490 495

 Ala Ser Asp Asp Leu Glu Glu Ile Lys Glu Gly Ala Phe Met Asn Asn
 500 505 510

 Arg Ile Glu Thr Leu Glu Leu Lys Asp Lys Leu Val Thr Ile Gly Asp
 515 520 525

 Ala Ala Phe His Ile Asn His Ile Tyr Ala Ile Val Leu Pro Glu Ser
 530 535 540

 Val Gln Glu Ile Gly Arg Ser Ala Phe Arg Gln Asn Gly Ala Asn Asn
 545 550 555 560

 Leu Ile Phe Met Gly Ser Lys Val Lys Thr Leu Gly Glu Met Ala Phe
 565 570 575

 Leu Ser Asn Arg Leu Glu His Leu Asp Leu Ser Glu Gln Lys Gln Leu
 580 585 590

 Thr Glu Ile Pro Val Gln Ala Phe Ser Asp Asn Ala Leu Lys Glu Val
 595 600 605

 Leu Leu Pro Ala Ser Leu Lys Thr Ile Arg Glu Glu Ala Phe Lys Lys
 610 615 620

 Asn His Leu Lys Gln Leu Glu Val Ala Ser Ala Leu Ser His Ile Ala
 625 630 635 640

 Phe Asn Ala Leu Asp Asp Asn Asp Gly Asp Glu Gln Phe Asp Asn Lys
 645 650 655

 Val Val Val Lys Thr His His Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Asp Gly Glu
 660 665 670

 His Phe Ile Val Asp Pro Asp Lys Leu Ser Ser Thr Ile Val Asp Leu
 675 680 685

 Glu Lys Ile Leu Lys Leu Ile Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Thr Leu Arg
 690 695 700

 Gln Thr Thr Gln Thr Gln Phe Arg Asp Met Thr Thr Ala Gly Lys Ala
 705 710 715 720

ES 2 648 231 T3

Leu Leu Ser Lys Ser Asn Leu Arg Gln Gly Glu Lys Gln Lys Phe Leu
 725 730 735
 Gln Glu Ala Gln Phe Phe Leu Gly Arg Val Asp Leu Asp Lys Ala Ile
 740 745 750
 Ala Lys Ala Glu Lys Ala Leu Val Thr Lys Lys Ala Thr Lys Asn Gly
 755 760 765
 Gln Leu Leu Glu Arg Ser Ile Asn Lys Ala Val Leu Ala Tyr Asn Asn
 770 775 780
 Ser Ala Ile Lys Lys Ala Asn Val Lys Arg Leu Glu Lys Glu Leu Asp
 785 790 795 800
 Leu Leu Thr Gly Leu Val Glu Gly Lys Gly Pro Leu Ala Gln Ala Thr
 805 810 815
 Met Val Gln Gly Val Tyr Leu Leu Lys Thr Pro Leu Pro Leu Pro Glu
 820 825 830
 Tyr Tyr Ile Gly Leu Asn Val Tyr Phe Asp Lys Ser Gly Lys Leu Ile
 835 840 845
 Tyr Ala Leu Asp Met Ser Asp Thr Ile Gly Glu Gly Gln Lys Asp Ala
 850 855 860
 Tyr Gly Asn Pro Ile Leu Asn Val Asp Glu Asp Asn Glu Gly Tyr His
 865 870 875 880
 Ala Leu Ala Val Ala Thr Leu Ala Asp Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Lys
 885 890 895
 Thr Ile Leu Asn Ser Lys Leu Ser Gln Leu Thr Ser Ile Arg Gln Val
 900 905 910
 Pro Thr Ala Ala Tyr His Arg Ala Gly Ile Phe Gln Ala Ile Gln Asn
 915 920 925
 Ala Ala Ala Glu Ala Glu Gln Leu Leu Pro Lys Pro Gly Thr His Ser
 930 935 940
 Glu Lys Ser Ser Ser Ser Glu Ser Ala Asn Ser Lys Asp Arg Gly Leu
 945 950 955 960
 Gln Ser Asn Pro Lys Thr Asn Arg Gly Arg His Ser Ala Ile Leu Pro

ES 2 648 231 T3

965

970

975

Arg Thr Gly Ser Lys Gly Ser Phe Val Tyr Gly Ile Leu Gly Tyr Thr
980 985 990

Ser Val Ala Leu Leu Ser Leu Ile Thr Ala Ile Lys Lys Lys Lys Tyr
995 1000 1005

<210> 7

<211> 1505

<212> ADN

<213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 7

ES 2 648 231 T3

atgaaaaaga aaattctttt aatgatgagt ttaatcagtg tcttttttgc ttggcaactt 60
 actcaggcaa aacaagtctt agcagagggg aaagtgaagg tggtgacaac tttctatcct 120
 gtttatgaat ttacaaaagg ggttattggg aatgatggcg atgttttcat gcttatgaaa 180
 gcaggaacgg aacctcatga ttttgagcct tctacaaaag acattaaaaa aatccaagat 240
 gcagatgcat ttgtttatat ggatgacaat atggaaactt gggtttctga tgtgaaaaaa 300
 tcattgacat ctaaaaaagt gaccatcgtc aagggaaactg gtaacatgct cttggtagca 360
 ggagctggac atgaccatcc ccatgaggat gctgacaaaa agcatgagca taataaacat 420
 agcgaagaag gacacaacca tgcttttgac ccacacgtgt ggttgtcacc ataccgtagc 480
 attacagtcg ttgaaaatat tcgcgacagt ctttcaaaag cttaccocaga aaaagcagag 540
 aacttcaaag ccaatgocgc tacttatatt gaaaaattaa aagagcttga caaagactat 600
 acggcagcac tttcagatgc taagcaaaag agctttgtga cacaacacgc agcttttggg 660
 tatatggcac ttgactatgg cttgaaccaa atttctatta atggtgtcac accagatgca 720
 gaaccatcag caaaacgtat tgctactttg tcaaaatagc ttaaaaaata tggcatcaaa 780
 tacatatttatt ttgaggaaaa tgcgtaagt aaagtcgcaa aaaccctagc taaagaagca 840
 ggagttaaag oggctgtgct tagtccgctt gaaggtttga ctgaaaaaga gatgaaagct 900
 ggccaagatt actttacggg catgcgtaaa aaccttgaaa ccttacgctt aaccactgat 960
 gtggctggta aagaaattct tccagaaaaa gacacgacta agacagttta caatggttat 1020
 ttcaaagaca aagaagtcaa agatcgtcaa ttatctgact ggtcaggtag ctggcaatct 1080
 gtttaccctt atctacaaga tggacttta gaccaagttt gggactacia ggctaaaaaa 1140
 tctaaaggta aaatgacagc agccgagtac aaagattact aactactgg ttataaaact 1200
 gacgtggaac aaatcaaaat caatggtgta aaaaagacca tgacctttgt tcgtaatggt 1260
 gaaaagaaaa ccttcactta cacatacgcc ggcaaagaaa tcttgacctt tccaaaagga 1320
 aatcgcgggg ttcgtttcat gtttgaagct aaagaagcag atgctggcga attcaaatac 1380
 gttcaattca gtgaccatgc cattgctcct gaaaaagcaa agcatttcca cctgtactgg 1440
 ggtggtgaca gccaaagaaa attacataaa gagttagaac attggccaac ttactacggg 1500
 tcaga 1505

<210> 8
 <211> 515
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogenes*
 <400> 8

ES 2 648 231 T3

Met Lys Lys Lys Ile Leu Leu Met Met Ser Leu Ile Ser Val Phe Phe
1 5 10 15

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Ala Lys Gln Val Leu Ala Glu Gly Lys Val
20 25 30

Lys Val Val Thr Thr Phe Tyr Pro Val Tyr Glu Phe Thr Lys Gly Val
35 40 45

Ile Gly Asn Asp Gly Asp Val Phe Met Leu Met Lys Ala Gly Thr Glu
50 55 60

Pro His Asp Phe Glu Pro Ser Thr Lys Asp Ile Lys Lys Ile Gln Asp
65 70 75 80

Ala Asp Ala Phe Val Tyr Met Asp Asp Asn Met Glu Thr Trp Val Ser
85 90 95

Asp Val Lys Lys Ser Leu Thr Ser Lys Lys Val Thr Ile Val Lys Gly
100 105 110

Thr Gly Asn Met Leu Leu Val Ala Gly Ala Gly His Asp His Pro His
115 120 125

Glu Asp Ala Asp Lys Lys His Glu His Asn Lys His Ser Glu Glu Gly
130 135 140

His Asn His Ala Phe Asp Pro His Val Trp Leu Ser Pro Tyr Arg Ser
145 150 155 160

Ile Thr Val Val Glu Asn Ile Arg Asp Ser Leu Ser Lys Ala Tyr Pro
165 170 175

Glu Lys Ala Glu Asn Phe Lys Ala Asn Ala Ala Thr Tyr Ile Glu Lys
180 185 190

Leu Lys Glu Leu Asp Lys Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Ser Asp Ala Lys

ES 2 648 231 T3

195						200						205			
Gln	Lys	Ser	Phe	Val	Thr	Gln	His	Ala	Ala	Phe	Gly	Tyr	Met	Ala	Leu
210						215					220				
Asp	Tyr	Gly	Leu	Asn	Gln	Ile	Ser	Ile	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Asp	Ala
225					230					235					240
Glu	Pro	Ser	Ala	Lys	Arg	Ile	Ala	Thr	Leu	Ser	Lys	Tyr	Val	Lys	Lys
				245					250					255	
Tyr	Gly	Ile	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Phe	Glu	Glu	Asn	Ala	Ser	Ser	Lys	Val
			260					265					270		
Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Gly	Val	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Ser
		275					280					285			
Pro	Leu	Glu	Gly	Leu	Thr	Glu	Lys	Glu	Met	Lys	Ala	Gly	Gln	Asp	Tyr
	290					295					300				
Phe	Thr	Val	Met	Arg	Lys	Asn	Leu	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	Thr	Thr	Asp
305					310					315					320
Val	Ala	Gly	Lys	Glu	Ile	Leu	Pro	Glu	Lys	Asp	Thr	Thr	Lys	Thr	Val
				325					330					335	
Tyr	Asn	Gly	Tyr	Phe	Lys	Asp	Lys	Glu	Val	Lys	Asp	Arg	Gln	Leu	Ser
			340					345					350		
Asp	Trp	Ser	Gly	Ser	Trp	Gln	Ser	Val	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Gln	Asp	Gly
		355					360					365			
Thr	Leu	Asp	Gln	Val	Trp	Asp	Tyr	Lys	Ala	Lys	Lys	Ser	Lys	Gly	Lys
	370					375					380				
Met	Thr	Ala	Ala	Glu	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Thr	Gly	Tyr	Lys	Thr
385					390					395					400
Asp	Val	Glu	Gln	Ile	Lys	Ile	Asn	Gly	Lys	Lys	Lys	Thr	Met	Thr	Phe
				405					410					415	
Val	Arg	Asn	Gly	Glu	Lys	Lys	Thr	Phe	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Ala	Gly	Lys
			420					425					430		
Glu	Ile	Leu	Thr	Tyr	Pro	Lys	Gly	Asn	Arg	Gly	Val	Arg	Phe	Met	Phe
		435					440					445			

ES 2 648 231 T3

Glu Ala Lys Glu Ala Asp Ala Gly Glu Phe Lys Tyr Val Gln Phe Ser
450 455 460

Asp His Ala Ile Ala Pro Glu Lys Ala Lys His Phe His Leu Tyr Trp
465 470 475 480

Gly Gly Asp Ser Gln Glu Lys Leu His Lys Glu Leu Glu His Trp Pro
485 490 495

Thr Tyr Tyr Gly Ser Asp Leu Ser Gly Arg Glu Ile Ala Gln Glu Ile
500 505 510

Asn Ala His
515

- <210> 9
- <211> 1629
- <212> ADN
- <213> *Streptococcus pyogenes*

- <400> 9

ES 2 648 231 T3

gtgtcaaaat acotaaaata cttctctatt atcaogttat ttttgactgg gcttatttta 60
 gttgcatgtc aacaacaaaa gcctcaaaca aaagaacgtc agcgcaaca acgtccaaaa 120
 gacgaacttg tcgtttctat gggggcaaaag ctccctcatg aattcgatcc aaaggaccgt 180
 tatggagtcc acaatgaagg gaatatcact catagcactc tattgaaacg ttctcctgaa 240
 ctagatataa aaggagagct tgctaaaaca taccatctct ctgaagatgg gctgacttgg 300
 tcgtttgact tgcgatgatga ttttaaattc tcaaatgggtg agcctgttac tgcgatgat 360
 gttaagttta cttatgatat gttgaaagca gatggaaagg cttgggatct aaccttcatt 420
 aagaacgttg aagtagttgg gaaaaatcag gtcaatatcc atttgactga ggcgattcg 480
 acatttacag cacagttgac tgaaatccca atcgcccta aaaaacatta caatgataag 540
 tataagagca atcctatcgg ttcaggacct tacatggtaa aagaatataa ggctggagaa 600
 caagctatth ttgttcgtaa cccttattgg catgggaaaa aaccatactt taaaaaatgg 660
 acttgggtct tacttgatga aaacacagca ctagcagctt tagaatctgg tgatgttgat 720
 atgatctacg caacgccaga acttgctgat aaaaaagtca aaggcaccgg cctccttgat 780
 attocatcaa atgatgtgog cggcttatca ttacctatg tgaaaaaggg cgtcatcact 840
 gattctctcg atggttatcc tgtaggaaat gatgtcacta gtgatccagc aatccgaaaa 900
 gccttgacta ttggtttaaa taggcaaaaa gttctcgata cggtttttaa tggttatgg 960
 aaaccagctt attcaattat tgataaaaca ccattttgga atccaaaaac agccattaaa 1020
 gataataaag tagctaaagc taagcaatta ttgacaaaag cgggatggaa agaacaagca 1080
 gacggtagcc gtaaaaaagg tgaccttgat gcagcgtttg atctgtacta ccctactaat 1140
 gatcaattgc gagcgaactt agccgttgaa gtagcagagc aagccaaggc cctagggatt 1200
 actattaaac tcaaagctag taactgggat gaaatggcaa cgaagtcaca tgactcagcc 1260
 ttactttatg cgggaggacg tcatcacgcg cagcaattht atgaatcgca tcatccaagc 1320
 ctagcagggg aaggttggac caatattacg ttttataaca atcctaccgt gactaagtac 1380
 cttgacaaaag caatgacatc ttctgacctt gataaagcta acgaatattg gaagttagcg 1440
 cagtgggatg gcaaaacagg tgcttctact cttggagatt tgccaaatgt atggttggtg 1500
 agccttaacc atacttatat tggtgataaa cgtatcaatg taggtaaaca aggcgtccac 1560
 agtcatggtc atgattggtc attattgact aacattgccg agtggacttg ggatgaatca 1620
 actaagtaa 1629

ES 2 648 231 T3

<210> 10
 <211> 542
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogenes*
 <400> 10

```

Val Ser Lys Tyr Leu Lys Tyr Phe Ser Ile Ile Thr Leu Phe Leu Thr
1           5           10           15

Gly Leu Ile Leu Val Ala Cys Gln Gln Gln Lys Pro Gln Thr Lys Glu
          20           25           30

Arg Gln Arg Lys Gln Arg Pro Lys Asp Glu Leu Val Val Ser Met Gly
          35           40           45

Ala Lys Leu Pro His Glu Phe Asp Pro Lys Asp Arg Tyr Gly Val His
          50           55           60

Asn Glu Gly Asn Ile Thr His Ser Thr Leu Leu Lys Arg Ser Pro Glu
65           70           75           80

Leu Asp Ile Lys Gly Glu Leu Ala Lys Thr Tyr His Leu Ser Glu Asp
          85           90           95

Gly Leu Thr Trp Ser Phe Asp Leu His Asp Asp Phe Lys Phe Ser Asn
          100          105          110

Gly Glu Pro Val Thr Ala Asp Asp Val Lys Phe Thr Tyr Asp Met Leu
          115          120          125

Lys Ala Asp Gly Lys Ala Trp Asp Leu Thr Phe Ile Lys Asn Val Glu
130          135          140
    
```

ES 2 648 231 T3

Val Val Gly Lys Asn Gln Val Asn Ile His Leu Thr Glu Ala His Ser
 145 150 155 160
 Thr Phe Thr Ala Gln Leu Thr Glu Ile Pro Ile Val Pro Lys Lys His
 165 170 175
 Tyr Asn Asp Lys Tyr Lys Ser Asn Pro Ile Gly Ser Gly Pro Tyr Met
 180 185 190
 Val Lys Glu Tyr Lys Ala Gly Glu Gln Ala Ile Phe Val Arg Asn Pro
 195 200 205
 Tyr Trp His Gly Lys Lys Pro Tyr Phe Lys Lys Trp Thr Trp Val Leu
 210 215 220
 Leu Asp Glu Asn Thr Ala Leu Ala Ala Leu Glu Ser Gly Asp Val Asp
 225 230 235 240
 Met Ile Tyr Ala Thr Pro Glu Leu Ala Asp Lys Lys Val Lys Gly Thr
 245 250 255
 Arg Leu Leu Asp Ile Pro Ser Asn Asp Val Arg Gly Leu Ser Leu Pro
 260 265 270
 Tyr Val Lys Lys Gly Val Ile Thr Asp Ser Pro Asp Gly Tyr Pro Val
 275 280 285
 Gly Asn Asp Val Thr Ser Asp Pro Ala Ile Arg Lys Ala Leu Thr Ile
 290 295 300
 Gly Leu Asn Arg Gln Lys Val Leu Asp Thr Val Leu Asn Gly Tyr Gly
 305 310 315 320
 Lys Pro Ala Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Thr Pro Phe Trp Asn Pro Lys
 325 330 335
 Thr Ala Ile Lys Asp Asn Lys Val Ala Lys Ala Lys Gln Leu Leu Thr
 340 345 350
 Lys Ala Gly Trp Lys Glu Gln Ala Asp Gly Ser Arg Lys Lys Gly Asp
 355 360 365
 Leu Asp Ala Ala Phe Asp Leu Tyr Tyr Pro Thr Asn Asp Gln Leu Arg
 370 375 380
 Ala Asn Leu Ala Val Glu Val Ala Glu Gln Ala Lys Ala Leu Gly Ile
 385 390 395 400

ES 2 648 231 T3

Thr Ile Lys Leu Lys Ala Ser Asn Trp Asp Glu Met Ala Thr Lys Ser
 405 410 415

His Asp Ser Ala Leu Leu Tyr Ala Gly Gly Arg His His Ala Gln Gln
 420 425 430

Phe Tyr Glu Ser His His Pro Ser Leu Ala Gly Lys Gly Trp Thr Asn
 435 440 445

Ile Thr Phe Tyr Asn Asn Pro Thr Val Thr Lys Tyr Leu Asp Lys Ala
 450 455 460

Met Thr Ser Ser Asp Leu Asp Lys Ala Asn Glu Tyr Trp Lys Leu Ala
 465 470 475 480

Gln Trp Asp Gly Lys Thr Gly Ala Ser Thr Leu Gly Asp Leu Pro Asn
 485 490 495

Val Trp Leu Val Ser Leu Asn His Thr Tyr Ile Gly Asp Lys Arg Ile
 500 505 510

Asn Val Gly Lys Gln Gly Val His Ser His Gly His Asp Trp Ser Leu
 515 520 525

Leu Thr Asn Ile Ala Glu Trp Thr Trp Asp Glu Ser Thr Lys
 530 535 540

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica, comprendiendo dicha composición una mezcla de:
 - (a) un polipéptido de PCE que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2);
 - (b) un polipéptido de peptidilpropil isomerasa que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 4 (SEQ ID NO: 4); y
 - (c) un supuesto polipéptido de adhesión que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 8 (SEQ ID NO: 8).
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un vehículo fisiológicamente aceptable.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende adicionalmente una cantidad eficaz de un adyuvante.
4. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición comprende cada polipéptido en una cantidad eficaz para prevenir o mejorar la colonización o infección por estreptococos β hemolíticos en un mamífero susceptible.
5. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, en la que los estreptococos β hemolíticos son estreptococos del Grupo A, estreptococos del Grupo B, estreptococos del Grupo C o estreptococos del Grupo G.
6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en la que los estreptococos β hemolíticos son *Streptococcus pyogenes*.
7. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso como un medicamento.
8. La composición inmunogénica de la reivindicación 7, en la que dicho medicamento es una vacuna.
9. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método de protección de un mamífero susceptible frente a la colonización o infección por estreptococos β hemolíticos.
10. La composición inmunogénica para su uso en el método de la reivindicación 9, en la que la composición inmunogénica se administra por inyección subcutánea, por inyección intramuscular, por ingestión oral, por vía intranasal o combinaciones de las mismas.
11. La composición inmunogénica para su uso en el método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en la que los estreptococos β hemolíticos son estreptococos del Grupo A, estreptococos del Grupo B, estreptococos del Grupo C o Estreptococos del grupo G.
12. La composición inmunogénica para su uso en el método de la reivindicación 11, en la que los estreptococos β hemolíticos son *Streptococcus pyogenes*.
13. La composición inmunogénica para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en las que el mamífero es un ser humano.

Fig. 1

>SPy 2010 |Precursor de peptidasa de C5A
 TTGCGTAAAAAACAAAAATTACCATTTGATAAACTTGCCATTGCGCTCATGTCTACGAGC
 ATCTTGCTCAATGCACAATCAGACATTAAGCAAATACTGTGACAGAAGACACTCCTGCT
 ACCGAACAAGCTGTAGAAAACCCACAAACCAACAGCGGTTTCTGAGGAAGCACCATCATCA
 AAGGAAACCAAAACCCACAACTCCTGATGACGCAGAAGAAACAATAGCAGATGACGCT
 AATGATCTAGCCCCCAAGCTCCTGCTAAAACCTGCTGATACACCAGCAACCTCAAAAAGCG
 ACTATTAGGGATTGAAACGACCCCTTCTCAGGTCAAAAACCTGCAGGAAAAAGCAGGCAAA
 GGAGCTGGGACTGTTGTTGCAGTGATGATGCTGGTTTTGATAAAAATCATGAAGCGTGG
 CGCTTAACAGACAAAACCAAAAGCACGTTACCAATCAAAAAGAAGATCTTGAAAAAGCTAAA
 AAAGAGCACGGTATTACCTATGGCGAGTGGGTCAATGATAAGGTTGCTTATTACCACGAC
 TATAGTAAAGATGGTAAAACCGCTGTGATCAAGAGCACGGCACACAGTGTGACGGGATC
 TTGTCAGGAAATGCTCCATCTGAAACGAAAGAACCTTACCGCCTAGAAGGTGCGATGCCT
 GAGGCTCAATTGCTTTTGTGATGCTGTCGAAATTTGTAATGGACTAGCAGACTATGCTCGT
 AACTACGCTCAAGCTATCATAGATGCTGTCAACTTGGGAGCTAAGGTGATTAATATGAGC
 TTTGGTAACTGCTGCACTAGCCTATGCCAACCTTCCAGACGAAACCAAAAAAGCCTTTGAC
 TATGCCAAATCAAAAAGGTGTTAGCATTTGTGACCTCAGCTGGTAATGATAGTAGCTTTGGG
 GGCAAGACCCGCTTACCTCTAGCAGATCATCCTGATTATGGGGTGGTTGGGACACCTGCA
 GCGGCAGACTCAACATTGACAGTTGCTTCTTACAGCCAGATAAACAGCTCACTGAAACT
 GCTACGGTCAAAACAGCCGATCAGCAAGATAAAGAAATGCCTGTTCTTCAACAAAACCGT
 TTTGAGCCAAACAAGGCTTACGACTATGCTTATGCTAATCGTGGGATGAAAGAGGATGAT
 TTTAAGGATGTCAAACCTAAGATTCCCCTTATTGAACGTGGCGATATTGATTTCAAAGAT
 AAGATTGCAAACGCTAAAAAGCTGGTGTGTAGGAGTCTTGATCTATGACAATCAGGAC
 AAGGGCTTCCCGATTGAATTGCCAAATGTTGATCAGATGCCTGCGGCCCTTATCAGTCGA
 AAAGATGGTCTCTTATTAAGAGAATCCCCAAAAACCATCACCTTCAATGCGACACCT
 AAGGTATTGCCAACAGCAAGTGGCAACAACTAAGCCGCTTCTCAAGCTGGGGTCTGACA
 GCTGACGGCAATATTAAGCCAGATATTGCAGCACCCGGCCAAGATATTTTGTATCAGTG
 GCTAACAAACAGTATGCCAACTTTCTGGAAGTATGCTGCGCCATTAGTAGCGGGT
 ATCATGGGACTGTTGCAAAAGCAATATGAGACACAGTATCCTGATATGACACCATCAGAG
 CGTCTTGATTTAGCTAAAAAGTATTGATGAGCTCAGCAACTGCCTTATATGATGAAGAT
 GAAAAAGCTTATTTTTCTCCTCGCCAAACAAAGGAGCAGGAGCAGTGCATGCTAAAAAGCT
 TCAGCAGCAACGATGTATGTGACAGATAAGGATAATACCTCAAGCAAGGTTCACTGAAAC
 AATGTTTCTGATAAATTTGAAGTAACAGTAACAGTTTCAACAAATCTGATAAACCTCAA
 GAGTTGATTTACCAAGCAACTGTTCAAACAGATAAAGTAGATGGAAAACCTTTTGCCCTG
 GCTCCTAAAGCATTGTATGAGACATCATGGCAAAAAATCACAATCCAGCCAATAGCAGC
 AAACAAGTCAACATCCAATCGATGTTAGTCAATTTAGCAAGGACTTGTGCCCCAATG
 AAAAATGGCTATTTCTTAGAAGTTTTGTTTCAACAAGATCCTACAAAAAGAGAG
 CTTATGAGTATTTCCCTATATTGGTTTTCCGAGGTGATTTTGGCAATCTGTCAGCCTTAGAA
 AAACCAATCTATGATAGCAAAGACGGTAGCAGCTACTATCATGAAGCAAAATAGTGAAGCC
 AAAGACCAATTAGATGGTGTGATTACAGTTTTTACGCTCTGAAAAATAACTTTACAGCA
 CTTACTACAGAGTCTAATCCATGGACGATTATTAAGCTGTCAAAGAAGGGGTTGAAAAAC
 ATAGAGGATATCGAATCTTCAGAGATCACAGAAACCATTTTTGACGGTACTTTTGCAAAA
 CAAGACGATGATAGCCACTACTATATCCACCGTCAAGCTAATGGCAAGCCATATGCTGCG
 ATCTCTCCAAATGGGGACGGTAACAGAGATTATGTCCAATCCAAGGTACTTTCTTGCGT
 AATGCTAAAAACCTTGTGGCTGAAGTCTTGGACAAAAGAAGGAAATGTTGTTTGGACAAGT
 GAGGTAACCGAGCAAGTTGTTAAAACCTACAACAATGACTTGGCAAGCACACTTGGTTCA
 ACCCGTTTTGAAAAACCGCTTGGGACGGTAAAGATAAAGACGGCAAAGTTGTTGCTAAC
 GGAACATACACCTATCGTGTTCCTACACTCCGATTAGCTCAGGTGCAAAAAGAACAACAC
 ACTGATTTTGTGATGATGTTAGACAATACGACACCTGAAGTCGCAACATCGGCAACATTC
 TCAACAGAAGATCGTCTTTGACACTTGCATCTAAACCAAAAAACCAGCCAACCGGTTTAC
 CGTGAGCGTATTGCTTACACTTATATGGATGAGGATCTGCCAACAACAGAGTATATTTCT
 CCAAATGAAGATGGTACCTTTACTCTTCTGAAAGGGCTGAAACAATGGAAGGCGCTACT
 GTTCCATGAAAATGTCAGACTTTACTTATGTTGTTGAAGATATGGCTGGTAACATCACT
 TATACACCAGTGAATAAGCTATTGGAAGGCCACTCTAATAAACAGAACAAAGACGGTTCA
 GATCAAGCACCAAGACAAAAACCAAGAACTAAACCAGAACAAAGACGGTTCAAGCA

ES 2 648 231 T3

Fig. 1 (continuación)

```
CCAGATAAAAAACCAGAACTAAACCAGAACAAGACGGTTCAGGTCAAACACCAGACAAA  
AAACCAGAACTAAACCAGAACAAGACGGTTCAGGTCAAACACCAGATAAAAAACCAGAA  
ACTAAACCAGAAAAAGATAGTTCAGGTCAAACACCAGGTAAAACTCCTCAAAAAGGTCAA  
CCTTCTCGTACTCTAGAGAAAACGATCTTCTAAGCGTGCTTTAGCTACAAAAGCATCAACA  
AAAGATCAGTTACCAACGACTAATGACAAGGATACAAATCGTTTACATCTCCTTAAGTTA  
GTTATGACCACTTTCTTCTTGGGAT
```

Fig. 2

>SPy 2010 |Precursor de peptidasa de C5A
LRKKQKLPFDKLAIALMSTSIILLNAQSDIKANTVTEDTPATEQAVETPQPTAVSEEAPSS
KETKTPQTPDDAEEETIADDANDLAPQAPAKTADTPATSKATIRDLNDPSQVKTLQEKAGK
GAGTVVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEWVNDKVAYYHD
YSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVEIVNGLADYAR
NYAQAIIDAVNLGAKVINMSFGNAALAYANLPDETCKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSSFG
GKTRLPLADHPDYGVVGTAAAADSTLTVASYS PDKQLTETATVKTADQQDKEMPVLSTNR
FEPNKAYDYAYANRGMKEDDFKDVKGKIALIERGDIIDFKDKIANAKKAGAVGVLIYDNQD
KGFPIELPNVDQMPAAFI SRKDGLLLKENPQKTIITFNATPKVLPTASGKLSRFSSWGLT
ADGNIKPDIAAPGQDILSSVANNKYAKLSGT SMSAPLVAGIMGLLQKQYETQYPMPTPSE
RLDLAKKVLMS SATALYDEDEKAYFSPRQQGAGAVDAKKASAATMYVTDKDN TSSKVHLN
NVSDKFEVTVTVHNKSDKPELYYQATVQTDKVDGKLFALAPKALYETSWQKITIIPANSS
KQVTIPIIDVSQFSKDLLAPMKNGYFLEGFVRFKQDPTKEELMSIPYIGFRGDFGNLSALE
KPIYDSKDGSSYYHEANS DAKDQLDGDGLQFYALKNNFTALTTE SNPWTIIKAVKEGVEN
IEDIESSEITETIFAGTFKQDDDSHYIHRHANGKPYAAISPNGDGNRDYVQFQGTFLR
NAKNLVAEVL DKEGNVWVTSEVTEQVVKNYNNDLASTLGSTRFEKTRWDGKDKDGKVVAN
GTYTYRVRYTPISSGAKEQHTDFDVIDNNTPEVATSATFSTEDRRRLTLASKPKTSQPVY
RERIAITYMDEDLPTTEYISPNEGDFTLPEEAETMEGATVPLKMSDFTYVVEDMAGNIT
YTPVTKLLEGHSNKPEQDGS DQAPDKKPKETKPEQDGSQAPDKKPKETKPEQDGSQTPDK
KPKETKPEQDGSQTPDKKPKETKPEKDSGQTPGKTPQKGQPSRTLEKRSSKRALATKAST
KDQLPTTNDKDTNRLHLLKLVMTTFFLGLVAHIFKTKRTED

Fig. 3

```
>SPy 1390 |peptidilpropil isomerasa
ATGAAAACTCAAATAAACTCATTGCTAGTGTGTGACATTGGCCTCAGTGATGGCTTTA
GCAGCTTGTCAATCAACTAATGACAATACTAAGGTTATTTTCGATGAAAGGTGATACAATT
AGCGTTAGTGATTTTTTACAATGAAACAAAAAACACAGAAGTATCGCAAAAAGCGATGCTA
AATCTGGTAATTAGTCGTGTTTTTGAAGCTCAATATGGTGATAAGGTTTCAAAAAAGAA
GTTGAAAAGGCGTATCATAAACAGCTGAACAGTATGGCGCTTCATTCTCTGCTGCTTTG
GCACAATCAAGCTTGACACCTGAGACTTTTAAGCGTCAGATCCGCTCTTCAAAATTAGTA
GAATATGCGGTTAAAGAAGCAGCTAAAAAGAATTGACAACACAAGAATATAAGAAAGCA
TATGAATCTTATACTCCAACAATGGCAGTCGAAATGATTACTTTAGATAATGAAGAGACA
GCTAAATCAGTCTTAGAGGAACTAAAAGCCGAAAGGCGCAGACTTTACAGCTATTGCTAAA
GAAAAACAACAACACCTGAGAAAAAGTGACCTATAAATTTGATTCAGGTGCGACAAAT
GTACCGACTGATGTGCTAAAAGCGGCTTCAAGTTTGAATGAGGGTGGCATATCAGACGTT
ATCTCGGTTTTAGATCCAACCTCTTATCAAAAAGAGTTTTTACATTGTTAAGGTGACTAAA
AAAGCAGAAAAAAATCAGATTGGCAAGAATATAAGAAACGTTTGAAAGCTATCATTATA
GCTGAAAAATCAAAAGATATGAATTTCCAAAACAAGGTTATTGCAAAATGCATTGGATAAA
GCTAATGTAAAAATTAAGACAAAGCTTTTGCTAATATTTTGGCGCAATATGCAAATCTT
GGTCAAAAACTAAAGCTGCAAGTGAAAGTTCAACAACCAGCGAATCATCAAAAGCTGCA
GAAGAGAACCCATCAGAATCAGAGCAAAACACAGACATCATCAGCTGAAGAACCAACTGAG
ACTGAGGCTCAGACGCAAGAGCCAGCTGCACAATAA
```

Fig. 4

>554 SPy 1390 |peptidilpropil isomerasa
MKNSNKLIASVVTLASVMALAAQSTNDNTKVISMKGDTISVSDFYNETKNTEVSQKAML
NLVISRVFEAQYGDVSKKEVEKAYHKTAEQYGASFSAALAQSSLPETFKRQIRSSKLV
EYAVKEAAKKELTTOEYKKAYESYPTMAVEMITLDNEETAKSVLEELKAEGADFTAIK
EKTTTPEKKVYKFDGATNVPTDVVKAASSLNEGGISDVISVLDPTSYQKKFYIVKVTK
KAEKSDWQYKKRLKAI IAEKSKDMNFQNKVIANALDKANVKIKDKAFANILAQYANL
GQKTKAASESSTTSESSKAAEENPSESEQTQTSSAEPTETEAQTQEPAAQ

Fig. 5

>1218 SPy0843||proteína hipotética
 ATGAAGAAACATCTTAAAACAGTTGCCTTGACCCTCACTACAGTATCGGTAGTCACCCAC
 AATCAGGAAGTTTTTAGTTTTAGTCAAAGAGCCAATTTCTTAAACAAACTCAAGCTTCTTCA
 TCGATTTCTGGCGCTGACTACGCAGAAAGTAGCGGTAAAAGCAAGTTAAAGATTAATGAA
 ACTTCTGGCCCTGTTGATGATACAGTCACTGACTTATTTTCGGATAAACGTACTACTCCT
 GAAAAAATAAAAAGATAATCTTGCTAAAGGTCCGAGAGAACAAGAGTTAAAGGCAGTAACA
 GAGAATACAGAATCAGAAAAGCAGATCACTTCTGGATCTCAACTAGAACAATCAAAAAGAG
 TCTCTTTCTTTAAATAAAAACAGTGCCATCAACGTCTAATTTGGGAGATTTGTGATTTTATT
 ACTAAGGGGAATACCCCTTGTGGTCTTTCAAAATCAGGTGTTGAAAAGTTATCTCAAACCT
 GATCATCTCGTATTGCCTAGTCAAGCAGCAGATGGAACCTCAATTTGATACAAGTAGCTAGT
 TTTGCTTTTACTCCAGATAAAAAGACGGCAATTTGCAGAATATACCAGTAGGGCTGGAGAA
 AATGGGGAAATAAGCCAACCTAGATGTGGATGGAAAAGAAAATTATTAACGAAGGTGAGGTT
 TTTAATCTTTATCTACTAAAGAAGGTAACAATCCCAACTGGTTATAAAACATATTTGGTCAA
 GATGCTTTTGTGGACAATAAGAATATTGCTGAGGTTAATCTTCCTGAAAAGCCTCGAGACT
 ATTTCTGACTATGCTTTTGGCTCACCTAGCTTTGAAACAGATCGATTTGCCAGATAATTTA
 AAAGCGATTGGAGAATTAGCTTTTTTTGATAATCAAATTTACAGGTAAACTTTCTTTGCCA
 CGTCAGTTAATGCGATTAGCAGAACGTGCTTTTAAATCAAACCATATCAAAAACAAATTGAG
 TTTAGAGGAAATAGTCTAAAAGTGATAGGGGAAGCTAGTTTTCAAGATAATGATCTGAGT
 CAACTAATGCTACCTGACGGTCTTGAAAAAATAGAATCAGAAGCTTTTACAGGAAATCCA
 GGAGATGATCACTACAATAACCGTGTGTGTGTGTGGACAAAATCTGGAAAAAATCCTTCT
 GGTCTTGCTACTGAAAATACCTATGTTAATCCTGATAAGTCACTATGGCAGGAAAAGTCCCT
 GAGATTGATTATACTAAATGGTTAGAGGAAGATTTTACCTATCAAAAAAATAGTGTTACA
 GGTTTTTCAAATAAAGGCTTACAAAAAGTAAAACGTAATAAAAAACTTAGAAATTTCCAAAA
 CAGCACAATGGTGTACTATTACTGAAATTTGGTGATAATGCTTTTCGCAATGTTGATTTT
 CAAAATAAAACTTTACGTAAATATGATTTGGAAGAAGTAAAGCTTCCCTCAACTATTCGG
 AAAATAGGTGCTTTTGGCTTTTCAATCTAATAACTTTGAAATCTTTTGAAGCAAGTGACGAT
 TTAGAAGAGATTAAAGAGGGAGCCTTTATGAATAATCGTATTGAAACCTTGGAATPAAAA
 GATAAATTAGTTACTATTGGTGATGCGGCTTTCCATATTAATCATATTTATGCCATTGTT
 CTTCCAGAATCTGTACAAGAAATAGGGCGTTTCAGCATTTCGGCAAAATGGTGCAAATAAT
 CTTATTTTTATGGGAAGTAAGGTTAAGACCTTAGGTGAGATGGCATTPTTATCAAATAGA
 CTTGAACATCTGGATCTTTCTGAGCAAAAACAGTTAACAGAGATTCCTGTTCAAGCCTTT
 TCAGACAATGCCTTGAAAGAAGTATTATTACCAGCATCACTGAAAACGATTCGAGAAGAA
 GCCTTCAAAGAAGAAATCATTTAAAACAACCTGGAAGTGGCATCTGCCTTGTCCCATATTGCT
 TTTAATGCTTTAGATGATAATGATGGTGATGAACAATTTGATAATAAAGTGGTTGTTAAA
 ACGCATCATAATTCCTACGCCTAGCAGATGGTGAGCATTPTTATCGTTGATCCAGATAAG
 TTATCTTCTACAATAGTAGACCTTGAAAAGATTTTAAAACCTAATCGAAGGTTTATGATAT
 TCTACATTACGTCAGACTACTCAAACCTCAGTTTAGAGACATGACTACTGCAGGTAAAGCG
 TTGTTGTCAAATCTAACCTCCGACAAGGAGAAAAACAAAAATTCCTTCAAGAAGCACAA
 TTTTTCCTTGGCCGCTTGATTTGGATAAAAGCCATAGCTAAAAGCTGAGAAGGCTTTAGTG
 ACCAAGAAGGCAACAAAGAATGGTCAGTTGCTTGAAAAGAAGTATTAACAAAGCGGTATTA
 GCTTATAATAATAGCGCTATTAAAAAAGCTAATGTTAAGCGCTTGAAAAAAGAGTTAGAC
 TTGCTAACAGGATTAGTTGAGGGAAAAGGACCATTAGCGCAAGCTACAATGGTACAAGGA
 GTTTATTTATTAAGACGCCTTTGCCATTGCCAGAATATTATATCGGATTTGAACGTTTAT
 TTTGACAAGTCTGGAAAATGATTTATGCACTTGATATGAGTGATACTATTTGGCGAGGGA
 CAAAAGACGCTTATGGTAATCCTATATTAATGTTGACGAGGATAATGAAGGTTATCAT
 GCCTTGGCAGTTGCCACTTTAGCTGATTATGAGGGGCTCGACATCAAAAACAAATTTAAAT
 AGTAAGCTTAGTCAATTAACATCTATTCGTCAAGTACCGACTGCAGCCTATCATAGAGCC
 GGTATTTTCCAAGCTATCCAAAATGCAGCGGCAGAAGCAGAGCAGTTATTGCCATAACCA
 GGTACGCACTCTGAGAAGTCAAGCTCAAGTGAATCTGCTAACTCTAAAAGATAGAGGATTG
 CAATCAAACCCAAAACGAATAGAGGACGACACTCTGCAATATTGCCTAGGACAGGGTCA
 AAAGGCAGCTTTGTCTATGGAATCTTAGGTTACACTAGCGTTGCTTTACTGTCACATAATA
 ACTGCTATAAAAAAGAAAAATATTA

Fig. 6

>1218 SPy0843||proteína hipotética
 MKKHLKTVALTLTTVSVVTHNQEVFSLVKEPILKQTQASSISGADYAESSGKSKLKINE
 TSGPVDDTVTDLFSDKRRTTPEKIKDNLAKGPREQELKAVTENTESEKQITSGSQLEQSKE
 SLSLNKTVPSTSNWEICDFITKGNTLVGLSKSGVEKLSQTDHLVLPSSQAADGTQLIQVAS
 FAFTPDKKTAIAEYTSRAGENGEISQLDVDGKEI INEGEVFN SYLLKKVTIPTGYKHIGQ
 DAFVDNKNIAEVNLPESLETISDYAFAHLALKQIDLDPNLKAIGELAFFDNQITGKLSLP
 RQLMRLAERAFKSNHIKTIEFRGNSLKVIGEASFQDNDLSQLMLPDGLEKIESEAFNGP
 GDDHYNNRVVLWTKSGKNPSGLATENTYVNPDKSLWQESPEIDYTKWLEEDFTYQKNSVT
 GFSNKGLQKVKRNKNLEIPKQHNGVTITEIGDNAFRNVDFQNKTLRKYDLEEVKLPSTIR
 KIGAFAFQSNNLKSFEASDDLEEIKEGAFMNNRIETLELKDKLVFIGDAAFHINHIAIV
 LPESVQEIGRSAFRQNGANNLIFMGSKVKTGLGEMAFLSNRLEHLDLSEQKQLTEIPVQAF
 SDNALKEVLLPASLKTIREEAFKKNHLKQLEVASALSHIAFNALDDNDGDEQFDNKVVVK
 THNSYALADGEHFIVDPDKLSSTIVDLEKILKLIIEGLDYSTLRQTTQTQFRDMTTAGKA
 LLSKSNLRQGEKQKFLQEAQFFLGRVDLDKAIKAKEKALVTKKATKNGQLLERSINKAVL
 AYNNSAIKKANVKRLEKELDLLTGLVEGKGPLAQATMVQGVYLLKTPPLPLPEYYIGLNVY
 FDKSGKLIYALDMSDTIGEGQKDAYGNPILNVEDNEGYHALAVATLADYEGLDIKTILN
 SKLSQLTSIRQVPTAAYHRAGIFQAIQNAAAEEAQLLPKPGTHSEKSSSSSESANSKDRGL
 QSNPKTNRGRHSAILPRTGSKGSFVYGILGYTSVALLSLITAIKKKKY

Fig. 7

>1358 SPy 0714 |supuesta proteína de adhesión
ATGAAAAGAAAATTCTTTTAATGATGAGTTTAATCAGTGTCTTTTTTGCTTGGCAACTT
ACTCAGGCAAAACAAGTCTTAGCAGAGGGTAAAGTGAAGGTGGTGACAACTTTCTATCCT
GTTTATGAATTTACAAAAGGGGTTATTGGTAATGATGGCGATGTTTTTCATGCTTATGAAA
GCAGGAACGGAACCTCATGATTTTGAGCCTTCTACAAAAGACATTAATAAATCCAAAGAT
GCAGATGCATTTGTTTATATGGATGACAATATGGAAACTTGGGTTTCTGATGTGAAAAAA
TCATTGACATCTAAAAAAGTGACCATCGTCAAGGGAACCTGGTAACATGCTCTTGGTAGCA
GGAGCTGGACATGACCATCCCCATGAGGATGCTGACAAAAAGCATGAGCATAATAAACAT
AGCGAAGAAGGACACAACCATGCTTTTTGACCCACACGTGTGGTTGTCACCATACCGTAGC
ATTACAGTCGTTGAAAATATTCGCGACAGTCTTTCAAAAAGCTTACCCAGAAAAAGCAGAG
AACTTCAAAGCCAATGCCGCTACTTATATTGAAAAATTAAGAAGCTTGACAAAGACTAT
ACGGCAGCACTTTAGATGCTAAGCAAAAAGAGCTTTGTGACACAACACGCAGCTTTTGGT
TATATGGCACTTGACTATGGCTTGAACCAAATTTCTATTAATGGTGTACACCAGATGCA
GAACCATCAGCAAAACGTATTGCTACTTTGTCAAAAATACGTTAAAAAATATGGCATCAAA
TACATTTATTTTGAGGAAAATGCGTCAAGTAAAGTCGCAAAAACCTAGCTAAAAGAAGCA
GGAGTTAAAGCGGCTGTGCTTAGTCCGCTTGAAGGTTTGACTGAAAAAGAGATGAAAGCT
GGCCAAGATTACTTTACGGTCATGCGTAAAAACCTTGAAACCTTACGCTTAACCACTGAT
GTGGCTGGTAAAGAAATTTCTTCCAGAAAAAGACACGACTAAGACAGTTTACAATGGTTAT
TTCAAAGACAAAGAAGTCAAAGATCGTCAATTATCTGACTGGTCAGGTAGCTGGCAATCT
GTTTACCCCTATCTACAAGATGGTACTTTAGACCAAGTTTGGGACTACAAGGCTAAAAAA
TCTAAAGGTAATAATGACAGCAGCCGAGTACAAAGATTACTACACTACTGGTTATAAAACT
GACGTGGAACAAATCAAAATCAATGGTAAGAAAAAGACCATGACCTTTGTTTCGTAATGGT
GAAAAGAAAACCTTCACTTACACATACGCCGGCAAAGAAATCTTGACCTATCCAAAAGGA
AATCGCGGGGTTTCGTTTCATGTTTGAAGCTAAAGAAGCAGATGCTGGCGAATTCAAAATAC
GTTCAATTCAGTGACCATGCCATTGCTCCTGAAAAAGCAAAGCATTTCACCTGTACTGG
GGTGGTGACAGCCAAGAAAAATTACATAAAGAGTTAGAACATTGGCCAACCTTACTACGGT
TCAGA

Fig. 8

1358 SPy 0714 |supuesta proteína de adhesión, SF370
MKKKILLMMSLISVFFAWQLTQAKQVLAEGKVKVVTTFYPVYEFTKGVIGNDGDVFMMLK
AGTEPHDFEPSTKDIKKIQDADAFVYMDDNMETWVSDVKKSLTSKKVTIVKGTGNMMLLVA
GAGHDHPHEDADKKHEHNKHSEEGHNHAFDPHVWLSPYRSITVVENIRDSLSKAYPEKAE
NFKANAATYIEKLELDKDYTAALSDAKQKSFVTQHAAFGYMALDYGLNQISINGVTPDA
EPSAKRIATLSKYVKKYGIKIYFEENASSKVAKTLAKEAGVKA AVLSPLEGLTEKEMKA
GQDYFTVMRKNLETLRLTTDVAGKEILPEKDTTKTVYNGYFKDKEVKDRQLSDWSGSWQS
VYPYLQDGTLDQVWDYKAKKSKGKMTAAEYKDYTTGYKTDVEQIKINGKKKTMTFVRNG
EKKTFTYTYAGKEILTYPKGNRGVRFMFEAKEADAGEFKYVQFSDHAI APEKAKHFHLYW
GGDSQEKLHKELEHWPTYYGSDLSGREIAQEINAH

Fig. 9

```

>SPy 2000 |lipoproteina de superficie
GTGTCAAAAATACCTAAAATACTTCTCTATTATCACGTTATTTTTGACTGGGCTTATTTTA
GTTGCATGTCAACAACAAAAGCCTCAAAACAAAAGAACGTCAGCGCAAACAACGTCCAAAA
GACGAACTTGTCGTTTCTATGGGGGCAAAGCTCCCTCATGAATTCGATCCAAAAGGACCGT
TATGGAGTCCACAATGAAGGGAATATCACTCATAGCACTCTATTGAAACGTTCTCCTGAA
CTAGATATAAAAAGGAGAGCTTGCTAAAACATACCATCTCTCTGAAGATGGGCTGACTTGG
TCGTTTGACTTGTCATGATGATTTTTAAATTCTCAAATGGTGAGCCTGTTACTGCTGATGAT
GTTAAGTTTACTTATGATATGTTGAAAAGCAGATGGAAAAGGCTTGGGATCTAACCTTCATT
AAGAACGTTGAAGTAGTTGGGAAAAATCAGGTCAATATCCATTTGACTGAGGCGCATTTCG
ACATTTACAGCACAGTTGACTGAAATCCCAATCGTCCCTAAAAAACATTACAATGATAAG
TATAAGAGCAATCCTATCGGTTTCAGGACCTTACATGGTAAAAGAATATAAGGCTGGAGAA
CAAGCTATTTTTGTTTCGTAACCTTATTGGCATGGGAAAAAACATACTTTAAAAAATGG
ACTTGGGTCTTACTTGATGAAAACACAGCACTAGCAGCTTTAGAATCTGGTGATGTTGAT
ATGATCTACGCAACGCCAGAACTTGCTGATAAAAAAGTCAAAGGCACCCGCCCTCCTTGAT
ATTCCATCAAATGATGTGCGCGGCTTATCATTACCTTATGTGAAAAAGGGCGTCATCACT
GATTCTCCTGATGGTTATCCTGTAGGAAATGATGTCCTAGTGATCCAGCAATCCGAAAA
GCCTTGACTATTGGTTTAAATAGGCAAAAAGTTCTCGATACGGTTTTAAATGGTTATGGT
AAACCAGCTTATTC AATTATTGATAAAAACACCATTTTGG AATCCAAAAACAGCCATTAAA
GATAATAAAGTAGCTAAAGCTAAGCAATTATTGACAAAAGCGGGATGGAAAAGAACAAGCA
GACGGTAGCCGTAAAAAAGGTGACCTTGATGCAGCGTTTGATCTGTACTACCTACTAAT
GATCAATTGCGAGCGAACTTAGCCGTTGAAGTAGCAGAGCAAGCCAAGGCCCTAGGGATT
ACTATTA AACTCAAAGCTAGTA AACTGGGATGAAATGGCAACGAAGTCACATGACTCAGCC
TTACTTTATGCCGGAGGACGTCATCACGCGCAGCAATTTTATGAATCGCATCATCCAAGC
CTAGCAGGGAAAGGTTGGACCAATATTACGTTTTTATAACAATCCTACCGTGACTAAGTAC
CTTGACAAAGCAATGACATCTTCTGACCTTGATAAAAGCTAACGAATATTGGAAGTTAGCG
CAGTGGGATGGCAAAAACAGGTGCTTCTACTCTTGGAGATTTGCCAAATGTATGGTTGGTG
AGCCTTAACCATACTTATATTGGTGATAAAACGTATCAATGTAGGTAAACAAGGCGTCCAC
AGTCATGGTCATGATTGGTCAATTATTGACTAACATTGCCGAGTGGACTTGGGATGAATCA
ACTAAGTAA
    
```

Fig. 10

```

>2459      SPy 2000 | lipoproteína de superficie
VSKYLKYFSIITLFLTGLILVACQQQKPQTKERQRKQRPKDELVVSMGAKLPHEFDPKDR
YGVHNEGNITHSTLLKRSPELDIKGELAKTYHLSHGGLTWSFDLHDDFKFSNGEPVTADD
VKFTYDMLKADGKAWDLTFIKNVEVVGKNQVNIHLTEAHSTFTAQLTEIPIVPKKHYNDK
YKSNPIGSGPYMVKEYKAGEQAI FVRNPNYWHGKKPYFKKWTWVLLDENTALAALES GDVD
MIYATPELADKKVKGTRLLDIPSNVVRGLSLPYVKKGVITDSPDGYFVGNDVTSDFPAIRK
ALTIGLNRQKVLDTVLNGYGKPAYSIIDKTPFWNPKTAIKDNKVAKAKQLLTKAGWKEQA
DGSRKKGDLDAAFDLYYPTNDQLRANLAVEVAEQAKALGITIKLKASNWDEMATKSHDSA
LLYAGGRHHAQQFYESHHPSLAGKGTNITFYNNPTVTKYLDKAMTSSDLDKANEYWKLA
QWDGKTGASTLGDLPNVWLVS LNHTYIGDKRINVGKQGVHSHGHDWSLLTNIAEWTWDES
TK
    
```

Fig. 11

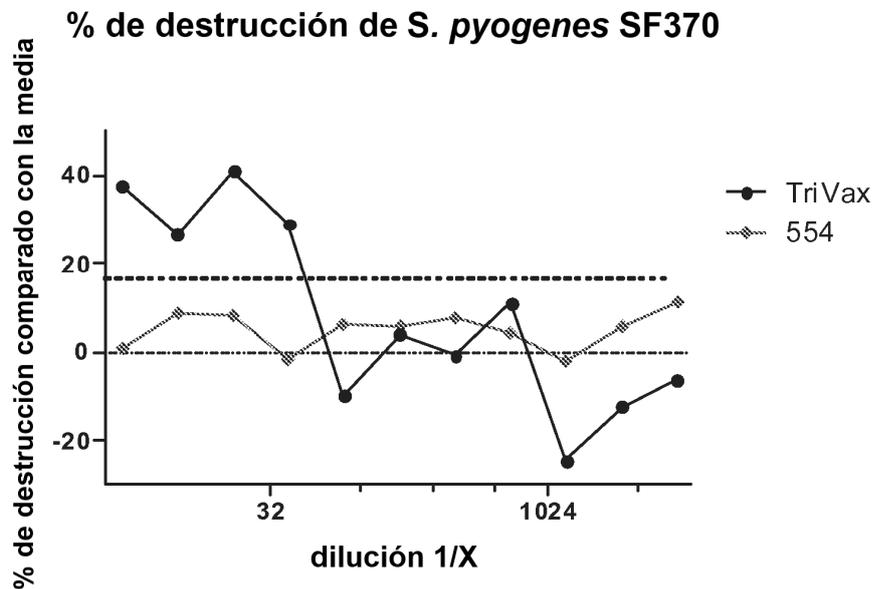


Fig 12

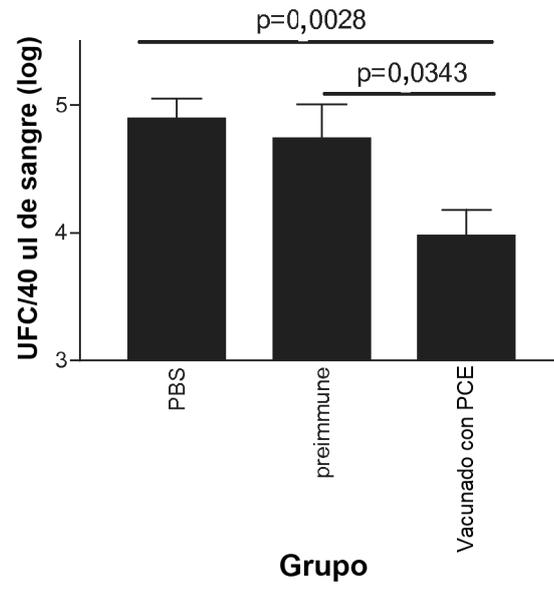


Fig 13

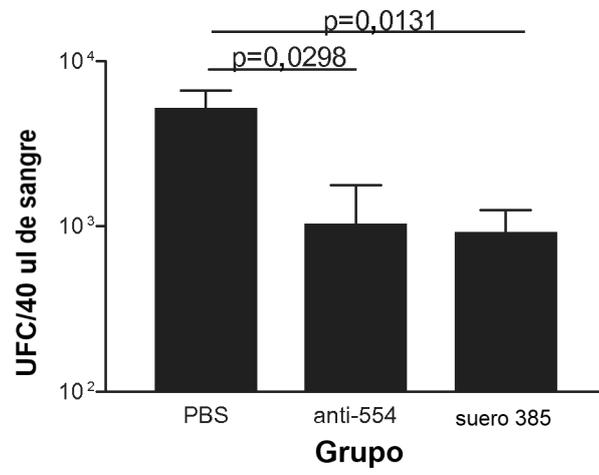


Fig 14

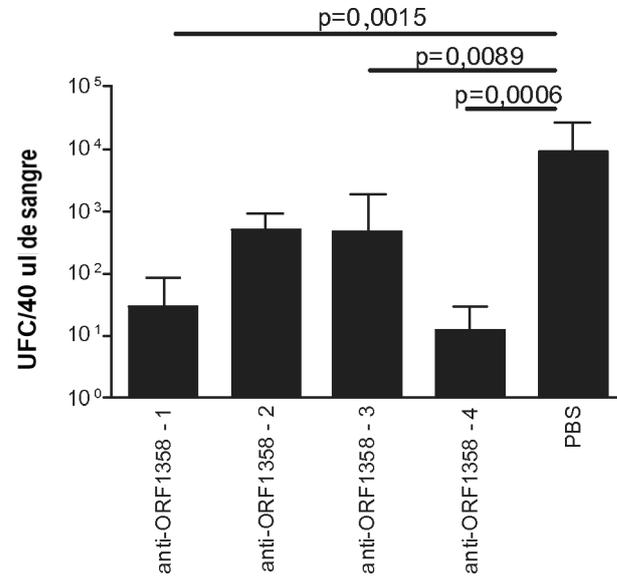


Fig 15

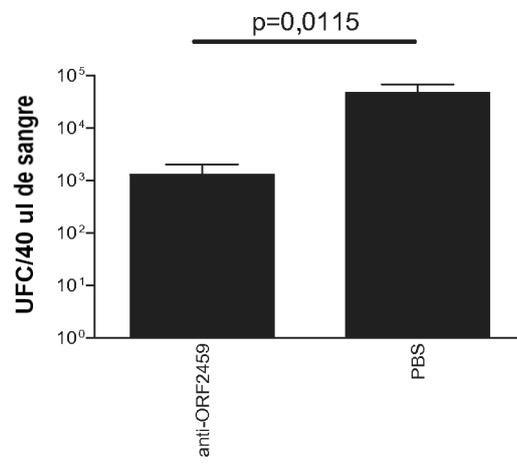


Fig 16

