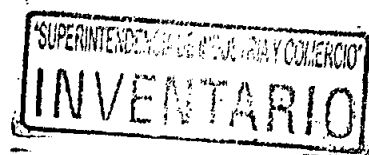


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Organizacion CSA Ltda



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

08-11728

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

INTERACCIONDE LA MORAXELLA CATARRHALIS CON CELULAR EPITELIALES
PROTEINAS DE MATRIZ EXTRA CELULAR Y EL SISTEMA COMPLEMENTO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

ARNE FORSGREN AB

DOMICILIO

FALSTERBO, SUECIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C 438,019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

**PETITORIO**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-011728- -00000-0000

Fecha: 2008-02-06 17:42:55 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 308

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT**

ENTRADA EN FASE NACIONAL

10 marzo 2008

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **ARNE FORSGREN AB**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Suecia.

Dirección: Sothönsvägen 4 B,
230 11 Falsterbo,
Suecia

Domicilio: Falsterbo,
Suecia

IDENTIFICACIÓNC.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓNC.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número 438.019 T.P. 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. **Arne FORSGREN**
Sothönsvägen 4 B,
230 11 Falsterbo,
Suecia

2. **Kristian RIESBECK**
Kolbäcksgatan 5,
216 20 Molmö,
Suecia

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/SE2006/000931Fecha: 8 de agosto de 2006Publicación Internacional No. WO 2007/018463 A2-A3Fecha: 15 de febrero de 2007

6

Título (54)

**INTERACCION DE LA MORAXELLA CATARRHALIS CON CELULAS EPITELIALES,
PROTEINAS DE MATRIZ EXTRA CELULAR Y EL SISTEMA COMPLEMENTO**

7

Clasificación Internacional (51) C07K 014/021

A61K 39/104 A61P 31/04

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US
US

(32) Fecha

10 de agosto de 2005
11 de agosto de 2005

(31) Número de Solicitud

60/706,745
60/707,148

9

Comprobante de pago No.: 08-9,460**Fecha:** 4 de febrero de 2008

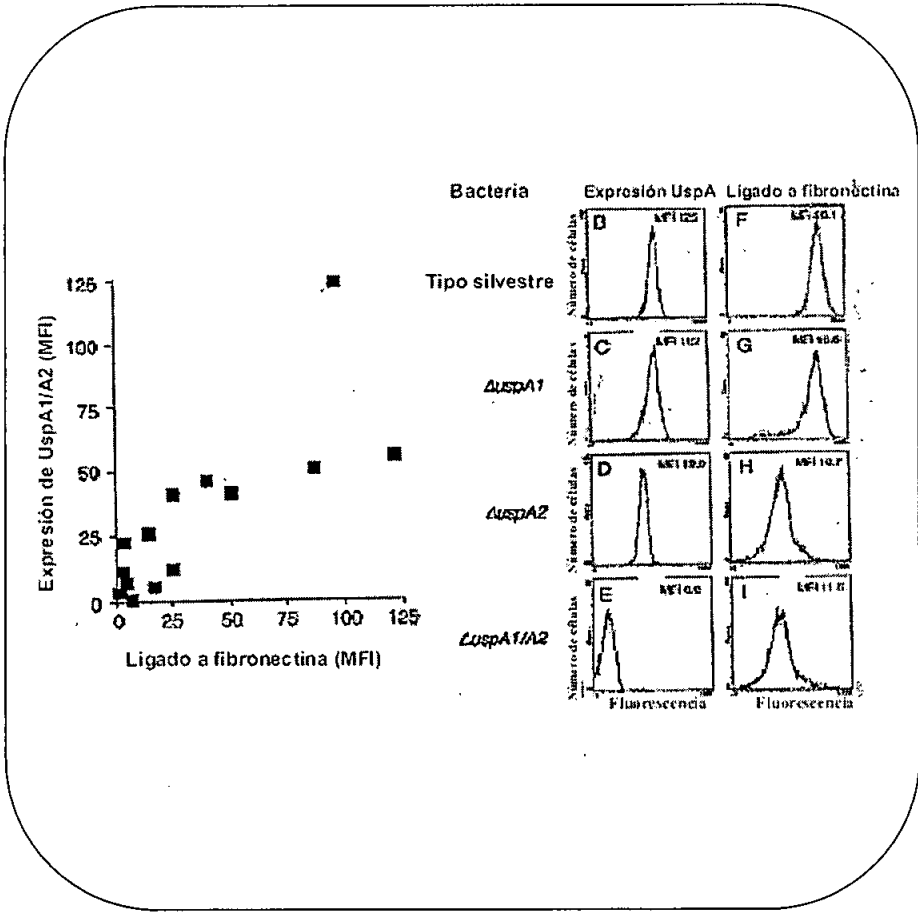
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 501.000.oo.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/018463 A3

Descripción:

Páginas 78 en el idioma original

Páginas 94 en español

Reivindicaciones: Número (s) 27

Figuras: Número (s) 21

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.
4. ☒ Listado de Secuencias.
5. ☒ Extracto de publicación.

**SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 February 2007 (15.02.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/018463 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 14/21 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/104 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/SE2006/000931

(22) International Filing Date: 8 August 2006 (08.08.2006)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/706,745 10 August 2005 (10.08.2005) US
60/707,148 11 August 2005 (11.08.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ARNE FORSGREN AB [SE/SE]; Sothönsvägen 4 B, S-230 11 Falsterbo (SE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FORSGREN, Arne [SE/SE]; Sothönsvägen 4B, S-239 41 Falsterbo (SE). RIESBECK, Kristian [SE/SE]; Kolbäcksgatan 5, S-216 20 Malmö (SE).

(74) Agent: AWAPATENT AB; Box 5117, S-200 71 Malmö (SE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
10 May 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: INTERACTION OF MORAXELLA CATARRHALIS WITH EPITHELIAL CELLS, EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS AND THE COMPLEMENT SYSTEM

(57) Abstract: The present invention relates to extracellular matrix proteins of Moraxella catarrhalis and their ability to interact with epithelial cells via cell-associated fibronectin and laminin, and also to their ability to inhibit the complement system. These extracellular proteins are useful in the preparation of vaccines. The present invention provides peptides interacting with the fibronectin, laminin and complement system.

WO 2007/018463 A3

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 February 2007 (15.02.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/018463 A2

- (51) International Patent Classification:
C07K 14/21 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/104 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/SE2006/000931
- (22) International Filing Date: 8 August 2006 (08.08.2006)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/706,745 10 August 2005 (10.08.2005) US
60/707,148 11 August 2005 (11.08.2005) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): ARNE FORSGREN AB [SE/SE]; Sothönsvägen 4 B, S-230 11 Falsterbo (SE).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): FORSGREN, Arne [SE/SE]; Sothönsvägen 4B, S-239 41 Falsterbo (SE). RIESBECK, Kristian [SE/SE]; Kolbäcksgatan 5, S-216 20 Malmö (SE).
- (74) Agent: AWAPATENT AB; Box 5117, S-200 71 Malmö (SE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

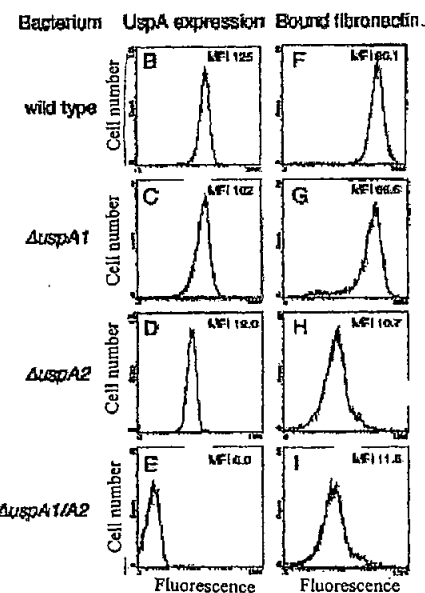
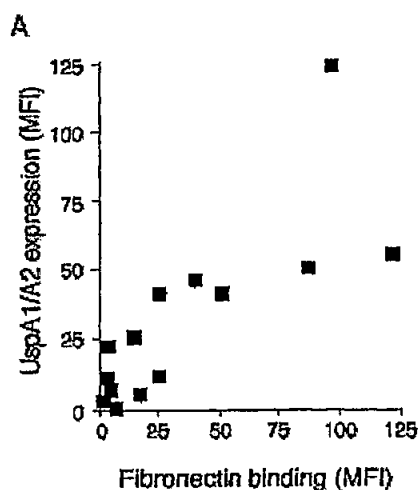
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: INTERACTION OF MORAXELLA CATARRHALIS WITH EPITHELIAL CELLS, EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS AND THE COMPLEMENT SYSTEM



(57) Abstract: The present invention relates to extracellular matrix proteins of Moraxella catarrhalis and their ability to interact with epithelial cells via cell-associated fibronectin and laminin, and also to their ability to inhibit the complement system. These extracellular proteins are useful in the preparation of vaccines. The present invention provides peptides interacting with the fibronectin, laminin and complement system.

INTERACTION OF MORAXELLA CATARRHALIS WITH EPITHELIAL
CELLS, EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS AND THE COMPLEMENT
SYSTEM

Technical field of the invention

The present invention relates to *Moraxella catarrhalis* and their ability to interact with epithelial cells via
5 extracellular matrix proteins such as fibronectin and laminin, and also to their ability to inhibit the complement system. The interaction with these extracellular proteins is useful in the preparation of vaccines.

Background art

10 The ability to bind epithelial cells is of great importance for several bacterial species. For example, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* possess fibronectin binding proteins (FnBP) with related sequence organization. These FnBP are known as Microbial Surface
15 Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs). They exploit the modular structure of fibronectin forming extended tandem beta-zippers in its binding to fibronectin. [27, 39, 47, 73] The function is to mediate bacterial adhesion and invasion of host cells.

20 The important mucosal pathogen *Moraxella catarrhalis* is the third leading bacterial cause of acute otitis media in children after *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. [14, 40, 55] *M. catarrhalis* is also one of the most common inhabitants of the pharynx of healthy children.

25 Furthermore, *M. catarrhalis* is also a common cause of sinusitis and lower respiratory tract infections in adults with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). [74] The success of this species in patients with COPD is probably related in part to its large repertoire of adhesins.

Recent years focus of research has been on the outer membrane proteins and their interactions with the human host.[6, 48, 56] Some of these outer membrane proteins appear to have adhesive functions including amongst others, *M. catarrhalis* IgD binding protein (MID, also designated Hag), protein CD, *M. catarrhalis* adherence protein (McaP) and the ubiquitous surface proteins (Usp).[1, 22, 33, 48, 61, 81, 84]

Summary of the invention

10 In view of the fact that *M. catarrhalis* has been found to be such a leading cause of infections in the upper and lower airways, there is a current need to develop vaccines which can be used against *M. catarrhalis*.

15 The aim of the present invention has therefore been to find out in which way *M. catarrhalis* interacts with epithelial cells in the body and affects the immune system. In this way, substances that can act as vaccines against *M. catarrhalis* can be developed.

In this study, using *M. catarrhalis* mutants
20 derived from clinical isolates, the inventors have been able to show that both UspA1 and A2 bind fibronectin and laminin. Furthermore, the inventors have been able to show that *M. catarrhalis* interfere with the classical pathway of the complement system, and also to elucidate in which way they
25 interfere.

Many bacteria adhere to epithelial cells via fibronectin binding MSCRAMMS.[54, 77] *Pseudomonas aeruginosa* has a FnBP that binds to cellular associated fibronectin on nasal epithelial cells.[69] Blocking the bacteria-
30 fibronectin protein interactions may help the host tissue to overcome the infection. In fact, it has been shown that antibodies against a *S. aureus* FnBP resulted in rapid clearance of the bacteria in infected mice.[71]

Recombinant truncated UspA1/A2 proteins together with
35 smaller fragments spanning the entire molecule have been

+

3

tested according to the present invention for fibronectin binding. Both UspA1 and A2 bound fibronectin and the fibronectin binding domains were found to be located within UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. These two truncated proteins both
5 inhibited binding of *M. catarrhalis* to Chang conjunctival epithelial cells to a similar extent as anti-fibronectin antibodies. The observations made show that both *M. catarrhalis* UspA1 and A2 are involved in the adherence to epithelial cells via cell-associated fibronectin. The
10 biologically active sites within UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ are therefore suggested as potential candidates to be included in a vaccine against *M. catarrhalis*.

Further, the inventors have studied and characterized binding of *M. catarrhalis* to laminin. *M. catarrhalis* is a
15 common cause of infectious exacerbations in patients with COPD. The success of this species in patients with COPD is probably related in part to its large repertoire of adhesins. In addition, there are pathological changes such as loss of epithelial integrity with exposure of basement
20 membrane where the laminin layer itself is thickened in smokers.[4] Some pathogens have been shown to be able to bind laminin and this may contribute to their ability to adhere to such damaged and denuded mucosal surfaces. These include pathogens known to cause significant disease in the
25 airways such as *S. aureus* and *P. aeruginosa* amongst others.[7, 63] The present inventors have been able to show that *M. catarrhalis* ubiquitous surface protein (Usp) A1 and A2 also bind to laminin. Laminin binding domains of UspA1 and A2 were, amongst others, found within the N-terminal
30 halves of UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ and UspA2³⁰⁻³⁵¹. These domains are also containing the fibronectin binding domains. However, the smallest fragments that bound fibronectin, UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, did not bind laminin to any appreciable extent. Fragments smaller than the N-terminal half of UspA1 (UspA1<sup>50-
35 491</sup>) lose all its laminin binding ability, whereas with

8

4

UspA2, only UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ bound laminin albeit at a lower level than the whole recombinant protein (UspA2³⁰⁻⁵³⁹). These findings suggest that different parts of the molecule might have different functional roles. UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ was also found to

5 have laminin binding properties.

Comparing the smallest laminin binding regions of UspA1 and A2, we find that there is, however, little similarity by way of amino acid homology between UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ and UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ (data not shown). This is not surprising as it is a known

10 fact that both proteins have a 'lollipop'-shaped globular head structure despite having only 22% identity in both N terminal halves.[2, 32]

The biologically active sites within UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ are suggested as potential candidates to be

15 included in a vaccine against *M. catarrhalis*.

Finally, the inventors have studied the interaction between *M. catarrhalis* ubiquitous surface proteins A1 and A2 and the innate immune system, and have found that *M. catarrhalis* interferes with the complement system. The

20 complement system is one of the first lines of innate defence against pathogenic microorganisms, and activation of this system leads to a cascade of protein deposition on the bacterial surface resulting in formation of the membrane attack complex or opsonization of the pathogen followed by

25 phagocytosis. [85, 86] One of the most important complement proteins is C3, which is present in the circulation in a concentration similar to some immunoglobulins (1-1.2 mg/ml). C3 does not only play a crucial role as an opsonin, but also is the common link between the classical, lectin and

30 alternative pathways of the complement activation. The alternative pathway functions as amplification loop for the classical and lectin pathways and can also be spontaneously activated by covalent attachment of C3 to the surface of a microbe in the absence of complement inhibitors. C3

35 deposition requires the presence of an internal thioester

bond, formed in the native protein by the proximity of a
sulfhydryl group (Cys¹⁰¹⁰) and a glutamyl carbonyl (Gln¹⁰¹²)
on the C3 α -chain.[76] Proteolytic cleavage of a 77-residue
peptide from the amino terminus of the C3 α -chain generates
5 C3a (anaphylatoxin) and C3b. Attachment of C3b is then
accomplished through a covalent link between the carbonyl
group of the metastable thioester and either -NH₂ or -OH
groups of proteins or carbohydrate structures on the
activator surface. [36, 37] *M. catarrhalis* UspA1 and A2 have
10 been found to non-covalently and in a dose dependent manner
bind both the third component of complement (C3) from EDTA-
treated serum and methylamine treated C3 (C3met). UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰
and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ have been found to bind to C3 and C3met. The
C3-binding region for UspA2 was found to mainly be localised
15 in UspA2²⁰⁰⁻⁴⁵⁸. UspA1 has however been found to have a minor
role in the interactions. The biologically active sites
within UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ are suggested as potential
candidates to be included in a vaccine against *M.*
catarrhalis.

20 The UspA family consists of UspA1 (molecular weight 88
kDa), UspA2 (62 kDa), and the hybrid protein UspA2H (92
kDa).[2, 43] These proteins migrate as high molecular mass
complexes in SDS-PAGE, are relatively conserved and hence
important vaccine candidates. The amino acid sequences of
25 UspA1 and A2 are 43 % identical and have 140 amino acid
residues that are 93 % identical. [2] In a series of 108 *M.*
catarrhalis nasopharyngeal isolates from young children with
otitis media, *uspA1* and *uspA2* genes were detected in 107 (99
) and 108 (100 %) of the isolates, respectively. Twenty-
30 one percent were identified as having the hybrid variant
gene *uspA2H*. [50] Moreover, it is known that naturally
acquired antibodies to UspA1 and A2 are bactericidal. [15]

Several functions have been attributed to the UspA
family of proteins. UspA1 expression is essential for the
35 attachment of *M. catarrhalis* to Chang conjunctival epithe-

lial cells and Hep-2 laryngeal epithelial cells.[43, 49] In a more recent study, UspA1 was shown to bind carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecules (CEACAM) expressed in the lung epithelial cell line A549.[31]

5 Purified UspA1 has also been shown to bind fibronectin in dot blot experiments while purified UspA2 did not.[49] Both UspA1 and A2 may play important roles for *M. catarrhalis* serum resistance.[1, 5, 58, 60]

The present invention demonstrates that both UspA1 and
10 A2 are determinants for *M. catarrhalis* binding to fibronectin and laminin in the clinical isolates *M. catarrhalis* BBH18 and RH4. Interestingly, recombinant UspA1 and A2 derived from *M. catarrhalis* Bc5 both bound fibronectin to the same extent. The binding domains for fibronectin were
15 found within amino acid residues 299 to 452 of UspA1 and 165 to 318 of UspA2. These two domains share 31 amino acid residues sequence identity. Importantly, truncated protein fragments containing these residues in UspA1 and UspA2 were able to inhibit *M. catarrhalis* binding to Chang epithelial
20 cells suggesting that the interactions with these cells were via cell-associated fibronectin.

The binding domains for laminin were found within the amino acid residues mentioned above. Binding assays with recombinant proteins revealed that the major binding regions
25 were localized in the N-terminal parts, where both proteins form a globular head.

Bacterial factors mediating adherence to tissue and extracellular matrix (ECM) components are grouped together in a single family named "microbial surface components
30 recognizing adhesive matrix molecules" (MSCRAMMS). Since UspA1/A2 both bind fibronectin and laminin, these proteins can be designated MSCRAMMS.

According to one aspect the present invention provides a peptide having sequence ID no. 1, and fragments,
35 homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate

11

7

or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

According to another aspect the present invention provides a peptide having sequence ID no. 2, and fragments,
5 homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

According to a further aspect the present invention provides a peptide having sequence ID no. 3, and fragments,
10 homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

According to another aspect the present invention provides a peptide having sequence ID no. 4, and fragments,
15 homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

According to a further aspect the present invention provides a peptide having sequence ID no. 5, and fragments,
20 homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

According to a further aspect the present invention provides a peptide having sequence ID no. 6, and fragments,
25 homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

According to another aspect the present invention provides a peptide having sequence ID no. 7, and fragments,
30 homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

According to another aspect the present invention provides a peptide having sequence ID no. 8, and fragments,
35 homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate

12

8

or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

According to another aspect the present invention provides a peptide having sequence ID no. 9, and fragments,
5 homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

According to another aspect the present invention provides a peptide having sequence ID no. 10, and fragments,
10 homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

According to another aspect, the present invention provides use of at least one peptide according to the
15 invention for the production of a medicament for the treatment or prophylaxis of an infection, preferably an infection caused by *M. catarrhalis*, in particular caused by carriage of *M. catarrhalis* on mucosal surfaces.

According to another aspect, the invention further
20 provides a ligand comprising a fibronectin binding domain, said ligand consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of Sequence ID No. 1, Sequence ID No. 2 and Sequence ID No. 3, and fragments, homologues,
functional equivalents, derivatives, degenerate or
25 hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

The invention further provides a ligand comprising a laminin binding domain, said ligand consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of Sequence
30 ID No. 4 to Sequence ID No. 8, and fragments, homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

Further, the present invention provides a ligand
35 comprising a C3 or C3met binding domain, said ligand

consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of Sequence ID No. 4, Sequence ID No. 6, Sequence ID No. 9 and Sequence ID No. 10, and fragments, homologues, functional equivalents, derivatives, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation products and other secondary processing products thereof.

Further, the present invention provides a medicament comprising one or more ligands according to the invention and one or more pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles, excipients, binders, carriers, or preservatives.

The present invention further provides a vaccine comprising one or more ligands according to the present invention and one or more pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles, excipients, binders, carriers, or preservatives.

The present invention also provides a method of treating or preventing an infection in an individual, preferably an infection caused by *M. catarrhalis*, in particular caused by carriage of *M. catarrhalis* on mucosal surfaces, comprising administering a pharmaceutically effective amount of a medicament or vaccine according to the present invention.

Finally, the present invention also provides a nucleic acid sequence encoding a ligand, protein or peptide of the present invention, as well as homologues, polymorphisms, degenerates and splice variants thereof.

Further disclosure of the objects, problems, solutions and features of the present invention will be apparent from the following detailed description of the invention with reference to the drawings and the appended claims.

The expression ligand as it is used herein is intended to denote both the whole molecule which binds to the receptor and any part thereof which includes the receptor binding domain such that it retains the receptor binding

14

10

property. Ligands comprising equivalent receptor binding domains are also included in the present invention.

The expressions fragment, homologue, functional equivalent and derivative relate to variants, modifications and/or parts of the peptides and protein fragments according to the invention which retain the desired fibronectin, laminin, C3 or C3met binding properties.

A homologue of UspA1 according to the present invention is defined as a sequence having at least 72% sequence identity, as can be seen from table 1 below.

A fragment according to the present invention is defined as any of the homologue sequences which are truncated or extended by 1, 2, 5, 10, 15, 20 amino acids at the N-terminus and/or truncated or extended by 1, 2, 5, 10, 15, 20 amino acids at the C-terminus.

The expressions degenerate, hydroxylation, sulphonation and glycosylation products or other secondary processing products relate to variants and/or modifications of the peptides and protein fragments according to the invention which have been altered compared to the original peptide or protein fragment by degeneration, hydroxylation, sulphonation or glycosylation but which retain the desired fibronectin, laminin, C3 or C3met binding properties.

The present invention concerns especially infections caused by *Moraxella catarrhalis*. A peptide according to the present invention can be used for the treatment or prophylaxis of otitis media, sinusitis or lower respiratory tract infections.

Table 1: Multiple alignment of full length UspA1 protein sequences, associated identity percentages

	O12E	O35E	O46E	P44	TTA24	TTA37	V1171
ATCC25238	81	75	83	83	84	79	84
O12E		74	77	83	76	72	75
O35E			72	74	83	73	78
O46E				81	81	82	80

11

P44					81	75	77
TTA24						76	84
TTA37							78

Table 2: UspA2 Pileup Analysis - Strains and sequences used

	<i>acc</i>	Strain	<i>des</i>	<i>sl</i>
☐ TREMBL:O54407_MORCA	O54407	O35E	Ubiquitous surface protein A 2.	576
☐ TREMBL:Q58XP4_MORCA	Q58XP4	MC317	UspA2.	650
☐ TREMBL:Q848S1_MORCA	Q848S1	E22	Ubiquitous surface protein A2H.	877
☐ TREMBL:Q848S2_MORCA	Q848S2	V1122	Ubiquitous surface protein A2.	616
☐ TREMBL:Q8GH86_MORCA	Q8GH86	P44	UspA2.	668
☐ TREMBL:Q9L961_MORCA	Q9L961	TTA37	USPA2H.	889
☐ TREMBL:Q9L962_MORCA	Q9L962	O46E	USPA2H.	894
☐ TREMBL:Q9L963_MORCA	Q9L963	O12E	USPA2 (Ubiquitous surface protein A2).	684
☐ TREMBL:Q9XD51_MORCA	Q9XD51	V1171	UspA2.	674
☐ TREMBL:Q9XD53_MORCA	Q9XD53	TTA24	UspA2.	613
TREMBL:Q8RTB2_MORCA	Q8RTB2	SP12-5	UspA2	686
☐ TREMBL:Q9XD55_MORCA	Q9XD55	ATCC25238	UspA2.	630
Forsgren_UspA2			UspA2.	630

5

Accordingly, the present invention provides a ligand isolated from *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein which has laminin and/or fibronectin and/or C3-binding, wherein said ligand is a polypeptide comprising or

10 consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-10 which are derived from the full-length *Moraxella catarrhalis* BC5 UspA1 & UspA2 sequences shown below, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation,

18

12

sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof.

Full-length UspA1 from *Moraxella catarrhalis* strain

BC5:

```

5  MNKIYKVKKN AAGHLVACSE FAKGHTKKAV LGSLLIVGIL GMATTASAQK
   VGGATNKGIS GDNNTANGTY LTIGGGDYNK TKGRYSTIGG GLFNEATNEY
   STIGSGGYNK AKGRYSTIGG GGYNEATNQY STIGGGDNNT AKGRYSTIGG
   GGYNEATIEN STVGGGGYNQ AKGRNSTVAG GYNNEATGTD STIAGGRKNQ
   ATGKGSFAAG IDNKANADNA VALGNKNTIE GENSVAGSN NTVKKGQONV
10 FILGSNTDTT NAQNGSVLLG HNTAGKAATI VNSAEVGGLS LTGFAGASKT
   GNGTVSVGKK GKERQIVHVG AGEISDTSTD AVNGSQLHVL ATVVAQNKAD
   IKDLDDDEVGL LGEEINSLEG EIFNNQDAIA KNQADIKTLE SNVEEGLLDL
   SGRLLDQKAD IDNNINNIYE LAQQQDQHSS DIKTLKNNVE EGLLDLSGRL
   IDQKADLT KD IKALESNVEE GLLDLSGRLI DQKADIAKNQ ADIAQNQTDI
15 QDLAAYNELQ DAYAKQQTEA IDALNKASSA NTDRIATAEL GIAENKKDAQ
   IAKAQANENK DGIQKNQADI QLHDKKITNL GILHSMVARA VGNNTQGVAT
   NKADIAKNQA DIANNIKNIY ELAQQQDQHS SDIKTLAKVS AANTDRIAKN
   KAEADASFET LTKNQNTLIE QGEALVEQNK AINQEELEGFA AHADVQDKQI
   LQNKADITTN KTAIEQNINR TVANGFEIEK NKAGIATNKQ ELILQNDRLN
20 RINETNNHQD QKIDQLGYAL KEQQQHFNRR ISAVERTAG GIANAIAT
   LPSPSRAGEH HVLFGSGYHN GQAAVSLGAA GLSDTGKSTY KIGLSWSDAG
   GLSGGVGGSY RWK

```

Full-length UspA2 from *Moraxella catarrhalis* strain

BC5:

```

25 MKTMKLLPLK IAVTSAMIIG LGAASTANAQ AKNDITLEDL PYLIKIDQN
   ELEADIGDIT ALEKYLALSQ YGNILALEEL NKALEELDED VGWNQNDIAN
   LEDDVETLTK NQNAFAEQGE AIKEDLQGLA DFVEGQEGKI LQNETSIKKN
   TQRNLVNGFE IEKNKDAIAK NNESIEDLYD FGHEVAESIG EIHANNEAQN
   ETLKGLITNS IENTNNITKN KADIQALENN VVEELFNLSG RLIDQKADID
30 NNINNIYELA QQQDQHSSDI KTLKKNVEEG LLELSDHIID QKTDIAQNQA
   NIQDLATYNE LQDQYAQKQT EAIDALNKAS SENTQNIEDL AAYNELQDAY
   AKQQTEAIDA LNKASSENTQ NIEDLAAYNE LQDAYAKQQA EAIDALNKAS
   SENTQNIQKN QADIANNITN IYELAQQQDK HRSDIKTLAK TSAANTDRIA
   KNKADDDASF ETLTKNQNTL IEKDKEHDKL ITANKTAIDA NKASADTKFA
35 ATADAFTKNG NAITKNAKSI TDLGTVKVDGF DSRVTALDTK VNAFDGRITA

```

13

LDISKVENGMA AQAALSGLFQ PYSVGKFNAT AALGGYGSKS AVAIGAGYRV
NPNLAFKAGA AINTSGNKKG SYNIGVNYEF

In a preferred embodiment, the ligand is a polypeptide
[or polypeptide truncate compared with a wild-type
5 polypeptide] comprising or consisting of an amino acid
sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-
10, or a fragment, homologue, functional equivalent,
derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or
glycosylation product or other secondary processing product
10 thereof.

The term ligand is used herein to denote both the whole
molecule which binds to laminin and/or fibronectin and/or C3
and any part thereof which includes a laminin and/or
fibronectin and/or C3-binding domain such that it retains
15 the respective binding property. Thus "ligand" encompasses
molecules which consist only of the laminin and/or fibro-
nectin and/or C3-binding domain i.e. the peptide region or
regions required for binding.

For the purposes of this invention laminin, fibronectin
20 or C3-binding properties of a polypeptide can be ascertained
as follows:

For the purposes of this invention laminin, fibronectin
or C3-binding properties of a polypeptide can be ascertained
as follows: Polypeptides can be labelled with ¹²⁵Iodine or
25 other radioactive compounds and tested for binding in radio
immunoassays (RIA) as fluid or solid phase (e.g., dot
blots). Moreover, polypeptides can be analysed for binding
with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) or flow
cytometry using appropriate antibodies and detection
30 systems. Interactions between polypeptides and laminin,
fibronectin, or C3 can further be examined by surface
plasmon resonance (Biacore). Examples of methods are
exemplified in detail in the Material and Methods section.

In another preferred embodiment, the polypeptide [or
35 polypeptide truncate compared with a wild-type polypeptide]

14

comprises or consists of at least one of the conserved sequences from within SEQ ID NO: 1-10 which are identified in the alignment shown herein. Hence, in this embodiment, the polypeptide [or polypeptide truncate compared with a wild-type polypeptide] comprises or consists of at least one of:

From UspA1 (conserved fragments from the fibronectin binding domain - '/' separating alternative choices of an amino acid at a position)

10 G T/V V S V G S/K Q/E/K/A G/N K/N/G/H/S E R Q I V N/H V G A
G Q/N/E/K I S/R A/D T/D S T D A V N G S Q L H/Y A L A S/K/T
T/A/V I/V

S T D A V N G S Q L

15 L L N/D L S G R L L/I D Q K A D I D N N I N N/H I Y E/D L A
Q Q Q D Q H S S D I K T L K

D Q K A D I D N N I N

20 L A Q Q Q D Q H S S D I K T L K

From UspA2 (conserved fragments from the fibronectin binding domain - '/' separating alternative choices of an amino acid at a position)

25 K A D I D N N I N N/H I Y E L A Q Q Q D Q H S S D

I K/Q T/A L K/E K/N/S N V/I E/V E G/E L L/F E/N L S D/G H/R
I/L I D Q K T/A D I/L A/T Q/K N/D

30 From UspA2 (conserved fragments from the C3-binding domain - '/' separating alternative choices of an amino acid at a position)

I E/Q D L A A Y N E L Q D A Y A K Q Q A/T E A I D A L N K A
S S E N T Q N I A K N Q A D I A N N I T/N N I Y E L A Q Q Q
35 D K/Q H R/S S D I K T L A K T/A S A A N T D/N R I

21

15

D L A A Y N E L Q D A Y A K Q Q

E A I D A L N K A S S E N T Q N I A K N Q A D I A N N I

5

It will be understood that the polypeptide ligands of the invention can comprise a laminin and/or fibronectin and/or C3-binding domain of sequence recited herein which is modified by the addition or deletion of amino acid residues to or from the sequences recited herein at either or both the N or C termini, which modified peptides retain the ability to bind laminin and/or fibronectin and/or C3, respectively. Accordingly, the invention further provides a ligand comprising or consisting of a polypeptide in which 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 or 1 amino acid residues have been added to or deleted from an amino acid sequence recited herein at either or both the N or C termini, wherein said modified polypeptide retains the ability to bind laminin and/or fibronectin and/or C3; and/or elicit an immune response against the non-modified peptide. By extension it is meant lengthening the sequence using the context of the peptide from the full-length amino acid sequence from which it is derived.

As regards fragments of the polypeptides of the invention, any size fragment may be used in the invention (based on the homologue sequences/conserved regions/functional domains discussed herein) provided that the fragment retains the ability to bind laminin and/or fibronectin and/or C3. It may be desirable to isolate a minimal peptide which contains only those regions required for receptor binding.

Polypeptide ligands according to the invention may be derived from known *Moraxella catarrhalis* UspA1 or UspA2 proteins by truncation at either or both of the N- and C-termini. Truncates are not the full-length native UspA1 or

35

22

16

A2 molecules. Accordingly, the invention further provides a wild-type UspA1 sequence lacking at least (or exactly) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160 etc to 298 amino acids from the N-terminus, and/or lacking at least (or
5 exactly) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 etc to 450 amino acids from the C-terminus. Preferably, the truncate retains fibronectin binding function (optionally also laminin and/or C3-binding).

10

15

Table 3. Possible combinations of truncations to the N- and C- termini of wild-type UspA1 protein.

No. of amino acids lacking, at least or exactly:																											
From the N-terminus	From the C-terminus																										
0	X	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360	380	400	420	440	450
20	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
30	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
40	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
50	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
60	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
70	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
80	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
100	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
120	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
140	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
160	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
180	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
200	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
220	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
240	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
260	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
280	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
298	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450

22

Accordingly the invention further provides a wild-type
UspA2 sequence lacking at least (or exactly) 20, 30, 40, 50,
60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, 164 amino acids from the N-
5 terminus, and/or lacking at least (or exactly) 20, 30, 40,
50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 180, 200 etc to 312 amino
acids from the C-terminus. Preferably, the truncate retains
fibronectin binding function (optionally also laminin and/or
C3-binding). Possible truncates may be selected from those
10 shown in the following table, all of which are within the
scope of the invention.

15

20

25

30

35

Table 4. Possible combinations of truncations to the N- and C- termini of wild-type UspA2 protein

No. of amino acids lacking, at least or exactly																				
From the N-terminus	From the C-terminus																			
0	X	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
20	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
30	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
40	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
50	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
60	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
70	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
80	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
100	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
120	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
140	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
160	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
164	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312

25

26

Accordingly the invention further provides a wild-type UspA2 sequence lacking at least (or exactly) 5, 10, 15, 20, 25 or 29 amino acids from the N-terminus, and/or lacking at least (or exactly) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 etc to 453 amino acids from the C-terminus. Preferably, the truncate retains laminin binding function (optionally also fibronectin and/or C3-binding). Possible truncates may be selected from those shown in the following table, all of which are within the scope of the invention.

Table 5. Possible combinations of truncations to the N- and C- termini of wild-type UspA2 protein

No. of amino acids lacking, at least or exactly:							
From the C-terminus	From the N-terminus						
0	X	5	10	15	20	25	29
20	0	5	10	15	20	25	29
30	0	5	10	15	20	25	29
40	0	5	10	15	20	25	29
50	0	5	10	15	20	25	29
60	0	5	10	15	20	25	29
70	0	5	10	15	20	25	29
80	0	5	10	15	20	25	29
100	0	5	10	15	20	25	29
120	0	5	10	15	20	25	29
140	0	5	10	15	20	25	29
160	0	5	10	15	20	25	29
180	0	5	10	15	20	25	29
200	0	5	10	15	20	25	29
220	0	5	10	15	20	25	29
240	0	5	10	15	20	25	29
260	0	5	10	15	20	25	29
280	0	5	10	15	20	25	29
300	0	5	10	15	20	25	29
320	0	5	10	15	20	25	29
340	0	5	10	15	20	25	29
360	0	5	10	15	20	25	29
380	0	5	10	15	20	25	29

27

21

400	0	5	10	15	20	25	29
420	0	5	10	15	20	25	29
440	0	5	10	15	20	25	29
453	0	5	10	15	20	25	29

Accordingly the invention further provides a wild-type UspA2 sequence lacking (or exactly) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160 etc. to 301 amino acids from the N-terminus, and/or lacking at least (or exactly) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160 or 172 amino acids from the C-terminus. Preferably, the truncate retains C3 binding function (optionally also fibronectin and/or laminin binding). Possible truncates may be selected from those shown in the following table, all of which are within the scope of the invention.

Table 6. Possible combinations of truncations to the N- and C- termini of wild-type UspA2 protein

15

No. of amino acids lacking, at least or exactly:													
From the N-terminus	From the C-terminus												
0	X	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
20	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
30	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
40	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
50	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
60	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
70	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
80	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
100	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
120	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
140	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
160	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
180	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172

22

200	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
220	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
240	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
260	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
280	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
290	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
301	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172

Known wild-type UspA1 sequences that may be truncated in this way are those of strains ATCC25238 (MX2; GenBank accession no. AAD43465), P44 (AAN84895), O35E (AAB96359), TTA37 (AAF40122), O12E (AAF40118), O46E (AAF36416), V1171 (AAD43469), TTA24 (AAD43467) (see Table 1/Figure 19); or BC5 (see above). Known wild-type UspA2 sequences that may be truncated in this way are those of strains O35E (GenBank accession no. O4407), MC317 (GenBank accession no. Q58XP4), E22 (GenBank accession no. Q848S1), V1122 (GenBank accession no. Q848S2), P44 (GenBank accession no. Q8GH86), TTA37 (GenBank accession no. Q9L961), O46E (GenBank accession no. Q9L962), O12E (GenBank accession no. Q9L963), V1171 (GenBank accession no. Q9XD51), TTA24 (GenBank accession no. Q9XD53), SP12-5 (GenBank accession no. Q8RTB2), ATCC25238 (GenBank accession no. Q9XD55) (see Table 2/Figure 20); or BC5 [Forsgren_UspA2] (see above).

Ideally the UspA1 or UspA2 truncate of this embodiment comprises or consists of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1-10 or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof; or comprises or consists of at least one of the conserved sequences from within these regions which are identified in the alignment shown in herein, for example:

23

From UspA1 (conserved fragments from the fibronectin binding domain - '/' separating alternative choices of an amino acid at a position)

G T/V V S V G S/K Q/E/K/A G/N K/N/G/H/S E R Q I V N/H V G A
5 G Q/N/E/K I S/R A/D T/D S T D A V N G S Q L H/Y A L A S/K/T
T/A/V I/V

S T D A V N G S Q L

10 L L N/D L S G R L L/I D Q K A D I D N N I N N/H I Y E/D L A
Q Q Q D Q H S S D I K T L K

D Q K A D I D N N I N

15 L A Q Q Q D Q H S S D I K T L K

From UspA2 (conserved fragments from the fibronectin binding domain - '/' separating alternative choices of an amino acid at a position)

20 K A D I D N N I N N/H I Y E L A Q Q Q D Q H S S D

I K/Q T/A L K/E K/N/S N V/I E/V E G/E L L/F E/N L S D/G H/R
I/L I D Q K T/A D I/L A/T Q/K N/D

25 From UspA2 (conserved fragments from the C3-binding domain - '/' separating alternative choices of an amino acid at a position)

I E/Q D L A A Y N E L Q D A Y A K Q Q A/T E A I D A L N K A
S S E N T Q N I A K N Q A D I A N N I T/N N I Y E L A Q Q Q
30 D K/Q H R/S S D I K T L A K T/A S A A N T D/N R I

D L A A Y N E L Q D A Y A K Q Q

E A I D A L N K A S S E N T Q N I A K N Q A D I A N N I

35

It may be convenient to produce fusion proteins containing polypeptide ligands as described herein. Accordingly, in a further embodiment, the invention provides fusion proteins comprising polypeptide ligands according to the invention. Preferably a fusion protein according to this embodiment is less than 50% identical to any known fully length sequence over its entire length. Such fusions can constitute a derivative of the polypeptides of the invention. Further derivatives can be the use of the polypeptides of the invention to as a carrier to covalently couple peptide or saccharide moieties. They may be coupled for instance to pneumococcal capsular oligosaccharides or polysaccharides, or *Moraxella catarrhalis* lipooligosaccharides, or non-typeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharides.

Homologous peptides of the invention may be identified by sequence comparison. Homologous peptides are preferably at least 60% identical, more preferably at least 70%, 80%, 90%, 95% or 99% identical in ascending order of preference to the peptide sequence disclosed herein or fragments thereof or truncates of the invention over their entire length. Preferably the homologous peptide retains the ability to bind fibronectin and/or laminin and/or C3; and/or elicit an immune response against the peptide sequences disclosed herein or fragment thereof.

Figures 19 and 20 show an alignment of peptide sequences of UspA1 and UspA2 of different origin which indicates regions of sequence that are capable of being modified to form homologous sequences whilst retained function (i.e. fibronectin and/or laminin and/or C3 binding ability). Homologous peptides to the BC5 SEQ ID NO: 1-10 peptides are for instance those sequences corresponding to the BC5 sequence from other strains in Figures 19 and 20.

Vaccines of the Invention

31

25

The polypeptides /peptides /functional domains /homologues /fragments /truncates /derivatives of the invention should ideally be formulated as a vaccine comprising an effective amount of said component(s) and a pharmaceutically acceptable excipient.

The vaccines of the invention can be used for administration to a patient for the prevention or treatment of *Moraxella catarrhalis* infection or otitis media or sinusitis or lower respiratory tract infections. They may be administered in any known way, including intramuscularly, parenternally, mucosally and intranasally.

Combination Vaccines of the Invention

The vaccines of the present invention may be combined with other *Moraxella catarrhalis* antigens for prevention or treatment of the aforementioned diseases.

The present inventors have found in particular that *Moraxella catarrhalis* has at least 2 means of hampering the host immune system from attacking the organism. In addition to the interaction with C3 (and C4BP) mentioned in the Examples below, *M. catarrhalis* has a strong affinity for soluble and membrane bound human IgD through protein MID (also known as OMP106). *Moraxella*-dependent IgD-binding to B lymphocytes results in a polyclonal immunoglobulin synthesis which may prohibit production of specific monoclonal anti-moraxella antibodies. The fact that *M. catarrhalis* hampers the human immune system in several ways might explain why *M. catarrhalis* is such a common inhabitant of the respiratory tract.

The inventors believe that the combination of antigens involved in the IgD-binding function (MID) and C3-binding function (UspA1 and/or UspA2) can provide an immunogenic composition giving the host enhanced defensive capabilities against *Moraxella*'s hampering of the human immune system thus providing an enhanced decrease in *M. catarrhalis* carriage on mucosal surfaces.

A further aspect of the invention is therefore a vaccine composition comprising an effective amount of UspA1 and/or UspA2 (particularly the latter) (for instance full-length polypeptides or polypeptides /peptides /functional domains /homologues /fragments /truncates /derivatives of the invention as described herein, preferably which retains a C3-binding function) in combination with an effective amount of protein MID (for instance full-length polypeptides or polypeptides /peptides /functional domains /homologues /fragments /truncates /derivatives thereof, preferably which retain a human IgD-binding function), and a pharmaceutically acceptable excipient.

Protein MID, and IgD-binding homologous/fragments/truncates thereof is described in WO 03/004651 (incorporated by reference herein). Particularly suitable fragments for this purpose is a polypeptide comprising (or consisting of) the F2 fragment described in WO 03/004651, or sequences with at least 60, 70, 80, 90, 95, 99% identity thereto which preferably retain human IgD-binding activity.

The MID and UspA components of this combination vaccine may be separate from each other, or may be conveniently fused together by known molecular biology techniques.

Brief description of the drawings

Figure 1 shows thirteen *M. catarrhalis* strains tested for fibronectin binding (A). Strong fibronectin binding correlated to UspA1/A2 expression as detected by anti-UspA1/A2 pAb (B-I). Flow cytometry profiles of *M. catarrhalis* BBH18 wild type and UspA1/A2 deficient mutants show an UspA1/A2-dependent binding to soluble fibronectin. The profiles of wild type clinical isolate (B and F) and corresponding mutants devoid of UspA1 (C and G), or UspA2 (D and H), and double mutants (E and I) lacking both UspA1 and UspA2 are shown. Bacteria were incubated with rabbit anti-UspA1/A2 or fibronectin followed by an anti-fibronectin pAb. FITC-conjugated rabbit pAb was subsequently added followed

27

by flow cytometry analysis. A typical experiment out of three with the mean fluorescence intensity (MFI) for each profile is shown.

Figure 2 shows that *M. catarrhalis* RH4 UspA2 deficient mutants do not bind ^{125}I -labeled fibronectin. *E. coli* BL21 was included as a negative control not binding fibronectin. Bacteria were incubated with ^{125}I -labeled fibronectin followed by several washes and analyzed in a gamma counter. Fibronectin binding to the RH4 wild type expressing both UspA1 and A2 was set as 100 %. The mean values of three independent experiments are shown. Error bars represent standard deviations (SD). Similar results were obtained with *M. catarrhalis* BBH18.

Figure 3 shows pictures that verify that *M. catarrhalis* mutants devoid of UspA1 and UspA2 do not bind to immobilized fibronectin. *M. catarrhalis* wild type was able to adhere at a high density on fibronectin coated glass slides (A). *M. catarrhalis* ΔuspA1 mutant was also retained at a high density (B), whereas *M. catarrhalis* ΔuspA2 and $\Delta\text{uspA1/A2}$ double mutants adhered poorly (C and D). Glass slides were coated with fibronectin and incubated with *M. catarrhalis* RH4 and its corresponding UspA1/A2 mutants. After several washes, bacteria were Gram stained.

Figure 4 is a graph showing that recombinant UspA1 and A2 bind to fibronectin in a dose-dependent manner. Specific fibronectin binding is shown for UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹. Both UspA proteins (40 nM) were coated on microtiter plates and incubated with increasing concentrations of fibronectin followed by detection with rabbit anti-human fibronectin pAb and HRP-conjugated anti-rabbit pAb. Mean values of three separate experiments are shown and error bars indicate SD.

Figure 5. The active fibronectin binding domains for UspA1 and UspA2 are located between amino acids 299 to 452 and 165 to 318, respectively. Truncated proteins derived from UspA1 (A) and UspA2 (B) are shown. All fragments were

28

tested for fibronectin binding in ELISA. Forty nM of each truncated fragment was coated on microtiter plates and incubated with 80 µg/ml and 120 µg/ml fibronectin for UspA1 and UspA2, respectively. Bound
5 fibronectin was detected with rabbit anti-fibronectin pAb followed by HRP-conjugated anti-rabbit pAb. Results are representative for three sets of experiments. Error bars represent SD.

Figure 6 shows the sequence according to sequence ID
10 No. 1, and the sequence homology between UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. The 31 identical amino acid residues are within brackets.

Figure 7 shows that truncated UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ and UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² fragments competitively inhibit *M. catarrhalis* UspA-
15 dependent fibronectin binding. *M. catarrhalis* ΔuspA1/A2 double mutants, which do not bind fibronectin, were included as negative controls. UspA1 recombinant proteins were pre-incubated with 2 mg/100 ml fibronectin before incubation with *M. catarrhalis*. The mean fluorescence values (MFI) of
20 *M. catarrhalis* with bound fibronectin detected by FITC conjugated anti-fibronectin pAb in flow cytometry are shown. UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ and UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² resulted in 95 % and 63 % inhibition respectively. Error bars represent mean ± SD of three independent experiments.

25 Figure 8 shows that UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ inhibit *M. catarrhalis* adherence to Chang conjunctival cells via cell-associated fibronectin. Chang epithelial cells expressed fibronectin on the surface as revealed by an anti-fibronectin pAb and flow cytometry (A). Pre-incubation with
30 the fibronectin binding proteins UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵², UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, or anti-fibronectin pAb resulted in significantly reduced binding by *M. catarrhalis* RH4 as compared to control recombinant proteins (UspA1⁴³³⁻⁵⁸⁰ and UspA2³⁰⁻¹⁷⁷) and a control antibody (anti-ICAM1 mAb) (B). P<0.05 by two-tailed

35

29

paired Student's *t* test. Mean values of three separate experiments are shown and error bars indicate SD.

Fig. 9A shows binding of *M. catarrhalis* RH4 to laminin via UspA1 and A2. *M. catarrhalis* RH4 wild type (wt) strongly bound to immobilized laminin with a mean OD of 1.27. RH4 Δ uspA1 showed mean OD of 1.14 (89.8 % of the wild type). RH4 Δ uspA2 and the double mutant RH4 Δ uspA1/A2 had a mean OD of 0.19 and 0.23 respectively (15.0% and 18.1% of the wild type). This was not significantly different from the residual adhesion to bovine serum albumin coated plates. Thirty μ g/ml of laminin or bovine serum albumin were coated on microtiter plates. They were blocked followed by incubation with bacteria suspension and finally washed. Bound bacteria was detected with anti-MID pAb and HRP-conjugated anti-rabbit pAb. The mean results of 3 representative experiments are shown. Error bars represent standard deviations (SD).

Fig. 9B shows the binding of recombinant UspA1 and A2 laminin in a dose-dependent manner. Specific laminin binding is shown for UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹. Both UspA proteins (40 nM) were coated on microtiter plates and incubated with increasing concentrations of laminin followed by detection with rabbit anti-laminin pAb and HRP-conjugated anti-rabbit pAb. Mean values of three separate experiments are shown and error bars indicate SD.

Fig. 10 A and B show that the active laminin binding domains for UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ (A) and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ (B) are located in the N-terminal halves. Forty nM of recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ together with the truncated proteins were coated on microtiter plates and incubated with 20 μ g/ml of laminin followed by detection with rabbit anti-laminin pAb and HRP-conjugated anti-rabbit pAb. Mean values of three separate experiments are shown and error bars indicate SD.

Fig. 11 is a schematic illustration of C3, covalent bound C3b and C3met. (A) The C3-molecule in serum consists

30

of one α -chain and one β -chain. (B) The α -chain contains an internal thioester site that after activation can attach covalently to a microbial surface. (C) The C3 has been treated with methylamine, which becomes covalently attached to the thioester.

Fig. 12 illustrates that *M. catarrhalis* counteracts the classical and alternative pathways of the complement system by the outer membrane proteins UspA1 and A2. (A) *M. catarrhalis* RH4 wild-type (wt), the Δ uspA1, the Δ uspA2 or the Δ uspA1/A2 mutants were incubated in the presence of 10 % NHS. (B) The Δ uspA1/A2 mutant was incubated with 10 % NHS supplemented with either EDTA or Mg-EGTA. Bacteria were collected at the indicated time points. After overnight incubation, colony forming units (cfu) were counted. The number of bacteria at the initiation of the experiments was defined as 100 %. Mean values of three separate experiments are shown and error bars indicate S.D. (A) The mean values after 5 min for the Δ uspA1, the Δ uspA2 or the Δ uspA1/A2 mutants were significantly different from the wild-type ($P < 0.05$). (B) The mean values after 5 min for the Δ uspA1/A2 mutant and after 10 min for the Δ uspA1/A2 mutant incubated Mg-EGTA were significantly different from the wild-type ($P < 0.05$).

Fig. 13 illustrates that *Moraxella catarrhalis* binds C3 in serum independently of complement activation. Flow cytometry profiles showing C3 binding to (A) *M. catarrhalis* RH4 or (B) *Streptococcus pneumoniae*. Bacteria were incubated with NHS or NHS pretreated with EDTA. Thereafter, a rabbit anti-human C3d pAb and as a secondary layer a FITC-conjugated goat anti-rabbit pAb were added followed by flow cytometry analysis. Bacteria in the absence of NHS, but in the presence of both pAb, were defined as background fluorescence. One representative experiment out of three is shown.

37

31

Fig. 14 illustrates that *M. catarrhalis* non-covalently binds purified methylamine-treated C3 in a dose-dependent manner, and that the binding is based on ionic interactions. Flow cytometry profiles showing (A) binding with increasing concentrations of C3met. (B) The mean fluorescence intensity (mfi) of each profile in panel (A) is shown. (C) C3met binding of RH4 decreases with increasing concentrations of NaCl. Bacteria were incubated with C3met with or without NaCl as indicated. C3met binding was measured by flow cytometry as described in Figure 3. Error bars indicate SD. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Fig. 15 illustrates that flow cytometry profiles of *M. catarrhalis* RH4 wild type and UspA1/A2 deficient mutants show a UspA1/UspA2-dependent C3met/ C3 binding. The profiles of a wild type clinical isolate (A, F, K) and corresponding mutants devoid of protein MID (B, G, L), UspA1 (C, H, M), UspA2 (D, I, N), or both UspA1 and UspA2 (E, J, O) are shown. Bacteria were incubated with C3met (A-E), NHS-EDTA (F-J) or NHS (K-O) and detected as outlined in Figure 3. One typical experiment out of three with the mean fluorescence intensity (mfi) for each profile is shown.

Fig. 16 illustrates that C3met binds to purified recombinant UspA2³⁰⁻⁵³⁹, whereas only a weak C3met binding to UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ is observed. Furthermore, the C3met binding region of UspA2 was determined to be located between the amino acid residues 200 to 458. (A) The recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ were immobilized on a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with [¹²⁵I]-labelled C3met overnight and bound protein was visualized with a Personal FX (Bio-Rad) using intensifying screens. The recombinant protein MID⁹⁶²⁻¹²⁰⁰ was included as a negative control. (B) UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹ and a series of truncated UspA2 proteins were coated on microtiter plates and incubated with C3met, followed by incubation with goat anti-human C3 pAb and HRP-conjugated anti-goat pAb. The mean values out of three

experiments are shown. The background binding was subtracted from all samples. Error bars correspond to S.D. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Fig. 17 illustrates that addition of recombinant
 5 UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ to serum inhibit C3b deposition and
 killing of *M. catarrhalis* via the alternative pathway. Flow
 cytometry profiles show C3b-deposition on RH4ΔuspA1/A2 after
 incubation with (A) NHS or NHS preincubated with recombinant
 (rec.) UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹, or (B) NHS-Mg-EGTA or NHS-
 10 Mg-EGTA preincubated with UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹. After
 addition of the various NHS combinations, bacteria were
 analyzed as described in Figure 13. (C) RH4ΔuspA1/A2 was
 incubated with 10 % NHS or NHS-Mg-EGTA. For inhibition, the
 NHS-Mg-EGTA was incubated with 100 nM UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and/ or
 15 UspA2³⁰⁻⁵³⁹ before addition of bacteria. Bacteria were
 collected at the indicated time points. The number of
 bacteria at the initiation of the experiments was defined as
 100 %. Mean values of three separate experiments are shown
 and error bars indicate S.D. The time points 10, 20 and 30
 20 min for the ΔuspA1/A2 mutant preincubated with recombinant
 proteins were significantly different from the ΔuspA1/A2
 mutant incubated with Mg-EGTA alone ($P < 0.05$).

Fig. 18 illustrates that recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and
 UspA2³⁰⁻⁵³⁹ decrease haemolysis of rabbit erythrocytes by
 25 inhibition of the alternative pathway. NHS was incubated
 with or without 100 nM UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and/ or UspA2³⁰⁻⁵³⁹ at 37 °C
 for 30 min. NHS at the indicated concentrations was
 thereafter added to rabbit erythrocytes. After incubation
 for 30 min, the suspensions were centrifuged and the
 30 supernatants were measured by spectrophotometry. Maximum
 haemolysis in each experiment was defined as 100 %. Mean
 values of three separate experiments are shown and error
 bars correspond to S.D. The results obtained with NHS +
 UspA2³⁰⁻⁵³⁹ and NHS + UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰/ UspA2³⁰⁻⁵³⁹ at NHS

concentrations of 2, 3 and 4% were significantly different from the NHS control ($P < 0.05$).

Fig. 19 illustrates a pileup-analysis of UspA1 for eight different strains, to show the homology of different parts of UspA1.

Fig. 20 illustrates a pileup-analysis of UspA2 for thirteen different strains to show the homology of different parts of UspA2.

Fig. 21 illustrates %identity in regions identified on Forsgren sequence computed as the ratio between the number of exact matches and the length of the region alignment, where the region alignment is that part of the above total alignment containing the Forsgren region.

Materials and methods
Interaction between *M. catarrhalis* and fibronectin
Bacterial strains and culture conditions

The sources of the clinical *M. catarrhalis* strains are listed in table 7. *M. catarrhalis* BBH18 and RH4 mutants were constructed as previously described.[23, 58] The *M. catarrhalis* strains were routinely cultured in brain heart infusion (BHI) liquid broth or on BHI agar plates at 37 °C. The UspA1-deficient mutants were cultured in BHI supplemented with 1.5 µg/ml chloramphenicol (Sigma, St. Louis, MO), and UspA2-deficient mutants were incubated with 7 µg/ml zeocin (Invitrogen, Carlsbad, CA). Both chloramphenicol and zeocin were used for growth of the double mutants.

Table 7. Clinical strains of *M. catarrhalis* used in the present study

Strain	Clinical Source	Reference
BBH18	Sputum	[53]
D1	Sputum	[53]
Ri49	Sputum	[53]
C10	Sputum	[10]
F16	Sputum	[10]

	Bro2	Respiratory tract	[53]
	Z14	Pharynx	[10]
	S6-688	Nasopharynx	[23]
	Bc5	Nasopharynx	[20]
5	RH4	Blood	[53]
	RH6	Blood	[53]
	R14	Unknown	[10]
	R4	Unknown	[10]
	SÖ-1914	Tympanic cavity aspirate	[23]

10 Note: The strains C10, R4 did not have the *uspA1* gene, whereas F16, R14, Z14 lacked the *uspA2* gene.[10] The remaining strains contained both *uspA1* and *A2* genes (data not shown).

DNA method

15 To detect the presence *uspA1*, *A2*, and *A2H* genes in those strains which this was unknown, primers and PCR conditions as described by Meier et al. was used.[50] Partial sequencing was also carried out with the *UspA1*²⁹⁹⁻⁴⁵² and *UspA2*¹⁶⁵⁻³¹⁸ 5' and 3' primers of the respective *uspA1* and
20 *uspA2* gene of RH4 and BBH18. Confirmation of the presence of the amino acid residues "DQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLK" was also performed by PCR with a primer (5'-CAAAGCTGACATCCAAGCACTTG-3') designed from the 5' end of this sequence and 3' primers for *uspA1* and *A2* as described by
25 Meier at al.[50]

Recombinant proteins construction and expression

Recombinant *UspA1*⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and *UspA*²³⁰⁻⁵³⁹, which are devoid of their hydrophobic C-termini, has recently been described.[58] The genomic DNA was extracted from *M. catarrhalis* Bc5 using a DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). In addition, recombinant proteins corresponding to multiple regions spanning *UspA1*⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and *UspA2*³⁰⁻⁵³⁹ were also constructed by the same method. The primers used are listed in table 8. All constructs were sequenced according to
35 standard methods. Expression and purification of the

recombinant proteins were done as described previously.[59]
Proteins were purified using columns containing a nickel
resin (Novagen) according to the manufacturer's instructions
for native conditions. The recombinant proteins were
5 analyzed on SDS-PAGE as described.[21]

Table 8. Primers used in this present study

	Protein	5' primer	3' primer
	UspA1 ⁵⁰⁻⁷⁷⁰	gcgtctcggatccagtaggcaaggcaacc	ccctgaagcttagtgcataacctaattg
10	UspA1 ⁵⁰⁻⁴⁹¹	gcgtctcggatccagtaggcaaggcaacc	ttgagcaagcttagcttggttttagcg
	UspA1 ⁵⁰⁻¹⁹⁷	gcgtctcggatccagtaggcaaggcaacc	acctgtggcaagcttcttctgcc
	UspA1 ⁵⁰⁻³²¹	gcgtctcggatccagtaggcaaggcaacc	
		ggtgtcactaagcttacctgcaccaacatgaac	
	UspA1 ²⁹⁹⁻⁴⁵²	ggatttcaggtgcatcggatcctgtaattggtact	gtcttttgaagatcaagcttttgatcaat
15	UspA1 ⁴³³⁻⁵⁸⁰	catagctctgatatggatccacttaaaac	catgctgagaagcttacctagattgg
	UspA1 ⁵⁵⁷⁻⁷⁰⁴	gccaaagcacaagcggatccaaataaagac	ggtcttattgtagtaagcttagcttggtttg
	UspA1 ⁶⁸⁰⁻⁷⁷⁰	gttgagcaaaaggatcccatcaatcaagag	ccctgaagcttagtgcataacctaattg
	UspA2 ³⁰⁻⁵³⁹	cgaatgcggatcctaaaaatgatataactttagagg	cattaagcttggtgtctaatgcagttac
20	UspA2 ³⁰⁻¹⁷⁷	cgaatgcggatcctaaaaatgatataactttagagg	ctcatgacaaaatcaagcttatcttcgatagactc
	UspA2 ¹⁰¹⁻²⁴⁰	gatattgcggatccggaagatgatgttgaaac	gatcaataagcttaccgcttagattgaatagtcttc
	UspA2 ¹⁰¹⁻³¹⁸	gatattgcggatccggaagatgatgttgaaac	gtcaatcgcttcaagcttctttgagcactg
	UspA2 ¹⁶⁵⁻³¹⁸	gagattgagaaggatccagatgctattgct	gtcaatcgcttcaagcttctttgagcactg
	UspA2 ³⁰²⁻⁴⁵⁸	gctcaaaaccaagcggatccccaagatctg	ggtgagcgtttcaagcttgcacagcatcggc
25	UspA2 ⁴⁴⁶⁻⁵³⁹	gcaagtgtcggatcctgatcgtattgct	cattaagcttggtgtctaatgcagttac

Antibodies

Rabbit anti-UspA1/A2 polyclonal antibodies (pAb) were
recently described in detail.[58] The other antibodies used
30 were rabbit anti-human fibronectin pAb, swine FITC-
conjugated anti-rabbit pAb, swine horseradish peroxidase
(HRP) conjugated anti-rabbit pAb and finally a mouse anti-
human CD54 (ICAM1) monoclonal antibody (mAb). Antibodies
were from Dakopatts (Glostrup, Denmark).

Flow cytometry analysis

The UspA1/A2-protein expression and the capacity of *M. catarrhalis* to bind fibronectin were analyzed by flow cytometry. *M. catarrhalis* wild type strains and UspA1/A2-deficient mutants were grown overnight and washed twice in phosphate buffered saline containing 3 % fish gelatin (PBS-gelatin). The bacteria (10^8) were then incubated with the anti-UspA1/A2 antiserum or 5 µg fibronectin (Sigma, St Louis, MO). They were then washed and incubated for 30 min at room temperature (RT) with FITC-conjugated anti-rabbit pAb (diluted according to the manufacturer's instructions) or with 1/100 dilution of rabbit anti-human fibronectin pAb (if fibronectin was first added) for 30 min at RT before incubation with the FITC-conjugated anti-rabbit pAb. After three additional washes, the bacteria were analyzed by flow cytometry (EPICS, XL-MCL, Coulter, Hialeah, FL). All incubations were kept in a final volume of 100 µl PBS-gelatin and the washings were done with the same buffer. Anti-fibronectin pAb and FITC-conjugated anti-rabbit pAb were added separately as a negative control for each strain analyzed. Fibronectin inhibition studies were carried out by pre-incubating 0.25 µmoles of UspA fragments for 1 h with 2 µg of fibronectin before incubation with *M. catarrhalis* bacteria (10^8). The residual free amount of fibronectin that bound to *M. catarrhalis* was determined by flow cytometry as outlined above.

Binding of *M. catarrhalis* to immobilized fibronectin

Glass slides were coated with 30 µl aliquots of fibronectin (1 mg/ml) and air dried at RT. After washing once with PBS, the slides were incubated in Petri dishes with pre-chilled bacteria at late exponential phase (optical density (OD) at 600 nm = 0.9). After 2 h at RT, glass slides were washed once with PBS followed by Gram staining.

Protein labeling and radio immunoassay (RIA)

37

Fibronectin was ^{125} Iodine labeled (Amersham, Buckinghamshire, England) to a high specific activity (0.05 mol iodine per mol protein) with the Chloramine T method.[21] *M. catarrhalis* strains BBH18 and RH4 together with their
5 corresponding mutants were grown overnight on solid medium and were washed in PBS with 2 % bovine serum albumin (BSA). Bacteria (10^8) were incubated for 1 h at 37°C with ^{125} I-labeled fibronectin (1600 kcpm/sample) in PBS containing 2 %
10 BSA. After three washings with PBS 2 % BSA, ^{125} I-labeled fibronectin bound to bacteria was measured in a gamma counter (Wallac, Espoo, Finland).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Microtiter plates (Nunc-Immuno Module; Roskilde, Denmark) were coated with 40 nM of purified recombinant
15 UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ proteins in 75 mM sodium carbonate, pH 9.6 at 4 °C overnight. Plates were washed four times with washing buffer (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, and 0.1 % Tween 20, pH 7.5) and blocked for 2 h at RT with washing buffer containing 3 % fish gelatin. After four additional washings,
20 the wells were incubated for 1 h at RT with fibronectin (120 µg/ml) diluted in three-fold step in 1.5 % fish gelatin (in wash buffer). Thereafter, the plates were washed and incubated with rabbit anti-human fibronectin pAb for 1 h. After additional washings, HRP-conjugated anti-rabbit pAb
25 was added and incubated for 1 h at RT. Both the antihuman fibronectin and HRP-conjugated anti-rabbit pAb were diluted 1:1,000 in washing buffer containing 1.5 % fish gelatin. The wells were washed four times and the plates were developed and measured at OD₄₅₀. ELISAs with truncated proteins
30 spanning UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ were performed with fixed doses of fibronectin at 80 µg/ml and 120 µg/ml, respectively.

Cell line adherence inhibition assay

35 Chang conjunctival cells (ATCC CCL 20.2) were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley,

44

38

Scotland) supplemented with 10 % fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, and 12 µg of gentamicin/ ml. On the day before adherence inhibition experiments, cells were harvested, washed twice in gentamicin-free RPMI 1640, and added to 96 well tissue culture plates (Nunc) at a final concentration of 10^4 cells/ well in 200 µl of gentamicin-free culture medium. Thereafter, cells were incubated overnight at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ and 95 % air. On the day of experiments, inhibition of *M. catarrhalis* adhesion was carried out by pre-incubating increasing concentration of recombinant UspA1/A2 truncated proteins containing the fibronectin binding domains (UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸) or rabbit anti-human fibronectin pAb (diluted 1:50) for 1 h. Nonfibronectin binding recombinant proteins (UspA1⁴³³⁻⁵⁸⁰ and UspA2³⁰⁻¹⁷⁷) were used as controls. Chang epithelial cells are known to express ICAM1.[18] Hence an anti-ICAM1 antibody was used to differentiate if the inhibitory effect of the anti-fibronectin antibody was secondary to steric hindrance. Subsequently, *M. catarrhalis* RH4 (10^6) in PBS-gelatin was inoculated onto the confluent monolayers. In all experiments, tissue culture plates were centrifuged at 3,000 x g for 5 min and incubated at 37 °C in 5 % CO₂. After 30 min, infected monolayers were rinsed several times with PBS-gelatin to remove non-adherent bacteria and were then treated with trypsin-EDTA (0.05 % trypsin and 0.5 mM EDTA) to release the Chang cells from the plastic support. Thereafter, the resulting cell/ bacterium suspension was seeded in dilution onto agar plates containing BHI and incubated overnight at 37 °C in 5 % CO₂.

30 Determination of fibronectin expression in Chang conjunctival epithelial cells

Chang conjunctival epithelial cells were harvested by scraping followed by re-suspension in PBS-gelatin. Cells (1×10^6 /ml) were labeled with rabbit anti-human fibronectin pAb followed by washing and incubation with a FITC-

45

39

conjugated anti-rabbit pAb. After three additional washes, the cells were analyzed by flow cytometry as outlined above.

Interaction between *M. catarrhalis* and laminin

Bacterial strains and culture conditions

5 The clinical *M. catarrhalis* strains BBH18 and RH4 and their corresponding mutants were previously described.[58] Both strains have a relatively higher expression of UspA2 compared to UspA1.[58] The mutants expressed equal amount of *M. catarrhalis* immunoglobulin D-binding protein (MID) when
10 compared to wild type strains. Bacteria were routinely cultured in brain heart infusion (BHI) broth or on BHI agar plates at 37 °C. The UspA1-deficient, UspA2-deficient and double mutants were cultured in BHI supplemented with antibiotics as described.[58]

15 Recombinant protein construction and expression Recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹, which are devoid of their hydrophobic C-termini, were manufactured.[58] In addition, recombinant proteins corresponding to multiple regions spanning UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ were used.[78]

Antibodies

20 Rabbit anti-UspA1/A2 and anti-MID polyclonal antibodies (pAb) were used.[22, 58] Rabbit anti-laminin pAb was from Sigma (St Louis, MO, USA). Swine horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit pAb was from Dakopatts
25 (Glostrup, Denmark).

Binding of *M. catarrhalis* to immobilized laminin

Microtiter plates (Nunc-Immuno Module; Roskilde, Denmark) were coated with Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma laminin (Sigma, Saint Louis, USA) or bovine serum
30 albumin (BSA) (30 µg/ml) in Tris-HCL, pH 9.0 at 4°C overnight. The plates were washed with phosphate buffered saline and 0.05% Tween 20, pH 7.2 (PBS-Tween) and subsequently blocked with 2 % BSA in PBS + 0.1 % Tween 20, pH 7.2. *M. catarrhalis* RH4 and BBH18 (10⁸) in 100 µl were
35 then added followed by incubation for 1 h. Unbound bacteria

40

were removed by washing 3 times with PBS-Tween. Residual bound bacteria were detected by means of an anti-MID pAb, followed by detection with HRP-conjugated anti-rabbit pAb. The plates were developed and measured at OD₄₅₀ according to a standard protocol.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Microtiter plates (Nunc-Immuno Module) were coated with 40 nM of purified recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ proteins in 75 mM sodium carbonate, pH 9.6 at 4°C. Plates were washed four times with washing buffer (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, and 0.1 % Tween 20, pH 7.5) and blocked at RT with washing buffer containing 3 % fish gelatin. After additional washings, the wells were incubated for 1 h at RT with laminin at different dilutions as indicated in 1.5 % fish gelatin (in wash buffer). Thereafter, the plates were washed and incubated with rabbit anti-laminin pAb. After additional washings, HRP-conjugated anti-rabbit pAb was added and incubated at RT. Both the anti-laminin and HRP-conjugated anti-rabbit pAb were diluted 1:1,000 in washing buffer containing 1.5 % fish gelatin. The wells were washed and the plates were developed and measured at OD₄₅₀. Uncoated wells incubated with identical dilutions of laminin were used as background controls. ELISAs with truncated proteins spanning UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ were performed with fixed doses of laminin (20 µg/ml).

Interaction between *M. catarrhalis* and C3 and C3met

Bacterial strains and culture conditions

The clinical *M. catarrhalis* isolates and related subspecies have recently been described in detail.[21, 53] Type strains were from the Culture Collection, University of Gothenburg (CCUG; Department of Clinical Bacteriology, Sahlgrenska Hospital, Gothenburg, Sweden), or the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Va); *Neisseria gonorrhoeae* CCUG 15821, *Streptococcus pyogenes* CCUG 25570 and 25571, *Streptococcus agalactiae* CCUG 4208, *Streptococcus pneumoniae*

47

41

ATCC 49619, *Legionella pneumophila* ATCC 33152, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, and finally *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The remaining strains in Table 9 were clinical isolates from Medical

5 Microbiology, Department of Laboratory Medicine, Malmö University Hospital, Lund University, Sweden.

Table 9. *M. catarrhalis* is a unique C3/ C3met binding bacterium. Related moraxella subspecies and other common human pathogens do not bind C3/ C3met (mfi < 2.0). After incubation with EDTA-treated NHS or C3met, bacteria were analysed by flow cytometry using a rabbit anti-C3d pAb and a FITC-conjugated goat anti-rabbit pAb.

	Species	NHS-EDTA (mfi)	C3met (mfi)
10	<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4	8.7	22.1
	<i>M. osloensis</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>M. bovis</i>	< 2.0	< 2.0
15	<i>M. caniculi</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>M. nonliquefacie</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>N. pharyngis</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>N. sicca</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>N. flava</i>	< 2.0	< 2.0
20	<i>N. subflava</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>Oligella ureolytica</i> (n=2)	< 2.0	< 2.0
	<i>Haemophilus influenzae</i> (n=7)	< 2.0	< 2.0
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=11)	< 2.0	< 2.0
	<i>Legionella pneumophila</i> (n=2)	< 2.0	< 2.0
25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=2)	< 2.0	< 2.0
	<i>Listeria monocytogenes</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=3)	< 2.0	< 2.0
	<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=2)	< 2.0	< 2.0
30	<i>Streptococcus agalactia</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>Enterococcus faecalis</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>Helicobacter pylori</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>Escherichia coli</i> (n=2)	< 2.0	< 2.0
	<i>M. ovis</i>	< 2.0	< 2.0
35	<i>M. caviae</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>N. meningitidis</i>	< 2.0	< 2.0
	<i>N. mucosa</i>	< 2.0	< 2.0

The different non-moraxella species were grown on appropriate standard culture media. *M. catarrhalis* strains were routinely cultured in brain heart infusion (BHI) liquid broth or on BHI agar plates at 37°C. *M. catarrhalis* BBH18 and RH4 mutants were manufactured as previously described.[22, 23, 58] The MID-deficient mutants were grown in BHI containing 50 µg/ml kanamycin. The UspA1-deficient mutants were cultured in BHI supplemented with 1.5 µg/ml chloramphenicol (Sigma, St. Louis, MO), and UspA2-deficient mutants were incubated with 7 µg/ml zeocin (Invitrogen, Carlsbad, CA). Both chloramphenicol and zeocin were used for growth of the UspA1/ A2 double mutants.

Antibodies

Rabbits were immunized intramuscularly with 200 µg recombinant full-length UspA1 emulsified in complete Freund's adjuvant (Difco, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), and boosted on days 18 and 36 with the same dose of protein in incomplete Freund's adjuvant.[22] Blood was drawn 3 weeks later. To increase the specificity, the anti-UspA1 antiserum was affinity-purified with Sepharose-conjugated recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰. [58] The antiserum bound equally to UspA1 and UspA2 and was thus designated anti-UspA1/ A2 pAb. The rabbit anti-human C3d pAb and the FITC-conjugated swine anti-rabbit pAb were purchased from Dakopatts (Glostrup, Denmark), and the goat anti-human C3 were from Advanced Research Technologies (San Diego, CA). The horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-goat pAb was obtained from Serotec (Oxford, UK).

Proteins and iodine labelling

The manufacture of recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹, which are devoid of their hydrophobic C-termini, has recently been described.[23] The truncated UspA1 and UspA2 proteins were manufactured as described in detail by Tan et al.[78] C3b was purchased from Advanced Research Technologies. C3(H₂O) was obtained by freezing and thawing

50

44

of purified C3. The C3b-like molecule (C3met) was made by incubation of purified C3 with 100 mM methylamine (pH 8.0) for 2 h at 37°C, and subsequent dialysis against 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl. For binding studies, C3met
5 was labelled with 0.05 mol ¹²⁵I (Amersham, Buckinghamshire, England) per mol protein, using the Chloramine T method.[25]
Flow cytometry analysis

Binding of C3 to *M. catarrhalis* and other species was analyzed by flow cytometry. Bacteria were grown on solid
10 medium overnight and washed twice in PBS containing 2 % BSA (Sigma) (PBS-BSA). Thereafter, bacteria (10⁸ colony forming units; cfu) were incubated with C3met, C3b, C3(H₂O), or 10 % NHS with or without 10 mM EDTA or 4 mM MgCl₂ and 10 mM EGTA (Mg-EGTA) in PBS-BSA for 30 min at 37°C. After washings, the
15 bacteria were incubated with anti-human C3d pAb for 30 min on ice, followed by washings and incubation for another 30 min on ice with FITC-conjugated goat anti-rabbit pAb. After three additional washes, bacteria were analyzed by flow cytometry (EPICS, XL-MCL, Coulter, Hialeah, FL). All
20 incubations were kept in a final volume of 100 µl PBS-BSA and the washings were done with the same buffer. The anti-human C3d pAb and FITC-conjugated anti-rabbit pAb were added separately as a negative control for each strain analyzed. In the inhibition studies, serum was preincubated with 100
25 nM of the recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ proteins for 30 min at 37°C. To analyze the characteristics of the *M. catarrhalis* and C3 interaction, increasing concentrations of NaCl (0 - 1.0 M) was added to bacteria and C3met. To analyze UspA1/ A2 expression, bacteria (10⁸ cfu) were incubated with
30 the anti-UspA1/ A2 pAb and washed as described above. A FITC-conjugated goat anti-rabbit pAb diluted according to the manufacturers instructions was used for detection. To assure that EDTA did not disrupt the outer membrane proteins UspA1 and UspA2, *M. catarrhalis* was incubated with or
35 without EDTA followed by detection of UspA1/ A2 expression.

45

EDTA, at the concentrations used in the NHS-EDTA experiments, did not change the density of UspA1/A2.

Serum and serum bactericidal assay

Normal human serum (NHS) was obtained from five healthy
5 volunteers. The blood was allowed to clot for 30 min at room
temperature and thereafter incubated on ice for 60 min.
After centrifugation, sera were pooled, aliquoted and stored
at -70°C. To inactivate both the classical and alternative
pathways, 10 mM EDTA was added. In contrast, Mg-EGTA was
10 included to inactivate the classical pathway. Human serum
deficient in the C4BP was prepared by passing fresh serum
through a HiTrap column (Amersham Biosciences) coupled with
mAb 104, a mouse mAb directed against CCP1 of the α -chain
of C4BP.[41] The flow through was collected and the depleted
15 serum was stored in aliquots at -70°C. Serum depleted of Clq
was obtained via the first step of Clq purification [79]
using Biorex 70 ion exchange chromatography (Bio-Rad,
Hercules, CA). The resulting sera displayed normal
haemolytic activity. The factor D and properdin deficient
20 serum was kindly provided by Dr. Anders Sjöholm (Department
of Medical Microbiology, Lund University, Lund, Sweden).
M. catarrhalis strains were diluted in 2.5 mM Veronal
buffer, pH 7.3 containing 0.1 % (wt/vol) gelatin, 1 mM
MgCl₂, 0.15 mM CaCl₂, and 2.5 % dextrose (DGV^{B++}). Bacteria
25 (10³ cfu) were incubated together with 10 % NHS and EDTA or
Mg-EGTA in a final volume of 100 μ l. The bacteria/ NHS was
incubated at 37°C and at various time points, 10 μ l aliquots
were removed and spread onto BHI agar plates. In inhibition
studies, 10 % serum was incubated with 100 nM of the
30 recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ proteins for 30 min at
37°C before bacteria were added.

Dot blot assays

Purified recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ diluted in
three-fold steps (1.9 - 150 nM) in 100 μ l of 0.1 M Tris-HCl,
35 pH 9.0 were applied to nitrocellulose membranes (Schleicher

52

46

& Schüll, Dassel, Germany) using a dot blot device. After saturation, the membranes were incubated for 2 h with PBS-Tween containing 5 % milk powder at room temperature and washed four times with PBS-Tween. Thereafter, 5 kcpm [¹²⁵I]-
5 labelled C3met in PBS-Tween with 2 % milk powder was added overnight at 4°C. The bound protein was visualized with a Personal FX (Bio-Rad) using intensifying screens.

Surface plasmon resonance (Biacore)

The interaction between UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ or UspA2³⁰⁻⁵³⁹ and C3
10 was further analysed using surface plasmon resonance (Biacore 2000; Biacore, Uppsala, Sweden) as recently described for the UspA1/2-C4BP interaction.[58] The K_D (the equilibrium dissociation constant) was calculated from a
15 binding curve showing response at equilibrium plotted against the concentration using steady state affinity model supplied by Biaevaluation software (Biacore).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Microtiter plates (Nunc-Immuno Module; Roskilde, Denmark) were coated with triplets of purified recombinant
20 UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹, or the truncated UspA1 and UspA2 fragments (40 nM in 75 mM sodium carbonate, pH 9.6) at 4°C overnight. Plates were washed four times with washing buffer (PBS with 0.1 % Tween 20, pH 7.2) and blocked for 2 hrs at
25 room temperature with washing buffer supplied with 1.5 % ovalbumin (blocking buffer). After washings, the wells were incubated overnight at 4°C with 0.25 µg C3met in blocking buffer. Thereafter, the plates were washed and incubated
30 with goat anti-human C3 in blocking buffer for 1 h at RT. After additional washings, HRP-conjugated donkey anti-goat pAbs was added for another 1 h at RT. The wells were washed
four times and the plates were developed and measured at OD₄₅₀.

Haemolytic assay

Rabbit erythrocytes were washed three times with ice-
35 cold 2.5 mM Veronal buffer, pH 7.3 containing 0.1 % (wt/vol)

47

gelatin, 7 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, and 2.5 % dextrose (Mg⁺⁺EGTA), and resuspended at a concentration of 0.5 x 10⁹ cells/ml. Erythrocytes were incubated with various concentrations (0 to 4 %) of serum diluted in Mg⁺⁺EGTA.

5 After 1 h at 37°C, erythrocytes were centrifuged and the amount of lysed erythrocytes was determined by spectrophotometric measurement of released hemoglobin at 405 nm. For inhibition with UspA1 and UspA2, 10 % serum was preincubated with 100 nM of recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and/ or

10 UspA2³⁰⁻⁵³⁹ proteins for 30 min at 37°C, and thereafter added to the erythrocytes at 0 to 4 %.

Isolation of polymorphonuclear leukocytes and phagocytosis

Human polymorphonuclear leukocytes (PMN) were isolated from fresh blood of healthy volunteers using macrodex

15 (Pharmalink AB, Upplands Väsby, Sweden). The PMN were centrifuged for 10 min at 300g, washed in PBS and resuspended in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley, Scotland). The bacterial suspension (0.5 x 10⁸) was opsonized with 3 % of either NHS or NHS-EDTA, or 20 µg of

20 purified C3met for 15 min at 37°C. After washes, bacteria were mixed with PMN (1 x 10⁷ cells/ml) at a bacteria/PMN ratio of 10:1 followed by incubation at 37°C with end-over-end rotation. Surviving bacteria after 0, 30, 60, and 120 min of incubation was determined by viable counts. The

25 number of engulfed NHS-treated bacteria was compared with bacteria phagocytosed in the absence of NHS. *S. aureus* opsonized with NHS was used as positive control.

Examples and results

Interaction between *M. catarrhalis* and fibronectin

30 *M. catarrhalis* devoid of UspA1 and A2 does not bind soluble or immobilized fibronectin.

We selected a random series of *M. catarrhalis* clinical strains (n=13) (table 7) and tested them for fibronectin binding in relation to their UspA1/A2 expression by flow

35 cytometry analysis. High UspA1/A2 expression as determined

54

48

by high mean fluorescence intensity (MFI) was correlated to UspA1/A2 expression (Pearson correlation coefficient 0.77, $P < 0.05$) (figure 1A). However, to discriminate between UspA1 and A2 expression was not possible with our anti-UspA1/A2 pAb. Moreover, the presence of UspA2H protein contributing to the binding was unlikely as the *uspA2H* gene was not found in the strains used in this study (data not shown).

Two *M. catarrhalis* isolates (BBH18 and RH4) and their specific mutants lacking UspA1, UspA2 or both proteins were also analyzed by flow cytometry. *M. catarrhalis* BBH18 strongly bound fibronectin with a mean fluorescence intensity (MFI) of 96.1 (figure 1F). In contrast, BBH18 Δ uspA1 showed a decreased fibronectin binding with an MFI of 68.6 (figure 1G). Fibronectin binding to BBH18 Δ uspA2 and the double mutant BBH18 Δ uspA1/A2 revealed an MFI of only 10.7 and 11.5, respectively (figure 1H, 1I). Similar results were obtained with UspA1/A2 mutants of the clinical strain *M. catarrhalis* RH4. Taken together, these results suggest that UspA1 and A2 bound fibronectin and that the ability of the bacteria to bind fibronectin strongly depended on UspA1/A2 expression.

To further analyze the interaction between fibronectin and *M. catarrhalis*, ^{125} I-labeled fibronectin was incubated with two clinical *M. catarrhalis* isolates (BBH18 and RH4) and their respective mutants. The wild type *M. catarrhalis* RH4 strongly bound ^{125} I-fibronectin while the corresponding Δ uspA1 mutant showed 80 % binding of the wild type. In contrast, the Δ uspA2 and double mutant bound ^{125} I-fibronectin at 14 % and 12 %, respectively, which was just above the background levels (5.0 to 10 %) (figure 2). Similar results were obtained with *M. catarrhalis* BBH18 and the corresponding UspA1/A2 mutants. Thus, our results suggest that both UspA1 and A2 are required for the maximal binding of soluble fibronectin by *M. catarrhalis*.

To investigate the bacterial attachment to immobilized fibronectin, *M. catarrhalis* RH4 and its corresponding Δ uspA1/A2 mutants were applied onto fibronectin coated glass slides. After 2 h of incubation, slides were washed, and subsequently Gram stained. *M. catarrhalis* wild type and the Δ uspA1 mutant were found to strongly adhere to the fibronectin coated glass slides (figure 3A and 3B). In contrast, *M. catarrhalis* Δ uspA2 and Δ uspA1/A2 double mutants weakly adhered to the fibronectin coated glass slide with only a few bacteria left after washing (figure 3C and 3D, respectively). Experiments with another *M. catarrhalis* clinical isolate (BBH18) and its derived mutants showed a similar pattern indicating that UspA2 was of major importance for *M. catarrhalis* binding to immobilized fibronectin.

The fibronectin binding domains include amino acid residues located between 299 and 452 of UspA1 and between 165 and 318 of UspA2

To further analyze the interactions of UspA1 and A2 with fibronectin, truncated UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ were recombinantly produced in *E. coli*, coated on microtiter plates and incubated with increasing concentrations of fibronectin. Bound fibronectin was detected with an anti-human fibronectin pAb followed by incubation with a horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit pAb. Both recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ bound soluble fibronectin and the interactions were dose-dependent (figure 4).

To define the fibronectin-binding domain of UspA1, recombinant proteins spanning the entire molecule of UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ were manufactured. Fibronectin was incubated with the immobilized UspA1 proteins fragments and the interactions were quantified by ELISA. UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ bound fibronectin almost as efficiently as UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ suggesting that the binding domain was within this part of the protein. Among the other

56

50

truncated fragments, UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² efficiently bound fibronectin (figure 5A). In parallel, the interactions between fibronectin and several recombinant UspA2 fragments including amino acids UspA2³⁰⁻⁵³⁹ were analyzed. The two fragments UspA2¹⁰¹⁻³¹⁸ and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ strongly bound fibronectin (figure 5B). Our findings provide significant evidence that the binding domains include residues found within UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. A sequence comparison between these two binding fragments revealed that the 31 amino acid residues "DQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLK" were identical for UspA1 and A2 (figure 6). Moreover, this repeat sequence was also found in the *uspA1* and *A2* gene of *M. catarrhalis* BBH18 and RH4 (data not shown).
UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ and UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² fragments competitively inhibit *M. catarrhalis* fibronectin binding

To further validate our findings on the UspA1/A2 fibronectin binding domains, recombinant truncated UspA1 proteins were tested for their capacity to block fibronectin binding to *M. catarrhalis*. Fibronectin (2 µg) was pre-incubated with 0.25 µmoles of recombinant UspA1 fragments and subsequently incubated with *M. catarrhalis*. Finally, *M. catarrhalis* UspA-dependent fibronectin binding was measured by flow cytometry. Pre-incubation with UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ and UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² resulted in decreased fibronectin binding with a 95 % reduction for UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ and a 63 % reduction for UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² (figure 7). When fibronectin was pre-incubated with the truncated UspA2¹⁰¹⁻³¹⁸, an inhibition of 50% was obtained.

Thus, the fibronectin binding domains of UspA1 and A2 block the interactions between fibronectin and *M. catarrhalis*.
UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ inhibit *M. catarrhalis* adherence to Chang epithelial cells

Epithelial cells are known to express fibronectin and many bacteria attach to epithelial cells via cell-associated

fibronectin.[46, 54, 69, 77] Previous studies have shown that *M. catarrhalis* adhere to epithelial cells.[43, 49] We analyzed Chang conjunctival cells, which have frequently been used in adhesion experiments with respiratory pathogens.

- 5 Chang cells strongly expressed fibronectin as revealed by flow cytometry analysis (figure 8A).

To analyze whether the UspA-dependent fibronectin binding was important for bacterial adhesion, Chang epithelial cells were pre-incubated with anti-human
10 fibronectin pAb, or the recombinant proteins UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. Thereafter, *M. catarrhalis* RH4 was added and bacterial adhesion analyzed. The relative adherence (measured by the number of colony forming units) after pre-incubation with 0.4 μ moles per 200 μ l of UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵²,
15 UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, or an anti-human fibronectin pAb were 36 %, 35 % and 32%, respectively. Higher concentrations of recombinant peptides did not result in further inhibition. In contrast, the non-fibronectin binding fragments UspA1⁴³³⁻⁵⁸⁰ and UspA2³⁰⁻¹⁷⁷ did not inhibit the interactions between *M. catarrhalis*
20 and the Chang epithelial cells (figure 8B). Thus, fibronectin on Chang epithelial cells may function as a receptor for *M. catarrhalis* and the amino acid residues 299-452 of UspA1 and 165-318 of UspA2 contain the ligand responsible for the interactions.

25 Interaction between *M. catarrhalis* and laminin
M. catarrhalis binds laminin through UspA1 and A2

Two clinical *M. catarrhalis* isolates (BBH18 and RH4) and their specific mutants lacking UspA1, UspA2 or both proteins were analyzed by a whole-cell ELISA. *M. catarrhalis*
30 RH4 strongly bound to immobilized laminin.(figure 9A). In contrast, *M. catarrhalis* RH4 uspA1 mutant (RH4 Δ uspA1) showed a laminin binding of 89.9% of the wild type. *M. catarrhalis* RH4 uspA2 mutant (RH4 Δ uspA2) and the double mutant RH4 Δ uspA1/A2 15.2% and 18.1% binding capacity of the wild
35 type, respectively. This was not significantly different

58

52

from the residual adhesion to BSA coated plates. Similar results were obtained with UspA1/A2 mutants originating from the clinical strain *M. catarrhalis* BBH18. In these two strains (BBH18 and RH4), UspA2 is the predominant protein expressed as compared to UspA1, explaining the minimal difference in binding between the wild type and RH4 Δ uspA1. Taken together, these results show that UspA1 and A2 bound laminin.

To further analyze the binding between UspA1/A2 and laminin, truncated UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ were produced in *E. coli*. Recombinant proteins were coated on microtiter plates and incubated with increasing concentrations of laminin. Bound laminin was detected with a rabbit anti-laminin pAb followed by incubation with an HRP-conjugated anti-rabbit pAb. Both recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ strongly bound soluble laminin and the binding was dose-dependent and saturable (figure 9B).

To define the laminin binding domains, recombinant UspA1 and A2 spanning the entire molecules were manufactured. Laminin was incubated with immobilized truncated UspA1 and A2 fragments and followed by quantification by ELISA. UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ bound to laminin almost as efficiently as UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ suggesting that the binding domain was within this part of the protein. However, among the other truncated fragments spanning this region, no other fragment appeared to bind laminin. The N-terminal part, UspA2³⁰⁻³⁵¹, was able to retain 44.7 % binding capacity as compared to the full length protein. The shorter protein UspA2³⁰⁻¹⁷⁷ showed a 43.7 % binding capacity. (figure 10B). These results show that the binding domains include residues found within the N-terminals of both UspA1 and UspA2.

Interaction between *M. catarrhalis* and C3 and C3met
M. catarrhalis outer membrane proteins UspA1 and UspA2
inhibit both the classical and the alternative pathway of
the complement cascade

UspA2 surface expression is crucial for *M. catarrhalis* survival in normal human serum (NHS) [1, 58], i.e., moraxella UspA2 deficient mutants are rapidly killed when exposed to NHS. We have recently shown that both UspA1 and A2 bind C4BP and thus might inhibit the classical pathway of complement activation [58]. To further shed light on *M. catarrhalis* interactions with the complement system, survival of UspA1/A2 double mutants was studied in serum treated with either EGTA with addition of $MgCl_2$ (Mg-EGTA) or EDTA. Mg-EGTA inhibits the classical and lectin pathways and thus allows separate analysis of the alternative pathway. In contrast, EDTA inhibits all complement pathways by absorbing divalent cations (Mg^{2+} and Ca^{2+}). The *M. catarrhalis* RH4 wild type survived after 30 min of incubation, whereas RH4 Δ UspA1/A2 double mutant was killed by intact NHS after 10 min (Fig. 12). When the classical pathway was inhibited (NHS + Mg-EGTA), the RH4 Δ UspA1/A2 mutant survived for a significantly longer period of time as compared to NHS without any chelators, but not as long as the wild type bacterium. Furthermore, when both the classical and alternative pathways were blocked with EDTA, *M. catarrhalis* RH4 Δ UspA1/A2 survived. A similar pattern was obtained with the *M. catarrhalis* BBH18 isolate and the corresponding BBH18 Δ UspA1/A2 mutants (not shown). In parallel, experiments with Clq and factor D/ properdin deficient sera demonstrated that both the classical and the alternative pathways were inhibited by *M. catarrhalis* (not shown). Thus, *M. catarrhalis*, a pathogen that frequently colonizes the human respiratory tract, does not only counteract the classical pathway but also the alternative pathway of the complement system by the outer membrane proteins UspA1 and A2.

M. catarrhalis absorbs C3 from EDTA-inactivated serum

C3b covalently binds to the surface of a microbe and hence induces the alternative pathway (Fig. 11B). To analyze whether *M. catarrhalis* can interact with C3, our RH4 wild

type strain was incubated with NHS or NHS treated with EDTA. Binding or deposition (via covalent link) of C3/ C3b at the bacterial surface of *M. catarrhalis* RH4 was detected by flow cytometry analysis with a polyclonal antibody (pAb) directed against C3d recognizing both C3 and C3b. Incubation of bacteria with NHS containing intact complement led to deposition of C3 (Fig. 13). Interestingly, when the complement cascade was inactivated in the presence of EDTA, the *M. catarrhalis* RH4 still bound C3 (Fig. 13A). *Streptococcus pneumoniae* that was included for comparison did not absorb C3 from the EDTA-treated serum (Fig. 13B). In contrast to pneumococci, *M. catarrhalis* thus bound C3 irrespectively of complement activation. The internal thioester of C3 is spontaneously hydrolysed in fluid phase to C3(H₂O). Thus, intact C3 or C3(H₂O) was the most likely forms of C3 interacting with *M. catarrhalis*. Since *M. catarrhalis* also binds C4BP [58], we wanted to exclude that C4BP was involved in the C3 binding and for that purpose we used C4BP depleted serum. *M. catarrhalis* absorbed C3 from the C4BP depleted serum to the same extent as to NHS (not shown).

Binding of C3met to *M. catarrhalis* is dose-dependent and non-covalent

Our experiments implied that C3 bound to the surface of *M. catarrhalis* irrespectively of complement activation. Therefore, we analyzed whether converted C3, which is non-functional, could bind to the bacteria. Native C3 was purified from human serum and treated with methylamine, which converts C3 to a C3met molecule equivalent to C3b without the capacity to covalently bind to microbes (Fig. 11C). Flow cytometry analysis revealed that the *M. catarrhalis* RH4 wild type strain efficiently bound C3met in a dose-dependent and saturable manner (Fig. 14A and B). This interaction was not mediated by the C3a part of the C3 molecule since C3b and C3(H₂O) also bound *M. catarrhalis*

(not shown). The binding between *M. catarrhalis* RH4 and C3met was based to a large extent on ionic interactions as increasing concentrations of NaCl inhibited the interaction (Fig. 14C). Similar results were obtained with the *M.*

5 *catarrhalis* BBH18 wild type strain (not shown).

To determine whether the binding of C3 is a general feature of all *M. catarrhalis* strains, we selected a random series of clinical isolates (n=13) and analyzed their capacity to bind C3met. All *M. catarrhalis* strains bound C3met as revealed by a flow cytometry analysis with an anti-C3d pAb. The mfi values varied from 4 to 39. However, *S. pneumoniae* and *E. coli* that were included for comparison did not bind C3met.

M. catarrhalis is a unique C3 and C3met binding bacterium

15 To extend our analysis of bacterial C3 absorption from NHS, related moraxella subspecies (n=13) as well as common human pathogens (n=13) were incubated in the presence of NHS-EDTA. Interestingly, among all the bacterial species tested, *M. catarrhalis* was the only bacterium binding C3 in complement-inactivated serum (Table 9). All related moraxella strains as well as the other human pathogens were also analyzed for binding of C3met. In parallel with the C3 binding, *M. catarrhalis* was the only species that bound C3met. Taken together, *M. catarrhalis* has a unique feature to strongly bind C3 and C3met in a non-covalent manner.

M. catarrhalis binds C3met via the outer membrane proteins UspA1 and UspA2

To determine the *M. catarrhalis* protein responsible for the C3 binding, we tested a series of bacterial mutants devoid of the outer membrane proteins MID, UspA1 and/ or UspA2 [22, 58]. Interestingly, the binding of C3met was significantly correlated with Usp expression (Fig. 15). *M. catarrhalis* RH4 Δ mid bound C3met to the same degree as the wild type counterpart (Fig. 15A-B). The RH4 Δ uspA1 mutant showed only a slightly decreased binding, whereas the

62

56

RH4ΔuspA2 was a weaker binder as compared to the wild type counterpart (Fig. 15C-D). In parallel, C3met binding to the double RH4ΔuspA1/A2 mutant was completely abolished (Fig. 15E). Furthermore, when the same experiments were performed using NHS-EDTA, the same pattern was seen (Fig. 15F-J). When normal human serum was used, all mutants showed similar amount of C3 on their surface since it was a mixture of covalent deposition and binding of C3 (Fig. 15K-O). Similar results were obtained with the *M. catarrhalis* BBH18 isolate and the corresponding BBH18 mutants.

To further analyze the interaction between C3 and UspA1/A2, UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ were produced in *E. coli* and purified. The recombinant proteins were dot blotted onto a nitrocellulose membrane followed by incubation with iodine-labelled C3met. Recombinant MID⁹⁶²⁻¹²⁰⁰, which is derived from the *M. catarrhalis* outer membrane protein MID [59], was included as a negative control. A weak binding to UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ was detected, whereas [¹²⁵I]-C3met strongly bound to UspA2³⁰⁻⁵³⁹ (Fig. 16A). These findings were further strengthened using surface plasmon resonance (i.e., Biacore). UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ were immobilized on the surface of a CM5 chip using amino coupling and C3met was injected until saturation was reached. The K_D for the interaction between C3met and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ or UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ was 3 and 14 μM, respectively. In conclusion, we found that UspA2 was the major C3met-binding protein of *M. catarrhalis*, whereas UspA1 contributed to the binding to a lower degree. A C3 binding domain is located between amino acid residues 200 and 458 of UspA2.

To define the C3 binding domain of UspA2, recombinant proteins spanning the entire UspA2³⁰⁻⁵³⁹ molecule were manufactured. C3met was incubated with the immobilized full length UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹ and a series of truncated UspA2 proteins. Thereafter, the interactions were quantified by ELISA. In agreement with the dot blot experiments (Fig.

57

16A), UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ bound C3met to a much lower extent compared to UspA2³⁰⁻⁵³⁹ in the ELISA (Fig. 16B). Among the truncated protein fragments, UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, UspA2²⁰⁰⁻⁵³⁹ and UspA2³⁰²⁻⁴⁵⁸ efficiently bound C3met, suggesting that a binding domain was within the amino acid residues 200 and 458.

Recombinant UspA1/ A2 neutralizes C3 activity

In order to in detail examine the role of UspA1/A2-dependent inhibition of the alternative pathway, a series of flow cytometry experiments was performed with bacteria incubated with 10 % NHS or serum that had been preincubated with 100 nM recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹. Interestingly, a significantly decreased C3 deposition/ binding at the surface of *M. catarrhalis* RH4ΔuspA1/A2 was observed when NHS was pretreated with UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ (Fig. 17A). When the classical pathway was shut down with Mg-EGTA, similar results were obtained (Fig. 17B). Thus, the recombinant proteins UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ absorbed C3 from NHS and inhibited deposition/ binding of C3.

To determine whether absorption of C3 by recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ increased bacterial survival, the double mutant *M. catarrhalis* RH4ΔuspA1/A2 was incubated with serum supplemented with UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ followed by determination of the number of surviving bacteria. Mg-EGTA was included in the reactions in order to inhibit the classical pathway. Interestingly, addition of recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and UspA2³⁰⁻⁵³⁹ to NHS prevented killing of the UspA1/A2 deficient *M. catarrhalis* (Fig. 17C). UspA2³⁰⁻⁵³⁹ was most efficient in inhibiting bacterial killing as compared to UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰. When both recombinant proteins were supplemented together, no additional inhibition of the alternative pathway was detected. Ten % NHS correspond to approximately 600 nM C3. To investigate whether more UspA1 molecules could neutralize the C3 activity, UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ and/ or UspA2³⁰⁻⁵³⁹ up to 600 nM was added. However, higher

64

58

concentrations of the recombinant proteins did not further increase the inhibition (not shown).

We also included an alternative pathway haemolytic assay consisting of rabbit erythrocytes and NHS in order to establish the role of UspA1 and A2 as inhibitors of the alternative pathway. NHS was preincubated with recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹, or both proteins together followed by addition to the erythrocytes. After 1 h incubation, the amount of erythrocyte lysis was determined. Interestingly, a significantly decreased haemolysis was observed when NHS was preincubated with UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ or UspA2³⁰⁻⁵³⁹ as compared to untreated NHS (Fig. 18). In parallel with the increased survival of bacteria in the presence of UspA2³⁰⁻⁵³⁹ or UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ (Fig. 17C), preincubation with UspA2³⁰⁻⁵³⁹ alone resulted in a more efficient inhibition of the alternative pathway as compared to when NHS was preincubated with UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰. In conclusion, recombinant UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ or UspA2³⁰⁻⁵³⁹ interfered with the activity of the alternative pathway due to their ability to capture C3.

In addition of being a key molecule in the complement cascade, deposited C3b and iC3b (inactivated C3b) target microbes for removal in the process of opsonophagocytosis. To investigate whether C3 or C3met that was non-covalently bound at the surface of *M. catarrhalis* could still function as an opsonin, a series of phagocytosis experiments was performed. *M. catarrhalis* was preincubated with C3met, NHS or NHS treated with EDTA followed by addition of polymorphonuclear leukocytes. Interestingly, *M. catarrhalis* was not engulfed in the presence of C3met, whereas NHS strongly promoted phagocytosis (data not shown). However, when NHS was pretreated with EDTA, *M. catarrhalis* was not phagocytosed by polymorphonuclear leukocytes. Thus, C3/C3met was inactive at the *M. catarrhalis* cell surface and did not function as an opsonin.

Discussion

65

Interaction between *M. catarrhalis* and fibronectin

UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ from the clinical *M. catarrhalis* strain Bc5 were the shortest fragments that still bound fibronectin. Interestingly, longer fragments encompassing the amino acid sequence found within UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ displayed a more efficient binding to fibronectin (figure 5A and B). This may mean that these two regions represent partial binding domains or that the binding site is highly dependent on a specific molecular structure. UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ share a sequence of 31 identical amino acid residues including the 23 residues "NNINNIYELAQQDQHSSDIKTL" (NNINNIY sequence). This sequence contains the epitope for the protective monoclonal antibody (mAb) 17C7 for which there is universal reactivity.[2, 50, 30] In a mouse model, passive immunization with mAb 17C7 provided protection and improved pulmonary clearance of *M. catarrhalis*. [30] It is hence most interesting that UspA1/A2 fibronectin binding domains contain these residues and argues for the importance of this region in the pathogenesis of *M. catarrhalis* respiratory tract infection.

The fibronectin binding *M. catarrhalis* BBH18 and RH4 used in our experiments also carry the 31 amino acid residues in their UspA1/A2 protein. Most *M. catarrhalis* have a part of this sequence (i.e., the NNINNIY sequence). However, strains like the O35E which has the NNINNIY sequence in their UspA2 gene do not express a fibronectin binding UspA2 protein.[49] A likely explanation would be that the variations in the flanking regions might affect the interaction with fibronectin. Also, the conserved NNINNIY sequence itself can have minor single amino acid base changes.[28] It is thus likely that fibronectin binding would depend not just on UspA1/A2 expression, but also on the individual makeup of each UspA protein. Interestingly, an almost identical amino acid sequence can be found in the hybrid UspA2H protein with adhesive properties (*M.*

66

60

catarrhalis TTA37 and O46E).[43] This give support to our findings that the 31 amino acid sequence is important in adhesion.

In our last set of experiments, we tested whether the adherence of *M. catarrhalis* to Chang conjunctival cells could be inhibited by the fibronectin binding fragments (UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸) (figure 8B). Preincubation with UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵², UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ or an anti-fibronectin pAb resulted in decreased binding to Chang epithelial cells. These results confirm the importance of these binding domains in the interactions of UspA1/A2 with Chang epithelial cells and further suggest that fibronectin is an important receptor for UspA. In addition, it is known that FnBP facilitate the adherence of bacteria to undifferentiated and injured airways.[54, 69] Fibronectin expression by lung fibroblasts is also increased by cigarette smoke extract.[87] The role of *M. catarrhalis* UspA1/A2 binding to ECM fibronectin or epithelial cell-associated fibronectin is thus of great importance in patients with COPD and may explain the common occurrence of *M. catarrhalis* infection in this group of patients.[40]

In conclusion, we have shown that UspA1/A2 of *M. catarrhalis* BBH18, RH4 and Bc5 are crucial FnBP. Both recombinant UspA1 and A2 derived from Bc5 bind fibronectin with a binding domain sharing identical amino acid residues including the conserved NNINNIY sequence. Furthermore, an interaction of *M. catarrhalis* UspA1/A2 with epithelial cells is via cell-associated fibronectin. The definition of these fibronectin binding domains is therefore an important step forward in the development of a vaccine against *M. catarrhalis*.

Interaction between *M. catarrhalis* and laminin

M. catarrhalis is a common cause of infectious exacerbations in patients with COPD. The success of this species in patients with COPD is probably related in part to

67

61

its large repertoire of adhesins. In addition, there are pathological changes such as loss of epithelial integrity with exposure of basement membrane where the laminin layer itself is thickened in smokers.[4] Some pathogens have been shown to be able to bind to laminin and thus may contribute to their ability to adhere to such damaged and denuded mucosal surfaces. These include pathogens known to cause significant disease in the airways such as *S. aureus* and *P. aeruginosa* amongst others.[7, 63]

10 We recently showed that both UspA1 and A2 bind fibronectin.[78] The fibronectin binding domains were located within UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. In this study, the N-terminal halves UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ and UspA2³⁰⁻³⁵¹ (containing the fibronectin domains) also bound laminin. However, the smallest fragments that bound fibronectin, UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² and UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ did not bind laminin to any appreciable extent. In fact, fragments smaller than the N-terminal half of UspA1 (UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹) losses all its laminin binding ability whereas with UspA2, only UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ bound laminin albeit at a lower level than the whole recombinant protein (UspA2³⁰⁻⁵³⁹). These findings suggest that perhaps different parts of the molecules might have different functional roles.

25 Comparing the smallest laminin binding regions of UspA1 and A2, we find that there is, however, little similarity by way of amino acid homology between UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ and UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ (data not shown). This is not surprising as it is a known fact that both proteins have a 'lollipop'-shaped globular head structure despite having only 22% identity in both N-terminal halves.[2, 32] We postulate that a tertiary structure is likely responsible for the interactions with laminin in the head region in vivo. The localization of the binding domains at the N-terminal end would be logical as this would be most exposed and in contact with the human basement membrane in vivo.

Bacterial factors mediating adherence to tissue and extracellular matrix (ECM) components are grouped together in a single family named "microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules" (MSCRAMMS). Since
5 UspA1/A2 bind both fibronectin and laminin, these proteins can be designated MSCRAMMS. Our results suggest that UspA1 and A2 are multifunctional adhesins with different domains interacting with different ligands in the respiratory tract. Similar broad-spectrum binding profiles have been reported
10 for other bacterial proteins such as YadA of *Yersinia enterocolitica* for which UspA1 and A2 bear a structural relationship. [45, 70] YadA too binds both fibronectin and laminin. [32]

In summary we have shown that UspA1/A2 are crucial to
15 *M. catarrhalis* interaction with the basement membrane glycoprotein laminin and this will play an important role in the pathogenesis of infections in patients with COPD. [74]
Interaction between *M. catarrhalis* and C3 and C3met

Complement resistance is one of the most important
20 bacterial virulence factors.[66] The majority (89 %) of *M. catarrhalis* isolates from patients with lower respiratory tract infections are resistant to complement-mediated killing.[34] *M. catarrhalis* UspA1 and A2 are crucial for bacterial survival in human serum in vivo [1, 15], and we
25 have shown that these two outer membrane proteins bind to the complement fluid phase regulator of the classical pathway, C4BP.[58] In the present study, we demonstrate that *M. catarrhalis* can inhibit the alternative pathway by non-covalently binding of C3 (Figs. 17 and 18). The binding of
30 C3 most likely also inhibits the classical pathway. This could, however, not be analysed in detail since *M. catarrhalis* also binds C4BP. Interestingly, the *M. catarrhalis*-dependent C3-binding is unique as several related moraxella subspecies as well as common human
35 pathogenic bacteria do not bind C3 (Table 9). The

interactions with C3 and methylamine-treated C3 are mediated mainly by UspA2, whereas UspA1 has a minor role (Figs. 15 and 16). The C3-binding region of UspA2 was localized between the amino acid residues 200 to 458. This region
5 contains a stretch of 140 amino acid residues that is 93 % identical to a region in UspA1.[2] However, despite this sequence similarity, UspA1 binds C3 to a much lower extent. This might be due to a specific difference in conformation between the proteins. The discrepancy in the C3 binding of
10 UspA1 and UspA2 stands in contrast to the UspA1/A2 interaction with C4BP.[58]

M. catarrhalis is equally resistant to both the classical and alternative pathways (Fig. 12B). The bacterium binds C4BP that inhibits the classical pathway [58] and in
15 this paper we demonstrate an interaction with the alternative pathway through binding of C3. To determine which of these mechanisms that is of most importance for the *M. catarrhalis* serum resistance in various in vivo situations is difficult. For example, the importance of the
20 classical pathway will strongly depend on history of infections with *M. catarrhalis* and ability to generate complement-activating antibodies. However, every mechanism providing protection from the complement is certainly beneficial for a pathogen. Since C3 is a key molecule in the
25 complement system, the binding of C3 most likely results in regulation of all three activation pathways and may contribute the most to serum resistance.

The importance of the complement system as a primary defence mechanism is mirrored by the fact that microbes have
30 developed various strategies to interfere with and/ or neutralize components of the complement system.[42, 35, 88] In addition to *M. catarrhalis*, *S. pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *E. coli* K1, *Candida albicans*, and *N. gonorrhoeae* express specific surface molecules that bind C4BP and as a
35 consequence protect the bacteria against the classical

complement pathway.[8, 9, 52, 58, 64, 65, 80] In addition to inhibition of the classical pathway, several bacteria (e.g., *C. albicans*, *N. meningitides*, *S. pyogenes*, and *S. pneumoniae*; for reviews see [68, 89] bind factor H and factor H-like molecule and hence are partially protected against the alternative complement pathway.

UspA1 and A2 absorb C3 from serum and hereby most likely inhibit the complement activation. Similarly, the Pneumococcal Surface Protein A (PspA) appears to inhibit the alternative pathway both in vitro and in vivo. PspA is an important virulence factor for *S. pneumoniae*. PspA-deficient pneumococcal strains are readily cleared from the blood, whereas the PspA-expressing strains survive.[82] Furthermore, in a murine model of bacteremia, PspA-deficient pneumococci have a significantly reduced virulence compared with pneumococci that express PspA.[11] It has been demonstrated that more C3b is deposited on PspA-negative pneumococci than on PspA-positive.[67, 82] Thus, expression of PspA reduces the complement-mediated clearance and phagocytosis of *S. pneumoniae* by limiting opsonization by C3b.[12, 67] PspA-deficient pneumococci that are not virulent in normal mice become virulent in C3-deficient and factor B-deficient mice.[82]

To our knowledge, there are only two examples of bacterial proteins that non-covalently bind C3 and thereby interfere with complement function. The first one is the extracellular fibrinogen-binding protein (Efb) of *Staphylococcus aureus*, which was found to bind C3b.[44] Efb inhibits both the classical and alternative pathways independently of the thioester conformation, i.e., the binding to C3b is non-covalent. The second example is the pneumococcal choline-binding protein (CbpA), which has been shown to bind methylamine-treated C3, suggesting a non-covalent interaction that is not dependent on complement activation.[16] CbpA is a component of the pneumococcal cell

71

65

wall, but may only bind C3 when the CbpA is secreted. In order to test this hypothesis, which is not firmly established in the literature, we analyzed eleven different pneumococcal isolates for C3 binding (methylamine-treated C3 or NHS-EDTA) by flow cytometry (Fig. 12B and Table 9). No bound C3 could be detected on the surface of *S. pneumoniae*. When lysates of *S. pneumoniae* and culture supernatants were analyzed on Western blots using methylamine-treated C3 followed by an anti-human C3 pAb, we confirmed the results by Cheng and collaborators [16] (not shown). In the light of Efb and CbpA, which both are C3-binding proteins secreted by two Gram-positive bacteria, the Gram-negative *M. catarrhalis* is a unique species with membrane anchored proteins that bind C3 and inhibit the alternative pathway at the surface of the bacterium.

The yeast *Candida albicans* has been shown to bind C3b, iC3b and C3d. However, C3b is bound at a considerably lower affinity than iC3b and C3d.[29] We found a large difference between C3 binding to *M. catarrhalis* and *C. albicans* (not shown); despite that candida bound C3met (56 % positive cells), the mean fluorescence intensity (mfi) was only < 2.0 as compared to mfi 36.9 for *M. catarrhalis*. Furthermore, no detectable binding was seen when *C. albicans* was incubated with EDTA-treated serum. Two C3d-binding proteins have been isolated from *C. albicans* and the most characterized protein is a 60 kDa mannoprotein that initially was recognized by an antibody directed against human complement receptor 2 (CD21).[13] However, *M. catarrhalis* UspA1 and A2 were not recognized by a polyclonal antibody directed against CD21 (not shown). In parallel with staphylococci and pneumococci [52, 64], a secreted C3d-binding protein from *C. albicans* also exists.[72] Finally, a *C. albicans* iC3b receptor has been isolated and is structurally similar to human CR3 (CD11b).[3] The mechanisms by which these receptors may participate in pathogenesis are not fully known.

The above examples of C3 binding pathogens are notably different from *M. catarrhalis* in that these species often are blood stream isolates. *M. catarrhalis* is mucosal pathogen with rare instances of bacteremic infections.

5 Hence, the binding and inactivating C3 most likely occur at the mucosal surface. This is supported by the fact that there is strong ongoing complement activation and consequent inflammation in disease state such as acute otitis media.[57] The complement proteins are believed to be

10 transported to the mucosal surface due to exudation of plasma.[26, 62] In middle-ear effusions (MEEs) from children for example, strongly elevated concentrations of C3 products can also be found.[51] In addition, complement factors in

15 MEEs fluid have been shown to be important in the bactericidal activity against other mucosal agents such as non-typable *H. influenzae*. [75] *M. catarrhalis* is a strict human pathogen. It does not cause diseases such as otitis media or pneumonia in animals. A mouse pulmonary clearance model and an otitis media model with chinchilla has been

20 used at several occasions. However, neither otitis media nor pneumonia develops and bacteria are rapidly cleared .[19, 83] It is thus difficult to test the biological significance of bacterial C3 binding in vivo. Since UspA1 and A2 are multifunctional proteins [1, 15, 31, 43, 58, 78], it would

25 be impossible to relate any differences in the clearance of *M. catarrhalis* to C3 binding. In particular the fact that UspA1 is an important adhesin of *M. catarrhalis* and binds both CEACAM1 and fibronectin [31, 78] would most likely affect the clearance. Nevertheless, due to the strong

30 complement activation in disease states such as otitis media, moraxella-dependent binding of C3 may represent an important way of combating the mucosal defense.

The fact that *M. catarrhalis* hampers the human immune system in several ways might explain why *M. catarrhalis* is

35 such a common inhabitant of the respiratory tract [73]. In

67

conclusion, *M. catarrhalis* has developed sophisticated ways of combating both the humoral and innate immune systems. The present data show that *M. catarrhalis* has a unique C3-binding capacity at the bacterial cell surface that cannot
5 be found in other bacterial species.

74

References

1. Aebi C, Lafontaine ER, Cope LD, et al. Phenotypic
5 effect of isogenic uspA1 and uspA2 mutations on
Moraxella catarrhalis 035E. Infect Immun 1998;66:3113-
9.
2. Aebi C, Maciver I, Latimer JL, et al. A protective
epitope of Moraxella catarrhalis is encoded by two
10 different genes. Infect Immun 1997;65:4367-77.
3. Alaei, S., C. Larcher, C. Ebenbichler, W. M. Prodinger,
J. Janatova, and M. P. Dierich. 1993. Isolation and
biochemical characterization of the iC3b receptor of
Candida albicans. Infect. Immun. 61:1395-1399.
- 15 4. Amin K, Ekberg-Jansson A, Lofdahl CG and Venge P.
Relationship between inflammatory cells and structural
changes in the lungs of asymptomatic and never smokers:
a biopsy study. Thorax 2003;58:135-42.
5. Attia AS, Lafontaine ER, Latimer JL, Aebi C,
20 Syrogiannopoulos GA and Hansen EJ. The UspA2 protein of
Moraxella catarrhalis is directly involved in the
expression of serum resistance. Infect Immun
2005;73:2400-10.
6. Bartos LC, Murphy TF. Comparison of the outer membrane
25 proteins of 50 strains of Branhamella catarrhalis. J
Infect Dis 1988; 158:761-5.
7. de Bentzmann S, Tristan A, Etienne J, Brousse N,
Vandenesch F and Lina G. Staphylococcus aureus isolates
associated with necrotizing pneumonia bind to basement
30 membrane type I and IV collagens and laminin. J Infect
Dis 2004;190:1506-15.
8. Berggård, K., E. Johnsson, F.R. Mooi, and G. Lindahl.
1997. Bordetella pertussis binds the human complement
regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin.
35 Infect. Immun. 65:3638-3643.

75

9. Blom, A. M., A. Rytönen, P. Vasquez, G. Lindahl, B. Dahlbäck, and A. B. Jonsson. 2001. A novel interaction between type IV pili of *Neisseria gonorrhoeae* and the human complement regulator C4B-binding protein. *J. Immunol.* 166:6764-6770.
10. Bootsma HJ, van der Heide HG, van de Pas S, Schouls LM and Mooi FR. Analysis of *Moraxella catarrhalis* by DNA typing: evidence for a distinct subpopulation associated with virulence traits. *J Infect Dis* 2000;181:1376-87.
11. Briles, D. E., J. Yother, L. S. McDaniel. 1988. Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* 10:(Suppl. 2):S372.
12. Briles, D. E., S. K. Hollingshead, E. Swiatlo, A. Brooks-Walter, A. Szalai, A. Virolainen, L. S. McDaniel, K. A. Benton, P. White, K. Prellner, A. Hermansson, P. C. Aerts, H. Van Dijk, and M. J. Crain. 1997. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb. Drug Resist.* 3:401-408.
13. Calderone, R. A., L. Linehan, E. Wadsworth, and A. L. Sandberg. 1988. Identification of C3d receptors on *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 56:252-258.
14. Catlin BW. *Branhamella catarrhalis*: an organism gaining respect as a pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:293-320.
15. Chen D, Barniak V, VanDerMeid KR and McMichael JC. The levels and bactericidal capacity of antibodies directed against the UspA1 and UspA2 outer membrane proteins of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* in adults and children. *Infect Immun* 1999;67:1310-6.
16. Cheng, Q., D. Finkel, and M. K. Hostetter. 2000. Novel purification scheme and functions for a C3-binding

- protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem.* 39:5450-5457.
17. Cope LD, Lafontaine ER, Slaughter CA, et al. Characterization of the *Moraxella catarrhalis* uspA1 and
5 uspA2 genes and their encoded products. *J Bacteriol* 1999;181:4026-34.
18. De Saint Jean M, Baudouin C, Di Nolfo M, et al. Comparison of morphological and functional
10 characteristics of primary-cultured human conjunctival epithelium and of Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival cell line. *Exp Eye Res* 2004;78:257-74.
19. Fulghum , R. S., and H. G. Marrow. 1996. Experimental otitis media with *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 105:234-241.
- 15 20. Forsgren, A., and A. Grubb. 1979. Many bacterial species bind human IgD. *J. Immunol* 122:1468-1472.
21. Forsgren A, Brant M, Mollenkvist A, et al. Isolation and characterization of a novel IgD-binding protein from *Moraxella catarrhalis*. *J Immunol* 2001;167:2112-20.
- 20 22. Forsgren A, Brant M, Karamahmedovic M and Riesbeck K. The immunoglobulin D-binding protein MID from *Moraxella catarrhalis* is also an adhesin. *Infect Immun* 2003; 71:3302-9.
23. Forsgren A, Brant M and Riesbeck K. Immunization with
25 the truncated adhesion moraxella catarrhalis immunoglobulin D-binding protein (MID764-913) is protective against *M. catarrhalis* in a mouse model of pulmonary clearance. *J Infect Dis* 2004;190:352-5.
24. Gjørloff-Wingren, A., R. Hadzic, A. Forsgren, and K.
30 Riesbeck. 2002. A novel IgD-binding bacterial protein from *Moraxella catarrhalis* induces human B lymphocyte activation and isotype switching in the presence of Th2 cytokines. *J. Immunol.* 168:5582-5588.

77

25. Greenwood FC, Hunter WM and Glover JS. The Preparation of I-131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. *Biochem J* 1963;89:114-23.
26. Greiff, D., I. Erjefält, C. Svensson, P. Wollmer, U. Alkner, M. Andersson, and C. G. Persson. 1993. Plasma exudation and solute absorbtion across the airway mucosa. *Clin. Physiol.* 13: 219-233.
27. Hanski E, Caparon M. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6172-6.
28. Hays JP, van der Schee C, Loogman A, et al. Total genome polymorphism and low frequency of intra-genomic variation in the *uspA1* and *uspA2* genes of *Moraxella catarrhalis* in otitis prone and non-prone children up to 2 years of age. Consequences for vaccine design? *Vaccine* 2003;21:1118-24.
29. Heidenreich, F., and M. P. Dierich. 1985. *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. *Infect. Immun.* 50:598-600.
30. Helminen ME, Maciver I, Latimer JL, et al. A large, antigenically conserved protein on the surface of *Moraxella catarrhalis* is a target for protective antibodies. *J Infect Dis* 1994;170:867-72.
31. Hill DJ, Virji M. A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Mol Microbiol* 2003;48:117-29.
32. Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A and Heesemann J. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* 2000;19:5989-99.

78

33. Holm MM, Vanlerberg SL, Foley IM, Sledjeski DD and Lafontaine ER. The *Moraxella catarrhalis* porin-like outer membrane protein CD is an adhesin for human lung cells. *Infect Immun* 2004;72:1906-13.
- 5 34. Hol, C., C. M. Verduin, E. E. Van Dijke, J. Verhoef, A. Fleer, H. van Dijk. 1995. Complement resistance is a virulence factor of *Branhamella (Moraxella) catarrhalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 11:207-211.
- 10 35. Hornef, M. W., M. J. Wick, M. Rhen, and S. Normark. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 3:1033-1040.
- 15 36. Hostetter, M. K., M. L. Thomas, F. S. Rosen, and B. F. Tack. 1982. Binding of C3b proceeds by a transesterification reaction at the thiolester site. *Nature* 298:72-75.
- 20 37. Hostetter, M. K., R. A. Krueger, and D. J. Schmeling. 1984. The biochemistry of opsonization: central role of the reactive thiolester of the third component of complement. *J. Infect. Dis.* 150:653-661.
38. Joh D, Wann ER, Kreikemeyer B, Speziale P and Hook M. Role of fibronectinbinding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol* 1999;18:211-23.
- 25 39. Joh HJ, House-Pompeo K, Patti JM, Gurusiddappa S and Hook M. Fibronectin receptors from gram-positive bacteria: comparison of active sites. *Biochemistry* 1994;33:6086-92.
- 30 40. Karalus R, Campagnari A. *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes Infect* 2000;2:547-59.
- 35 41. Kask, L., L.A. Trouw, B. Dahlback, and A. M. Blom. 2004. The C4b-binding protein-protein S complex inhibits the phagocytosis of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 279:23869-23873.

79

42. Lachmann, P. J. 2002. Microbial subversion of the immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:8461-8462.
43. Lafontaine ER, Cope LD, Aebi C, Latimer JL, McCracken GH, Jr. and Hansen EJ. The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. *J Bacteriol* 2000;182:1364-73.
44. Lee, L. Y. L., M. Höök, D. Haviland, R. A. Wetsel, E. O. Yonter, P. Syribeys, J. Vernachio, and E. L. Brown. 2004. Inhibition of complement activation by secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J. Infect. Dis.* 190:571-579.
45. Mack D, Heesemann J and Laufs R. Characterization of different oligomeric species of the *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein YadA. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1994;183:217-27.
46. Maheshwari RK, Kedar VP, Bhartiya D, Coon HC and Kang YH. Interferon enhances fibronectin expression in various cell types. *J Biol Regul Homeost Agents* 1990;4:117-24.
47. McGavin MJ, Gurusiddappa S, Lindgren PE, Lindberg M, Raucchi G and Hook M. Fibronectin receptors from *Streptococcus dysgalactiae* and *Staphylococcus aureus*. Involvement of conserved residues in ligand binding. *J Biol Chem* 1993;268:23946-53.
48. McMichael JC. Vaccines for *Moraxella catarrhalis*. *Vaccine* 2000;19 Suppl 1:S101-7.
49. McMichael JC, Fiske MJ, Fredenburg RA, et al. Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. *Infect Immun* 1998;66:4374-81.
50. Meier PS, Troller R, Grivea IN, Syrogiannopoulos GA and Aebi C. The outer membrane proteins UspA1 and UspA2 of *Moraxella catarrhalis* are highly conserved in

- nasopharyngeal isolates from young children. *Vaccine* 2002;20:1754-60.
51. Meri, S., T. Lehtinen, and T. Palva. 1984. Complement in chronic secretory otitis media. C3 breakdown and C3 splitting activity. *Arch. Otolaryngol.* 110:774-778.
52. Meri, T., A. M. Blom, A. Hartmann, D. Lenk, S. Meri, P. F. Zipfel. 2004. The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein. *Infect. Immun.* 72:6633-6641.
53. Mollenkvist A, Nordstrom T, Hallden C, Christensen JJ, Forsgren A and Riesbeck K. The *Moraxella catarrhalis* immunoglobulin D-binding protein MID has conserved sequences and is regulated by a mechanism corresponding to phase variation. *J Bacteriol* 2003;185:2285-95.
54. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, et al. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun* 2002;70:620-30.
55. Murphy TF. *Branhamella catarrhalis*: epidemiology, surface antigenic structure, and immune response. *Microbiol Rev* 1996;60:267-79.
56. Murphy TF, Brauer AL, Aeby C and Sethi S. Identification of surface antigens of *Moraxella catarrhalis* as targets of human serum antibody responses in chronic obstructive pulmonary disease. *Infect Immun* 2005;73:3471-8.
57. Närkiö-Mäkelä, M., J. Jero, and S. Meri 1999. Complement activation and expression of membrane regulators in the middle ear mucosa in otitis media with effusion. *Clin. Exp. Immunol.* 116:401-409.
58. Nordstrom T, Blom AM, Forsgren A and Riesbeck K. The emerging pathogen *Moraxella catarrhalis* Interacts with complement inhibitor C4b binding protein through ubiquitous surface proteins A1 and A2. *J Immunol* 2004;173:4598-606.

81

59. Nordstrom T, Forsgren A and Riesbeck K. The immunoglobulin D-binding part of the outer membrane protein MID from *Moraxella catarrhalis* comprises 238 amino acids and a tetrameric structure. *J Biol Chem* 2002;277:34692-9.
60. Nordstrom T, Blom AM, Tan TT, Forsgren A and Riesbeck K. Ionic binding of C3 to the human pathogen *Moraxella catarrhalis* is a unique mechanism for combating innate immunity. *J Immunol* 2005; MS#05-2213, in press.
61. Pearson MM, Lafontaine ER, Wagner NJ, St Geme JW, 3rd and Hansen EJ. A hag mutant of *Moraxella catarrhalis* strain O35E is deficient in hemagglutination, autoagglutination, and immunoglobulin D-binding activities. *Infect Immun* 2002;70:4523-33.
62. Persson, C. G., I. Erjefält, U. Alkner, C. Baumgarten, L. Greiff, B. Gustafsson, A. Luts, U. Pipkorn, F. Sundler, C. Svensson et al. 1991. Plasma exudation as a first line respiratory mucosal defence. *Clin. Exp. Allergy* 21: 17-24.
63. Plotkowski MC, Tournier JM and Puchelle E. *Pseudomonas aeruginosa* strains possess specific adhesins for laminin. *Infect Immun* 1996;64:600-5.
64. Prasadaraao, N. V., A. M. Blom, B. O. Villoutreix, and L. C. Linsangan. 2002. A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1. *J. Immunol.* 169:6352-6360.
65. Ram, S., M. Cullinane, A. M. Blom, S. Gulati, D. P. McQuillen, B. G. Monks, C. O'Connell, R. Boden, C. Elkins, M. K. Pangburn, B. Dahlback, and P. A. Rice. 2001. Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.* 193:281-296.
66. Rautemaa, R., and S. Meri. 1999. Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes Infect.* 1:785-94.

67. Ren, B., A. J. Szalai, S. K. Hollingshead, D. E. Briles. 2004. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect. Immun.* 72:114-122.
- 5 68. Rodríguez de Córdoba, S., J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa, and P. Sánchez-Corral. 2004. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol. Immunol.* 41:355-367.
- 10 69. Roger P, Puchelle E, Bajolet-Laudinat O, et al. Fibronectin and alpha5beta1 integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. *Eur Respir J* 1999;13:1301-9.
- 15 70. Roggenkamp A, Ackermann N, Jacobi CA, Truelzsch K, Hoffmann H and Heesemann J. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* 2003;185:3735-44.
- 20 71. Rozalska B, Wadstrom T. Protective opsonic activity of antibodies against fibronectin-binding proteins (FnBPs) of *Staphylococcus aureus*. *Scand J Immunol* 1993;37:575-80.
- 25 72. Saxena, A., and R. Calderone. 1990. Purification and characterization of the extracellular C3d-binding protein of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 58:309-314.
73. Schwarz-Linek U, Werner JM, Pickford AR, et al. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature* 2003;423:177-81.
- 30 74. Sethi, S., and T. F. Murphy. 2001. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:336-363.
75. Shimizu, T., T. Harada, Y. Majima, and Y. Sakakura. 1988. Bactericidal activity of middle ear effusion on a

- single isolate of non-typable *Haemophilus influenzae*.
Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 16:211-217.
76. Tack, B. F., R. A. Harrison, J. Janatova, M. L. Thomas,
and J. W. Prahl. 1980. Evidence for presence of an
5 internal thiolester bond in third component of human
complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 5764-
5768.
77. Talay SR, Valentin-Weigand P, Jerlstrom PG, Timmis KN
and Chhatwal GS. Fibronectin-binding protein of
10 *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain
involved in adherence of streptococci to epithelial
cells. *Infect Immun* 1992;60:3837-44.
78. Tan, T. T., T. Nordström, A. Forsgren, and K. Riesbeck.
2005. The Respiratory Pathogen *Moraxella catarrhalis*
15 Adheres to Epithelial Cells by Interacting with
Fibronectin through Ubiquitous Surface Proteins A1 and
A2. *J. Infect. Dis.*, MS# 33893, in press.
79. Tenner, A. J., P. H. Lesavre, and N. R. Cooper. 1981.
Purification and radiolabeling of human C1q. *J.*
20 *Immunol.* 127:648-653.
80. Thern, A., L. Stenberg, B. Dahlbäck, and G. Lindahl.
1995. Ig-binding surface proteins of *Streptococcus*
pyogenes also bind human C4b-binding protein (C4BP), a
regulatory component of the complement system. *J.*
25 *Immunol.* 154:375-386.
81. Timpe JM, Holm MM, Vanlerberg SL, Basrur V and
Lafontaine ER. Identification of a *Moraxella*
catarrhalis outer membrane protein exhibiting both
adhesin and lipolytic activities. *Infect Immun*
30 2003;71:4341-50.
82. Tu, A. H., R. L. Fulgham, M. A. McCrory, D. E. Briles,
A. J. Szalai. 1999. Pneumococcal surface protein A
inhibits complement activation by *Streptococcus*
pneumoniae. *Infect. Immun.* 67:4720.

83. Unhanand, M., I. Maciver, O. Ramilo, O. Arencibia-Mireles, J. C. Argyle, G. H. McCracken Jr, and E. J. Hansen. 1992. Pulmonary clearance of *Moraxella catarrhalis* in an animal model. *J. Infect. Dis.* 165:644-650.
84. Verduin CM, Hol C, Fleer A, van Dijk H and van Belkum A. *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:125-44.
85. Walport, M. J. 2001. Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344:1058-1066.
86. Walport, M. J. 2001. Complement. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344:1140-1144.
87. Wang H, Liu X, Umino T, et al. Effect of cigarette smoke on fibroblast-mediated gel contraction is dependent on cell density. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L205-13.
88. Wurzner, R. 1999. Evasion of pathogens by avoiding recognition or eradication by complement, in part via molecular mimicry. *Mol. Immunol.* 36:249-260.
89. Zipfel, P. F., C. Skerka, J. Hellwage, S. T. Jokiranta, S. Meri, V. Brade, P. Kraiczy, M. Noris, and G. Remuzzi. 2001. Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 30:971-978.



CLAIMS

1. Peptide consisting of Sequence ID No. 1, or a
5 fragment, homologue, functional equivalent, derivative,
degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation
product or other secondary processing product thereof.
2. Peptide consisting of Sequence ID No. 2, or a
10 fragment, homologue, functional equivalent, derivative,
degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation
product or other secondary processing product thereof.
3. Peptide consisting of Sequence ID No. 3, or a
15 fragment, homologue, functional equivalent, derivative,
degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation
product or other secondary processing product thereof.
4. Peptide consisting of Sequence ID No. 4, or a
20 fragment, homologue, functional equivalent, derivative,
degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation
product or other secondary processing product thereof.
5. Peptide consisting of Sequence ID No. 5, or a
25 fragment, homologue, functional equivalent, derivative,
degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation
product or other secondary processing product thereof.
6. Peptide consisting of Sequence ID No. 6, or a
30 fragment, homologue, functional equivalent, derivative,
degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation
product or other secondary processing product thereof.
7. Peptide consisting of Sequence ID No. 7, or a
35 fragment, homologue, functional equivalent, derivative,
degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation
product or other secondary processing product thereof.
8. Peptide consisting of Sequence ID No. 8, or a
fragment, homologue, functional equivalent, derivative,
degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation
product or other secondary processing product thereof.

9. Peptide consisting of Sequence ID No. 9, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof.

5 10. Peptide consisting of Sequence ID No. 10, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof.

10 11. Use of at least one peptide according to any one of claims 1 to 10 for the production of a medicament for the treatment or prophylaxis of an infection.

12. Use according to claim 11, wherein the infection is caused by *Moraxella catarrhalis*.

15 13. Use according to claim 11 or 12, for the prophylaxis or treatment of otitis media, sinusitis or lower respiratory tract infections.

20 14. A ligand comprising a fibronectin binding domain, said ligand consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of Sequence ID No. 1 to Sequence ID No. 3, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof.

25 15. A ligand comprising a laminin binding domain, said ligand consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of Sequence ID No. 4 to Sequence ID No. 8, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof.

30 16. A ligand comprising a C3 or C3met binding domain, said ligand consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of Sequence ID No. 4, Sequence ID No. 6, Sequence ID No. 9 and Sequence ID No. 10, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative,

87

81

degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof.

17. A medicament comprising one or more ligands according to any one of claims 14 to 16 and one or more
5 pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles, excipients, binders, carriers, or preservatives.

18. A vaccine comprising one or more ligands according to any one of claims 14 to 16 and one or more
10 pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles, excipients, binders, carriers, or preservatives.

19. A method of treating or preventing an infection in an individual comprising administering a pharmaceutically effective amount of a medicament or a vaccine according to claim 17 or 18.

15 20. A method according to claim 19, wherein the infection is caused by *Moraxella catarrhalis*.

21. A nucleic acid sequence encoding a ligand, protein or peptide of the present invention, as well as homologues, polymorphisms, degenerates and splice variants thereof.

20 22. A polypeptide or a polypeptide truncate comprising at least one of the conserved sequences of Sequence ID No 1 to Sequence ID No 3 with the ability of binding fibronectin.

23. A polypeptide or a polypeptide truncate comprising at least one of the conserved sequences of Sequence ID No 4
25 to Sequence ID No 8 with the ability of binding laminin.

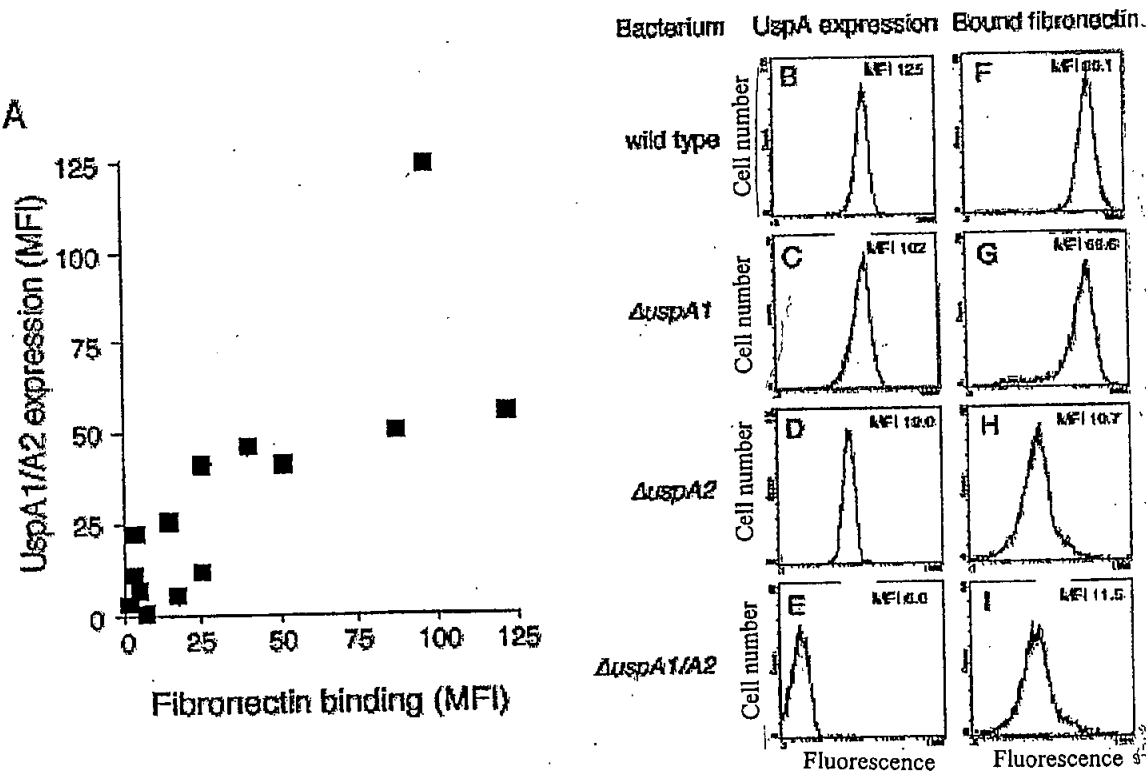
24. A polypeptide or a polypeptide truncate comprising at least one of the conserved sequences of Sequence ID No 4, 6, 9, and 10, with the ability of binding C3 and/or C3met.

25. A vaccine composition comprising an effective
30 amount of UspA1 and/or UspA2 in combination with an effective amount of protein MID and one or more pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles, excipients, binders, carriers, or preservatives.

26. Use of an effective amount of UspA1 and/or UspA2 in
35 combination with an effective amount of protein MID for the

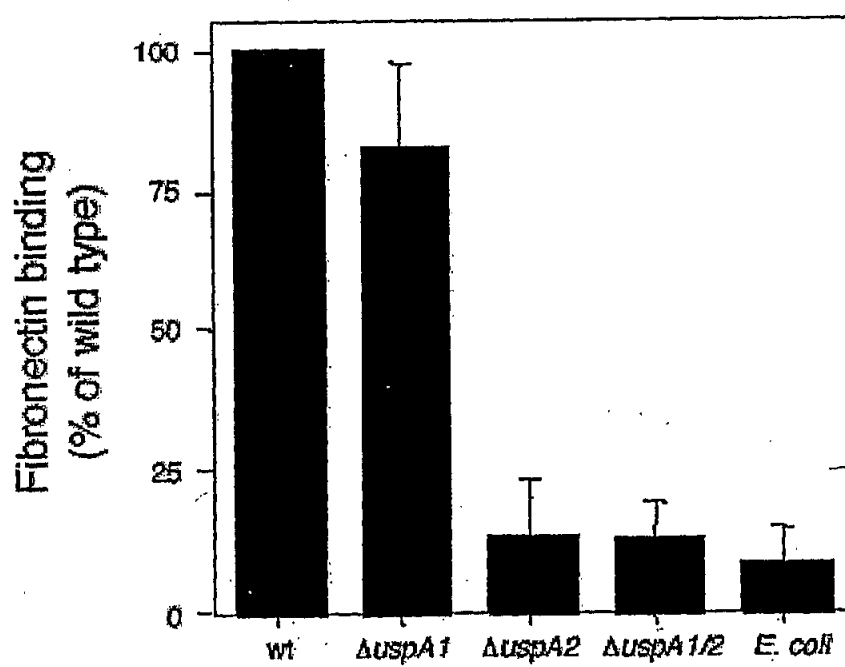
89

Figure 1



90

Figure 2



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Figure 3

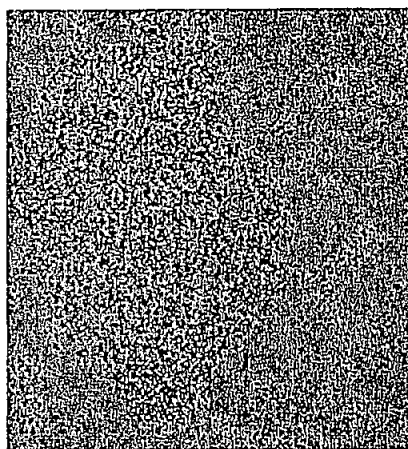
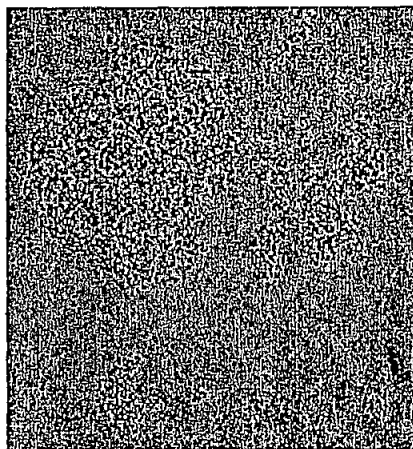
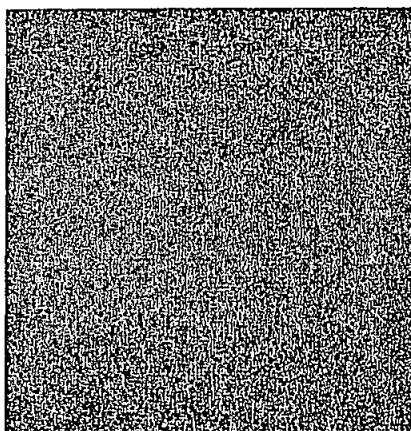
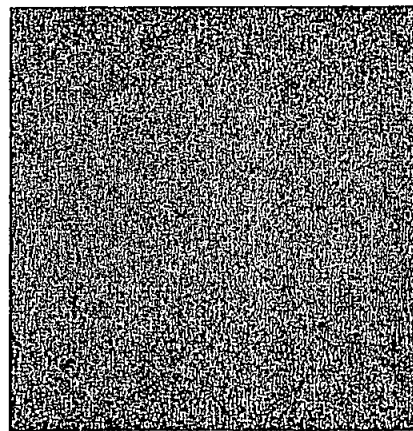
A. *M. catarrhalis* wild typeB. $\Delta uspA1$ mutantC. $\Delta uspA2$ mutantD. $\Delta uspA1/A2$ double mutant

Figure 4

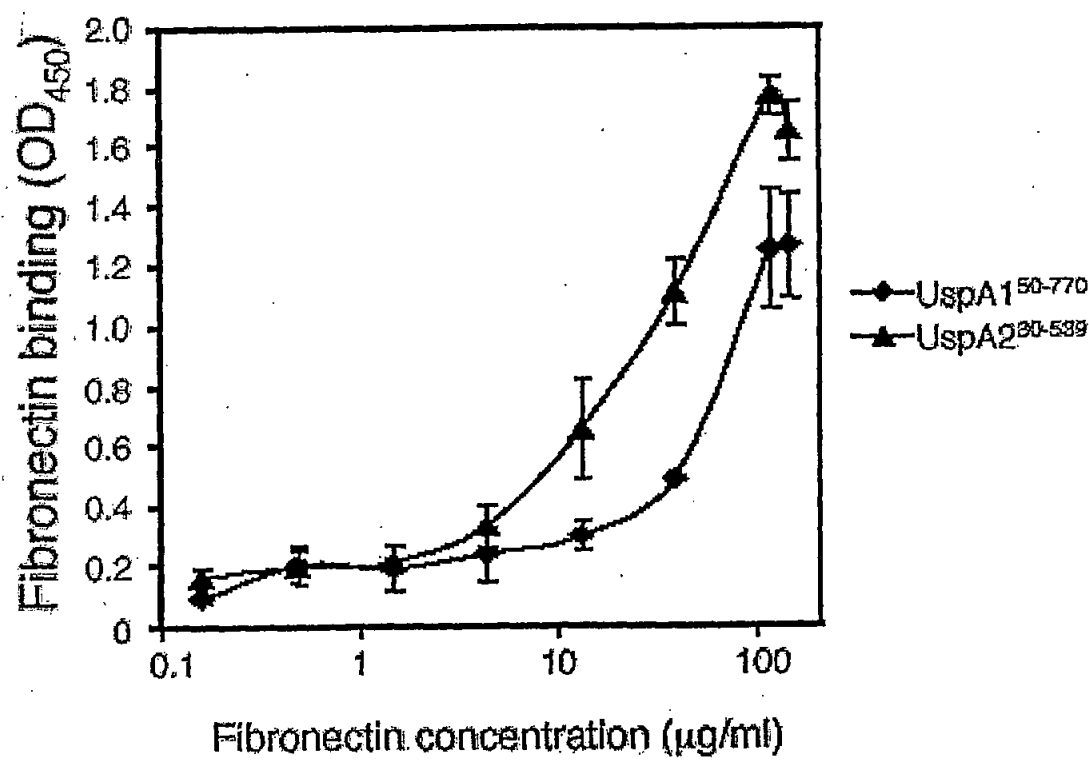
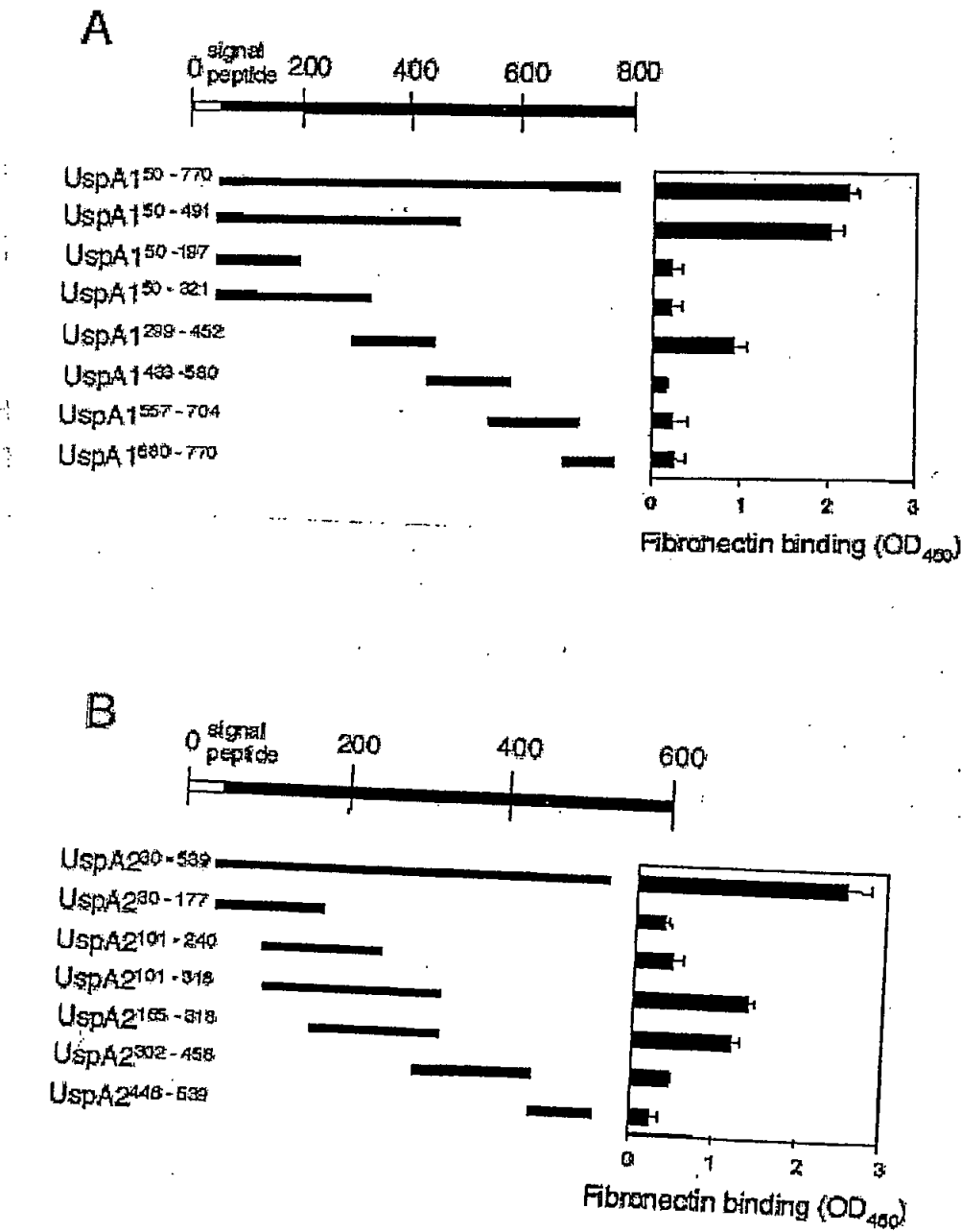


Figure 5



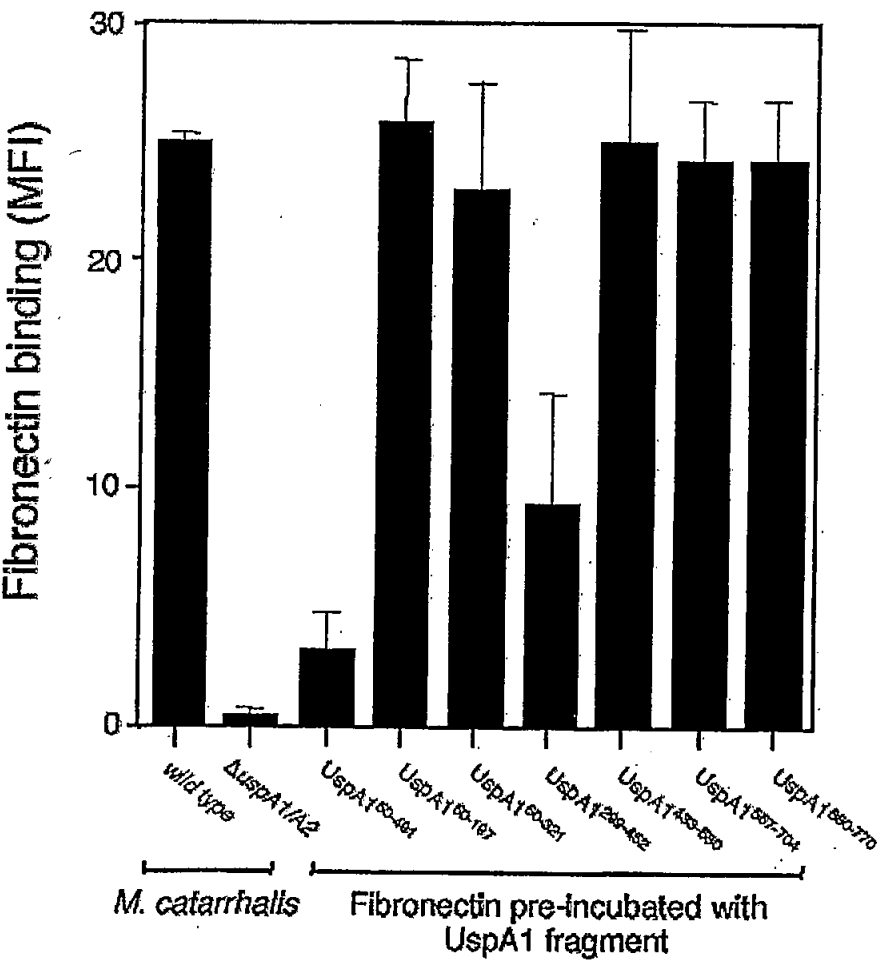
94

Figure 6

UspA1 299-452	TGNGTVSVGKKGKERQIVHVGAGRISDTST
UspA2 165-318	- -KDAIAKNNESIED-LYDFGH-EVAES - -
UspA1 299-452	DAYNGSQLHVLATVVAQNKADIKDLDDRYG
UspA2 165-318	- - -IG-EIHAHN - -EAQNET - - - -LK - - -G
UspA1 299-452	LLGEEINSLEGEIFNNQDAIAKNQADIKTL
UspA2 165-318	LI - - -TNSIE - -NTNN - - -ITKNKADIQAL
UspA1 299-452	ESNVEEGLLDLSGRLLDQKADIDNNINNIY
UspA2 165-318	KNNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIY
UspA1 299-452	ELAQQDQHS SDIKTLKNNVEEGLLDLSGR
UspA2 165-318	ELAQQDQHS SDIKTLKKNVEEGLLELSDH
UspA1 299-452	LIDQ - - - - - - - - - - - - - - - -
UspA2 165-318	IIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAAQ
UspA1 299-452	-
UspA2 165-318	K

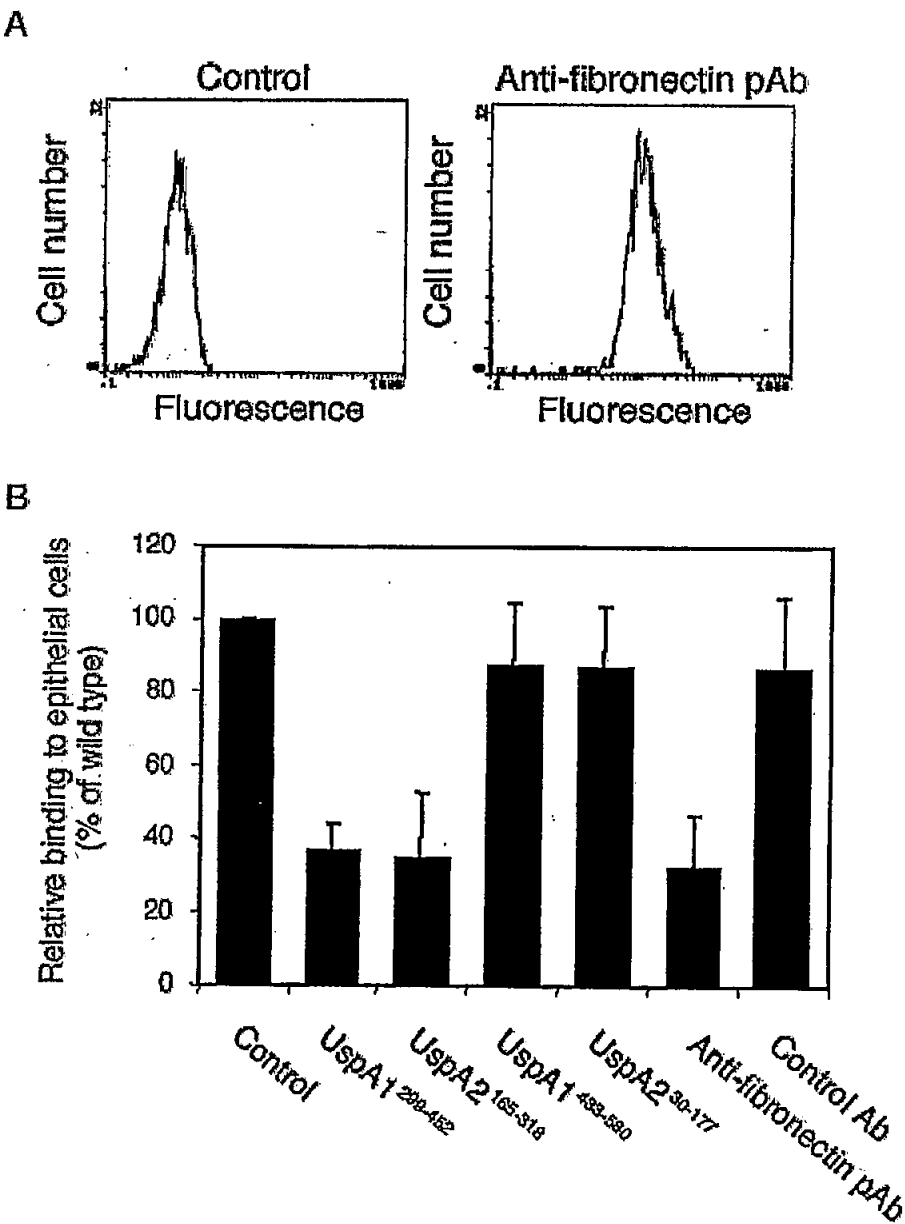
95

Figure 7



96

Figure 8



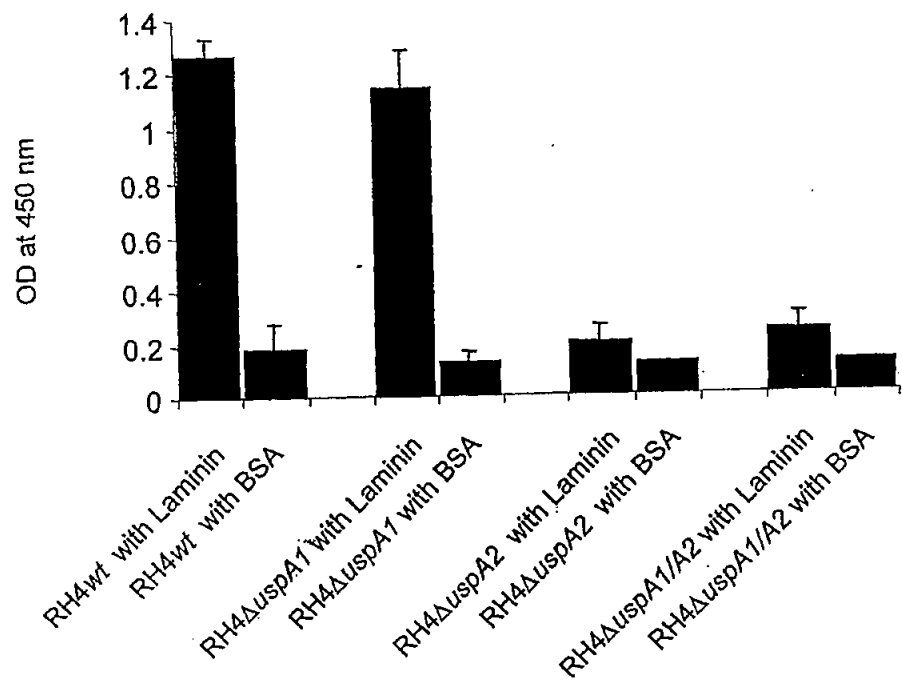


Figure 9A.

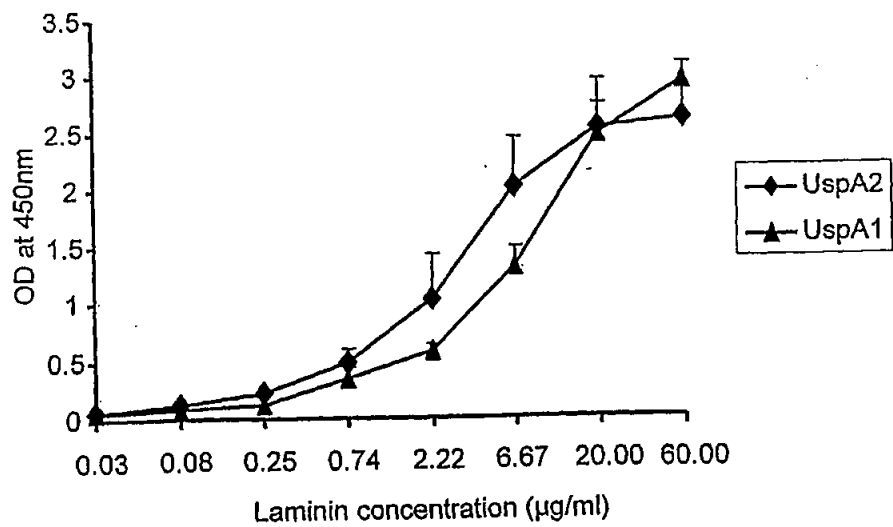


Figure 9B.

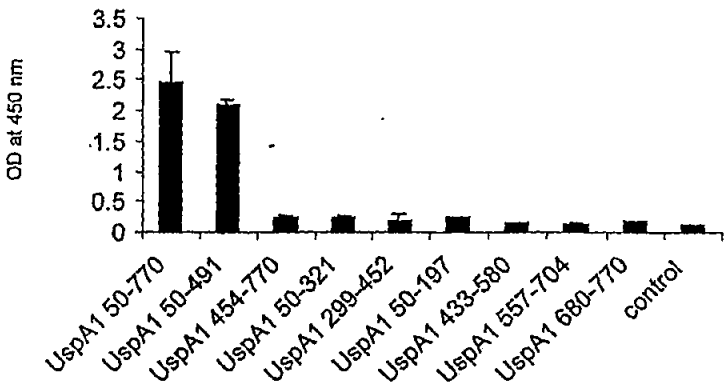


Figure 10A.

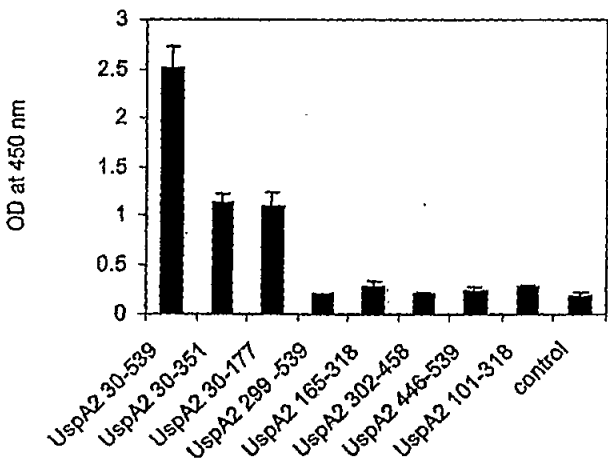
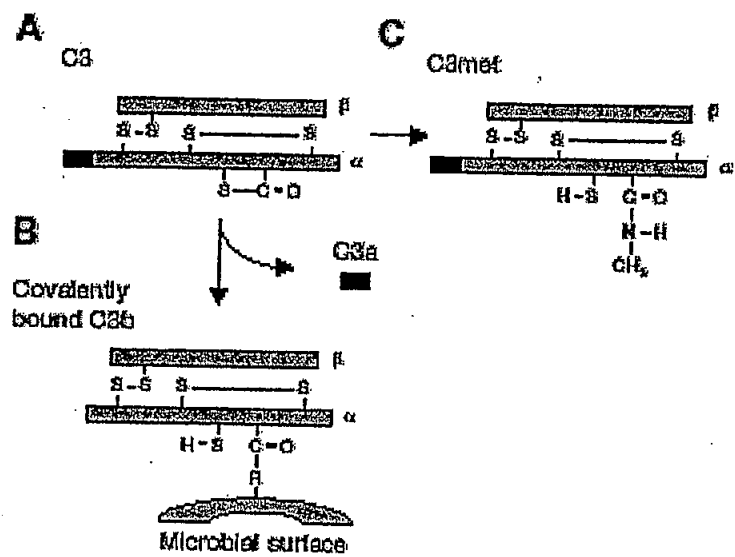


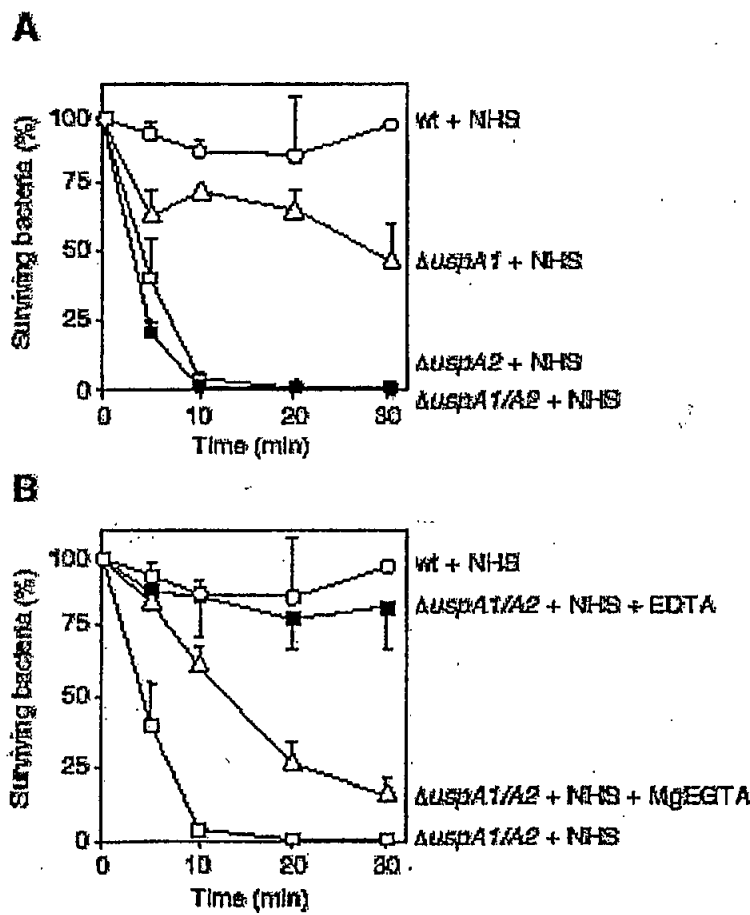
Figure 10B.

Figure 11



100

Figure 12



101

Figure 13

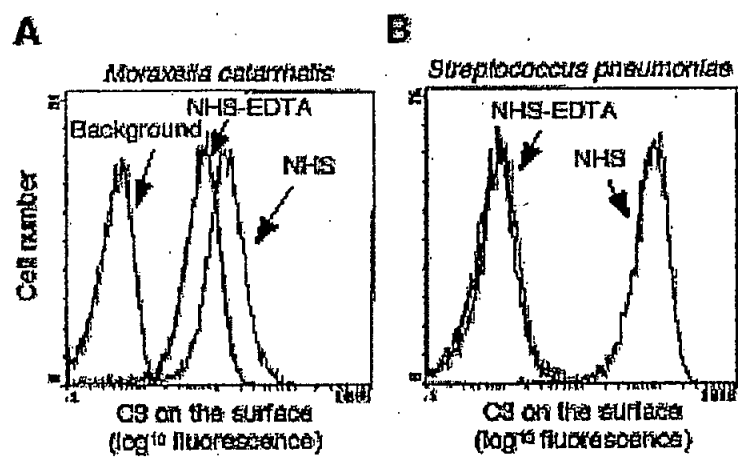


Figure 14

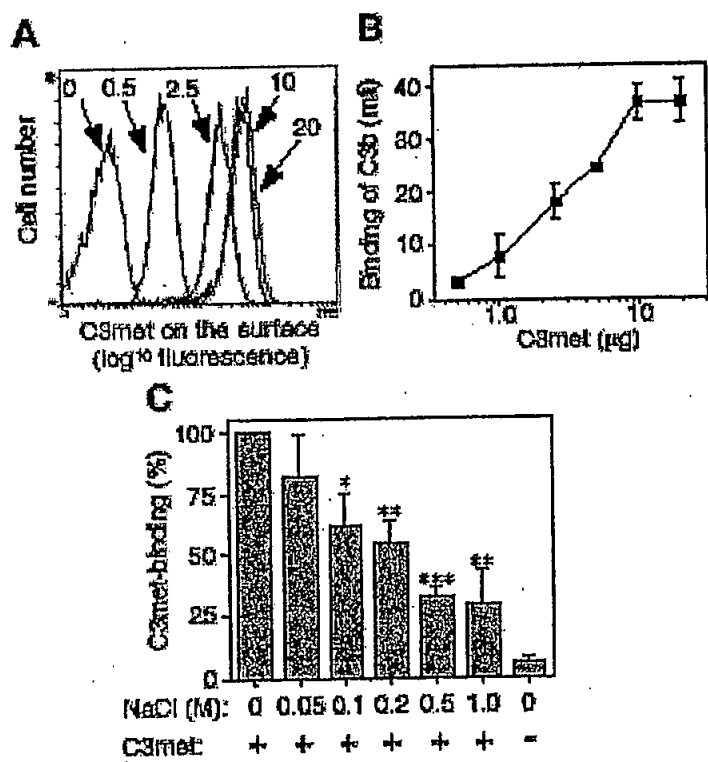
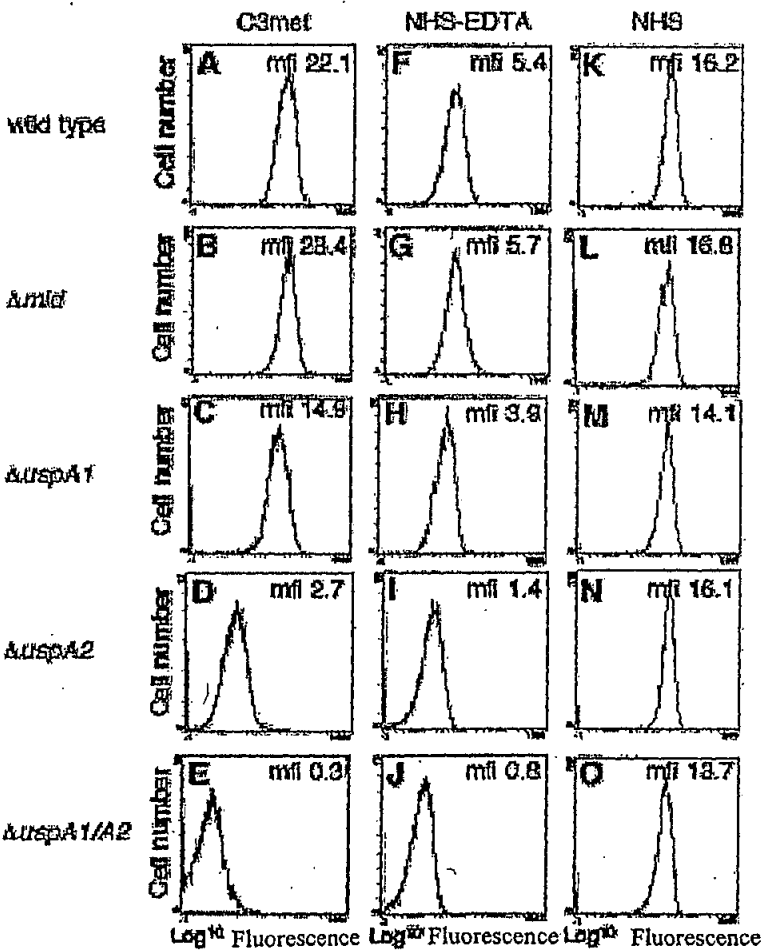
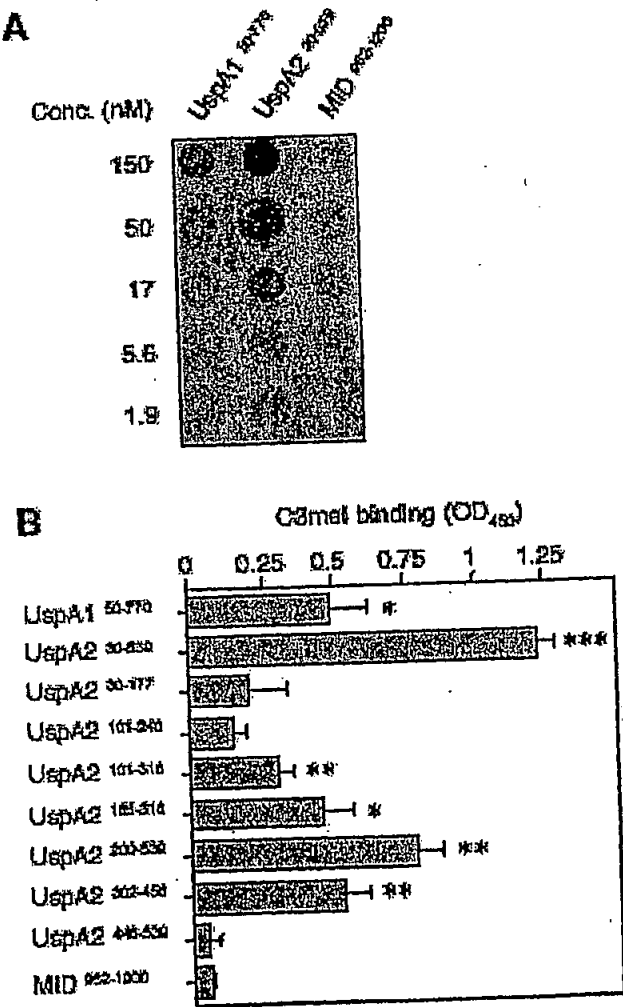


Figure 15



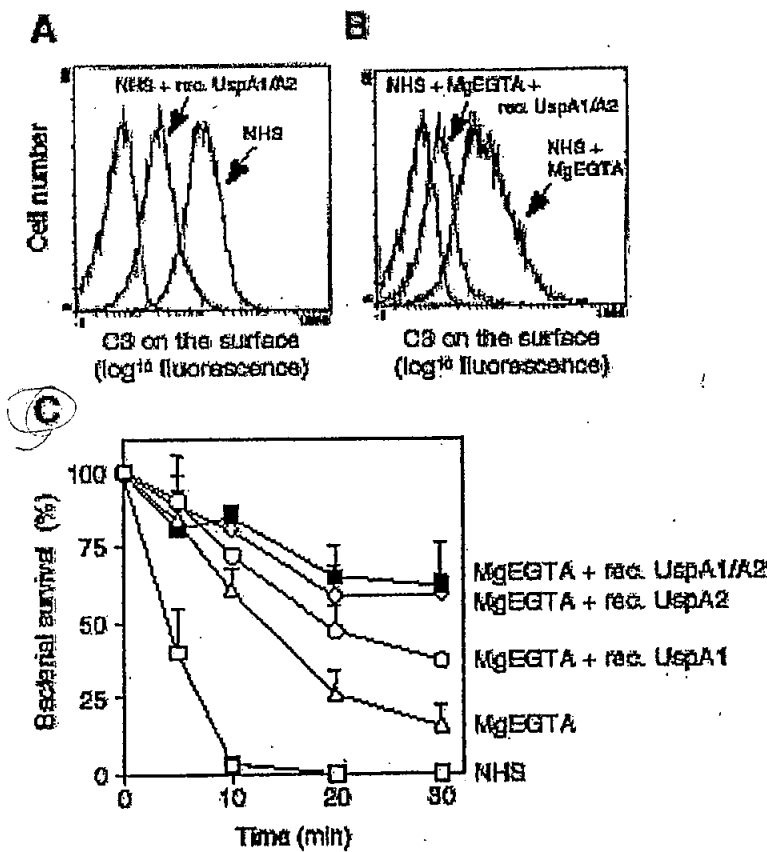
704

Figure 16



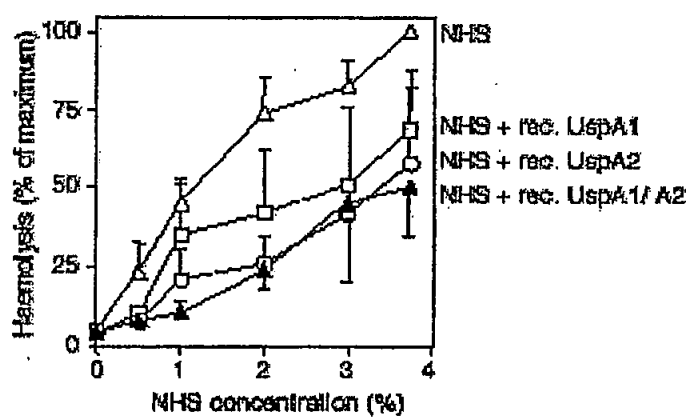
105

Figure 17



106

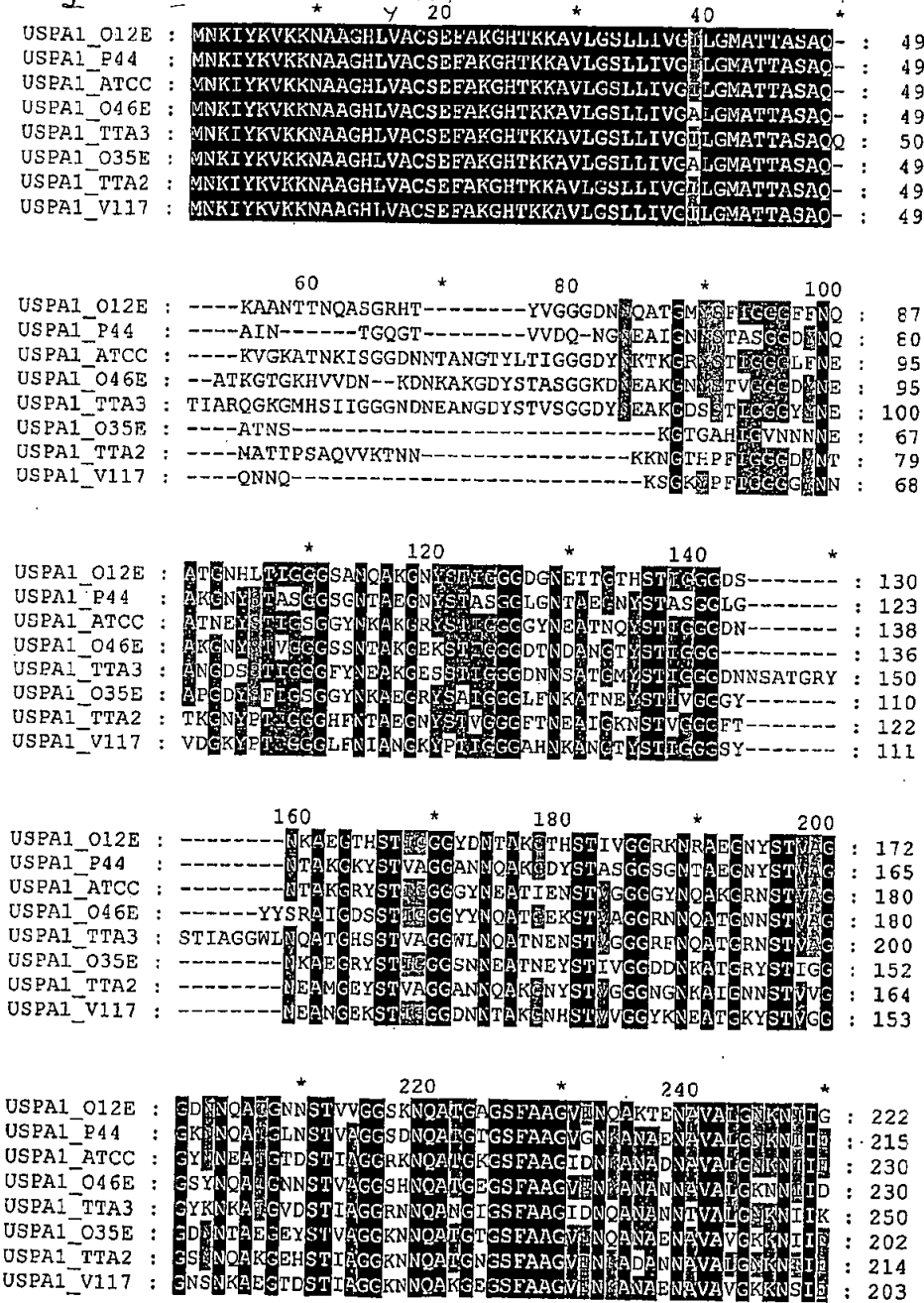
Figure 18



107

Fig. 19

Pileup – beginning and end of the fibronectin binding domain marked with { and }



	260	*	280	*	300	
USPA1_O12E :	GTNSVAIGSNNTVEDGKQDVFILGSN	---	TNNFSSGSVLLGNNTSGKKAATA	:	270	
USPA1_P44 :	GENSVAIGSNNTVETGKENVFILGSG	---	TGVTSSNSVLLGNKTGKKAATA	:	263	
USPA1_ATCC :	GENSVAIGSNNTVKKGQONVFILGSNTD	---	TNNFSSGSVLLGNNTSGKKAATA	:	280	
USPA1_O46E :	GDNSVAIGSNNTIDSGKONVFILGSSTNT	---	TNNFSSGSVLLGNNTSGKKAATA	:	280	
USPA1_TTA3 :	GKDSVAIGSNNTVETGKENVFILGS	---	NTKDRHSNSVLLGNNTSGKKAATA	:	298	
USPA1_O35E :	GENSVAIGSENTVKTCHKNVFILGS	---	GTTGVTSSNSVLLGNNTSGKKAATA	:	250	
USPA1_TTA2 :	GTNSVAIGSNNTVKTCKENVFILGSNTNT	---	ENFSSGSVLLGNNTSGKKAATA	:	264	
USPA1_V117 :	GKDSVAIGSENTVENNKONVFILGS	---	KTSGFSSNSVLLGNNTSGKKAATA	:	251	
		*	320	*	340	*
USPA1_O12E :	VSSATVGRKLITGFCGVSONQA	---	NSGTVSVGSAFSEKQIVNVGAGQISA	:	319	
USPA1_P44 :	VNDATVNGLTILKNTAGVSKT	---	GNCTVSVGSENHERQIVNVGAGKISA	:	309	
USPA1_ATCC :	VNSAEVGLSLITGFCGSKT	---	GNCTVSVGKKKQKQIVNVGAGKISA	:	326	
USPA1_O46E :	VSSAKVNGLTILGFCGSKT	---	NCITVSVGSENNERQIVNVGAGNISA	:	326	
USPA1_TTA3 :	VENAKVGLSLITGFCGSKANT	---	NNCTVSVGKQKQKQIVNVGAGQISA	:	346	
USPA1_O35E :	VKNAEVGLSLITGFCGSKEN	---	CVVSVGSEFGERQIVNVGAGQISA	:	296	
USPA1_TTA2 :	VNNAEVNGLTILENFCGSKENANN	---	ICTVSVGSENNERQIVNVGAGQISA	:	313	
USPA1_V117 :	VENAEVGLSLITGFCGSKENANANT	---	CTVSVGSOQKQKQIVNVGAGQISA	:	301	
	360	*	380	*	400	
USPA1_O12E :	DSTDVNGSQLHALATAVSON	---	QDNILTNRVDIQETK	:	355	
USPA1_P44 :	DSTDVNGSQLHALATAVAKK	---	SDITKNQAEITLVNRVNIKELE	:	352	
USPA1_ATCC :	DSTDVNGSQLHALATAVVAQ	---	KADIDLD	:	355	
USPA1_O46E :	DSTDVNGSQLYALATAVAKAD	---	ADENFRALT	:	356	
USPA1_TTA3 :	DSTDVNGSQLHALATAV	---	DAEFRTLT	:	372	
USPA1_O35E :	DSTDVNGSQLHALATAVDD	---	QYDIVNNRADILNNQDDIKDLQKEVGLD	:	346	
USPA1_TTA2 :	DSTDVNGSQLHALATAVAK	---	KSDIKGLNKGVEELD	:	349	
USPA1_V117 :	DSTDVNGSQLHALASTIDEE	---	VDLLG	:	327	
		*	420	*	440	*
USPA1_O12E :	RKQENDIKEVVEMQNAIAEAD	---	NKNHQQDIAKAQLAGVAVMEEOK	:	402	
USPA1_P44 :	RKQENDIKEVVEMQNAIAEADK	---	NKNHQQDIAKAQLAGVTVMEEINK	:	399	
USPA1_ATCC :	DEVG	---	LLG	:	362	
USPA1_O46E :	KTQN	---	TLIEGE	---	AQDALIAQNQT	378
USPA1_TTA3 :	QTQN	---	ALIEGEA	---	INQELECTADYTNAQDEKILKNQT	408
USPA1_O35E :	NEVGELSRDINSLSHDVTDNQD	---	DKKEKRGVKELDNEVGVLRSR	:	389	
USPA1_TTA2 :	KEVGVLRSRINSLSHDVADNQDSIAKNKAD	---	KGENKEVKELDKEVGVLRSR	:	399	
USPA1_V117 :	EEINSLEGEIFNNQDAIAKNQA	---	DIAATNKTNIETNGSKITNIGT	:	370	
	460	*	480	*	500	
USPA1_O12E :	HVEDLYETNENLDKESQLDGAVFNNTQNIEDLAAYNELQDAYAKQQTEA	:	452			
USPA1_P44 :	HVEDLYETNENLDKESQLDGAVFN	---	---	:	424	
USPA1_ATCC :	---	---	EEINSLEGEIFN	---	---	374
USPA1_O46E :	DITANKTIERNFNRTVVGFETEK	---	---	:	403	
USPA1_TTA3 :	DITANKTIEQNFNRTVTGFETEK	---	---	:	433	
USPA1_O35E :	DINSLHDDVADNQDDIAKAKADIKGLNKEVKELDKEVG	---	---	VLSRD	:	432
USPA1_TTA2 :	DIGSLHDDVADNQDSIAKAKADIKGLNKEVKELDKEVG	---	---	VLSRD	:	442
USPA1_V117 :	LYATVTKFVGNNITQGVAAKADITKNKADIQDLDEVG	---	---	VLSQD	:	413
		*	520	*	540	*
USPA1_O12E :	IDALNKASSENTQNIAKNSNHTTLESNVEEELNLSGRLIDQKADIDNN	:	502			
USPA1_P44 :	---	---	NTQNIAKNSNHTTLENNVEEELNLSGRLIDQKADIDNN	:	464	
USPA1_ATCC :	---	---	NQDAIAKNQADITLESNVEEGLDLSGRLIDQKADIDNN	:	414	
USPA1_O46E :	---	---	NKAGIAKNQADITOLENNVGEELNLSGRLIDQKADIDNN	:	443	
USPA1_TTA3 :	---	---	NKAGIAKNQADITOLENDVGKELNLSGRLIDQKADIDNN	:	473	

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

109

USPA1_O35E : IGS LHDDVATNQADIAKNQADIKLENNVEEELLNSGRLLDQKADIDNN : 482
USPA1_TTA2 : IGS LHDDVATNQADIAKNQADIKLENNVEEELLNSGRLLDQKADIDNN : 492
USPA1_V117 : IGS LHDDVATNQADIAKNQADIKLENNVEEELLNSGRLLDQKADIDNN : 463

560 * 580 * 600
USPA1_O12E : INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK : 525
USPA1_P44 : INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK : 514
USPA1_ATCC : INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK : 464
USPA1_O46E : INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK : 493
USPA1_TTA3 : INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK : 523
USPA1_O35E : INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK : 505
USPA1_TTA2 : INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK : 542
USPA1_V117 : INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK : 513

* 620 * 640 *
USPA1_O12E : --NVEEGLLDLSGRLLDQKADIKNQADIAKNQADIAQNOIDIQDLAAYNELODAYA : 573
USPA1_P44 : --NVEEGLLDLSGRLLDQKADIKNQADIAKNQADIAQNOIDIQDLAAYNELODAYA : 564
USPA1_ATCC : --NVEEGLLDLSGRLLDQKADIKNQADIAKNQADIAQNOIDIQDLAAYNELODAYA : 514
USPA1_O46E : --NVEEGLLDLSGRLLDQKADIKNQADIAKNQADIAQNOIDIQDLAAYNELODAYA : 543
USPA1_TTA3 : --NVEEGLLDLSGRLLDQKADIKNQADIAKNQADIAQNOIDIQDLAAYNELODAYA : 566
USPA1_O35E : --NVEEGLLDLSGRLLDQKADIKNQADIAKNQADIAQNOIDIQDLAAYNELODAYA : 553
USPA1_TTA2 : KNNVEEGLLDLSGRLLDQKADIKNQADIAKNQADIAQNOIDIQDLAAYNELODAYA : 592
USPA1_V117 : --NVEEGLLDLSGRLLDQKADIKNQADIAKNQADIAQNOIDIQDLAAYNELODAYA : 563

660 * 680 * 700
USPA1_O12E : KQOTEALDALNKASSANTDRITAEFLGTAENKKDAQTAKAQANENKDGTA : 623
USPA1_P44 : KQOTEALDALNKASSANTDRITAEFLGTAENKKDAQTAKAQANENKDGTA : 614
USPA1_ATCC : KQOTEALDALNKASSANTDRITAEFLGTAENKKDAQTAKAQANENKDGTA : 564
USPA1_O46E : KQOTEALDALNKASSANTDRITAEFLGTAENKKDAQTAKAQANENKDGTA : 593
USPA1_TTA3 : KQOTEALDALNKASSANTDRITAEFLGTAENKKDAQTAKAQANENKDGTA : 616
USPA1_O35E : KQOTEALDALNKASSANTDRITAEFLGTAENKKDAQTAKAQANENKDGTA : 572
USPA1_TTA2 : KQOTEALDALNKASSANTDRITAEFLGTAENKKDAQTAKAQANENKDGTA : 642
USPA1_V117 : KQOTEALDALNKASSANTDRITAEFLGTAENKKDAQTAKAQANENKDGTA : 613

* 720 * 740 *
USPA1_O12E : KNOADICQHDRIKKTNEGLTHSMVARAVGNNTOGVATNKADIAKNQADIAN : 673
USPA1_P44 : KNOADICQHDRIKKTNEGLTHSMVARAVGNNTOGVATNKADIAKNQADIAN : 664
USPA1_ATCC : KNOADICQHDRIKKTNEGLTHSMVARAVGNNTOGVATNKADIAKNQADIAN : 614
USPA1_O46E : KNOADICQHDRIKKTNEGLTHSMVARAVGNNTOGVATNKADIAKNQADIAN : 643
USPA1_TTA3 : KNOADICQHDRIKKTNEGLTHSMVARAVGNNTOGVATNKADIAKNQADIAN : 624
USPA1_O35E : KNOADICQHDRIKKTNEGLTHSMVARAVGNNTOGVATNKADIAKNQADIAN : 583
USPA1_TTA2 : KNOADICQHDRIKKTNEGLTHSMVARAVGNNTOGVATNKADIAKNQADIAN : 692
USPA1_V117 : KNOADICQHDRIKKTNEGLTHSMVARAVGNNTOGVATNKADIAKNQADIAN : 663

760 * 780 * 800
USPA1_O12E : NIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 723
USPA1_P44 : NIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 714
USPA1_ATCC : NIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 664
USPA1_O46E : NIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 693
USPA1_TTA3 : NIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 674
USPA1_O35E : NIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 633
USPA1_TTA2 : NIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 742
USPA1_V117 : NIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 713

* 820 * 840 *

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

110

USPA1_O12E : QNTLIEQGEALVEQNKAINQELLEGFAAHADVQDKOILNQADITTNKTAI : 773
USPA1_P44 : QNTLIEQGEALVEQNKAINQELLEGFAAHADVQDKOILNQADITTNKTAI : 764
USPA1_ATCC : QNTLIEQGEALVEQNKAINQELLEGFAAHADVQDKOILNQADITTNKTAI : 714
USPA1_O46E : QNTLIEQGEALVEQNKAINQELLEGFAAHADVQDKOILNQADITTNKTAI : 743
USPA1_TTA3 : QNTLIEQGEALVEQNKAINQELLEGFAAHADVQDKOILNQADITTNKTAI : 724
USPA1_O35E : QNTLIEQGEALVEQNKAINQELLEGFAAHADVQDKOILNQADITTNKTAI : 683
USPA1_TTA2 : QNTLIEQGEALVEQNKAINQELLEGFAAHADVQDKOILNQADITTNKTAI : 792
USPA1_V117 : QNTLIEQGEALVEQNKAINQELLEGFAAHADVQDKOILNQADITTNKTAI : 763

860 * 880 * 900
USPA1_O12E : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILODRNLNRINETNNHODQKID : 823
USPA1_P44 : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILODRNLNRINETNNHODQKID : 814
USPA1_ATCC : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILODRNLNRINETNNHODQKID : 764
USPA1_O46E : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILODRNLNRINETNNHODQKID : 793
USPA1_TTA3 : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILODRNLNRINETNNHODQKID : 774
USPA1_O35E : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILODRNLNRINETNNHODQKID : 733
USPA1_TTA2 : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILODRNLNRINETNNHODQKID : 842
USPA1_V117 : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILODRNLNRINETNNHODQKID : 813

* 920 * 940 *
USPA1_O12E : QLGYPALKEQGQHFNNRISAVERTAGGIANATAIATLPSPSRAGEHHVLE : 873
USPA1_P44 : QLGYPALKEQGQHFNNRISAVERTAGGIANATAIATLPSPSRAGEHHVLE : 864
USPA1_ATCC : QLGYPALKEQGQHFNNRISAVERTAGGIANATAIATLPSPSRAGEHHVLE : 814
USPA1_O46E : QLGYPALKEQGQHFNNRISAVERTAGGIANATAIATLPSPSRAGEHHVLE : 843
USPA1_TTA3 : QLGYPALKEQGQHFNNRISAVERTAGGIANATAIATLPSPSRAGEHHVLE : 824
USPA1_O35E : QLGYPALKEQGQHFNNRISAVERTAGGIANATAIATLPSPSRAGEHHVLE : 783
USPA1_TTA2 : QLGYPALKEQGQHFNNRISAVERTAGGIANATAIATLPSPSRAGEHHVLE : 892
USPA1_V117 : QLGYPALKEQGQHFNNRISAVERTAGGIANATAIATLPSPSRAGEHHVLE : 863

960 * 980 *
USPA1_O12E : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 922
USPA1_P44 : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 913
USPA1_ATCC : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 863
USPA1_O46E : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 892
USPA1_TTA3 : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 873
USPA1_O35E : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 832
USPA1_TTA2 : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 941
USPA1_V117 : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 912

211

Fig. 20

PileUp multiple alignment of full length UspA2 protein sequences

			*	20	*	40	*
q848s1_morca	:	MNKIYKVRKNAAGHSVACSEFAKGHTKKAVLGSLIIVGALGMATTASAO-L					
: 50							
q91961_morca	:	MNKIYKVRKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLIIVGALGMATTASAOEL					
: 51							
q8rtb2_morca	:	~~~~~					
:							
q91963_morca	:	~~~~~					
:							
o54407_morca	:	~~~~~					
:							
q9xd51_morca	:	~~~~~					
:							
q58xp4_morca	:	~~~~~					
:							
q8gh86_morca	:	~~~~~					
:							
q91962_morca	:	~~~~~MNKIYKVRKNA					
: 10							
forsgren_uspa2	:	~~~~~					
:							
q9xd55_morca	:	~~~~~					
:							
q848s2_morca	:	~~~~~					
:							
q9xd53_morca	:	~~~~~					
:							
			60	*	80	*	100
q848s1_morca	:	VSTHOFNDYRFSSTIGNNIRGSSWSIIGAGHDNIIVKSAISNSGILSCYKNIV					
: 101							
q91961_morca	:	VSTNKE-----NQVKEIWSIIGAGRIINIVGCSAHHSGIIGCHKNIV					
: 93							
q8rtb2_morca	:	~~~~~					
:							
q91963_morca	:	~~~~~					
:							
o54407_morca	:	~~~~~					
:							
q9xd51_morca	:	~~~~~					
:							
q58xp4_morca	:	~~~~~					
:							
q8gh86_morca	:	~~~~~					
:							
q91962_morca	:	AAGHSVACSEFAKGHTKKAVLGSLIIVGALGMATTASAOIGSTNAANGNII					
: 61							
forsgren_uspa2	:	~~~~~					
:							
q9xd55_morca	:	~~~~~					
:							
q848s2_morca	:	~~~~~					
:							

```
q9xd53_morca : ~~~~~~
: -

q848s1_morca :      *      120      *      140      *
: 152 : NGSTSAIVGGYDNETNLSKYTFVGGGYKNLAECHQSNIIGGGYANWAECDNAT
q91961_morca : NGYFSAIVGGYGNETQGDYTFVGGGYKNLAIGNYHIVGGGYKNLAEGDNAT
: 144
q8rtb2_morca : ~~~~~~
: -
q91963_morca : ~~~~~~
: -
o54407_morca : ~~~~~~
: -
q9xd51_morca : ~~~~~~
: -
q58xp4_morca : ~~~~~~
: -
q8gh86_morca : ~~~~~~
: -
q91962_morca : SGVGAIVGGGVINQAKGNYPPIVGGGFENRAIGNYSVISEGGFENQAKCPHST
: 112
forsgren_uspa2 : ~~~~~~
: -
q9xd55_morca : ~~~~~~
: -
q848s2_morca : ~~~~~~
: -
q9xd53_morca : ~~~~~~
: -

q848s1_morca :      160      *      180      *      200
: 203 : IAGGFENFAAGCNISAIIGGGYNNIAEGMDATITAGGFENRAEGNQSATGGGVA
q91961_morca : IAGGFANLAECDNATIAGGFENRAEGQIDSMVSGGYENQATIGESSIVAGGSN
: 195
q8rtb2_morca : ~~~~~~
: -
q91963_morca : ~~~~~~
: -
o54407_morca : ~~~~~~
: -
q9xd51_morca : ~~~~~~
: -
q58xp4_morca : ~~~~~~
: -
q8gh86_morca : ~~~~~~
: -
q91962_morca : IAGGESNFAAGFNSTVAGGSNNQAVCTNSTVAGGFENQAKGNSTIAGVGN
: 163
forsgren_uspa2 : ~~~~~~
: -
q9xd55_morca : ~~~~~~
: -
q848s2_morca : ~~~~~~
: -
q9xd53_morca : ~~~~~~
: -
```

113

```

      *           220           *           240           *
q848s1_morca : NEFAAGLDTTFVGGGLENRAIGNQSAIGGGYANLAEGDNATITAGGLENPAKGE
: 254
q91961_morca : NLAECKSSAIGGGGRONEASGDRSTVSGGYINLAEGCKSSAIGGGLENIAICN
: 246
q8rtb2_morca : ~~~~~~
: ~~~~~~
q91963_morca : ~~~~~~
: ~~~~~~
o54407_morca : ~~~~~~
: ~~~~~~
q9xd51_morca : ~~~~~~
: ~~~~~~
q58xp4_morca : ~~~~~~
: ~~~~~~
q8gh86_morca : ~~~~~~
: ~~~~~~
q91962_morca : QNNTDNAMALGKNNETNGNNRAALISENTLVNENQNNKALIGSNITNADSGS
: 214
forsgren_uspa2 : ~~~~~~
: ~~~~~~
q9xd55_morca : ~~~~~~
: ~~~~~~
q848s2_morca : ~~~~~~
: ~~~~~~
q9xd53_morca : ~~~~~~
: ~~~~~~

      260           *           280           *           300
q848s1_morca : NSVWSSGCVANQATCEESTTAGG-----FENRLEGIDSVVSGGZANQANPA
: 300
q91961_morca : NATISGGGRONEASGDRSTVAGG-----FONRIGKYSTVSGGRONEASDR
: 292
q8rtb2_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIIIGLGAASTANAQ-----ALETFLPNLFNDY
: 44
q91963_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGMASTANAQOQKSPKLEIFLPNLFNDN
: 49
o54407_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGASTMNAQ-----VVEQFERPNIFENEN
: 44
q9xd51_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGASTMNAQ-----VVEQFERPNIFENEN
: 44
q58xp4_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAQOQKLEIFLPNLFNDY
: 49
q8gh86_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGMASTANAQVAPSPNQKI-----QOK
: 42
q91962_morca : VILGHTASGAEATAVSRARNGLLILKNEFGYERKEDYCTVSV-----SSS
: 258
forsgren_uspa2 : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIIIGLGAASTANAQAQKN-----DI-----T
: 36
q9xd55_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIIIGLGAASTANAQAQKN-----DI-----T
: 36
q848s2_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGASTMNAQAQSRSEIDOL-----QTK
: 42
q9xd53_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIIIGLGAASTANAQQRERSLEEDI-----QDS
: 42

      *           320           *           340           *
q848s1_morca : -SFAAGLYNNQATGESSTTAGGANNQAIPFQSSAAGVENAMADNAWELN

```

114

```

: 350
q91961_morca : -SPWAGGEONQATCKYSTVSGYRNOATGKESBAAGIDNKANADNAVALAN
: 342
q8rtb2_morca : DEEDDLHYHGMILGNTA-I--KOD-T--QMKFYAENSENVPDSLRFNKILL
: 89
q91963_morca : DEEDDLHYHNMILGNTALI--DDE-N--QMKFYADDSGVPDSLRFNKILL
: 95
o54407_morca : HDELD DAYHNMILGDTAIVNSQD--NSTQLKFYSNDEDSVPDSLRFNKILL
: 94
q9xd51_morca : HDELD DAYHNMILGDTAIVNSQD--NSTQLKFYSNDEDSVPDSLRFNKILL
: 94
q58xp4_morca : DEEDDLHYHNMILGDTAIVRONYSNOLKFYSNDEDSVPDSLRFNKILL
: 100
q8gh86_morca : IKK-----MKELRODIKSPNDELD-----ENTEDIGSTINDDVAAN
: 78
q91962_morca : GKE-----KQIVHVGAGOFST--D-----STDVNGSGLIYALATA
: 291
forsgren_uspa2 : LEDLEYLIKKEIDONEBDAIDGDIKATKYLALSQYGNILABEELN-----
: 81
q9xd55_morca : LEDLEYLIKKEIDONEBDAIDGDIKATKYLALSQYGNILABEELN-----
: 81
q848s2_morca : LADLAGKTAAGKNGGGQNNQNNQNDINKYLFISQANILTMELNINNVKN
: 93
q9xd53_morca : LSKLV-----QEDIDTILKODOCKMKNKILLENOLANTILITDELNINNVKN
: 86

360          *          380          *          400
q848s1_morca : NNILNG--DNFAAIGEN--NTVKKEQKDVFIKSN--ISGADSNSELLSENE
: 396
q91961_morca : KNTITG--ENSVTIGEN--NTVKKNQKNVFIKSN--TKQASASVILLKKN
: 390
q8rtb2_morca : EQOLNGFKEGDTHIIFLDENGKPVYKIDETENGVKIKVYSVTIKKTATREDV
: 140
q91963_morca : EQOLNGFKEGDTHIIFLDENGKPVYKIDSIIVEQKVKTVYSVTIKKTATADDV
: 146
o54407_morca : EQOLNGFKAGDTHIIFLDKDGKPVYKIDETIKDKGVETVYSVTIKKTATODDV
: 145
q9xd51_morca : EQOLNGFKAGDTHIIFLDKDGKPVYKIDETIKDKGVETVYSVTIKKTATODDV
: 145
q58xp4_morca : EQOLNGFKAGDTHIIFVDANGKMYKQDERVEEGKUTTVLSVTIKKTATQODV
: 151
q8gh86_morca : QDDI--EENQADIKKNOD-----DIKKNQADIKELDEKVEVLSKE---
: 116
q91962_morca : VD-----ENQYDIEINOD-----NIKDLKEVKGLDEKVEVLSKD---
: 326
forsgren_uspa2 : -KAL--EEDDEDVGNQNN-----DIANLEDDVETLTKNQNAFALOGEA
: 121
q9xd55_morca : -KAL--EEDDEDVGNQNN-----DIANLEDDVETLTKNQNALALOGEA
: 121
q848s2_morca : SSSI--ETETDICHMEN-----DVABLEDGVVEELTKNQTLEKDEE
: 134
q9xd53_morca : TNSI--EAGGDEIGHVEN-----DIADLEEGVEELTKNQTLEKDEE
: 127

*          420          *          440          *          46
q848s1_morca : TGRKAQAWEDATVGDL-----SLTGFAGVKANSKTVEVVSQKERO
: 438
q91961_morca : SGRKAQAWEDATVGDL-----SLTGFAGVKANSKTVEVVSQKERO
: 432

```

730

q8rtb2_morca : EQSAYSRGIQGDIDDLMEANKENNNRLPEHGDRIIFANEESVQYLNKRVQNN
: 191
q91963_morca : -NSAYSRGIQGDIDDLMEANKENNNRLPEHGDRIIFANEESVQYLNKRVQNN
: 196
o54407_morca : EQSAYSRGIQGDIDDLMDINRENNYLYKAMHDYNEKOTEATDALNKASSAN
: 196
q9xd51_morca : EQSAYSRGIQGDIDDLMDINRENNYLYKAMHDYNEKOTEATDALNKASSAN
: 196
q58xp4_morca : D-SAYSRGIQCKVNDLDEEMNENLHUTTSLYDVTANQDDIKGLKKGVKD
: 201
q8gh86_morca : -----IGSLNDREANNYTETEDNYTDHIDNEANIANKNDTEKN
: 155
q91962_morca : -----IGSLNDREANNYTETEDNYTDHIDNEANIANKNDTEKN
: 344
forsgren_uspa2 : EKEDE-QGLADAVEGQEGKELNNMTSLIKENNDORNLVNGFEIEKNKDAIAKN
: 171
q9xd55_morca : EKEDE-QGLADAVEGQEGKELNNMTSLIKENNDORNLVNGFEIEKNKDAIAKN
: 171
q848s2_morca : HERLTAQNGAD-LOLENNVVEELFNL---SDRLIDOKADIANKADIAQNG
: 181
q9xd53_morca : HERLTAQNGAD-LOLENNVVEELFNL---SDRLIDOKADIANKADIAQNG
: 167

0 * 480 * 500 *
q848s1_morca : EVHVGAGELISNDSTDAVNGSRLIAAAVEEDNOVDIANKNODDKEKRGV-
: 488
q91961_morca : EVHVGAGELISNDSTDAVNGSRLIAAAVEEDNOVDIANKNODDKEKRGV-
: 483
q8rtb2_morca : IENI-HEI---AQQDDSSRIKELKRNVEEGLELSE---LIAQKEDIA
: 235
q91963_morca : IENI-HEI---AQQDDSSRIKELKRNVEEGLELSE---LIAQKEDIA
: 240
o54407_morca : IERI-ETA---EERIKNEYDIKALENVEEGLELSE---LIDOKADET
: 240
q9xd51_morca : IERI-ETA---EERIKNEYDIKALENVEEGLELSE---LIDOKADET
: 240
q58xp4_morca : KKGK-KEL---NKELEKELDKELGVLSRDEG---SLNDD---VAQNNESTE
: 241
q8gh86_morca : QADI-KEL---DKEVGVISREIGSLNDV-----ADNQADIA
: 188
q91962_morca : KADI-KEL---DKEVGVISREIGSLNDV-----ADNQADIA
: 377
forsgren_uspa2 : NESI-EDLYDFEHEVAESIEGIHANNEACNETIKGLITN---SIENNTNIT
: 218
q9xd55_morca : NESI-EDLYDFEHEVAESIEGIHANNEACNETIKGLITN---SIENNTNIT
: 218
q848s2_morca : NESI-EDLYDFEHEVAESIEGIHANNEACNETIKGLITN---SIENNTNIT
: 228
q9xd53_morca : NESI-EDLYDFEHEVAESIEGIHANNEACNETIKGLITN---SIENNTNIT
: 214

520 * 540 * 560
q848s1_morca : -----KELDKEMVLSRDVSLNDV-----AQNO-----SD
: 515
q91961_morca : KNOADIQTTEIENIVKELNLNLSGRLIDOKADIDNNINHIELAQQDDQHSSE
: 534
q8rtb2_morca : QNQEDIQELATYNEH---QDQQAQKQTEATDALNKASSENTONIAKNSNH
: 282
q91963_morca : QNQEDIQELATYNEH---QDQQAQKQTEATDALNKASSENTONIAKNSNH

116

```

: 287
o54407_morca : KD-----
: 242
q9xd51_morca : KD-----
: 242
q58xp4_morca : SEVLESQEVADSLGE---EAFNKAQNETTEODITINSMENTNNIEKNKAC
: 288
q8gh36_morca : KNOADIQTLENNVEEGELLELSGHLIDOKADIDNNNNIYELAQQQDQHSSD
: 239
q91962_morca : KNOADIKTLENNVEEGELLELSGRLIDOKADIDNNNINHIYELAQQQDQHSSD
: 428
forsgren_uspa2 : KKKADIOALENNVVEELENLSGRLIDOKADIDNNNNIYELAQQQDQHSSD
: 269
q9xd55_morca : KKKADIOALENNVVEELENLSGRLIDOKADIDNNNNIYELAQQQDQHSSD
: 269
q848s2_morca : KN-----KADIDNNNINHIYELAQQQDQHSSD
: 254
q9xd53_morca : KN-----KADIDNNNINHIYELAQQQDQHSSD
: 240

```

```

*          580          *          600          *
q848s1_morca : IKTLKNNVEEGLELSGHLIDOKADLTCKDIKALENNVEEGLLD-----
: 558
q91961_morca : IKTLKNNVEEGLELSGHLIDOKADLTCKDIKALESNVEEGLLD-----
: 577
q8rtb2_morca : IKTLENNVEEGLELSGHLIDOKADLTCKDIKALESNVEEGLLD-----
: 325
q91963_morca : IKTLENNVEEGLELSGHLIDOKADLTCKDIKALESNVEEGLLD-----
: 330
o54407_morca : IKALENNVEEGLELSGHLIDOKADLTCKDIKALESNVEEGLLD-----
: 285
q9xd51_morca : IKALENNVEEGLELSGHLIDOKADLTCKDIKALESNVEEGLLD-----
: 285
q58xp4_morca : IQALENNVVEELENLSGRLIDOKADLTCKDIKLESNVEEGLLD-----
: 331
q8gh86_morca : IKTLKKNVEEGLELSGHLIDOKADLAQNOQKHQDTATYNELQDQYAEQQT
: 290
q91962_morca : IKTLKKNVEEGLELSGHLIDOKADLAQNOQKHQDTATYNELQDQYAEQQT
: 479
forsgren_uspa2 : IKTLKKNVEEGLELSGHLIDOKADLAQNOQKHQDTATYNELQDQYAEQQT
: 299
q9xd55_morca : IKTLKKNVEEGLELSGHLIDOKADLAQNOQKHQDTATYNELQDQYAEQQT
: 299
q848s2_morca : IKTLKKNVEEGLELSGHLIDOKADLTCKDIKLE-----
: 288
q9xd53_morca : IKTLKNNVEEGLELSGHLIDOKADLTCKDIKALE-----
: 274

```

```

          620          *          640          *          660
q848s1_morca : -----LSGRLIDOKADIKNQAD
: 576
q91961_morca : -----LSGRLIDOK-----AD
: 588
q8rtb2_morca : -----LSGRLIDOKADIKNQAD
: 343
q91963_morca : -----LSGRLIDOK-----AD
: 341
o54407_morca : -----LSGRLIDOKADIKNQAD
: 303

```

117

```

q9xd51_morca : -----LSGRLIDQKADIAQNOAN
: 303
q58xp4_morca : -----LSGHLIDOKADIKNQAD
: 349
q8gh86_morca : EAIDALNKASSENTQNI-----AK-NSNRIMALE-----SN
: 320
q91962_morca : EAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAKQOTEAEIDALNKASSENTQNI
: 530
forsgren_uspa2 : -----AN
: 301
q9xd55_morca : -----AN
: 301
q848s2_morca : -----NN
: 290
q9xd53_morca : -----SN
: 276

```

```

               *      680      *      700      *
q848s1_morca : I-----
: 577
q91961_morca : E-----
: 589
q8rtb2_morca : I-----AQNQTQIODLAAYNELODAYAK
: 366
q91963_morca : I-----AENQANIODLAAYNELODAYAK
: 364
o54407_morca : I-----
: 304
q9xd51_morca : IODLAAYNELODAYAKQOTEAEIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAK
: 354
q58xp4_morca : I-----
: 350
q8gh86_morca : VEE-GLLELSGHLIDOKAD---LTKDLKAKESNVVEE-GLLELSGHLID
: 363
q91962_morca : IEDLAAYNELODAYAKQOTEAEIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAK
: 581
forsgren_uspa2 : IQD---LATINNELEDOQAE---KOTTAITAEAL-----
: 325
q9xd55_morca : IQD---LATINNELEDOQAE---KOTTAITAEAL-----
: 325
q848s2_morca : VEE-GLLELSGRLIDOKAD---TEKN-----
: 312
q9xd53_morca : VEE-GLLELSGRLIDOKAD---LTKDLKAKESNVVEE-GLLELSGRLID
: 319

```

```

               720      *      740      *      760
q848s1_morca : -----AQNQTQIODLAAYNELODAYAKQOTEAEIDALNKASSEN
: 615
q91961_morca : -----AQNQANIODLAAYNELODAYAKQOTEAEIDALNKASSEN
: 627
q8rtb2_morca : QOTEAEIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAKQOTEAEIDALNKASSEN
: 417
q91963_morca : QQTEAEIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAKQOTEAEIDALNKASSEN
: 415
o54407_morca : -----AQNQTD-----
: 310
q9xd51_morca : QQTEAEIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAKQOTEAEIDALNKASSEN
: 405
q58xp4_morca : -----AQNQANIODLAAYNELODAYAKQOTEAEIDALNKASSEN

```


118

```

: 388
q8gh86_morca : QKADI-----AQNCEDIODLAAYNELODDYAKQOTEAIDALNKASSEN
: 406
q91962_morca : QCTEAIDALNKASSENNTQNIODLAAYNELODDYAKQOTEAIDALNKASSEN
: 632
forsgren_uspa2 : NKAS-----SENNTQNTIEDLAAYNELODDYAKQOTEAIDALNKASSEN
: 368
q9xd55_morca : NKAS-----SENNTQNTIEDLAAYNELODDYAKQOTEAIDALNKASSEN
: 368
q848s2_morca : QADI-----AQNCEDIODLAAYNELODDYAKQOTEAIDALNKASSEN
: 354
q9xc53_morca : QKADI-----AQNCEDIODLAAYNELODDYAKQOTEAIDALNKASSEN
: 362

```

	780	800
q848s1_morca : 666	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
q91961_morca : 678	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
q8rtb2_morca : 468	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
q91963_morca : 466	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
o54407_morca : 358	---TQDIAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
q9xd51_morca : 456	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
q58xp4_morca : 439	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
q8gh86_morca : 457	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
q91962_morca : 683	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
forsgren_uspa2 : 419	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
q9xd55_morca : 419	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
q848s2_morca : 405	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN
q9xd53_morca : 413	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN	TONIEDLAAYNELQDAYAKQOQTEAIDALNKASSENTONIAKNQADIANNIN

	820	*	840	*	860
q848s1_morca	:	NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL			
: 717	:				
q91961_morca	:	NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL			
: 729	:				
q8rtb2_morca	:	NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL			
: 519	:				
q91963_morca	:	NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL			
: 517	:				
o54407_morca	:	NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL			
: 409	:				
q9xd51_morca	:	NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL			
: 507	:				
q58xp4_morca	:	NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL			
: 490	:				
q8gh86_morca	:	NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL			
: 508	:				

119

```

q91962_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 734
forsgren_uspa2 : NIYELAQQQDKHRSIDIKTLAKTSAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 470
q9xd55_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 470
q848s2_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 456
q9xd53_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTNRI-----ANALGTAENKDAQ
: 458

*      880      *      900      *      9
q848s1_morca : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 768
q91961_morca : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 780
q8rtb2_morca : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 570
q91963_morca : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 568
o54407_morca : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 460
q9xd51_morca : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 558
q58xp4_morca : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 541
q8gh86_morca : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 559
q91962_morca : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 785
forsgren_uspa2 : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 521
q9xd55_morca : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 521
q848s2_morca : IEKDKHEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 507
q9xd53_morca : IEKDAQAN-----ANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 504

20      *      940      *      960
q848s1_morca : DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 812
q91961_morca : DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 824
q8rtb2_morca : DLGTVKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 621
q91963_morca : DLGTVKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 619
o54407_morca : DLGTVKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 511
q9xd51_morca : DLGTVKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 609
q58xp4_morca : DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 585
q8gh86_morca : DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 603
q91962_morca : DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 829
forsgren_uspa2 : DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL

```

120

```

: 565
q9xd55_morca : DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 565
q848s2_morca : DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 551
q9xd53_morca : DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 548

```

```

*          980          *          1000          *          1020
q848s1_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 863
q91961_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 875
q8rtb2_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 672
q91963_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 670
o54407_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 562
q9xd51_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 660
q58xp4_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 636
q8gh86_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 654
q91962_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 860
forsgren_uspa2 : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 616
q9xd55_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 616
q848s2_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 602
q9xd53_morca : SGLFQPYISVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 599

```

```

*
q848s1_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 877
q91961_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 889
q8rtb2_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 686
q91963_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 684
o54407_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 576
q9xd51_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 674
q58xp4_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 650
q8gh86_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 668
q91962_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 894
forsgren_uspa2 : NKKGSYNIGVNYEF : 630
q9xd55_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 630
q848s2_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 616
q9xd53_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 613

```

125

Fig. 21

% identity in regions identified on Forsgren sequence

	30-177 laminin binding	165-318 fibronectin binding	302-458 C3-binding
q848s1_morca	8	19	74
q9l961_morca	6	41	73
q8rtb2_morca	9	22	67
q9l963_morca	10	23	68
o54407_morca	10	17	53
q9xd51_morca	10	19	66
q58xp4_morca	10	16	75
q8gh86_morca	18	43	69
q9l962_morca	9	36	64
q9xd55_morca	99	98	96
q848s2_morca	35	54	74
q9xd53_morca	29	52	64

122

21027432(21020135).ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Arne Forsgren AB

<120> INTERACTION OF MORAXELLA CATARRHALIS TO EPITHELIAL CELLS...

<130> 21027432

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> protein fragment from Moraxella catarrhalis (UspA1 405-435 or UspA2 244-274) or synthetic petide

<400> 1

Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu
1 5 10 15Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys
20 25 30

<210> 2

<211> 154

<212> PRT

<213> protein fragment from Moraxella catarrhalis (UspA1 299-452) or synthetic peptide

<400> 2

Thr Gly Asn Gly Thr Val Ser Val Gly Lys Lys Gly Lys Glu Arg Gln
1 5 10 15Ile Val His Val Gly Ala Gly Glu Ile Ser Asp Thr Asp Ala Val Asn
20 25 30

82B

21027432(21020135).ST25
Gly Ser Gln Leu His Val Leu Ala Thr Val Val Ala Gln Asn Lys Ala
35 40 45

Asp Ile Lys Asp Leu Asp Asp Glu Val Gly Leu Leu Gly Glu Glu Ile
50 55 60

Asn Ser Leu Glu Gly Glu Ile Phe Asn Asn Gln Asp Ala Ile Ala Lys
65 70 75 80

Asn Gln Ala Asp Ile Lys Thr Leu Glu Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu
85 90 95

Leu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Leu Ser Thr Asp Gln Lys Ala Asp Ile
100 105 110

Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln
115 120 125

His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys Asn Asn Val Glu Glu Gly Leu
130 135 140

Leu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp Gln
145 150

<210> 3

<211> 154

<212> PRT

<213> protein framgent from Moraxella catarrhalis (UspA2 165-318) or synthetic peptide

<400> 3

Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Asn Glu Ser Ile Glu Asp Leu Tyr Asp
1 5 10 15

Phe Gly His Glu Val Ala Glu Ser Ile Gly Glu Ile His Ala His Asn
20 25 30

Glu Ala Gln Asn Glu Thr Leu Lys Gly Leu Ile Thr Asn Ser Ile Glu
35 40 45

Asn Thr Asn Asn Ile Thr Lys Asn Lys Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu
50 55 60

Asn Asn Val Val Glu Glu Leu Phe Asn Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp
65 70 75 80

Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala
85 90 95

124

21027432(21020135).ST25

Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn
 100 105 110

Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Leu Ser Asp His Ile Ile Asp Gln Lys
 115 120 125

Thr Asp Ile Ala Gln Asn Gln Ala Asn Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr
 130 135 140

Asn Glu Leu Gln Asp Gln Tyr Ala Gln Lys
 145 150

<210> 4

<211> 721

<212> PRT

<213> protein fragment from *Moraxella catarrhalis* (UspA1 50-770) or synthetic peptide

<400> 4

Lys Val Gly Lys Ala Thr Asn Lys Ile Ser Gly Gly Asp Asn Asn Thr
 1 5 10 15

Ala Asn Gly Thr Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Gly Asp Tyr Asn Lys Thr
 20 25 30

Lys Gly Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Leu Phe Asn Glu Ala Thr
 35 40 45

Asn Glu Tyr Ser Thr Ile Gly Ser Gly Gly Tyr Asn Lys Ala Lys Gly
 50 55 60

Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Asn Gln
 65 70 75 80

Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asn Asn Thr Ala Lys Gly Arg Tyr
 85 90 95

Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Ile Glu Asn Ser
 100 105 110

Thr Val Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Gln Ala Lys Gly Arg Asn Ser Thr
 115 120 125

Val Ala Gly Gly Tyr Asn Asn Glu Ala Thr Gly Thr Asp Ser Thr Ile
 130 135 140

Ala Gly Gly Arg Lys Asn Gln Ala Thr Gly Lys Gly Ser Phe Ala Ala
 145 150 155 160

Sida 3

128

21027432(21020135).ST25

Gly Ile Asp Asn Lys Ala Asn Ala Asp Asn Ala Val Ala Leu Gly Asn
 165 170 175

Lys Asn Thr Ile Glu Gly Glu Asn Ser Val Ala Ile Gly Ser Asn Asn
 180 185 190

Thr Val Lys Lys Gly Gln Gln Asn Val Phe Ile Leu Gly Ser Asn Thr
 195 200 205

Asp Thr Thr Asn Ala Gln Asn Gly Ser Val Leu Leu Gly His Asn Thr
 210 215 220

Ala Gly Lys Ala Ala Thr Ile Val Asn Ser Ala Glu Val Gly Gly Leu
 225 230 235 240

Ser Leu Thr Gly Phe Ala Gly Ala Ser Lys Thr Gly Asn Gly Thr Val
 245 250 255

Ser Val Gly Lys Lys Gly Lys Glu Arg Gln Ile Val His Val Gly Ala
 260 265 270

Gly Glu Ile Ser Asp Thr Ser Thr Asp Ala Val Asn Gly Ser Gln Leu
 275 280 285

His Val Leu Ala Thr Val Val Ala Gln Asn Lys Ala Asp Ile Lys Asp
 290 295 300

Leu Asp Asp Glu Val Gly Leu Leu Gly Glu Glu Ile Asn Ser Leu Glu
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Phe Asn Asn Gln Asp Ala Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
 325 330 335

Ile Lys Thr Leu Glu Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser
 340 345 350

Gly Arg Leu Leu Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn
 355 360 365

Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys
 370 375 380

Thr Leu Lys Asn Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser Gly Arg
 385 390 395 400

Leu Ile Asp Gln Lys Ala Asp Leu Thr Lys Asp Ile Lys Ala Leu Glu
 405 410 415

Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp
 420 425 430

126

21027432(21020135).ST25

Gln Lys Ala Asp Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp Ile Ala Gln Asn Gln
435 440 445

Thr Asp Ile Gln Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala Tyr
450 455 460

Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser
465 470 475 480

Ala Asn Thr Asp Arg Ile Ala Thr Ala Glu Leu Gly Ile Ala Glu Asn
485 490 495

Lys Lys Asp Ala Gln Ile Ala Lys Ala Gln Ala Asn Glu Asn Lys Asp
500 505 510

Gly Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp Ile Gln Leu His Asp Lys Lys Ile
515 520 525

Thr Asn Leu Gly Ile Leu His Ser Met Val Ala Arg Ala Val Gly Asn
530 535 540

Asn Thr Gln Gly Val Ala Thr Asn Lys Ala Asp Ile Ala Lys Asn Gln
545 550 555 560

Ala Asp Ile Ala Asn Asn Ile Lys Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln
565 570 575

Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Ala Lys Val Ser Ala
580 585 590

Ala Asn Thr Asp Arg Ile Ala Lys Asn Lys Ala Glu Ala Asp Ala Ser
595 600 605

Phe Glu Thr Leu Thr Lys Asn Gln Asn Thr Leu Ile Glu Gln Gly Glu
610 615 620

Ala Leu Val Glu Gln Asn Lys Ala Ile Asn Gln Glu Leu Glu Gly Phe
625 630 635 640

Ala Ala His Ala Asp Val Gln Asp Lys Gln Ile Leu Gln Asn Gln Ala
645 650 655

Asp Ile Thr Thr Asn Lys Thr Ala Ile Glu Gln Asn Ile Asn Arg Thr
660 665 670

Val Ala Asn Gly Phe Glu Ile Glu Lys Asn Lys Ala Gly Ile Ala Thr
675 680 685

Asn Lys Gln Glu Leu Ile Leu Gln Asn Asp Arg Leu Asn Arg Ile Asn
690 695 700

127

21027432(21020135).ST25

Glu Thr Asn Asn His Gln Asp Gln Lys Ile Asp Gln Leu Gly Tyr Ala
705 710 715 720

Leu

<210> 5

<211> 443

<212> PRT

<213> protein fragment from Moraxella catarrhalis (UspA1 50-491) or synthetic peptide

<400> 5

Lys Val Gly Lys Ala Thr Asn Lys Ile Ser Gly Gly Asp Asn Asn Thr
1 5 10 15

Ala Asn Gly Thr Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Gly Asp Tyr Asn Lys Thr
20 25 30

Lys Gly Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Leu Phe Asn Glu Ala Thr
35 40 45

Asn Glu Tyr Ser Thr Ile Gly Ser Gly Gly Tyr Asn Lys Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Asn Gln
65 70 75 80

Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asn Asn Thr Ala Lys Gly Arg Tyr
85 90 95

Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Ile Glu Asn Ser
100 105 110

Thr Val Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Gln Ala Lys Gly Arg Asn Ser Thr
115 120 125

Val Ala Gly Gly Tyr Asn Asn Glu Ala Thr Gly Thr Asp Ser Thr Ile
130 135 140

Ala Gly Gly Arg Lys Asn Gln Ala Thr Gly Lys Gly Ser Phe Ala Ala
145 150 155 160

Gly Ile Asp Asn Lys Ala Asn Ala Asp Asn Ala Val Ala Leu Gly Asn
165 170 175

Lys Asn Thr Ile Glu Gly Glu Asn Ser Val Ala Ile Gly Ser Asn Asn
Sida 6

128

21027432(21020135).ST25
180 185 190

Thr Val Lys Lys Gly Gln Gln Asn Val Phe Ile Leu Gly Ser Asn Thr
195 200 205

Asp Thr Thr Asn Ala Gln Asn Gly Ser Val Leu Leu Gly His Asn Thr
210 215 220

Ala Gly Lys Ala Ala Thr Ile Val Asn Ser Ala Glu Val Gly Gly Leu
225 230 235 240

Ser Leu Thr Gly Phe Ala Gly Ala Ser Lys Thr Gly Asn Gly Thr Val
245 250 255

Ser Val Gly Lys Lys Gly Lys Glu Arg Gln Ile Val His Val Gly Ala
260 265 270

Gly Glu Ile Ser Asp Thr Ser Thr Asp Ala Val Asn Gly Ser Gln Leu
275 280 285

His Val Leu Ala Thr Val Val Ala Gln Asn Lys Ala Asp Ile Lys Asp
290 295 300

Leu Asp Asp Glu Val Gly Leu Leu Gly Glu Glu Ile Asn Ser Leu Glu
305 310 315 320

Gly Glu Ile Phe Asn Asn Gln Asp Ala Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
325 330 335

Ile Lys Thr Leu Glu Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser
340 345 350

Gly Arg Leu Leu Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn
355 360 365

Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys
370 375 380

Thr Leu Lys Asn Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser Gly Arg
385 390 395 400

Leu Ile Asp Gln Lys Ala Asp Leu Thr Lys Asp Ile Lys Ala Leu Glu
405 410 415

Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp
420 425 430

Gln Lys Ala Asp Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
435 440

<210> 6

sida 7

21027432(21020135).ST25

<211> 510

<212> PRT

<213> protein fragment from *Moraxella catarrhalis* (UspA2 30-539) or synthetic peptide

<400> 6

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

130

21027432(21020135).ST25
 Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp
 225 230 235 240
 Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Leu Ser
 245 250 255
 Asp His Ile Ile Asp Gln Lys Thr Asp Ile Ala Gln Asn Gln Ala Asn
 260 265 270
 Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Gln Tyr Ala Gln
 275 280 285
 Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser Glu Asn
 290 295 300
 Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala
 305 310 315 320
 Tyr Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser
 325 330 335
 Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu
 340 345 350
 Gln Asp Ala Tyr Ala Lys Gln Gln Ala Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn
 355 360 365
 Lys Ala Ser Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
 370 375 380
 Ile Ala Asn Asn Ile Thr Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp
 385 390 395 400
 Lys His Arg Ser Asp Ile Lys Thr Leu Ala Lys Thr Ser Ala Ala Asn
 405 410 415
 Thr Asp Arg Ile Ala Lys Asn Lys Ala Asp Asp Asp Ala Ser Phe Glu
 420 425 430
 Thr Leu Thr Lys Asn Gln Asn Thr Leu Ile Glu Lys Asp Lys Glu His
 435 440 445
 Asp Lys Leu Ile Thr Ala Asn Lys Thr Ala Ile Asp Ala Asn Lys Ala
 450 455 460
 Ser Ala Asp Thr Lys Phe Ala Ala Thr Ala Asp Ala Phe Thr Lys Asn
 465 470 475 480
 Gly Asn Ala Ile Thr Lys Asn Ala Lys Ser Ile Thr Asp Leu Gly Thr
 485 490 495

131

21027432(21020135).ST25
 Lys Val Asp Gly Phe Asp Ser Arg Val Thr Ala Leu Asp Thr
 500 505 510

<210> 7

<211> 322

<212> PRT

<213> protein fragment from *Moraxella catarrhalis* (UspA2 30-351) or synthetic peptide

<400> 7

Gln Ala Lys Asn Asp Ile Thr Leu Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Ile Lys
 1 5 10 15

Lys Ile Asp Gln Asn Glu Leu Glu Ala Asp Ile Gly Asp Ile Thr Ala
 20 25 30

Leu Glu Lys Tyr Leu Ala Leu Ser Gln Tyr Gly Asn Ile Leu Ala Leu
 35 40 45

Glu Glu Leu Asn Lys Ala Leu Glu Glu Leu Asp Glu Asp Val Gly Trp
 50 55 60

Asn Gln Asn Asp Ile Ala Asn Leu Glu Asp Asp Val Glu Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Lys Asn Gln Asn Ala Phe Ala Glu Gln Gly Glu Ala Ile Lys Glu Asp
 85 90 95

Leu Gln Gly Leu Ala Asp Phe Val Glu Gly Gln Glu Gly Lys Ile Leu
 100 105 110

Gln Asn Glu Thr Ser Ile Lys Lys Asn Thr Gln Arg Asn Leu Val Asn
 115 120 125

Gly Phe Glu Ile Glu Lys Asn Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Asn Glu
 130 135 140

Ser Ile Glu Asp Leu Tyr Asp Phe Gly His Glu Val Ala Glu Ser Ile
 145 150 155 160

Gly Glu Ile His Ala His Asn Glu Ala Gln Asn Glu Thr Leu Lys Gly
 165 170 175

Leu Ile Thr Asn Ser Ile Glu Asn Thr Asn Asn Ile Thr Lys Asn Lys
 180 185 190

Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu Asn Asn Val Val Glu Glu Leu Phe Asn
 195 200 205

132

21027432(21020135).ST25

Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile
210 215 220

Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp
225 230 235 240

Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Leu Ser
245 250 255

Asp His Ile Ile Asp Gln Lys Thr Asp Ile Ala Gln Asn Gln Ala Asn
260 265 270

Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Gln Tyr Ala Gln
275 280 285

Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser Glu Asn
290 295 300

Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala
305 310 315 320

Tyr Ala

<210> 8
<211> 148
<212> PRT
<213> protein fragment from Moraxella catarrhalis (UspA2 30-177) or synthetic peptide

<400> 8
Gln Ala Lys Asn Asp Ile Thr Leu Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Lys Ile Asp Gln Asn Glu Leu Glu Ala Asp Ile Gly Asp Ile Thr Ala
20 25 30

Leu Glu Lys Tyr Leu Ala Leu Ser Gln Tyr Gly Asn Ile Leu Ala Leu
35 40 45

Glu Glu Leu Asn Lys Ala Leu Glu Glu Leu Asp Glu Asp Val Gly Trp
50 55 60

Asn Gln Asn Asp Ile Ala Asn Leu Glu Asp Asp Val Glu Thr Leu Thr
65 70 75 80

Lys Asn Gln Asn Ala Phe Ala Glu Gln Gly Glu Ala Ile Lys Glu Asp
85 90 95

21027432(21020135).ST25

Leu Gln Gly Leu Ala Asp Phe Val Glu Gly Gln Glu Gly Lys Ile Leu
 100 105 110

Gln Asn Glu Thr Ser Ile Lys Lys Asn Thr Gln Arg Asn Leu Val Asn
 115 120 125

Gly Phe Glu Ile Glu Lys Asn Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Asn Glu
 130 135 140

Ser Ile Glu Asp
 145

<210> 9

<211> 340

<212> PRT

<213> protein fragment from *Moraxella catarrhalis* (UspA2 200-539) or synthetic peptide

<400> 9

Asn Glu Thr Leu Lys Gly Leu Ile Thr Asn Ser Ile Glu Asn Thr Asn
 1 5 10 15

Asn Ile Thr Lys Asn Lys Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu Asn Asn Val
 20 25 30

Val Glu Glu Leu Phe Asn Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Ala
 35 40 45

Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln
 50 55 60

Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn Val Glu Glu
 65 70 75 80

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

Ala Gln Asn Gln Ala Asn Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr Asn Glu Leu
 100 105 110

Gln Asp Gln Tyr Ala Gln Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn
 115 120 125

Lys Ala Ser Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr
 130 135 140

Asn Glu Leu Gln Asp Ala Tyr Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp
 Sida 12

134

21027432(21020135).ST25

145		150		155		160									
Ala	Leu	Asn	Lys	Ala	Ser	Ser	Glu	Asn	Thr	Gln	Asn	Ile	Glu	Asp	Leu
				165					170					175	
Ala	Ala	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Asp	Ala	Tyr	Ala	Lys	Gln	Gln	Ala	Glu
			180					185					190		
Ala	Ile	Asp	Ala	Leu	Asn	Lys	Ala	Ser	Ser	Glu	Asn	Thr	Gln	Asn	Ile
		195					200					205			
Ala	Lys	Asn	Gln	Ala	Asp	Ile	Ala	Asn	Asn	Ile	Thr	Asn	Ile	Tyr	Glu
	210					215					220				
Leu	Ala	Gln	Gln	Gln	Asp	Lys	His	Arg	Ser	Asp	Ile	Lys	Thr	Leu	Ala
225					230					235					240
Lys	Thr	Ser	Ala	Ala	Asn	Thr	Asp	Arg	Ile	Ala	Lys	Asn	Lys	Ala	Asp
				245					250					255	
Asp	Asp	Ala	Ser	Phe	Glu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Asn	Thr	Leu	Ile
			260					265					270		
Glu	Lys	Asp	Lys	Glu	His	Asp	Lys	Leu	Ile	Thr	Ala	Asn	Lys	Thr	Ala
		275					280					285			
Ile	Asp	Ala	Asn	Lys	Ala	Ser	Ala	Asp	Thr	Lys	Phe	Ala	Ala	Thr	Ala
	290					295					300				
Asp	Ala	Phe	Thr	Lys	Asn	Gly	Asn	Ala	Ile	Thr	Lys	Asn	Ala	Lys	Ser
305					310					315					320
Ile	Thr	Asp	Leu	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Gly	Phe	Asp	Ser	Arg	Val	Thr
				325					330					335	
Ala	Leu	Asp	Thr												
			340												

<210> 10

<211> 157

<212> PRT

<213> protein fragment from Moraxella catarrhalis (UspA2 302-458) or synthetic peptide

<400> 10

Ile	Gln	Asp	Leu	Ala	Thr	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Asp	Gln	Tyr	Ala	Gln
1				5					10					15	

135

21027432(21020135).ST25
Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser Glu Asn
20 25 30
Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala
35 40 45
Tyr Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser
50 55 60
Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu
65 70 75 80
Gln Asp Ala Tyr Ala Lys Gln Gln Ala Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn
85 90 95
Lys Ala Ser Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
100 105 110
Ile Ala Asn Asn Ile Thr Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp
115 120 125
Lys His Arg Ser Asp Ile Lys Thr Leu Ala Lys Thr Ser Ala Ala Asn
130 135 140
Thr Asp Arg Ile Ala Lys Asn Lys Ala Asp Asp Asp Ala
145 150 155

INTERACCIÓN DE LA MORAXELLA CATARRHALIS CON CÉLULAS
EPITELIALES, PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRA CELULAR Y EL SISTEMA
COMPLEMENTO

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se relaciona con la *Moraxella catarrhalis* y su capacidad para interactuar con células epiteliales vía proteínas de matriz extracelular tales como la fibronectina y laminina, y también a su capacidad para
10 inhibir el sistema complemento. La interacción con estas proteínas extracelulares es útil en la preparación de vacunas.

Antecedentes de la técnica

15 La capacidad para ligar células epiteliales es de gran importancia para diversas especies bacterianas, por ejemplo, el *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* posee proteínas de ligado a la fibronectina (FnBP) con una organización de secuencia relacionada. Estas FnBP son conocidas como componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz
20 adhesivo (MSCRAMM). Estas explotan la estructura modular de la fibronectina formando conjuntos paralelos extendidos beta-cremalleras en su ligado a la fibronectina. [27, 39, 47, 73] La función es mediar la adhesión bacteriana y la invasión de células anfitrionas

25 La *Moraxella catarrhalis* mucosal patógena importante es la tercera causa de ataque bacteriano de otitis aguda media en los niños después del *Streptococcus pneumoniae* Y *Haemophilus Influenzae*. [14, 40, 55] *M. catarrhalis*

también es uno de los más comunes habitantes en la faringe de niños sanos. Adicionalmente, la *M. catarrhalis* también es una causa común de la sinusitis y de infecciones del tracto respiratorio inferior en adultos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). [74] El éxito de estas especies en los pacientes con

5 COPD está probablemente relacionado en parte con su gran repertorio de adhesinas.

En años recientes el enfoque de la investigación ha sido sobre las proteínas de membrana exterior y su interacción con el anfitrión humano. [6, 48, 56] Algunas

10 de estas proteínas de membrana exterior parecen tener funciones adhesivas que incluyen entre otras, la proteína de ligado A1 IgD a la *M. catarrhalis* (MID, también designada Hag), la proteína CD, la proteína de adherencia *M. catarrhalis* (McaP) y las proteínas de superficie ubicua (Usp). [1, 22, 33, 48, 61, 81, 84]

15 Resumen de la invención

En vista del hecho de que se ha encontrado que la *M. catarrhalis* es la que causa el inicio de infecciones en las vías respiratorias superiores e inferiores, existe una necesidad actual de desarrollar vacunas que puedan ser usadas contra

20 la *M. catarrhalis*.

El propósito de la presente invención por lo tanto ha sido encontrar de que manera interactúa la *M. catarrhalis* con las células epiteliales en el cuerpo y afectan el sistema inmune. De esta manera, las sustancias que puedan actuar

25 como vacunas contra la *M. catarrhalis* pueden ser desarrolladas.

En este estudio, usando mutantes de *M. catarrhalis* derivados de aislados clínicos, los inventores han sido capaces de mostrar que tanto la UspA1 y A2 ligan a la fibronectina y laminina. Más aún, los inventores han sido capaces de mostrar que la *M. catarrhalis* interfiere con el trayecto clásico del sistema complemento, y
5 también para elucidar de que manera ellos interfiere.

Muchas bacterias se adhieren a las células epiteliales mediante MSCRAMMS que liga a la fibronectina. [54, 77] *Pseudomonas aeruginosa* ha sido un FnBP que se liga a la fibronectina asociada a las células en células epiteliales
10 nasales. [69] Bloquear las interacciones de la bacteria con la proteína de fibronectina puede ayudar al tejido anfitrión a sobreponerse a la infección. De hecho, se ha mostrado que los anticuerpos contra un FnBP de *S. aureus* resultaron en una clarificación rápida de la bacteria en ratones infectados. [71]

15 Las proteínas recombinantes truncadas UspA1/A2 junto con fragmentos más pequeños que separan la molécula completa han sido ensayadas de acuerdo con la presente invención en cuanto a la ligadura a la fibronectina. Tanto el UspA1 y A2 ligan a la fibronectina y los dominios que ligan a la fibronectina se encontraron localizados dentro de UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. Estas dos proteínas truncadas
20 inhibieron ambas el ligado de la *M. catarrhalis* a las células epiteliales conjuntivas de Chang a un grado similar como los anticuerpos anti-fibronectina. Las observaciones hechas muestran que tanto la UspA1 y A2 de la *M. catarrhalis* están involucradas en la adherencia a las células epiteliales mediante a la fibronectina asociada a las células. Los sitios activos biológicamente dentro de la
25 UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ han sido sugeridos por lo tanto como candidatos potenciales para ser incluidos en una vacuna contra la *M. catarrhalis*.

Adicionalmente, los inventores han estudiado y caracterizado el ligando de la *M. catarrhalis* a la laminina. La *M. catarrhalis* es una causa común de exarcebaciones infecciosas en pacientes con COPD. El éxito de estas especies en los pacientes con COPD está probablemente relacionado en parte a su gran repertorio de adhesinas. Adicionalmente, hay cambios patológicos tales como pérdida de la integridad epitelial con exposición de la membrana basal en donde la capa de laminina misma se ha engruesado en los fumadores. [4] Se ha mostrado que algunos patógenos son capaces de ligar a la laminina y de esta manera contribuyen a su capacidad para adherirse a tales superficies mucosales dañadas y desnudas. Estos incluyen patógenos conocidos por causar enfermedad significativa en las vías respiratorias tales como el *S. aureus* y *P. aeruginosa* entre otros. [7, 63] Los presentes inventores han sido capaces de mostrar que la proteína de superficie ubicua *M. catarrhalis* (Usp) A1 y A2 también se ligan a la laminina. Los dominios de ligando de la laminina del UspA1 y A2 se encontraron, entre otros, dentro de las mitades del terminal N del UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA2³⁰⁻³⁵¹. Estos dominios también contienen los dominios de ligando de la fibronectina. Sin embargo, los fragmentos más pequeños que ligan a la fibronectina, UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, no ligan a la laminina a un grado apreciable. Los fragmentos más pequeños que la mitad del terminal N del UspA1 (UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹) pierde toda su capacidad para ligar la laminina, mientras que con el UspA2, solamente el UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ se liga a la laminina a pesar de un nivel inferior al de la proteína recombinante completa (UspA2³⁰⁻⁵³⁹). Estos hallazgos sugieren que las partes diferentes de la molécula pueden tener diferentes papeles funcionales. Se encontró también que la UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ tiene propiedades de ligando a la laminina.

Haciendo la comparación de las regiones de ligando a la laminina más pequeñas de la UspA1 y A2, encontramos que existe sin embargo, una muy poca

similaridad por vía de homología de aminoácidos entre la UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ y la UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ (datos no mostrados). Esto no sorprende ya que es un hecho conocido de que ambas proteínas tienen una estructura de cabeza globular en forma de "chupeta" a pesar de tener solamente un 22% de identidad tanto en ambas mitades de terminal N. [2, 32]

Los sitios activos biológicamente dentro de la UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ son sugeridos como candidatos potenciales para ser incluidos en una vacuna contra la *M. catarrhalis*.

10

Finalmente, los inventores han estudiado la interacción entre las proteínas de superficie ubicua *M. catarrhalis* A1 y A2 y el sistema inmune innato, y se ha encontrado que la *M. catarrhalis* interfiere con el sistema complemento. El sistema complemento es una de las primeras líneas de defensa innata contra microorganismos patogénicos, y la activación de este sistema lleva a una cascada de posición de proteína en la superficie bacteriana resultando en la formación de la membrana de ataque complejo o opsonización del patógeno seguido por fagocitosis [85, 86] Una de las más importantes proteínas de complemento es la C3, que está presente en la circulación en una concentración similar a algunas inmunoglobulinas (1-1.2 mg/ml). La C3 no solamente juega un papel crucial en in opsonino, sino también es el enlace común entre la lectina y los trayectos alternativos clásicos de la activación del complemento. Las funciones de trayecto alternativo como lazo de amplificación para los trayectos clásico y de lectina y pueden también ser activados espontáneamente mediante el ligado covalente de C3 a la superficie de un microbio en la ausencia de inhibidores complemento. La deposición de C3 requiere la presencia de un enlace de tioéster interno formado en la proteína nativa mediante la proximidad de un grupo sulfidrilo (Cys¹⁰¹⁰) y un

glutamilo carbonilo (Gln¹⁰¹²) en la cadena α del C3. [76] La división oroteolítica de un péptido de 77 residuos del terminal amino de la cadena α del C3 genera C3a (anafilatoxina) y C3b. El ligado de C3b es entonces llevado a cabo mediante un enlace covalente entre el grupo carbonilo del tioéster metastable y cualquiera
5 entre los grupos de proteínas o estructuras de carbohidratos- -NH₂ o -OH sobre la superficie activadora. [36, 37] El *M. catarrhalis* UspA1 y A2 se ha encontrado que ligan de manera no covalente en una dosis dependiente tanto del tercer componente de complemento (C3) del suero tratado con EDTA y el C3 tratado con metilamina (C3met). La UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ se encuentra que ligan al C3 y
10 C3met. La región de ligado al C3 para la UspA2 se encontró principalmente localizado en UspA2²⁰⁰⁻⁴⁵⁸. La UspA1 sin embargo se encontró que tiene un papel menor en las interacciones. Los sitios activos biológicamente dentro del UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ están sugeridos como candidatos potenciales para ser incluidos en una vacuna contra el *M. catarrhalis*.

15

La familia UspA consiste de UspA1 (peso molecular 88 kDa), UspA2 (62 kDa), y la proteína híbrida UspA2H (92 kDa). [2, 43] Estas proteínas migran como complejos de alta masa molecular en SDS-PAGE, y son conservados relativamente y por lo tanto candidatos importantes como vacunas. Las
20 secuencias de aminoácidos del UspA1 y A2 son 43 % idénticas y tienen 140 residuos de aminoácidos que son 93% idénticos. [2] En una serie de 108 aislados nasofaríngeos de *M. catarrhalis* niños jóvenes con otitis media, los genes uspA1 y uspA2 fueron detectados en 107 (99 %) y 108 (100 %) de los aislados, respectivamente. 21% fueron identificados como tenían el gen de la variante
25 híbrida uspA2H. [50] Más aún, es conocido que los anticuerpos adquiridos naturalmente contra el UspA1 y A2 son bactericidas. [15]

Diversas funciones han sido atribuidas a la familia de proteínas UspA. La expresión UspA1 es esencial para el ligado del *M. catarrhalis* a las células epiteliales conjuntivas Chang y las células epiteliales laríngeas Hep-2. [43, 49] En un estudio más reciente, el UspA1 mostró que se liga al antígeno carcinoembrionario relacionado con moléculas de adhesión celular (CEACAM) expresadas en las líneas de células epiteliales de pulmón A549. [31] El UspA1 purificado también ha mostrado que se liga a la fibronectina en experimentos dot blot mientras que el UspA2 purificado no lo hace. [49] Tanto el UspA1 y A2 pueden jugar papeles importantes para la resistencia al suero de la *M. catarrhalis* [1, 5, 58, 60]

La presente invención demuestra que tanto el UspA1 y el A2 son determinantes para el ligado del *M. catarrhalis* a la fibronectina y a la laminina en aislados clínicos de *M. catarrhalis* BBH18 y RH4. De manera muy interesante, el UspA1 y A2 recombinantes derivados del Bc5 del *M. catarrhalis* se ligan ambos a la fibronectina al mismo grado. Los dominios de ligado para la fibronectina fueron encontrados dentro de los residuos de aminoácidos 299 a 452 del UspA1 y 165 a 318 del UspA2. Estos dos dominios comparten 31 residuos de aminoácidos con identidad de secuencia. De manera muy importante, los fragmentos de proteína truncados que contienen estos residuos en UspA1 y UspA2 fueron capaces de inhibir el ligado de *M. catarrhalis* a las células epiteliales chang sugiriendo que las interacciones con estas células se hicieron vía fibronectina asociada a células.

Los dominios de ligado para la laminina se encontraron dentro de los residuos de aminoácido mencionados anteriormente. Los ensayos de ligado con proteínas recombinantes revelaron que las regiones de ligado principales fueron

localizadas en las partes de terminal N, en donde ambas proteína forman una cabeza globular.

Los factores bacterianos que median la adherencia al tejido y a los
5 componentes de matriz extracelular (ECM) son agrupados juntos en una única familia llamada "componentes de superficie microbiana que reconoce las moléculas de matriz adhesiva" (MSCRAMMS). Ya que tanto UspA1/A2 se ligan a la fibronectina y a la laminina, estas proteínas pueden ser designadas como MSCRAMMS.

10

De acuerdo con un aspecto la presente invención suministra un péptido que tiene la secuencia ID no. 1, y fragmentos, homólogos, equivalentes funcionales, derivados, degenerados o hidroxilación, sulfolación, o productos de glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

15

De acuerdo con otro aspecto la presente invención suministra un péptido que tiene la secuencia ID no. 2, y fragmentos, homólogos, equivalentes funcionales, derivados, productos de degeneración, o hidroxilación, sulfonación o glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

20

De acuerdo con un aspecto adicional la presente invención suministra un péptido que tiene la secuencia ID no. 3, y fragmentos, homólogos, equivalentes funcionales, derivados, productos degenerados o de hidroxilación, sulfonación o glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

25

De acuerdo con otro aspecto la presente invención suministra un péptido que tiene la secuencia ID no. 4, y fragmentos, homólogos, equivalentes

funcionales, derivados, productos degenerados o de hidroxilación, sulfonación o glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

De acuerdo con un aspecto adicional la presente invención suministra un
5 péptido que tiene la secuencia ID no. 5, y fragmentos, homólogos, equivalentes
funcionales, derivados, productos degenerados o de hidroxilación, sulfonación o
glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

De acuerdo con un aspecto adicional la presente invención suministra un
10 péptido que tiene la secuencia ID no. 6, y fragmentos, homólogos, equivalentes
funcionales, derivados, productos degenerados o de hidroxilación, sulfonación o
glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

De acuerdo con otro aspecto la presente invención suministra un péptido
15 que tiene la secuencia ID no. 7, y fragmentos, homólogos, equivalentes
funcionales, derivados, productos degenerados o de hidroxilación, sulfonación o
glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

De acuerdo con otro aspecto la presente invención suministra un péptido
20 que tiene la secuencia ID no. 8, y fragmentos, homólogos, equivalentes
funcionales, derivados, productos degenerados o de hidroxilación, sulfonación o
glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

De acuerdo con otro aspecto la presente invención suministra un péptido
25 que tiene la secuencia ID no. 9, y fragmentos, homólogos, equivalentes
funcionales, derivados, productos degenerados o de hidroxilación, sulfonación o
glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

De acuerdo con otro aspecto la presente invención suministra un péptido que tiene la secuencia ID no. 10, y fragmentos, homólogos, equivalentes funcionales, derivados, productos degenerados o de hidroxilación, sulfonación o glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención suministra el uso de por lo menos un péptido de acuerdo con la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una infección, preferiblemente una infección causada por *M. catarrhalis*, en particular causada por el portador de *M. catarrhalis* sobre superficies mucosales.

De acuerdo con otro aspecto, la invención suministra adicionalmente un ligando que comprende un dominio que liga a la fibronectina, dicho ligando consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de Secuencia ID No. 1, La secuencia ID No. 2 y La secuencia ID No. 3, y fragmentos, homólogos, equivalentes funcionales, derivados, productos degenerados o de hidroxilación, sulfonación o glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

20

La invención suministra adicionalmente un ligando que comprende un dominio de ligado a la laminina, dicho ligando consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de La secuencia ID No. 4 a La secuencia ID No. 8, y fragmentos, homólogos, equivalentes funcionales, derivados, productos degenerados o de hidroxilación, sulfonación o glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

25

146

Adicionalmente, la presente invención suministra un ligando que comprende un dominio de ligado a C3 o C3met, dicho ligando consiste de una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de La secuencia ID No. 4, La secuencia ID No. 6, La secuencia ID No. 9 y La secuencia ID No. 10, y
5 fragmentos, homólogos, equivalentes funcionales, derivados, productos degenerados o de hidroxilación, sulfonación o glicosilación y otros productos de procesamiento secundario del mismo.

Adicionalmente, la presente invención suministra un medicamento que
10 comprende uno o más ligandos de acuerdo con la invención y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglomerantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables

La presente invención suministra adicionalmente una vacuna que
15 comprende uno o más ligandos de acuerdo con la presente invención y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglomerantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también suministra un método para tratar o prevenir una
20 infección en un individuo, pre feriblemente una infección causada por *M. catarrhalis*, en particular causada por el portador de *M. catarrhalis* sobre superficies mucosales, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de un medicamento o vacuna de acuerdo con la presente invención.

25

Finalmente, la presente invención también suministra una secuencia de ácido nucleico que codifica un ligado, proteína o péptido de la presente invención,

/

147

lo mismo que homólogos, polimorfismos, degenerados y variantes divididas de los mismos.

La divulgación adicional de los objetos, problemas, soluciones, y rasgos de la presente invención será evidente a partir de la siguiente descripción detallada de la invención con referencia a los dibujos y a las reivindicaciones adjuntas.

La expresión ligando como se usa aquí tiene el propósito de denotar tanto la molécula completa que liga al receptor y cualquier parte de la misma que incluye el dominio de ligado al receptor tal que este retiene la propiedad de ligado al receptor. Los ligandos comprenden dominios de ligado receptor equivalentes también son incluidos en la presente invención.

Las expresiones fragmento, homólogo, equivalente funcional y derivados se relacionan con variantes como modificaciones y/o partes de los péptidos y fragmentos de proteínas de acuerdo con la invención los cuales retienen las propiedades de ligado a la fibronectina, laminina, C3 o C3met deseadas.

Un homólogo del UspA1 de acuerdo con la presente invención se define como una secuencia que tiene por lo menos 72% de identidad de secuencia, como puede verse en la Tabla 1 adelante.

Un fragmento de acuerdo con la presente invención está definido como cualquiera de las secuencias homólogas que son truncadas o extendidas por 1, 2, 5, 10, 15, 20 aminoácidos en el terminal N y/o truncados y extendidos por 1, 2, 5, 10, 15, 20 aminoácidos en el terminal C.

148

Las expresiones producto degenerado, de hidroxilación, de sulfonación, o de glicosilación u otros productos de procesamiento secundario se relacionan con variantes y/o modificaciones de los péptidos y fragmentos de proteínas de acuerdo con la invención que han sido alterados comparados con el péptido o fragmento de proteína original por degeneración, hidroxilación, sulfonación o glicosilación pero que retienen las propiedades de ligado deseadas a la fibronectina, laminina, C3 o C3met.

La presente invención se relaciona especialmente con infecciones causadas por *Moraxella catarrhalis*. Un péptido de acuerdo con la presente invención puede ser usado para el tratamiento o profilaxis de la otitis media, sinusitis o infecciones del tracto respiratorio inferior.

Tabla 1: Alineación múltiple de longitud completa de las secuencias de proteína UspA1, asociadas por porcentajes de identidad

	O12E	O35E	O46E	P44	TTA24	TTA37	V1171
ATCC25238	81	75	83	83	84	79	84
O12E		74	77	83	76	72	75
O35E			72	74	83	73	78
O46E				81	81	82	80
P44					81	75	77
TTA24						76	84
TTA37							78

Tabla 2: Análisis de la pila de UspA2-cepas y secuencias usadas

	<i>acc</i>	Cepa	<i>des</i>	<i>sl</i>
☐ TREMBL:O54407 MORCA	O54407	O35E	Proteína superficie protein A 2.	576
☐ TREMBL:Q58XP4 MORCA	Q58XP4	MC317	UspA2.	650
☐ TREMBL:Q848S1 MORCA	Q848S1	E22	Proteína superficie ubicua A2H.	877
☐ TREMBL:Q848S2 MORCA	Q848S2	V1122	Proteína superficie ubicua A2.	616
☐ TREMBL:Q8GH86 MORCA	Q8GH86	P44	UspA2.	668
☐ TREMBL:Q9L961 MORCA	Q9L961	TTA37	USPA2H.	889
☐ TREMBL:Q9L962 MORCA	Q9L962	O46E	USPA2H.	894
☐ TREMBL:Q9L963 MORCA	Q9L963	O12E	USPA2 (Proteína superficie ubicua A2.	684
☐ TREMBL:Q9XD51 MORCA	Q9XD51	V1171	UspA2.	674
☐ TREMBL:Q9XD53 MORCA	Q9XD53	TTA24	UspA2.	613
TREMBL:Q8RTB2 MORCA	Q8RTB2	SP12-5	UspA2	686
☐ TREMBL:Q9XD55 MORCA	Q9XD55	ATCC25238	UspA2.	630
Forsgren_UspA2			UspA2.	630

De acuerdo a lo anterior, la presente invención suministra un ligando aislado de la proteína de membrana exterior de la *Moraxella catarrhalis* que tiene

5 ligado a la laminina y/o fibronectina y/o C3 en donde dicho ligando es un polipéptido que comprende o consiste de una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1-10 que son derivado de las secuencias UspA1 & UspA2 del BC5 de *Moraxella catarrhalis* mostradas abajo,

10 o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado, o de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otro producto de procesamiento secundario del mismo.

La UspA1 de longitud completa de la cepa BC5 de la *Moraxella catarrhalis*:

MNKIYKVKKN AAGHLVACSE FAKGHTKKAV LGSLLIVGIL GMATTASAQK
VGKATNKISG GDNNTANGTY LTIGGGDYNK TKGRYSTIGG GLFNEATNEY
STIGSGGYNK AKGRYSTIGG GGYNEATNQY STIGGGDNNT AKGRYSTIGG
GGYNEATIEN STVGGGGYNQ AKGRNSTVAG GYNNEATGTD STIAGGRKNQ
5 ATGKGSFAAG IDNKANADNA VALGNKNTIE GENSVAIGSN NTVKKGQQNV
FILGSNTDTT NAQNGSVLLG HNTAGKAATI VNSAEVGGLS LTGFAGASKT
NGTIVSVGKK GKERQIVHVG AGEISDTSTD AVNGSQLHVL ATVVAQNKAD
IKDLDDDEVGL LGEEINSLEG EIFNNQDAIA KNQADIKTLE SNVEEGLLDL
SGRLLDQKAD IDNNINNIYE LAQQQDQHSS DIKTLKNNVE EGLLDLSGRL
10 IDQKADLT KD IKALESNVEE GLLDLSGRLI DQKADIAKNQ ADIAQNQTDI
QDLAAYNELQ DAYAKQQTEA IDALNKASSA NTDRIATAEL GIAENKKDAQ
IAKAQANENK DGIKNQADI QLHDKKITNL GILHSMVARA VGNNTQGVAT
NKADIAKNQA DIANNIKNIY ELAQQQDQHS SDIKTLAKVS AANTDRIAKN
KAEADASFET LTKNQNTLIE QGEALVEQNK AINQELEGFA AHADVQDKQI
15 LQNQADITTN KTAIEQNINR TVANGFEIEK NKAGIATNKQ ELILQNDRNL
RINETNNHQD QKIDQLGYA1 KEQQQHFNNR ISAVRQTAG GIANAIAT
LPSPSRAGEH HVLFSGSYHN GQAAVSLGAA GLSDTGKSTY KIGLSWSDAG
GLSGGVGGSY RWK

20 La UspA2 de longitud completa de la cepa BC5 de la *Moraxella catarrhalis*

MKTMKLLPLK IAVTSAMIIG LGAASTANAQ AKNDITLEDL PYLIKKIDQN
ELEADIGDIT ALEKYLALSQ YGNILALEEL NKALEELDED VGWNQNDIAN
LEDDVETLTK NQNAFAEQGE AIKEDLQGLA DFVEGQEGKI LQNETSIIKN
25 TQRNLVNGFE IEKNKDIAIAK NNESIEDLYD FGHEVAESIG EIIAHNEAQN
ETLKGLITNS IENTNNITKN KADIQALENN VVEELFNLSG RLIDQKADID
NNINNIYELA QQQDQHSSDI KTLKKNVEEG LLELSDHIID QKTDIAQNQA

151

NIQDLATYNE LQDQYAQKQT EAIDALNKAS SENTQNIEDL AAYNELQDAY
 AKQQTEAIDA LNKASSENTQ NIEDLAAYNE LQDAYAKQQA EAIDALNKAS
 SENTQNIKN QADIANNITN IYELAQQQDK HRSDIKTLAK TSAANTDRIA
 KNKADDDASF ETLTKNQNTL IEKDKEHDKL ITANKTAIDA NKASADTKFA
 5 ATADAFTKNG NAITKNAKSI TDLGTKVDGF DSRVTALDTK VNAFDGRITA
 LDSKVENGMA AQAALSGLFQ PYSVGKFNAT AALGGYGSKS AVAIGAGYRV
 NPNLAFKAGA AINTSGNKKG SYNIGVNYEF

En una modalidad preferida, el ligando es un polipéptido [o un polipéptido
 10 truncado comparado con un polipéptido tipo silvestre] que comprende o consiste
 de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ
 ID No: 1-10, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto
 degenerado o de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otro producto de
 procesamiento secundario del mismo.

15

El término ligando es usado aquí para denotar tanto la molécula completa
 que se liga a la laminina y/o fibronectina y/o C3 y cualquier parte de la misma que
 incluye un dominio de ligado a la laminina y/o fibronectina y/o C3 tal que este
 retiene la propiedad de ligado respectiva. Así, "ligando" abarca moléculas que
 20 consisten solamente del dominio que liga a la laminina y/o fibronectina y/o C3 es
 decir la región de polipéptido o regiones de polipéptido requeridas para el ligado.

Para el propósito de esta invención las propiedades de ligado a laminina,
 fibronectina o C3 de un polipéptido pueden ser determinadas como sigue:

25

Para el propósito de esta invención las propiedades de ligado de laminina,
 fibronectina o C3 de un polipéptido pueden ser determinadas como sigue: los

152

polipéptidos pueden ser marcados con ^{125} yodo u otros compuestos radiactivos y ser ensayados en cuanto al ligado en radioinmuno ensayos (RIA) como fase fluida o sólida (por ejemplo dot blots). Más aún, los polipéptidos pueden ser analizados en cuanto a ligado con ensayos inmunosorbentes ligados a enzima (ELISA) o

5 citometría de flujo usando anticuerpos apropiados y sistemas de detección. Las interacciones entre polipéptidos y laminina, fibronectina, o C3 pueden ser examinados adicionalmente por resonancia de plasmón de superficie (Biacore). Ejemplos de métodos se ejemplifican en detalle en la sección material y métodos.

10 En otra modalidad preferida, el polipéptido [o el polipéptido truncado comparado con un polipéptido tipo silvestre] comprende o consiste de por lo menos una de las secuencias conservadas de entre la SEQ ID NO: 1-10 que son identificadas en la alineación mostrada aquí. Así, en esta modalidad, el polipéptido [o polipéptido truncado comparado con un polipéptido tipo silvestre] comprende o

15 consiste de por lo menos uno de:

Del UspA1 (fragmentos conservados del dominio de ligado a la fibronectina-
'/' escogencias alternativas de separación de un aminoácido en una posición)

20 G T/V V S V G S/K Q/E/K/A G/N K/N/G/H/S E R Q I V N/H V G A G Q/N/E/K I S/R
A/D T/D S T D A V N G S Q L H/Y A L A S/K/T T/A/V I/V

S T D A V N G S Q L

25 L L N/D L S G R L L/I D Q K A D I D N N I N N/H I Y E/D L A Q Q Q D Q H S S D I
K T L K

DQKADIDNNIN

LAQQQDQHSSDIKTLK

5 De la UspA2 (fragmentos conservados del dominio de ligado a la fibronectina- ' / ' escogencia alternativa de separación de un aminoácido en una posición)

KADIDNNINN/HIYELAQQQDQHSSD

10

I K/Q T/A L K/E K/N/S N V/I E/V E G/E L L/F E/N L S D/G H/R I/L I D Q K T/A D I/L
A/T Q/K N/D

De la UspA2 (fragmentos conservados del dominio de ligado a C3- ' / ' escogencia alternativa de separación de un aminoácido en una posición)

15

IE/Q DLAAYNELQDAYAKQQATEAIDALNKASSENTQNI
AKNQADIANNIT/NNIYELAQQQDK/QHR/SSDIKTLAKT/ASAA
NTD/NRI

20

DLAAYNELQDAYAKQQ

EAIDALNKASSENTQNI
AKNQADIANNI

25 Podrá entenderse que los ligandos de polipéptido de la invención pueden comprender un dominio de ligado a laminina y/o fibronectina y/o C3 de secuencia recitada aquí que es modificada mediante la adición o eliminación de residuos de aminoácido a o desde las secuencias recitadas aquí sea en uno o ambos terminales N o C, dichos péptidos modificados retienen la capacidad para ligar a la

154

laminina y/o fibronectina y/o C3, respectivamente. De acuerdo a lo anterior la invención suministra adicionalmente un ligando que comprende o consiste de un polipéptido en el cual 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 o 1 residuos de aminoácido han sido agregados a o eliminados de una secuencia de aminoácidos recitada aquí sea en uno o ambos de los terminales N o C, en donde dicho polipéptido modificado retiene la capacidad para ligar a la laminina y/o la fibronectina y/o C3; y/o producir una respuesta inmune contra el péptido no modificado. Por extensión se quiere significar agrandar en longitud la secuencia usando el contexto del péptido de secuencias de aminoácidos de longitud completa desde los cuales se deriva.

10

Con respecto a los fragmentos de los polipéptidos de la invención, cualquier tamaño de fragmento puede ser usado en la invención (con base en las secuencias homólogas/regiones conservadas/dominios funcionales discutidos aquí) siempre que el fragmento retenga la capacidad para ligar a la laminina y/o fibronectina y/o C3. Puede ser deseable aislar un péptido mínimo que puede contener solamente aquellas regiones requeridas para el ligado al receptor. Los ligandos de polipéptido de acuerdo con la invención pueden ser derivados de las proteínas UspA1 o UspA2 de la *Moraxella catarrhalis* mediante el truncado sea de cada uno o de ambos terminales N y C. Los truncados no son molécula de UspA1 o A2 nativas de longitud completa. De acuerdo a lo anterior, la invención suministra adicionalmente una secuencia de UspA1 tipo silvestre que carece de por lo menos (o exactamente) de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160 etc a 298 aminoácidos del terminal N, y/o carece de por lo menos (o exactamente) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 etc a 450 aminoácidos del terminal C. Preferiblemente, el truncado retiene la función de ligado a la fibronectina (opcionalmente también a la laminina y/o ligado al C3).

Tabla 3. Combinaciones posibles de truncaciones en los terminales N y C de la proteína UspA1 tipo silvestre

No. de carencia de aminoácidos, lo menos o exactamente:																											
Del terminal N	Del terminal C																										
0	X	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360	380	400	420	440	450
20	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
30	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
40	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
50	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
60	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
70	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
80	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	280	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
100	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
120	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
140	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
160	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
180	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
200	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	280	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
220	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
240	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
260	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
280	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
298	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450

156

De acuerdo con lo anterior, la invención suministra adicionalmente una secuencia UspA2 tipo silvestre que carece de por lo menos (o exactamente) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, 164 aminoácidos del terminal N y/o carece de por lo menos (o exactamente) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 180, 200 etc a 3 12 aminoácidos del terminal C. Preferiblemente, el truncado retiene la función de ligado a la fibronectina (opcionalmente también el ligado a la laminina y/o C3). Truncados posibles pueden ser seleccionados entre aquellos mostrados en la siguiente tabla, todos están dentro del alcance de la invención.

Tabla 4. Combinaciones posibles de truncaciones en terminales N y C de la proteína UspA2 tipo silvestre

No. de carencia de aminoácidos, lo menos o exactamente:																				
Del terminal N	Del terminal C																			
0	X	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
20	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
30	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
40	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
50	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
60	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
70	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
80	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
100	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
120	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
140	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
160	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
164	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312

LS8

De acuerdo con esto, la invención suministra adicionalmente una secuencia de UspA2 tipo silvestre que carece de por lo menos (o exactamente) 5, 10, 15, 20, 25 o 29 aminoácidos del terminal N y/o que carece de por lo menos (o exactamente) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 etc a 453 aminoácidos del terminal C. Preferiblemente, el truncado retiene la función de ligado a la laminina (opcionalmente también el ligado a la fibronectina y/o C3). Posibles truncados se pueden seleccionar de aquellos mostrados en la siguiente tabla, todos dentro del alcance de la presente invención.

Tabla 5. Posibles combinaciones de truncaciones en terminales N y C de la proteína UspA2 del tipo silvestre

159

No. de carencia de aminoácidos, por lo menos o exactamente:							
Del terminal N	Del terminal C						
0	X	5	10	15	20	25	29
20	0	5	10	15	20	25	29
30	0	5	10	15	20	25	29
40	0	5	10	15	20	25	29
50	0	5	10	15	20	25	29
60	0	5	10	15	20	25	29
70	0	5	10	15	20	25	29
80	0	5	10	15	20	25	29
100	0	5	10	15	20	25	29
120	0	5	10	15	20	25	29
140	0	5	10	15	20	25	29
160	0	5	10	15	20	25	29
180	0	5	10	15	20	25	29
200	0	5	10	15	20	25	29
220	0	5	10	15	20	25	29
240	0	5	10	15	20	25	29
260	0	5	10	15	20	25	29
280	0	5	10	15	20	25	29
300	0	5	10	15	20	25	29
320	0	5	10	15	20	25	29
340	0	5	10	15	20	25	29
360	0	5	10	15	20	25	29
380	0	5	10	15	20	25	29
400	0	5	10	15	20	25	29
420	0	5	10	15	20	25	29
440	0	5	10	15	20	25	29
453	0	5	10	15	20	25	29

De acuerdo con esto, la invención suministra adicionalmente una secuencia UspA2 tipo silvestre que carece (o exactamente) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160 etc. a 301 aminoácidos del terminal N, y/o carece de por lo menos (o exactamente) de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160 o 172 aminoácidos del terminal C. Preferiblemente, el truncado retiene la función de ligado a C3 (opcionalmente también el ligado a la fibronectina y/o laminina). Posibles truncados se pueden seleccionar de aquellos mostrados en la siguiente tabla, todos dentro del alcance de la presente invención.

Tabla 6. Posibles combinaciones de truncaciones en terminales N y C de la proteína UspA2 tipo silvestre

No. de carencia de aminoácidos, por lo menos o exactamente:													
Del terminal N	Del terminal C												
0	X	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
20	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
30	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
40	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
50	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
60	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
70	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
80	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
100	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
120	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
140	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
160	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
180	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
200	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
220	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
240	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
260	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
280	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
290	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172
301	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172

Secuencias conocidas de UspA1 tipo silvestre que pueden ser truncadas de esta manera son aquellas de las cepas ATCC25238 (MX2; No. de acceso GenBank AAD43465), P44 (AAN84895), O35E (AAB96359), TTA37 (AAF40122), O12E (AAF40118), O46E (AAF36416), V1171(AAD43469), TTA24 (AAD43467) (Ver Tabla 1/Figura 19); o BC5 (ver anterior). Las secuencias conocidas de UspA2 tipo silvestre que pueden ser truncadas de esta manera son aquellas de las cepas O35E (No. de acceso GenBank O4407), MC317 (No. de acceso GenBank Q58XP4), E22 (No. de acceso GenBank Q848S1), V1122 (No. de acceso

161

GenBank Q848S2), P44 (No. de acceso GenBank Q8GH86), TTA37 (No. de acceso GenBank Q9L961), O46E (No. de acceso GenBank Q9L962), O12E (No. de acceso GenBank Q9L963), V1171 (No. de acceso GenBank Q9XD51), TTA24 (No. de acceso GenBank Q9XD53), SP12-5 (No. de acceso GenBank Q8RTB2), ATCC25238 (No. de acceso GenBank Q9XD55) (ver tabla 2/Figura 20) ; o BC5 [Forsgren_UspA2] (ver anterior).

Idealmente el UspA1 o UspA2 truncados de esta modalidad comprenden o consisten de una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1-10 o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otro producto de procesamiento secundario del mismo; o comprende o consiste de por lo menos una de las secuencias conservadas desde dentro de estas regiones que son identificadas en la alineación mostrada aquí, por ejemplo:

De la UspA1 (fragmentos conservados del dominio de ligado a la fibronectina- 'I' escogencia de alternativa de separación de un aminoácido en una posición)

G T V V S V G S / K Q / E / K / A G / N K / N / G / H / S E R Q I V N / H V G A G Q / N / E / K I S / R
A / D T / D S T D A V N G S Q L H / Y A L A S / K / T T / A / V I / V

S T D A V N G S Q L

L L N / D L S G R L L / I D Q K A D I D N N I N N / H I Y E / D L A Q Q Q D Q H S S D I
K T L K

162

DQKADIDNNIN

LAQQQDQHSSDIKTLK

De la UspA2 (fragmentos conservados del dominio de ligado a la fibronectina- 'I' escogencia de alternativa de separación de un aminoácido en una posición)

KADIDNNINN/HIYELAQQQDQHSSD

I K/Q T/A L K/E K/N/S N V/I E/V E G/E L L/F E/N L S D/G H/R I/L I D Q K T/A D I/L
A/T Q/K N/D

De la UspA2 (fragmentos conservados del dominio de ligado a C3-'I' escogencias alternativas de separación de un aminoácido en una posición)

IE/QDLAAYNELQDAYAKQQATEAIDALNKASSENTQNI
AKNQADIANNIT/NNIYELAQQQDK/QHR/SSDIKTLAKT/ASAA
NTD/NRI

DLAAYNELQDAYAKQQ

EAIDALNKASSENTQNI AKNQADIANNI

Puede ser conveniente producir proteínas de fusión que contienen ligandos de polipéptidos como se describen aquí. De acuerdo a lo anterior, en una modalidad adicional, la invención suministra proteínas de fusión que comprenden

ligandos de polipéptido de acuerdo con la invención. Preferiblemente una proteína de fusión de acuerdo con esta invención es menos de 50% idéntica a cualquier secuencia de longitud completa conocida en toda su longitud. Tales fusiones pueden constituir un derivado de polipéptido de la invención. Derivados adicionales pueden ser usados de los polipéptidos de la invención como un portador para un péptido covalentemente acoplado o partes de sacáridos. Estos pueden ser acoplados por ejemplo a oligosacáridos capsulares del neumococo o polisacáridos de, o lipooligosacáridos de la *Moraxella catarrhalis*, o lipooligosacáridos no clasificables del *Haemophilus influenzae*.

Los péptidos homólogos de la invención pueden ser identificados por comparación de secuencia. Péptidos homólogos son preferiblemente por lo menos 60% idénticos, más preferiblemente por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 99% idénticos en orden ascendente de preferencia a la secuencia de polipéptido descrita aquí o a los fragmentos de la misma o truncados de la invención sobre su longitud completa. Preferiblemente los péptidos homólogos retienen la capacidad para ligar a la fibronectina y/o laminina y/o C3; y/o producen una respuesta inmune contra las secuencias de péptido descritas aquí o los fragmentos de los mismos.

Las Figuras 19 y 20 muestran un alineamiento de secuencias de péptido de UspA1 y UspA2 de origen diferente que indica regiones de secuencia que son capaces de ser modificadas para formar secuencias homólogas mientras se retiene la función (Es decir la capacidad de ligado a la fibronectina y/o laminina y/o C3). Los péptidos homólogos al BC5 SEQ ID NO: 1-10 son por ejemplo aquella secuencia correspondiente a la secuencia de BC5 de otras cepas en las figuras 19 y 20.

164

Vacunas de la invención

Los polipéptidos/péptidos/dominios funcionales/fragmentos/truncados/derivados de la invención deberían ser formulados idealmente como una vacuna que comprende una cantidad efectiva de dichos componentes y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las vacunas de la invención pueden ser usadas para la administración a un paciente para la prevención o tratamiento de la infección por *Moraxella catarrhalis* u otitis media o sinusitis o infecciones del tracto respiratorio inferior. Ellas pueden ser administradas de cualquier forma conocida, incluyendo intramuscularmente, parenteralmente, mucosal e intranasalmente.

Combinación de vacunas de vacunas de la invención

Las vacunas de la presente invención pueden ser combinadas con otros antígenos de *Moraxella catarrhalis* para la prevención o tratamiento de las enfermedades anteriormente mencionadas.

Los inventores de la presente han encontrado en particular que la *Moraxella catarrhalis* tiene por lo menos dos medios de anidarse en el sistema inmune anfitrión para atacar el organismo. En adición a la interacción con C3 (y C4BP) mencionados en los ejemplos adelante, la *M. catarrhalis* tiene una fuerte afinidad para la IgD humana ligada a membrana y soluble mediante la proteína MID (también conocida como OMP106). El ligado de *Moraxella* dependiente de IgD a los linfocitos B resulta en una síntesis de inmunoglobulina policlonal que puede prohibir la producción de anticuerpos anti-*moraxella* monoclonales específicos. El

165

hecho de que la *M. catarrhalis* se anida en el sistema inmune humano de diversas maneras puede explicar porque la *M. catarrhalis* es un habitante tan común del tracto respiratorio.

Los inventores creen que la combinación de antígenos involucrados en la función de ligado a IgD (MID) y la función de ligado a C3 (UspA1 y/o UspA2) pueden suministrar una composición inmunogénica que da capacidades defensivas mejoradas al anfitrión contra el anidamiento de la *Moraxella* en el sistema inmune humano suministrando así una disminución mejorada en la *M. catarrhalis* sobre superficies mucosales.

Un aspecto adicional de la invención es por lo tanto una composición de vacuna que comprende una cantidad efectiva de UspA1 y/o UspA2 (particularmente el último) (por ejemplo polipéptidos de longitud completa o polipéptidos/péptidos/dominios funcionales/homólogos/fragmentos/truncados/derivados de la invención como se describió aquí, preferiblemente que retengan una función de ligado a C3) en combinación con una cantidad efectiva de la proteína MID (por ejemplo polipéptidos de longitud completa o polipéptidos/péptidos/dominios funcionales/homólogos/fragmentos/truncados/derivados de mismo, preferiblemente que retengan una función de ligado al IgD humano), y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La proteína MID, y los homólogos/fragmentos/truncados de ligado a IgD el mismo se describen en la WO 03/004651 (incorporada aquí como referencia). Particularmente los fragmentos adecuados para este propósito es un polipéptido que comprende (o consiste de) el fragmento F2 descrito en la WO 03/004651, o

las secuencias con por lo menos 60, 70, 80, 90, 95, 99% de identidad con respecto a este que preferiblemente retengan la actividad de ligado a IgD humano.

Los componentes MID y UspA de esta vacuna de combinación pueden ser separados uno del otro, o pueden ser fusionados convenientemente juntos mediante técnicas de biología molecular conocidas

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra 13 cepas de *M. catarrhalis* ensayadas en cuanto a ligado a fibronectina (A). El ligado a fibronectina fuerte correlacionado con la expresión de UspA1/A2 es detectado por el anti- UspA1/A2 pAb (B-I). Los perfiles de citometría de flujo del BBH18 de la *M. catarrhalis* tipo silvestre y de los mutantes deficientes de UspA1/A2 muestran un ligado dependiente al UspA1/A2-a la fibronectina soluble. Los perfiles de aislado clínico tipo silvestre (B y F) y los mutantes correspondientes libres de UspA1 (C y G), o UspA2 (D y H), y los mutantes dobles (E y I) que carecen tanto de UspA1 y UspA2 se muestran. Las bacterias fueron incubadas con anti- UspA1/A2 o fibronectina de conejo seguido por un pAb de anti-fibronectina. El pAb de conejo conjugado con FITC fue subsiguientemente agregado seguido por el análisis de citometría de flujo. Un experimento típico de tres con intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada perfil se muestra.

La Figura 2 muestra que los mutantes deficientes RH4 UspA2 de la *M. catarrhalis* no ligan a la fibronectina marcada con ^{125}I . El BL21 E. coli fue incluido como un control negativo que no se liga a la fibronectina. Las bacterias fueron incubadas con fibronectina marcada con ^{125}I seguido por varios lavados y

analizado en un contador gama. El ligado a la fibronectina al RH4 tipo silvestre expresa tanto el UspA1 y A2 fue establecido como 100 %. El valor medio de tres experimentos independientes se muestra. Las barras de error representan desviaciones estándar (DE). Resultados similares fueron obtenidos con el BBH18 de la *M. catarrhalis*.

La Figura 3 muestra fotos que verifican que los mutantes de *M. catarrhalis* exentos de UspA1 y UspA2 no se ligan a la fibronectina inmovilizada. El *M. catarrhalis* tipo silvestre fue capaz de adherirse en una alta densidad sobre platinas de vidrio recubiertas con fibronectina de alta densidad (A). El mutante Δ uspA1 de la *M. catarrhalis* también fue retenido a una alta densidad (B), mientras que los mutantes dobles a Δ uspA2 y Δ uspA1/A2 de la *M. catarrhalis* se adhirieron pobremente (C y D). Las platinas de vidrio fueron recubiertas con fibronectina e incubadas con el RH4 del *M. catarrhalis* y sus mutantes correspondientes UspA1/A2. Después de varios lavados, las bacterias fueron gram manchadas.

La Figura 4 es un gráfico que muestra que el UspA1 y A2 recombinantes se ligan a la fibronectina de una manera dependiente de la dosis. El ligado específico a la fibronectina es mostrado para el UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹. Ambas proteínas de UspA (40 nM) fueron recubiertas sobre placas microtítulo e incubadas con concentraciones incrementales de fibronectina seguido por la detección con pAb de fibronectina anti-humana de conejo y pAb anti-conejo conjugada con HRP. Los valores medios de tres experimentos separados se muestran y las barras de error indican la DE.

La Figura 5. Los dominios que ligan a la fibronectina activas para el UspA1 y UspA2 están localizados entre los aminoácidos 299 a 452 y 165 a 318,

respectivamente. Las proteínas truncadas derivadas de UspA1 (A) y UspA2 (B) Se muestran. Todos los fragmentos fueron ensayados en cuanto al ligado a fibronectina en ELISA. Cuarenta nM de cada fragmento truncado fue recubierto sobre placas microtítulo e incubados con 80 µg/ml y 120 µg/ml de fibronectina para UspA1 y UspA2, respectivamente. La fibronectina ligada fue detectada con pAb anti-fibronectina de conejo seguido por pAb anti-conejo conjugada con HRP. Los resultados son representativos para tres conjuntos de experimentos. Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 6 muestra la secuencia de acuerdo con la secuencia ID No. 1, y la homología de secuencia entre el UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y el UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. Los 31 residuos de aminoácido idénticos están entre corchetes.

La Figura 7 muestra que los fragmentos truncados del UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² inhiben de manera competitiva el ligado a la fibronectina dependiente del UspA del *M. catarrhalis*. Los mutantes dobles Δ uspA1/A2 del *M. catarrhalis*, que no se ligan a la fibronectina, fueron incluidos como controles negativos. Las proteínas recombinantes de UspA1 fueron pre-incubadas con 2 mg/100 ml de fibronectina antes la incubación con *M. catarrhalis*. Los valores medios de fluorescencia (MFI) del *M. catarrhalis* con fibronectina ligada detectados por FITC conjugado con pAb anti-fibronectina en citometría de flujo se muestran. El UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² resultó en una inhibición del 95 % y 63 % respectivamente. Las barras de error representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

La Figura 8 muestra que el UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ inhibe la adherencia al *M. catarrhalis* a la fibronectina asociada con las células vía las células

conjuntivales Chang. Las células epiteliales Chang expresan la fibronectina sobre la superficie según se reveló por un pAb anti-fibronectina y la citometría de flujo (A). La Pre-incubación con las proteínas UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵², UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, que ligan a la fibronectina, o la pAb anti-fibronectina resultaron en un ligado significativamente reducido por el RH4 de *M. catarrhalis* en comparación con las proteínas recombinantes de control (UspA1⁴³³⁻⁵⁸⁰ y UspA2³⁰⁻¹⁷⁷) y un anticuerpo de control (anti-ICAM1 mAb) (B). El $P < 0.05$ mediante dos ensayos Student emparejados de dos filas. Los valores medios de tres experimentos separados se muestran y las barras de error indican la DE.

La Figura 9A muestra el ligado del RH4 *M. catarrhalis* a la laminina mediante el UspA1 y A2. El RH4 de *M. catarrhalis* tipo silvestre (wt) se liga fuertemente a la laminina inmovilizada con un OD medio de 1.27. La RR4 Δ uspA1 mostró un OD medio de 1.14 (89.8 % del tipo silvestre). EL RR4 Δ uspA2 y el mutante doble RR4 Δ uspA1/A2 tenían un diámetro externo medio de 0.19 y 0.23 respectivamente (15.0% y 18.1% del tipo silvestre). Esto no fue diferente de manera significativa de la adhesión residual a las placas recubierta con albúmina de suero bovino. 30 μ g/ μ l de laminina o de albúmina de suero bovino fueron recubiertos sobre placas micro título. Estas fueron bloqueadas seguido por la incubación con una suspensión de bacterias y finalmente lavadas. Las bacterias ligadas fueron detectadas con pAb anti-MID y pAb anti-conejo conjugado con HRP. Los resultados medios de tres experimentos representativos se muestran. Las barras de error representan las desviaciones estándar (DE).

La figura 9B muestra el ligado del UspA1 y A2 recombinantes a la laminina en una manera dependiente de la dosis. El ligado a la laminina específico se muestra para el UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹. Ambas proteínas de UspA (40 nM)

fueron recubiertas sobre placas microtítulo e incubadas con concentraciones incrementales de laminina seguido por la detección con pAb anti-laminina de conejo y pAb anti-conejo conjugada con HRP. Los valores medios de tres experimentos separados se muestran y las barras de error indican la DE.

Las figuras 10 A y B muestran que los dominios de ligado a la laminina activos para el UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ (A) y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ (B) se localizan en las mitades del Terminal N. 40 nM de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes juntos con las proteínas truncadas fueron recubiertos sobre placas microtítulo e incubas con 20 µg/ml de laminina seguido por la detección con pAb anti-laminina de conejo y pAb anti-conejo conjugada con HRP. Los valores medios de tres experimentos separados se muestran y las barras de error indican la DE.

La figura 11 es una ilustración esquemática de C3, C3b y C3met ligados covalentemente. (A) La molécula C3 en suero consiste de una cadena α y una cadena β . (B) La cadena α contiene un sitio tioéster interno que después de activación puede ligar covalentemente con una superficie microbiana. (C) El C3 ha sido tratado con metilamina la que se liga covalentemente al tio éster.

La Figura 12 ilustra que el *M. catarrhalis* contractúa con los trayectos clásicos y alternativos del sistema complemento mediante las proteínas de membrana exterior UspA1 y A2. (A) EL RH4 del *M. catarrhalis* tipo silvestre (wt), el Δ uspA1, el Δ uspA2 o los mutantes Δ uspA1/A2 fueron incubados en la presencia de 10 % NHS. (B) El mutante Δ uspA1/A2 fue incubado con 10 % de NHS suplementado con EDTA o con Mg-EGTA. Las bacterias fueron recolectadas en los puntos del tiempo indicados. Después de incubación durante la noche, las unidades formadoras de colonia (cfu) fueron contadas. El número de bacterias a la

iniciación de los experimentos se definió como el 100 %. Los valores medios de tres experimentos separados se muestran y las barras de error indican la D. E. (A) Los valores medios después de 5 minutos para el Δ uspA1, el Δ uspA2 o los mutantes Δ uspA1/A2 fueron diferentes significativamente del tipo silvestre ($P < 0.05$). (B) Los valores medios después de 5 minutos para los mutantes Δ uspA1/A2 y después de 10 minutos para el mutante Δ uspA1/A2 incubado con Mg-EGTA fueron significativamente diferentes del tipo silvestre ($P < 0.05$).

La figura 13 ilustra que la *Moraxella catarrhalis* se liga a C3 en suero independientemente de la activación del complemento. Los perfiles de citometría de flujo muestran el ligado a C3 a (A) *M. catarrhalis* RH4 o (B) *Streptococcus pneumoniae*. Las bacterias fueron incubadas con NHS o NHS pretratado con EDTA. Luego, un pAb de C3d de anti-humano de conejo y una segunda capa de un pAb anti-conejo de cabra conjugado con FITC fueron agregados seguido por el análisis de citometría de flujo. Las bacterias en la ausencia de NHS, pero en la presencia de ambos pAb, fueron definidos como fluorescencia de fondo. Un experimento representativo de tres se muestra.

La figura 14 ilustra que el *M. catarrhalis* no se liga covalentemente al C3 tratado con metilamina purificado de una manera dependiente a dosis, y que el ligado se basa en interacciones iónicas. Los perfiles de citometría de flujo muestran (A) el ligado con concentraciones incrementales de C3met. (B) la intensidad media de fluorescencia (mfi) de cada perfil en el panel (A) Se muestran. (C) el ligado a C3met del RH4 disminuye con concentraciones incrementales de NaCl. Las bacterias se incuban con C3met con o sin NaCl como se indicó. El ligado a C3met fue medido mediante citometría de flujo como se describió en la figura 3. Las barras de error indican la DE. * $P \leq 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

La Figura 15 ilustra que los perfiles de la citometría de flujo del RH4 del *M. catarrhalis* tipo silvestre y los mutantes deficientes de UspA1/A2 muestran un ligado a C3met/ C3 dependiente de UspA1/UspA2. Los perfiles de un aislado clínico tipo silvestre (A, F, K) y los mutantes correspondientes exentos de proteína MID (B, G, L), UspA1 (C, H, M), UspA2 (D, I, N), o ambos UspA1 y UspA2 (E, J, O) se muestran. Las bacterias se incubaron con C3met (A-E), NHS-EDTA (F-J) o NHS (K-O) y detectadas según se delinea en la figura 3. Un experimento típico de tres con intensidad media de fluorescencia (mfi) para cada perfil se muestra.

La figura 16 ilustra que el C3met se liga al UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinante purificado, mientras que solamente un ligado del C3met débil a la UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ se observa. Más aún, la región de ligado al C3met del UspA2 fue determinada localizada entre los residuos de aminoácidos 200 a 458. (A) El UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes fueron inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con C3met marcado con [¹²⁵I] durante la noche y la proteína ligada fue visualizada con un FX personal (Bio- Rad) usando pantallas de intensificación. La proteína recombinante MID⁹⁶²⁻¹²⁰⁰ fue incluida como un control negativo. (B) el UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹ y una serie de proteínas UspA2 truncadas fueron recubiertas sobre placas microtítulo e incubadas con C3met, seguido por incubación con pAb de C3 anti-humano de cabra y pAb anti-cabra conjugada con HRP. Los valores medios de tres experimentos se muestran. El ligado de fondo fue sustraído de todas las muestras. Las barras de error corresponden a D. E. * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001.

La figura 17 ilustra que la adición del UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes al suero inhiben la deposición de C3b y matan la *M. catarrhalis* vía

172

el trayecto alternativo. Los perfiles de citometría de flujo muestran la deposición de C3b sobre RH4 Δ uspA2/A2 después de incubación con (A) NHS o NHS preincubado con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes (rec.), o (B) NHS-Mg-EGTA o NHS- Mg-EGTA preincubado con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹. Después de la adición de varias combinaciones de NHS, las bacterias fueron analizadas como se describió en la figura 13. (C) El RH4 Δ uspA1/A2 fue incubado con 10 % de NHS o NHS-Mg-EGTA. Para la inhibición, el NHS-Mg-EGTA fue incubado con 100 nM UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y/o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ antes de la adición de la bacteria. Las bacterias fueron recolectadas en los puntos del tiempo indicados. El número de bacterias a la iniciación de los experimentos se definió como el 100 %. Los valores medios de tres experimentos separados se muestran y las barras de error indican la D.E. Los puntos de tiempo 10, 20 y 30 min para el mutante Δ uspA1/A2 preincubado con proteínas recombinantes fueron diferentes de manera significativa del mutante Δ uspA1/A2 incubado con Mg-EGTA solo ($P < 0.05$).

La Figura 18 ilustra que el UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes disminuyen la hemólisis de los eritrocitos de conejo mediante la inhibición del trayecto alternativo. El NHS fue incubado con o sin 100 nM UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y/o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ a 37 °C durante 30 min. El NHS en las concentraciones indicadas fue luego agregado a eritrocitos de conejo. Después de la incubación durante 30 minutos, la suspensión fue centrifugada y los sobrenadantes fueron medidos por espectrofotometría. La hemólisis máxima en cada experimento fue definida como el 100%. Los valores medios de tres experimentos separados se muestran y las barras de error corresponden a D.E. Los resultados obtenidos con NHS + UspA2³⁰⁻⁵³⁹ y NHS + UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰/ UspA2³⁰⁻⁵³⁹ en concentraciones NHS de 2, 3 y 4% fueron significativamente diferentes del control de NHS ($P < 0.05$).

173

La figura 19 ilustra un análisis de apilado del UspA1 para 8 cepas diferentes, para mostrar la homología de partes diferentes del UspA1.

La figura 20 ilustra un análisis de apilado del UspA2 para trece cepas diferentes para mostrar la homología de partes diferentes del UspA2.

La Figura 21 ilustra el % de identidad en regiones identificadas sobre la secuencia Forsgren calculada como la proporción entre el número de casos exactos y la longitud del alineamiento de la región, en donde el alineamiento de la región es aquella parte del alineamiento total anterior que contiene la región Forsgren

Materiales y métodos

Interacción entre *M. catarrhalis* y cepas bacterianas con fibronectina y condiciones de cultivo

Las fuentes de las cepas *M. catarrhalis* se dan en la tabla 7. Los mutantes BBH18 y RH4 de la *M. catarrhalis* fueron construidos como se describió previamente. [23, 58] Las cepas de *M. catarrhalis* fueron cultivadas rutinariamente en infusión de cerebro y corazón (BHI) como caldo de líquido o en placas de agar con BHI a 37 °C. Los mutantes deficientes del UspA1 fueron cultivados en BHI suplementado con 1.5 µg/ml de cloramfenicol (Sigma, St. Louis, MO), y los mutantes deficientes de UspA2 fueron incubados con 7 µg/ml de zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Tanto el cloramfenicol como la zeocina fueron usadas para el crecimiento de mutantes dobles.

174

Tabla 7. Cepas clínicas de *M. catarrhalis* usadas en el presente estudio

Cepa	fuentes clínica	referencia
BBH18	Espuito	[53]
DI	Espuito	[53]
Ri49	Espuito	[53]
CIO	Espuito	[10]
F16	Espuito	[10]
Bro2	tracto respiratorio	[53]
Z14	faringe	[10]
S6-688	Nasofaringe	[23]
Bc5	Nasofaringe	[20]
RH4	Sangre	[53]
RH6	Sangre	[53]
R14	Desconocido	[10]
R4	Desconocido	[10]
SO-1914	aspirado de la cavidad timpánica	[23]

Nota: las cepas C10, R4 no tenían el gen *uspA1*, mientras que las F16, R14, Z14 carecían del gen *uspA2*. [10] Las cepas restantes contenían tanto genes *uspA1* y A2 (datos no mostrados).

Método de ADN

Para detectar la presencia de genes *uspA1*, A2, y A2H en aquellas cepas que eran desconocidas, los cebadores y condiciones de PCR según se describió por Meier et al. Fueron usadas. [50] secuenciamiento parcial fue también llevado a cabo con el *UspA1*²⁹⁹⁻⁴⁵² y *UspA2*¹⁶⁵⁻³¹⁸ los cebadores 5' y 3' de los genes *uspA1* y *uspA2* respectivos del RH4 y el BBH18. La confirmación de la presencia de los residuos de aminoácido "DQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLK" también se llevó a cabo mediante PCR con un cebador (5'-

CAAAGCTGACATCCAAGCACTTG-3') diseñado desde el terminal 5' de esta secuencia y los cebadores 3' para uspA1 y A2 como se describió en Meier et al. [50]

Construcción y expresión de proteínas recombinantes

Las UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA²³⁰⁻⁵³⁹, que están exentas de sus terminales C hidrofóbicos, han sido descritas recientemente. [58] el ADN genómico fue extraído del Bc5 de la *M. catarrhalis* usando un kit de tejido DNasy (Qiagen, Hilden, Alemania). En adición, las proteínas recombinantes correspondientes a las regiones múltiples que anidan UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ también fueron construidas por el mismo método. Los cebadores usados se dan en la tabla 8. Todas las construcciones fueron secuenciadas de acuerdo con métodos estándar. La expresión y purificación de las proteínas recombinantes se hizo como se describió previamente. [59] Las proteínas fueron purificadas usando columnas que contenían resina de níquel (Novagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para las condiciones nativas. Las proteínas recombinantes fueron analizadas sobre SDS-PAGE como se describió. [21]

Tabla 8. Cebadores usados en el presente estudio

176

Proteína	cebador 5'	cebador 3'
UspA1 ⁵⁰⁻⁷⁷⁰	gcgtctgcggatccagtaggcaaggcaacc	ccctgaagcttagtgcataacctaattg
UspA1 ⁵⁰⁻⁴⁹¹	gcgtctgcggatccagtaggcaaggcaacc	ttgagcaagcttagcttggttttagcg
UspA1 ⁵⁰⁻¹⁹⁷	gcgtctgcggatccagtaggcaaggcaacc	acctgtggcaagcttcttctgcc
UspA1 ⁵⁰⁻³²¹	gcgtctgcggatccagtaggcaaggcaacc	
	gggtgcactaagcttacctgcaccaacatgaac	
UspA1 ²⁹⁹⁻⁴⁵²	ggatttgcaggatgcatcgatcctggtaattggtact	gtcttttgaagatcaagcttttgatcaat
UspA1 ⁴³³⁻⁵⁸⁰	catagctctgatatggatccacttaaaaac	catgctgagaagcttacctagattgg
UspA1 ⁵⁵⁷⁻⁷⁰⁴	gccaaagcacaagcggatccaaataaagac	ggcttattggtagtaagcttagcttggtttg
UspA1 ⁶⁸⁰⁻⁷⁷⁰	gttgagcaaaaggatcccatcaatcaagag	ccctgaagcttagtgcataacctaattg
UspA2 ³⁰⁻⁵³⁹	cgaatgcggatcctaaaaatgatataactttagagg	cattaagcttgggtctaatgcagttac
UspA2 ³⁰⁻¹⁷⁷	cgaatgcggatcctaaaaatgatataactttagagg	ctcatgaocaaaalcaagcttatcttcgatagactc
UspA2 ¹⁰¹⁻²⁴⁰	gatattgcggatccggaagatgatgttgaac	gatcaataagcttaccgcttagattgaatgttcttc
UspA2 ¹⁰¹⁻³¹⁸	gatattgcggatccggaagatgatgttgaac	gtcaatcgcttcaagcttctttgagcatactg
UspA2 ¹⁶⁵⁻³¹⁸	gagattgagaaggatccagatgctattgct	gtcaatcgcttcaagcttctttgagcatactg
UspA2 ³⁰²⁻⁴⁵⁸	gctcaaaaccaagcggatccccaagatcig	ggtgagcgttcaagctttgcatcagcatcggc
UspA2 ⁴⁴⁶⁻⁵³⁹	gcaagtgctgcggatcctgatcgtattgct	cattaagcttgggtctaatgcagttac

Anticuerpos

Los anticuerpos policlonales anti-UspA1/A2 de conejo (pAb) fueron descritos recientemente en detalle. [58] Los otros anticuerpos usados fueron pAb de fibronectina anti-humana de conejo, pAb anti-conejo conjugado con FITC de cerdo, peroxidasa de rábano de cerdo (HRP) conjugada con pAb anti-conejo y finalmente un anticuerpo monoclonal (mAb) CD54 (ICAM1) anti-humano de ratón. Los anticuerpos fueron obtenidos de Dakopatts (Glostrup, Dinamarca).

Análisis por citometría de flujo

La expresión de la proteína UspA1/A2 y la capacidad de la *M. catarrhalis* de ligar a la fibronectina fueron analizadas por citometría de flujo. Las cepas tipo silvestre de *M. catarrhalis* y los mutantes deficientes de UspA1/A2 se hicieron

crecer durante la noche y se lavaron dos veces en una salina amortiguada con fosfato que contenía 3% de gelatina de pescado (PBS- gelatina). Las bacterias (10^8) fueron entonces incubadas con el anti suero anti-UspA1/A2 o con 5 μ g de fibronectina (Sigma, St Louis, MO). Estos se lavaron e incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) con pAb anti-conejo conjugada con FITC (diluida de acuerdo con las instrucciones del fabricante) o con 1/100 de disolución de pAb de fibronectina anti-humana de conejo (si fue la fibronectina que se agregó primero) durante 30 minutos a Ta antes de la incubación con el pAb anti-conejo conjugado con FITC. Después de tres lavados adicionales, las bacterias fueron analizadas por citometría de flujo (EPICS, XL-MCL, Coulter, Hialeah, FL). Todas las incubaciones fueron mantenidas en un volumen final de 100 μ l de PBS- gelatina y los lavados se hicieron con el mismo amortiguador. El pAb anti-fibronectina y el pAb anti-conejo conjugado con FITC se agregaron separadamente como control negativo para cada cepa analizada. Los estudios de inhibición de fibronectina se llevaron a cabo mediante preincubar 0.25 μ moles de fragmentos de UspA durante 1 h con 2 μ g de fibronectina antes de la incubación con la bacteria *M. catarrhalis* (10^8). La cantidad residual libre de fibronectina que se ligó al M. se determinó por citometría por flujo como se mencionó anteriormente.

Ligado del *M. catarrhalis* a la fibronectina inmovilizada

Platinas de vidrio fueron recubiertas con 30 μ l de alícuotas de fibronectina (1 mg/ml) y aire seco a RT. Después del lavado una vez con PBS, las platinas fueron incubadas en platos petri con bacterias pre-enfriadas en una fase exponencial tardía (densidad óptica (OD) a 600 nm == 0.9). Después de 2h a RT,

las platinas de vidrio fueron lavadas una vez con PBS seguido por manchado gram

Marcado de la proteína y radioinmuno ensayo (RIA)

La Fibronectina fue marcada con ^{125} yodo (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) hasta una actividad altamente específica (0.05 mol de yodo por mol de proteína) con el método de cloramina T. [21] Las cepas BH18 y RH4 de la *M. catarrhalis* junto con sus mutantes correspondientes se hicieron crecer durante la noche sobre un medio sólido y fueron lavadas en PBS con 2 % de albúmina de suero bovino (BSA). Las Bacterias (10^8) fueron incubadas durante 1 h a 37°C con fibronectina marcada con ^{125} I (1600 kcpm/muestra) en PBS que contiene 2 % BSA. Después de tres lavados con PBS y 2% de BSA, la fibronectina marcada con ^{125} I ligada a la bacteria fue medida en un contador gama (Wallac, Espoo, Finlandia).

Ensayo inmuno absorbente ligado a enzima (ELISA)

Las placas microtítulo Nunc-Immuno Module; Roskilde, Dinamarca) fueron recubiertas con 40 nM de las proteínas UspA1^{50"-70} y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ en 75 mM de carbonato de sodio, pH 9.6 a 4 °C durante la noche. Las placas fueron lavadas 4 veces con amortiguador de lavado (50 mM de Tris-HCl, 0.15 M NaCl, y 0.1 % Tween 20, pH 7.5) y fueron bloqueadas durante 2 h a RP con el amortiguador de lavado que contenía 3% de gelatina de pescado. Después de 4 lavados adicionales, los pozos fueron incubados durante 1 h a RP con fibronectina (120 µg/ml) diluido en etapas de tres veces en 1.5% de gelatina de ensacado (en amortiguador de lavado). Después de ahí en adelante, las placas fueron lavadas e

incubadas con pAb de fibronectina anti-humana de conejo durante 1 h. Después de lavados adicionales, el pAb anti-conejo conjugado con HRP fue agregado y se incubó durante 1 h a RT. Tanto la fibronectina anti humana como el pAb anti-conejo conjugado con HRP fueron diluidos 1:1,000 en amortiguador de lavado que contenía 1.5% de gelatina de pescado. Los pozos fueron lavados cuatro veces y las placas fueron desarrolladas y medidas en OD450. Los ELISA con proteínas truncadas anidadas en UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ se llevó a cabo con dosis fijas de fibronectina en 80 µg/ml y 120 µg/ml, respectivamente.

Ensayo de inhibición de adherencia de la línea celular

Células conjuntivas Chang (ATCC CCL 20.2) se cultivaron en un medio de RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) suplementadas con 10 % de suero de ternero fetal, 2 mM de L- glutamina, y 12 µg de gentamicina/ ml. En el día antes de los experimentos de inhibición de adherencia, las células fueron cosechadas, lavadas dos veces en RPMI 1640 libre de gentamicina, y agregadas a placas de cultivo de tejidos de 96 pozos (Nunc) a una concentración final de 10⁴ células/ pozo en 200 µl de medio de cultivo libre de gentamicina. Después de ahí en adelante, las células fueron incubadas durante la noche a 37 °C en un atmósfera humidificada y 5% de CO₂ y 95 % de aire. En el día de los experimentos, la inhibición de la adhesión del *M. catarrhalis* se llevó a cabo mediante pre-incubar concentraciones incrementales de proteínas truncadas UspA1/A2 recombinantes que contenían los ligados a la fibronectina (UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸) o pAb de fibronectina anti-humana de conejo (diluida 1:50) durante 1 h. las proteínas recombinantes que no ligan a la fibronectina (UspA1⁴³³⁻⁵⁸⁰ y UspA2³⁰⁻¹⁷⁷) fueron usadas como controles. Las células epiteliales Chang son conocidas porque expresan el ICAM1. [18] Por lo tanto un anticuerpo anti-ICAM1

fue usado para diferenciar si el efecto inhibitorio del anticuerpo anti- fibronectina era secundario al impedimento estérico. Subsiguientemente el, RH4 del *M. catarrhalis* (10^6) en PBS-gelatina se inoculó dentro de las monocapas confluentes. En todos los experimentos, las placas de cultivo de tejido fueron centrifugadas a $3,000 \times g$ durante 5 min e incubadas a 37°C en 5 % CO_2 . Después de 30 min, las mono capas infectadas fueron enjuagadas varias veces con PBS-gelatina para remover bacteria no adherente y fueron entonces tratadas con tripsina-EDTA (0.05 % de tripsina y 0.5 mM de EDTA) para liberar las células Chang del soporte de plástico. De ahí en adelante la suspensión resultante de célula/bacteria fue sembrada en dilución en placas agar que contenía BHI y se incubó durante la noche a 37°C en 5 % de CO_2 .

Determinación de la expresión de fibronectina en células epiteliales conjuntivas Chang

Las células epiteliales conjuntivas Chang fueron cosechadas mediante raspado seguido por la re-suspensión en PBS-gelatina. Las células (1×10^6 /ml) se marcaron con pAb de fibronectina anti-humana de conejo seguida por el lavado e incubación con pAb anti-conejo conjugada con FITC. Después de tres lavados adicionales, las células fueron analizadas por citometría de flujo como se estableció anteriormente.

Interacción entre cepas bacterianas *M. catarrhalis* y laminita y concisiones de cultivo

Las cepas *M. catarrhalis* BBH18 y RH4 clínicas de *M. catarrhalis* y sus mutantes correspondientes fueron descritos previamente. [58] Ambas cepas tienen

una expresión relativamente más alta de UspA2 comparado con UspA1.[58] Los mutantes expresaron igual cantidad de proteína ligada a la inmunoglobulina del *M. catarrhalis* (MID) cuando se comparó con las cepas tipos silvestre. Las bacterias fueron cultivadas rutinariamente en caldo de infusión de cerebro corazón (BHI) o en unas placas agar con BHI a 37 °C. Los mutantes dobles y los deficientes de UspA1, UspA2 fueron cultivados en BHI suplementado en antibióticos como se describió. [58]

Construcción y expresión de la proteína recombinante

Las UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes, que estaban exentas de sus terminales C hidrofóbicos, fueron fabricadas [58] Adicionalmente, las proteínas recombinantes que correspondían a regiones múltiples que anidaban el UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ fueron usadas. [78]

Anticuerpos

Los anticuerpos policlonales anti-UspA1/A2 y anti-MID de conejo (pAb) fueron usados. [22, 58] EL pAb anti-laminina de conejo era de Sigma (St Louis, MO, USA). El pAb anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano de cerdo (HRP) era de Dakopatts (Glostrup, Dinamarca).

Ligado de la *M. catarrhalis* a la laminita inmovilizada

Placas microtítulo (Nunc-Immuno Module; Roskilde, Dinamarca) fueron recubiertas con laminita de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (Sigma, Saint Louis, USA) o con albúmina de suero bovino (BSA) (30 µg/ml) en Tris-HCL, pH 9.0 a 4°C

durante la noche. Las placas fueron lavadas con salina amortiguada con fosfato y 0.05% Tween 20, pH 7.2 (PBS-Tween) y se bloquearon subsiguientemente con 2 % de BSA en PBS + 0.1 % Tween 20, pH 7.2. El RH4 y BBH18 de *M. catarrhalis* (10^8) en 100 μ l fueron entonces agregados seguido por incubación durante 1 h. Las bacterias no ligadas fueron removidas mediante lavado tres veces con PBS-Tween. La bacteria residual fue detectada por medio de un pAb anti-MID, seguido por la detección con pAb anti-ratón conjugado con HRP. Las placas fueron desarrolladas y medidas en OD₄₅₀ de acuerdo con un protocolo estándar

Ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA)

Las placas microtítulo (Nunc-Immuno Module) fueron recubiertas con 40 nM de proteínas UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes purificadas en 75 mM de carbonato de sodio. pH 9.6 a 4 °C. Las placas fueron lavadas 4 veces con amortiguador de lavado (50 mM de Tris-HCl, 0.15 M NaCl, y 0.1 % Tween 20, pH 7.5) y fueron bloqueadas durante RP con el amortiguador de lavado que contenía 3% de gelatina de pescado. Después de lavados adicionales, los pozos fueron incubados durante 1 h a RP con laminina en diferentes diluciones como se indicó en 1.5% de gelatina de pescado (en amortiguador de lavado). Después de ahí en adelante, las placas fueron lavadas e incubadas con pAb anti-laminina de conejo. Después de lavados adicionales, el pAb anti-conejo conjugado con HRP fue agregado y se incubó TA. Tanto el anti-laminina como el pAb anti-conejo conjugado con HRP fueron diluidos 1:1,000 en amortiguador de lavado que contenía 1.5% de gelatina de pescado. Los pozos fueron lavados y las placas fueron desarrolladas y medidas en OD₄₅₀. Los pozos no recubiertos incubados con diluciones idénticas de laminina fueron usados como controles de fondo. Los ELISA

con proteínas truncadas anidadas en UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ se llevó a cabo con dosis fijas de laminita (20 µg/ml).

Interacción entre *M. catarrhalis* y las cepas bacterianas C3 y C3meto y concisiones de cultivo

Los aislados de *M. catarrhalis* clínicos y las sub-especies relacionadas han sido descritas recientemente en detalle [21, 53] las cepas tipos fueron de la Culture Collection, Universidad de Gothenburg (CCUG; Departamento de bacteriología clínica, Sahlgrenska Hospital, Gothenburg, Suiza), o el American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Va); *Neisseria gonorrhoeae* CCUG 15821, *Streptococcus pyogenes* CCUG 25570 y 25571, *Streptococcus agalactiae* CCUG 4208, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Legionella pneumophila* ATCC 33152, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, y finalmente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Las cepas restantes en la tabla 9 fueron aislados clínicos de microbiología médica, departamento del laboratorio de medicina, Malmo University Hospital, Lund University, Suiza.

Tabla 9. *M. catarrhalis* es una bacteria que liga al C3/C3met únicamente. Las sub-especies de moraxella relacionadas y otros patógenos humanos comunes no se ligan al C3/ C3met (mfi < 2.0). Después de incubación con NHS tratado con EDTA o con C3met, las bacterias fueron analizadas por citometría de flujo usando un pAb anti-C3d de conejo y un pAb anti-conejo de cabra conjugado con FITC

184

Especies	NHS-EDTA (mfi)	C3met (mfi)
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4	8.7	22.1
<i>M. osloensis</i>	< 2.0	< 2.0
<i>M. bovis</i>	< 2.0	< 2.0
<i>M. caniculi</i>	< 2.0	< 2.0
<i>M. nonliquefacie</i>	< 2.0	< 2.0
<i>N. pharyngis</i>	< 2.0	< 2.0
<i>N. sicca</i>	< 2.0	< 2.0
<i>N. flava</i>	< 2.0	< 2.0
<i>N. subflava</i>	< 2.0	< 2.0
<i>Oligella ureolytica</i> (n=2)	< 2.0	< 2.0
<i>Haemophilus influenzae</i> (n=7)	< 2.0	< 2.0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=11)	< 2.0	< 2.0
<i>Legionella pneumophila</i> (n=2)	< 2.0	< 2.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=2)	< 2.0	< 2.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	< 2.0	< 2.0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	< 2.0	< 2.0
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=3)	< 2.0	< 2.0
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=2)	< 2.0	< 2.0
<i>Streptococcus agalactia</i>	< 2.0	< 2.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	< 2.0	< 2.0
<i>Helicobacter pylori</i>	< 2.0	< 2.0
<i>Escherichia coli</i> (n=2)	< 2.0	< 2.0
<i>M. ovis</i>	< 2.0	< 2.0
<i>M. caviae</i>	< 2.0	< 2.0
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	< 2.0	< 2.0
<i>N. meningitidis</i>	< 2.0	< 2.0
<i>N. mucosa</i>	< 2.0	< 2.0

Las diferentes especies diferentes a *Moraxella* se hicieron crecer en medios de cultivo estándar apropiados. Las cepas de *M. catarrhalis* fueron cultivadas rutinariamente en un caldo líquido de infusión de cerebro y corazón (BHI) o sobre placas agar de BHI a 37 °C. Los mutantes BBH18 y RH4 de la *M. catarrhalis* fueron fabricados como se describió previamente. [22, 23, 58] Los mutantes deficientes de MID se hicieron crecer en BHI que contenía 50 µg/ml de canamicina. Los mutantes deficientes de UspA1 fueron cultivados en BHI

185

suplementado con 1.5 µg/ml de cloramfenicol (Sigma, St. Louis, MO), y los mutantes deficientes de UspA2 fueron incubados con 7 µg/ml de zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Tanto el cloramfenicol y la zeocina fueron usadas para el crecimiento de los mutantes dobles UspA1/ A2.

Anticuerpos

Los conejos fueron inmunizados intramuscularmente con 200 µg de UspA1 de longitud completa recombinante emulsificado en adyuvante Freund's completo (Difco, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania), y se reforzó en los días 18 y 36 con la misma dosis de proteína en adyuvante Freund's incompleto. [22] Se tomaron muestras de Sangre tres semanas después. Para incrementar la especificidad, el anti suero anti-UspA1 fue purificado con respecto a la afinidad con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ recombinante conjugado con sefarosa. [58] El anti suero ligado igualmente a la UspA1 y UspA2 y se designó como pAb anti-UspA1/ A2. El pAb de C3d anti-humano de conejo y el pAb anti-conejo de cerdo conjugado con FITC fueron comparados de Dakopatts (Glostrup, Dinamarca), y el C3 anti-humano de cabra fue obtenido de Advanced Research Technologies (San Diego, CA). El pAb anti-cabra de burro conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) fue obtenido de Serotec (Oxford, UK).

Proteínas y marcación con yodo

La fabricación del UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹, recombinantes que estaban exentos de sus terminales C hidrofóbicos, han sido descritos recientemente. [23] Las proteínas UspA1 y UspA2 truncadas fueron fabricadas como se describió en detalle por Tan et al.[18] El C3b Se compró de Advanced Research Technologies.

C3 (H₂O) fue obtenido mediante congelar y deshelar el C3 purificado. La molécula similar a C3b (C3met) fue hecha mediante la incubación de C3 purificado con 100 mM de metilamina (pH 8.0) durante 2 h a 37 °C, y la diálisis subsiguiente contra 100 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM de NaCl. Para estudios de ligado, el C3met fue marcado con 0.05 mol ¹²⁵I (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) por mol de proteína, usando el método de cloramina T. [25]

Análisis por citometría de flujo

El ligado de C3 de la *M. catarrhalis* y otras especies fue analizado por citometría de flujo. Las bacterias se hicieron crecer sobre un medio sólido durante la noche y se lavaron dos veces en PBS que contenía BSA al 2% (Sigma) (PBS-BSA). De ahí en adelante, las bacterias (10^8 unidades formadoras de colonias; cfu) se incubaron con C3met, C3b, C3 (H₂O), o 10 % de NHS con o sin 10 mM de EDTA o 4 mM de MgCl₂ y 10 mM EGTA (Mg-EGTA) en PBS-BSA durante 30 min a 37 °C. Después de los lavados, las bacterias fueron incubadas con pAb de C3d anti-humano durante 30 minutos sobre hielo, seguido por lavados e incubación durante otros 30 minutos sobre hielo con pAb anti-conejo de cabra conjugado con FITC. Después de tres lavados adicionales, las bacterias fueron analizadas por citometría de flujo (EPICS, XL-MCL, Coulter, Hialeah, FL). Todas las incubaciones fueron mantenidas a un volumen final de 100 µl PBS-BSA y los lavados fueron hechos con el mismo amortiguador. El pAb de C3d anti-humano y el pAb anti-conejo conjugado con FITC fueron agregados separadamente como control negativo para cada cepa analizada. En los estudios de inhibición, el suero fue pre-incubado con 100 nM de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes, durante 30 minutos a 37 °C. Para analizar las características de la interacción entre *M. catarrhalis* y C3, concentraciones incrementales de NaCl (0 -

187

1.0 M) fueron agregadas a las bacterias y al y C3met. Para analizar la expresión del UspA1/A2, las bacterias (10^8 cfu) se incubaron con el pAb anti-UspA1/A2 pAb y lavadas como se describió anteriormente. Un pAb anti-conejo de cabra conjugado con FITC diluido de acuerdo con las instrucciones del fabricante fue usado para la detección. Para asegurar que el EDTA no rompía las membranas de proteína exterior UspA1 y UspA2, el *M. catarrhalis* fue incubado con o sin EDTA seguido por la detección de la expresión del UspA1/A2.

El EDTA, en las concentraciones usadas en los experimentos NHS-EDTA, no cambian la densidad del UspA1/A2.

Ensayo de suero y suero bactericida

El suero humano normal (NHS) fue obtenido de 5 voluntarios saludables. Se permitió que la sangre se coagulara durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se incubó sobre hielo durante 60 min. Después de centrifugación, el suero fue agrupado, se formaron alícuotas y se almacenó a -70° C. Para inactivar tanto los trayectos clásico y alternativo, se agregó 10 mM de EDTA. En contraste, el Mg-EGTA se incluyó para inactivar el trayecto clásico. El suero humano deficiente en el C4BP se preparó mediante pasar suero fresco por una columna HiTrap (Amersham Biosciences) acoplada con mAb 104, un mAb de ratón dirigido contra el CCP1 de la cadena α del C4BP. [41] El flujo que pasó fue recolectado y fue vaciado del suero y almacenado en alícuotas a -70° C. El suero vaciado de C1q fue obtenido vía la primera etapa de purificación del C1q [79] usando cromatografía de intercambio iónico Biorex 70 (Bio-Rad, Hercules, CA). El suero resultante mostró una actividad hemolítica normal. El factor D y el suero deficiente de properdina fue suministrado amablemente por el Dr. Anders Sjöholm

188

(Departamento de microbiología médica, Lund University, Lund, Suiza). Las cepas de *M. catarrhalis* fueron diluidas en 2.5 mM de amortiguador Veronal, pH 7.3 que contenía 0.1 % (p/v) de gelatina, 1 mM de $MgCl_2$, 0.15 mM de $CaCl_2$, y 2.5 % de dextrosa (DGV^{B++}). Las Bacterias (10^3 cfu) se incubaron junto con 10 % NHS y EDTA o Mg-EGTA en un volumen final de 100 μ l. Las bacterias/ NHS fueron incubadas a 37° C y en diferentes puntos del tiempo, se tomaron alícuotas de 10 μ l y se distribuyeron en placas agar BHI. En estudios de inhibición, 10% del suero fue incubado con 100 nM de las proteínas UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes durante 30 minutos a 37° C antes de que las bacterias fueron agregadas.

Ensayos Dot blot

Las UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes purificadas diluidas en etapas de tres veces (1.9 -150 nM) en 100 μ l de 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0 se aplicaron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schüll, Dassel, Alemania) usando un dispositivo dot blot. Después de saturación, las membranas fueron incubadas durante 2 h con PBS- Tween que contiene 5 % de leche en polvo a temperatura ambiente y lavadas durante 4 veces con PBS-Tween. De ahí en adelante, 5 kcpm de 3met marcado con [¹²⁵I]- En PBS-Tween con 2 % de leche en polvo fueron agregados durante la noche a 4° C. La proteína ligada fue visualizada con un FX personal (Bio-Rad) usando pantallas intensificadoras.

Resonancia de plasmón de superficie (Biacore)

La interacción entre UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ y C3 fue analizada adicionalmente usando resonancia de plasmón de superficie (Biacore 2000;

Biacore, Uppsala, Suiza) como se describió recientemente para la interacción UspA1/2-C4BP. [58] El K_D (la constante de disociación de equilibrio) fue calculada de una curva de ligado que muestra la respuesta en equilibrio graficado contra la concentración usando el modelo de afinidad de estado estable suministrado por el software Bioevaluation (Biacore).

Ensayo inmunosorbente enlazado e enzima (ELISA)

Placas microtítulo (Nunc-Immuno Module; Roskilde, Dinamarca) fueron recubiertas con tripletas de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹, purificadas recombinantes, o fragmentos UspA1 y UspA2 truncados (40 nM en 75 mM de carbonato de sodio, pH 9.6) a 4° C durante la noche. Las placas fueron lavadas cuatro veces con amortiguador de lavado (PBS con 0.1 % Tween 20, pH 7.2) y bloqueadas durante dos horas a temperatura ambiente con el amortiguador de lavado suministrado con 1.5 % de ovalbumina (amortiguador de bloqueo). Después de los lavados, los pozos fueron incubados durante la noche a 4° C con 0.25 µg de C3 met en amortiguador de bloqueo. De ahí en adelante, las placas fueron lavadas e incubadas con C3 anti-humano de cabra en amortiguador de bloqueo durante 1 h a RT. Después de lavados adicionales, los pAb anti-cabra de burro conjugado con HRP fueron agregados durante otra hora a RT. Los pozos fueron lavados cuatro veces y las placas fueron desarrolladas y medidas en OD₄₅₀.

Ensayo hemolítico

Los eritrocitos de conejo fueron lavados tres veces con hielo frío 2.5 mM de amortiguador Veronal, pH 7.3 que contenía 0.1 % (p/v) de gelatina, 7 mM de MgCl₂, 10 mM de EGTA, y 2.5 % de dextrosa (Mg⁺⁺EGTA), y se resuspende a una

concentración de 0.5×10^9 células/ml. Los Eritrocitos fueron incubados con diversas concentraciones (0 a 4 %) de suero diluido en Mg^{++} EGTA. Después de 1 h a 37° C, los eritrocitos fueron centrifugados y la cantidad de eritrocitos lisados fue determinada mediante medidas espectrofotométricas y de la hemoglobina liberada a 405 nm. Para la inhibición con UspA1 y UspA2, 10 % del suero fue pre-incubado con 100 nM de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y/o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ durante 30 min a 38° C, y de ahí en adelante se agregó a los eritrocitos entre 0 a 4 %.

Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares y fagocitosis

Los leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN) fueron aislados de sangre fresca de voluntarios saludables usando macro dex (Pharmalink AB, Upplands Vasby, Suiza). El PMN se centrifuga durante 10 min a 300 g, lavado en PBS y resuspendido en el medio RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley, Scotland). La suspensión bacteriana (0.5×10^8) fue opsonizada con 3 % de NHS o NHS-EDTA, o 20 µg de C3met purificado durante 15 min a 37°C. Después de lavados, las bacterias fueron mezcladas con PMN (1×10^7 células/ml) en una proporción de bacterias/PMN de 10:1 seguido por incubación a 37° C con rotación final sobre final. Las bacterias sobrevivientes después de 0, 30, 60, y 120 minutos de incubación fueron determinadas mediante cuentas viables. El número de bacterias tratadas con NHS agrupadas fueron comparadas con las bacterias fagosidades en la ausencia de NHS. El *S. aureus* opsonizado con NHS fue usado como control positivo.

Ejemplos y resultados

Interacción entre *M. catarrhalis* y fibronectina *M. catarrhalis* exenta de UspA1 y A2 no se liga a la fibronectina soluble o inmovilizada.

Nosotros seleccionamos una serie aleatoria de cepas clínicas de *M. catarrhalis* (n=13) (tabla 7) y las ensayamos en cuanto a su ligado a la fibronectina en relación con su expresión de UspA1/A2 mediante análisis por citometría de flujo. La expresión alta de UspA1/A2 según se determinó mediante intensidad media de fluorescencia (MFI) fue correlacionada con la expresión de UspA1/A2 (coeficiente de correlación Pearson 0.77, $P < 0.05$) (figura 1A). Sin embargo, para discriminar entre la expresión UspA1 y A2 no fue posible con nuestro pAb anti-UspA1/A2 pAb. Más aún, la presencia de la proteína UspA2H que contribuye al ligado fue improbablemente como el gen *uspA2H* encontrado en las cepas usadas en este estudio.

Dos aislados de *M. catarrhalis* (BBH18 y RH4) y sus mutantes específicos que carecían de UspA1, UspA2 o de ambas proteínas fueron también analizados por citometría de flujo. El BBH18 del *M. catarrhalis* se ligo fuertemente a la fibronectina con una intensidad de fluorescencia media (MFI) de 96.1 (figura 1F). En contraste, el BBH18 Δ uspA1 mostró un ligado a la fibronectina disminuido con un MFI de 68.6 (figura 1G). El ligado de la fibronectina al BBH18 Δ uspA2 y del mutante doble BBH18 Δ uspA1/A2 reveló un MFI de solamente 10.7 y 11.5, respectivamente (figuras 1H, 1J). Resultados similares se obtuvieron con los mutantes UspA1/A2 de la cepa clínica RH4 de *M. catarrhalis*. Tomados juntos, estos resultados sugieren que el UspA1 y A2 se ligan a la fibronectina y que la capacidad de las bacterias para ligarse a la fibronectina fuertemente dependen de la expresión de UspA1/A2.

Para analizar adicionalmente la interacción entre la fibronectina y el *M. catarrhalis*, fibronectina marcada con ^{125}I fue incubada con dos aislados clínicos de *M. catarrhalis* (BBH18 y RH4) y sus mutantes respectivos. El RH4 de la *M. catarrhalis* tipo silvestre se ligó fuertemente a la fibronectina ^{125}I mientras que el mutante correspondiente ΔuspA1 mostró 80 % de ligado del tipo silvestre. En contraste, el ΔuspA2 y el mutante doble se ligó a la fibronectina marcada con ^{125}I en 14 % y 12 %, respectivamente, lo que estaba justo por encima de los niveles de fondo (5.0 a 10 %) (figura 2). Resultados similares fueron obtenidos con el BBH18 de la *M. catarrhalis* y los mutantes correspondientes UspA1/A2 . Así, nuestros resultados sugieren que tanto el UspA1 y A2 son requeridos para el ligado máximo de la fibronectina soluble por el *M. catarrhalis*.

Para investigar la sujeción bacteriana a la fibronectina inmovilizada, el RH4 de *M. catarrhalis* y sus mutantes correspondientes $\Delta\text{uspA1/A2}$ fueron aplicados sobre platinas de vidrio recubiertas con fibronectina. Después de 2 h de incubación, las platinas fueron lavadas, y manchadas gram subsiguientemente. El *M. catarrhalis* tipo silvestre y el mutante ΔuspA1 fueron encontrados que se adhieren fuertemente a las platinas de vidrio recubiertas con fibronectina (figura 3A y 3B). En contraste, la ΔuspA2 del *M. catarrhalis* y los mutantes UspA1/A2 se adhirieron débilmente a la platina de vidrio recubierta con fibronectina con solamente unas pocas bacterias que quedaron después del lavado (figura 3C y 3D, respectivamente). Los experimentos con otro aislado clínico de *M. catarrhalis* (BBH18) y sus mutantes derivados mostró un patrón similar indicando que el UspA2 era de mayor importancia del ligado de la *M. catarrhalis* a la fibronectina inmovilizada.

Los dominios de ligado de fibronectina incluyen residuos de aminoácidos localizados entre 299 y 452 de la UspA1 y entre 165 y 318 de la UspA2

Para analizar adicionalmente las interacciones del UspA1 y A2 con la fibronectina, UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ truncados fueron producidos recombinantemente en *E. coli*, recubiertos sobre placas micro títulos e incubados con concentraciones incrementales de fibronectina. La fibronectina ligada fue detectada con un pAb de fibronectina anti-humano seguido por incubación por un pAB anti-conejo conjugado con peroxidas de rábano. Ambos la spA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes se ligaron a la fibronectina soluble y las interacciones fueron dependientes de la dosis (figura 4).

Para definir el dominio de ligado de la fibronectina de las proteínas recombinantes UspA1 anidadas en la molécula entera de la UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ fueron fabricadas. La fibronectina fue incubada con los fragmentos de proteína UspA1 inmovilizados y las interacciones fueron cuantificadas por HELISA. La UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ se ligó a la fibronectina casi tan eficientemente como la UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ sugiriendo que el dominio de ligado estaba dentro de esta parte de la proteína. Entre los otros fragmentos truncados, la UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² se ligó eficientemente a la fibronectina (figura 5A). En paralelo, las interacciones entre la fibronectina y los varios fragmentos de UspA2 recombinantes que incluyen aminoácidos UspA2³⁰⁻⁵³⁹ fueron analizados. Los dos fragmentos UspA2¹⁰¹⁻³¹⁸ y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ se ligaron fuertemente a la fibronectina (figura 5B). Nuestros hallazgos suministran evidencia significativa de que los dominios de ligado incluyen los residuos encontrados dentro de la UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. Una comparación de secuencias entre estos dos fragmentos de ligado revelaron que los 31 residuos de aminoácido "DQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLK" fueron idénticos para UspA1 y A2

(figura 6). Más aún, esta secuencia repetida también se encontró en los genes UspA1 y A2 BBH18 y RH4 del *M. catarrhalis* (datos no mostrados)

Fragmentos UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² inhiben competitivamente el ligado de la fibronectina al *M. catarrhalis*

Para validar adicionalmente nuestros hallazgos sobre los dominios de ligado de la fibronectina UspA1/A2, las proteínas UspA1 truncadas recombinantes fueron ensayadas en cuanto a su capacidad para bloquear el ligado de la fibronectina a la *M. catarrhalis*. Fibronectina (2 µg) fue pre-incubada con 0.25 µmoles de fragmentos UspA1 recombinantes y se incubó subsiguientemente con *M. catarrhalis*. Finalmente, el ligado de la fibronectina dependiente de UspA a la *M. catarrhalis* fue medida mediante citometría de flujo. La pre-incubación con UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² resultó en un ligado de fibronectina disminuido con un 95% de reducción para la UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y un 63 % de reducción para la UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² (figura 7). Cuando la fibronectina fue pre-incubada con el UspA2¹⁰¹⁻³¹⁸, truncado, una inhibición del 50% fue obtenida.

Así, los dominios de ligado de la fibronectina de UspA1 y A2 bloquean las interacciones entre la fibronectina y el *M. catarrhalis*.

UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ inhiben la adherencia del *M. catarrhalis* a las células epiteliales Chang

Las células epiteliales son conocidas por expresar fibronectina y muchas bacterias se sujetan a las células epiteliales mediante a la fibronectina ahocicada a la célula. [46, 54, 69, 77] Estudios previos han mostrado que la *M. catarrhalis* se

195

adhiere a las células epiteliales. [43, 49] Nosotros analizamos las células conjuntivas Chan que frecuentemente han sido usadas en experimentos de adhesión con patógenos respiratorios. Las células Chang expresan fuertemente la fibronectina según se reveló por el análisis de citometría de flujo. (figura 8A).

Para analizar si el ligado de la fibronectina dependiente de la UspA era importante para la adhesión bacteriana, las células epiteliales Chang fueron pre-incubadas con pAb de fibronectina anti-humano, o las proteínas recombinantes UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. De ahí en adelante, el RH4 del *M. catarrhalis* fue agregado y se analizó la adhesión bacteriana. La adherencia relativa (medida por el número de unidades formadoras de colonia) después de pre-incubación con 0.4 μ moles por 200 μ l de UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵², UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, o un pAb de fibronectina antihumana fueron de 36 %, 35 % y 32%, respectivamente. Concentraciones mayores de péptidos recombinantes no resultaron en inhibición adicional. En contraste, los fragmentos que no ligan a la fibronectina UspA1⁴³³⁻⁵⁸⁰ y UspA2³⁰⁻¹⁷⁷ no inhibieron las interacciones entre la *M. catarrhalis* y las células epiteliales Chang (figura 8B). Así, la fibronectina sobre células epiteliales Chang puede funcionar como un receptor para la *M. catarrhalis* y los residuos de aminoácidos 299- 452 de la UspA1 y 165-318 de la UspA2 contienen el ligando responsable para las interacciones.

Interacción entre *M. catarrhalis* y laminina

La *M. catarrhalis* se liga a la laminina mediante UspA1 y A2

Dos aislados clínicos de *M. catarrhalis* (BBH18 y RH4) y sus mutantes específicos que carecen de UspA1, UspA2 o de ambas proteínas fueron a

analizados mediante un ELISA de célula completo. El RH4 del *M. catarrhalis* se liga frecuentemente a la laminita inmovilizada (figura 9A). En contraste, el mutante *uspA1* del RH4 de la *M. catarrhalis* (RH4 Δ *uspA1*) mostró un ligado a laminita del 89.9% de la del tipo silvestre. El mutante *UspA2* del RH4 de la *M. catarrhalis* (RH4 Δ *uspA2*) y el mutante doble RH4 Δ *uspA1/A2* tiene una capacidad de ligado de 15.2% y 18.1% del tipos silvestre, respectivamente. Esto no fue diferente de manera significativa de la adhesión residual a las placas recubiertas con BSA. Resultados similares fueron obtenidos con los mutantes *UspA1/A2* que se originan de la cepa clínica BBH18 del *M. catarrhalis*. En estas dos cepas (BBH18 y RH4), el *UspA2* es la proteína predominante expresada en comparación con la *UspA1*, explicando la diferencia mínima en el ligado entre el tipo silvestre y el RH4 Δ *uspA1*. Tomados juntos, estos resultados muestran que *UspA1* y *A2* se ligan a la laminita.

Para analizar adicionalmente el ligado entre *UspA1/A2* y laminina, *UspA1*⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y *UspA2*³⁰⁻⁵³⁹ truncados fueron producidos en *E. coli*. Las proteínas recombinantes fueron recubiertas sobre placas microtítulo y se incubaron con concentraciones incrementadas de laminina. La laminita ligada fue detectada con un pAb anti-laminina de conejo seguido por incubación con pAb anti-conejo conjugado con HRP. Ambas *UspA1*⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y *UspA2*³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes se ligaron fuertemente a la laminina soluble y el ligado fue dependiente de dosis y saturable (figura 9B).

Para definir los dominios de ligado de la laminina, la *UspA1* y *A2* recombinantes que se anidan en las moléculas completas fueron fabricadas. La laminina fue incubada con fragmentos *UspA1* y *A2* truncados inmovilizados y seguido por cuantificación mediante HELISA. El *UspA1*⁵⁰⁻⁴⁹¹ se ligó a la laminina casi tan eficientemente como el *UspA1*⁵⁰⁻⁷⁷⁰ sugiriendo que el dominio de ligado

estaba dentro de esta parte de la proteína. Sin embargo, entre los otros fragmentos truncados que se anidan en esta región, no hubo fragmentos que aparentemente se ligaran a la laminina. La parte del Terminal N, UspA2³⁰⁻³⁵¹, fue capaz de retener 44.7% de su capacidad de ligado cuando se comparó con la proteína de longitud completa. La proteína más corta UspA2³⁰⁻¹⁷⁷ mostró un 43.7% de capacidad de ligado. (figura 10B). Estos resultados muestran que los dominios de ligado incluyen los residuos encontrados dentro de los terminales N tanto de la UspA1 como de la UspA2.

Interacción entre *M. catarrhalis* y C3 y C3met

Las proteínas de membrana externa UspA1 y UspA2 del *M. catarrhalis* inhiben tanto el trayecto clásico como el alternativo de la cascada de complemento

La expresión de superficie UspA2 es crucial para la supervivencia de la *M. catarrhalis* en suero humano normal (NHS) [1, 58], es decir, los mutantes deficientes de UspA2 de la moraxella son matados rápidamente cuando están expuestos al NHS. Hemos mostrado recientemente que tanto el UspA1 y A2 se ligan al C4BP y por lo tanto pueden inhibir el trayecto clásico de la activación complemento [58]. Para luz adicional sobre las interacciones de la *M. catarrhalis* con el sistema complemento, la supervivencia de los mutantes dobles UspA1/A2 fue estudiada en el suero tratado con EGTA con la adición de MgCl₂ (Mg-EGTA) o EDTA. El Mg-EGTA inhibe los trayectos clásicos y de lectina y por lo tanto permiten el análisis separado del trayecto alternativo. En contraste, el EDTA inhibe todos los trayectos complemento mediante absorber cationes divalentes (Mg²⁺ y Ca²⁺). El RH4 del *M. catarrhalis* tipo silvestre sobrevivió después de 30 minutos de incubación, mientras que el mutante doble RH4ΔuspA1/A2 fue muerto por el NHS

intacto después de 10 minutos (Figura 12). Cuando el trayecto clásico fue inhibido (NHS + Mg-EGTA), el mutante RH4AuspA1/A2 sobrevivió durante un periodo de tiempo significativamente más largo en comparación con el NHS sin ningún quelante, pero no tan largo como la bacteria del tipo silvestre. Adicionalmente, cuando ambos trayectos clásico y alternativo fueron bloqueados con EDTA, el RR4AuspA1/A2 del *M. catarrhalis* sobrevivió. Un patrón similar fue obtenido con el aislado BBH18 del *M. catarrhalis* y los mutantes correspondientes del BBH18 AuspA1/A2 (no mostrados). En paralelo, experimentos con C1q y el suero deficiente del factor D/properdina demostró que tanto los trayectos clásico como alternativo fueron inhibidos mediante el *M. catarrhalis* (no mostrado). Así, *M. catarrhalis*, un patógeno que frecuentemente coloniza el tracto respiratorio humano, no solamente contractúa contra el trayecto clásico sino también contra el trayecto alternativo del sistema complemento mediante las proteínas de membrana exterior UspA1 y A2. M.

El *M. catarrhalis* absorbe C3 del suero inactivado con EDTA

El C3b liga covalentemente a la superficie de un microbio y por lo tanto induce el trayecto alternativo (figura 11B). Para analizar si el *M. catarrhalis* puede interactuar con C3, nuestra cepa RH4 tipo silvestre incubada con NHS o NHS tratado con EDTA. El ligado o deposición (vía enlace covalente) de C3/ C3b en la superficie bacteriana del RH4 del *M. catarrhalis* fue detectada mediante análisis de citometría de flujo con un anticuerpo policlonal (pAb) dirigido contra C3d que reconoce tanto C3 como C3b. La incubación de las bacterias con NHS que contenían el complemento intacto llevó a la deposición de C3 (figura 13). De manera muy interesante, cuando la cascada complemento fue inactivada en la presencia de EDTA, el RH4 de *M. catarrhalis* todavía se ligó al C3 (figura 13A). El

Streptococcus pneumoniae que fue incluido como comparación no absorbido el C3 del suero tratado con EDTA (figura 13B). En contraste a los neumococos, el *M. catarrhalis* si se ligó al C3 y respectivamente de la activación complemento. El tioéster interno C3 es hidrolisado espontáneamente en la fase fluida al C3 (H₂O). Así, C3 intacto o C3(H₂O) fueron las formas más probables de C3 que interactúan con el *M. catarrhalis*. Ya que el *M. catarrhalis* también se liga al C4BP [58], nosotros quisimos excluir que el C4BP estuviera involucrado en el ligado del C3 y para este propósito se usó suero sin C4BP. El *M. catarrhalis* absorbido en el C3 del suero sin C4BP al mismo grado que el NHS (no mostrado).

Ligado del C3met al *M. catarrhalis* es dependiente de dosis y no covalente.

Nuestros experimentos implicaron que el C3 ligado a la superficie del *M. catarrhalis* y respectivamente de la activación de complemento. Por lo tanto, analizamos si el C3 convertido, que es no funcional podría ligarse a la bacteria. El C3 nativo fue purificado de suero humano y tratado con metilamina. Lo que convierte el C3 en una molécula C3met equivalente al C3b sin la capacidad del ligado covalentemente a los microbios (figura 11C). El análisis de citometría de flujo reveló que el RH4 del *M. catarrhalis* de la cepa tipos silvestre se ligó eficientemente al C3met en una manera dependiente de dosis y saturable (figuras 14A y B). Esta interacción no fue mediada por el C3a parte de la molécula de C3. ya que el C3b y el C3 (H₂O) también se ligaron a la *M. catarrhalis* (no mostrado). El ligado entre el RH4 del *M. catarrhalis* y el C3met fue basado a un buen grado en interacciones iónicas a medida que se incrementó las concentraciones de NaCl se inhibió la interacción (figura 14C). Resultados similares fueron obtenidos con la cepa tipo silvestre BBH18 del *M. catarrhalis* (no mostrado).

Para determinar si el ligado de C3 es un rasgo general de todas las cepas *M. catarrhalis*, seleccionamos una serie aleatoria de aislados clínicos (n=13) y se analizó su capacidad para ligarse al C3met. Todas las cepas de *M. catarrhalis* se ligaron al C3met como se reveló mediante un análisis de citometría de flujo con un pAb anti-C3d. Los valores MFI variaron entre 4 a 39. Sin embargo, el *S. pneumoniae* y *E. coli* que fueron incluidos para la comparación no se ligaron al C3met.

M. catarrhalis es una bacteria que se liga al C3 y al C3met única

Para extender nuestro análisis de la absorción bacteriana de C3 desde en NHS, subespecies de moraxella relacionadas (n=13) lo mismo que patógenos humanos comunes (n=13) fueron incubados en la presencia de NHS-EDTA. De manera muy interesante, entre todas las especies bacterianas ensayadas, la *M. catarrhalis* fue la única bacteria que se ligó al C3 en suero inactivado por complemento (tabla 9). Todas las cepas de moraxella relacionadas lo mismo que los otros patógenos humanos fueron también analizados en cuanto al ligado del C3met. En paralelo con el ligado al C3, la *M. catarrhalis* fue la única especie que se ligó al C3met. Tomados juntos, la *M. catarrhalis* tiene un rasgo único de ligado fuerte al C3 y al C3met de una manera no covalente.

El *M. catarrhalis* se liga al C3meti vía las proteínas de membrana exterior UspA1 y UspA2

Para determinar si la proteína de *M. catarrhalis* es responsable para el ligado con C3, ensayamos una serie de mutantes bacterianos exentos de las

proteínas de membrana exterior MID, UspA1 y/o UspA2 [22, 58]. De manera muy interesante, el ligado del C3meti fue correlacionado significativamente con la expresión de Usp (Figura 15). El RH4Δmid de la *M. catarrhalis* se ligó el C3met al mismo grado que la contraparte tipo silvestre (figuras 15A-B). El mutante RH4ΔuspA1 mostró solamente una ligera disminución en el ligado, mientras que el RH4AuspA2 fue el ligador más débil en comparación con su contraparte tipo silvestre (figuras 15C-D). En paralelo, el ligado del C3met al mutante doble RHAAuspA1/A2 fue abolido completamente (Figura 15E). Más aún, cuando los mismos experimentos se llevaron a cabo usando NHS-EDTA, el mismo patrón fue visto (figura 15F-J). Cuando el suero humano normal fue usado, todos los mutantes mostraron una cantidad similar de C3 sobre su superficie ya que era una mezcla de deposición covalente y ligado de C3 (figura 15K-O). Resultados similares se obtuvieron con el aislado BBH18 de *M. catarrhalis* y los mutantes de BBH18 correspondientes.

Para analizar adicionalmente la interacción entre C3 y UspA1/A2, UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ fueron producidos en *E. coli* y purificados. Las proteínas recombinantes fueron ensayadas en dot blot sobre una membrana de nitrocelulosa seguida por la incubación con C3met marcado con yodo. El MID⁹⁶²⁻¹²⁰⁰, recombinante, que es derivado de la proteína MID de membrana exterior de la *M. catarrhalis* [59], fue incluido como un control negativo. Un ligado débil a la UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ fue detectado, mientras que el C3met marcado con [¹²⁵I] se ligó fuertemente a la UspA2³⁰⁻⁵³⁹ (Figura 16A). Estos hallazgos fueron fortalecidos adicionalmente usando resonancia de plasmón de superficie (es decir, Biacore). La UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ fueron inmovilizados en la superficie de una pastilla CM5 usando acoplamiento amino y el C3met fue inyectado hasta que se alcanzó la saturación. El K_d para la interacción entre el C3met y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ o UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰

fue 3 y 14 μ M, respectivamente. En conclusión, encontramos que el UspA2 fue la proteína más importante en el ligado con el C3met de la *M. catarrhalis*, mientras que el UspA1 contribuyó al ligado a un grado menor.

Un dominio de ligado C3 es localizado entre los residuos de aminoácido 200 y 458 del UspA2.

Para definir el dominio de ligado C3 del UspA2, proteínas recombinantes que anidan el UspA2³⁰⁻⁵³⁹ completo fueron fabricados. El C3met fue incubado con el UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹ de longitud completa inmovilizados y una serie de proteínas UspA2 truncadas. De ahí en adelante, las interacciones fueron cuantificadas mediante ELISA. De acuerdo con los experimentos dot blot (figura 16A), el UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ se ligó al C3met a un grado mucho menor en comparación con el UspA2³⁰⁻⁵³⁹ en el ELISA (Figura 16B). Entre los fragmentos de proteína truncados, el UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, UspA2²⁰⁰⁻⁵³⁹ y UspA2³⁰²⁻⁴⁵⁸ se ligaron eficientemente al C3met, sugiriendo que un dominio de ligado estaba dentro de los residuos de aminoácido 200 y 458.

El UspA1/ A2 recombinante neutraliza la actividad C3

Con el objeto de examinar en detalle el papel de la inhibición dependiente de UspA1/A2 del trayecto alternativo, una serie de experimentos de citometría de flujo fue llevada a cabo con bacterias incubadas con 1% de NHS o suero que había sido pre-incubado con 100 mM de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹. De manera interesante, una disminución significativa de la deposición/ligado de C3 en la superficie del RH4 Δ uspA1/A2 del *M. catarrhalis* fue observada cuando el NHS fue pre-tratado con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ (Figura 17A). Cuando el trayecto clásico

fue terminado con Mg-EGTA, resultados similares fueron obtenidos (Figura 17B). Así, las proteínas recombinantes UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ absorbieron el C3 del NHS e inhibieron la deposición/ligado del C3.

Para determinar si la absorción del C3 mediante la UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes incrementó la supervivencia bacteriana, el mutante doble RH4AuspA1/A2 del *M. catarrhalis* fue incubado con suero suplementado con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ seguido por la determinación del número de bacterias sobrevivientes. El Mg-EGTA fue incluido en la reacción para poder inhibir el trayecto clásico. De manera muy interesante, la adición del UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes al NHS impidió la muerte del *M. catarrhalis* deficiente de la UspA1/A2 (Figura 17C). La UspA2³⁰⁻⁵³⁹ fue más eficiente en inhibir la muerte bacteriana en comparación con el UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰. Cuando ambas proteínas recombinantes fueron suplementadas juntas, ninguna inhibición adicional del trayecto alternativo fue detectada. 10% de NHS corresponde a aproximadamente 600 nM de C3. Para investigar si más moléculas UspA1 pudieran neutralizar la actividad C3, UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y/o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ hasta 600 nM se agregó. Sin embargo, concentraciones mayores de las proteínas recombinantes no incrementaron adicionalmente la inhibición (no mostrado).

También incluimos un ensayo hemolítico de trayecto alternativo que consiste de eritrocitos de conejo y NHS para poder establecer el papel de la UspA1 y A2 como inhibidores del trayecto alternativo. El NHS fue pre-incubado con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹, recombinantes o ambas proteínas juntas seguido por la adición a los eritrocitos. Después de 1 h de incubación, la cantidad de lisis de eritrocitos fue determinada. De manera muy interesante, una hemólisis significativamente disminuida fue observado cuando el NHS fue pre-incubado con

UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ en comparación con el NHS no tratado (Figura 18). En paralelo con la supervivencia incrementada de bacterias en la presencia de UspA2³⁰⁻⁵³⁹ o UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ (Figura 7C), la pre-incubación con UspA2³⁰⁻⁵³⁹ solo resultó en una inhibición más eficiente del trayecto alternativo en comparación a cuando el NHS fue pre-incubado con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰. En conclusión, el UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes interfirieron con la actividad del trayecto alternativo debido a su capacidad para capturar el C3.

En adición a ser una molécula clave en la cascada complemento, microbios objetivos C3b y C3b depositados (C3b inactivado) para la remoción en el proceso de opsonofagocitosis. Para investigar si el C3 o el C3met que no se ligaban covalentemente en la superficie del *M. catarrhalis* podrían todavía funcionar como opsonina, una serie de experimentos de fagocitosis fue llevada a cabo. El *M. catarrhalis* fue pre-incubado con C3met, NHS o NHS tratado con EDTA seguido por la adición de leucocitos polimorfo nucleares. De manera muy interesante, el *M. catarrhalis* no fue engullido en la presencia del C3met, mientras que el NHS promovió fuertemente la fagocitosis (datos no mostrados⁹: sin embargo, cuando el NHS fue pre-tratado con EDTA, el *M. catarrhalis* no fue fagositosidado por los leucocitos polimorfo nucleares. Así, el C3/C3met fue inactivo en la superficie de célula *M. catarrhalis* y no funciona como un opsonino.

Discusión

Interacción entre el *M. catarrhalis* y al fibronectina

La UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ de la cepa Bc5 clínica del *M. catarrhalis* fueron los fragmentos más cortos que todavía se ligaban a la fibronectina. De

205

manera muy interesante, fragmentos más largos que abarcan la secuencia de aminoácido encontrada dentro del UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ mostraron un ligado más eficiente a la fibronectina (figura 5A y B). Esto puede significar que estas dos regiones representan dominios de ligado parciales o que el sitio de ligado es altamente dependiente de una estructura molecular específica. El UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ comparten una secuencia de 31 residuos de aminoácidos idénticos incluyendo los 23 residuos "NNINNIYELAQQQDQHSSDIKTL" (secuencia NNINNIY). Esta secuencia contiene el epítipo para el anticuerpo monoclonal protector (mAb) 17C7 para el cual existe reactividad universal. [2, 50, 30] En un modelo de ratón, la inmunización pasiva con mAb 17C7 suministró protección y mejoró la clarificación pulmonar de la *M. catarrhalis*. [30] Por lo tanto es más interesante que los dominios de ligado a la fibronectina UspA1/A2 contengan estos residuos y argumenta la importancia de esta región en la patogénesis de la infección del tracto respiratorio por la *M. catarrhalis*.

La fibronectina que liga al BBH18 y RH4 del *M. catarrhalis* usada en nuestros experimentos también lleva los 31 residuos de aminoácidos en su proteína UspA1/A2. La mayoría de los *M. catarrhalis* tienen un parte de esta secuencia (es decir, la secuencia NNINNIY). Sin embargo, las cepas similares a O35E que tienen la secuencia NNINNIY en su gen UspA2 no expresan una proteína UspA2 que se liga a la fibronectina. [49] Una explicación probable sería que las variaciones en las regiones de flaqueo pueden afectar las interacciones con la fibronectina. También, la secuencia NNINNIY conservada misma puede tener menores cambios de base de aminoácido únicos. [28] Por lo tanto es probable que el ligado de la fibronectina depende no justo en la expresión de UspA1/A2 sino también en la fabricación individual de cada proteína UspA. De manera muy interesante, en casi la secuencia de aminoácidos idéntica se pueden

encontrar en la proteína UspA2H híbrida con propiedades adhesivas [*M. catarrhalis* TTA37 y O46E). [43] Esto da soporte a nuestros hallazgos de que la secuencia de 31 aminoácidos es importante en la adhesión

En nuestro último conjunto de experimentos, ensayamos si la adherencia del *M. catarrhalis* a las células conjuntivas Chang pudiera ser inhibido mediante los fragmentos que ligan a la fibronectina (UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸) (figura 8B). La preincubación con UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵², UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ o un pAb anti-fibronectina resultó en un ligado disminuido a las células epiteliales Chang. Estos resultados confirman la importancia de estos dominios de ligado en las interacciones del UspA1/A2 con las células epiteliales Chang y sugiere adicionalmente que la fibronectina es un receptor importante para la UspA. En adición, es conocido que el FNBP facilita la adherencia de las bacterias a trayectos no diferenciados y dañados. [54, 69] La expresión de fibronectina mediante los fibroblastos de pulmón se incrementa también mediante el extracto del humo del cigarrillo. [87] el papel del ligado del UspA1/A2 del *M. catarrhalis* a la fibronectina ECM o a la fibronectina asociada a célula epitelial es por lo tanto de gran importancia en pacientes con COPD y puede explicar la ocurrencia común de infección *M. catarrhalis* en este grupo de pacientes. [40]

En conclusión, hemos mostrado que la UspA1/A2 del BBH18, RH4 y Bc5 del *M. catarrhalis* son cruciales para el FnBP. Ambas la UspA1 y A2 recombinantes derivadas del Bc5 se ligan a la fibronectina con un dominio de ligado que comparte residuos de aminoácidos idénticos incluyendo la secuencia NNINNIY conservada. Más aún, una interacción del UspA1/A2 del *M. catarrhalis* con células epiteliales se hace vía fibronectina asociada a la célula. La definición

207

de estos dominios de ligado a la fibronectina es por lo tanto un paso importante hacia el desarrollo de una vacuna contra la *M. catarrhalis*.

Interacción entre *M. catarrhalis* y laminina

La *M. catarrhalis* es una causa común de exacerbaciones infecciosas en pacientes con COPD. El éxito de estas especies en pacientes con COPD está relacionado probablemente en parte con su amplio repertorio de adhesinas. Adicionalmente, hay cambios patológicos tales como pérdida de integridad epitelial con la exposición de la membrana de base donde la capa de laminina misma se ha engruesado en los fumadores. [4] Algunos patógenos han mostrado ser capaces de ligar a la laminina y por lo tanto pueden contribuir con su capacidad para adherirse a tales superficies mucosales dañadas y desnudas. Estos patógenos conocidos incluyen la causa de la enfermedad significativa en las vías respiratorias tales como *S. aureus* y *P. aeruginosa* entre otras. [1, 63] Hemos mostrado recientemente que tanto el UspA1 y A2 se ligan a la fibronectina. [78] Los dominios de ligado de la fibronectina fueron localizados dentro del UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. En este estudio, las mitades de Terminal N UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA2³⁰⁻³⁵¹ (que contienen los dominios de fibronectina) también se ligan a la laminina. Sin embargo, los fragmentos más pequeños que se ligan a la fibronectina (UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸) no se ligan a la laminina en ningún grado apreciable. De hecho, fragmentos más pequeños que la mitad del Terminal N de la UspA1 (UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹) pierde toda su capacidad de ligado a la laminina mientras que con UspA2, solamente UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ se liga a la laminina a pesar de un bajo nivel entonces la proteína recombinante completa (UspA2³⁰⁻⁵³⁹). Estos hallazgos sugieren que quizás partes diferentes de las moléculas pueden tener diferentes papeles funcionales.

Comparando las regiones de ligado de laminina más pequeñas del UspA1 y A2, encontramos que existe, sin embargo, una pequeña similaridad por vía de homología de aminoácidos entre UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ y UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ (datos no mostrados). No es sorprendente que sea un hecho conocido de que ambas proteínas tienen una estructura de cabeza globular similar a colombina o chupeta a pesar de tener solamente 22% de identidad en ambas mitades de Terminal N. [2, 32] Nosotros postulamos que una estructura terciaria es probablemente responsable de las interacciones con la laminina en la región de cabeza in vivo. La localización de los dominios de ligado en el Terminal N serían lógicas ya que esta sería la mayor parte expuesta y en contacto con la membrana profunda humana in vivo.

Los factores bacterianos que median la adherencia al tejido y a los componentes de matriz extracelular (ECM) son agrupados juntos en una única familia denominada "componentes de superficie microbiana que reconocen las moléculas de matriz adhesiva" (MSCRAMMS). Ya que la UspA1/A2 liga tanto a la fibronectina como a la laminina, estas proteínas pueden ser designadas como MSCRAMMS. Nuestros resultados sugieren que la UspA1 y A2 son adhesinas multifuncionales con diferentes dominios que interactúan con diferentes ligandos en el tracto respiratorio. Perfiles de ligado de amplio espectro similares han sido reportados para otras proteínas bacterianas tales como la YadA de *Yersinia enterocolitica* para la cual el UspA1 y A2 tiene una relación estructural. [45, 70] YadA también liga tanto a la fibronectina como a la laminina. [32]

En resumen hemos mostrado que las UspA1/A2 son cruciales para la interacción con la *M. catarrhalis* con la membrana basal de glicoproteína de

laminina y esta juega un papel importante en la patogénesis de las infecciones en pacientes con COPD. [74]

Interacción entre la *M. catarrhalis* y C3 y C3met

La resistencia del complemento es uno de los factores de virulencia bacterianos más importantes. [66] La mayoría (89 %) de los aislados de *M. catarrhalis* de pacientes con infecciones del tracto respiratorio inferior son resistentes a la muerte mediada por el complemento. [34] La UspA1 y A2 de la *M. catarrhalis* son cruciales para la supervivencia bacteriana en el suero humano in vivo [1, 15], y hemos mostrado que estas dos proteínas de membrana externa se ligan al regulador de fase fluida complemento del trayecto clásico, C4BP. [58] En el presente estudio, hemos demostrado que la *M. catarrhalis* puede inhibir el trayecto alternativo mediante ligado no covalente del C3 (figuras 17 y 18). El ligado de C3 más probablemente también inhibe el trayecto clásico. Este podría, sin embargo, no ser analizado en detalle ya que el *M. catarrhalis* también se liga al C4BP. De manera muy interesante, el ligado del C3 dependiente del *M. catarrhalis* es único ya que varias subespecies de moraxella relacionadas también como bacterias patogénicas comunes humanas no se ligan al C3 (tabla 9). Las interacciones con C3 y C3 tratada con metilamina son mediadas principalmente por UspA2, mientras que el UspA1 tiene un papel menor (figuras 15 y 16). La región de ligado al C3 del UspA2 fue localizada entre los residuos de aminoácidos 200 a 458. Esta región contiene un estiramiento de 140 residuos de aminoácidos que es el 93% idéntica a una región en la UspA1. [2] Sin embargo, a pesar de esta similitud en la secuencia, la UspA1 se liga a C3 a un grado mucho menor. Esto puede ser debido a una diferencia específica en la conformación entre las

proteínas. La discrepancia en el ligado de C3 de la UspA1 y UspA2 se da por el contraste con respecto a la interacción UspA1/A2 con el C4BP. [58]

La *M. catarrhalis* igualmente es resistente tanto a los trayectos clásicos como los alternativos (figura 12B). La bacteria de liga al C4BP que inhibe el trayecto clásico [58] y en este papel nosotros demostramos una interacción con el trayecto alternativo mediante el ligado del C3. Para determinar cuales de estos mecanismos que son de mayor importancia para la resistencia al suero de la *M. catarrhalis* en varias situaciones in vivo es difícil. Por ejemplo, la importancia del trayecto clásico dependerá fuertemente de la historia de las infecciones con el *M. catarrhalis* y la capacidad para generar anticuerpos que activan el complemento. Sin embargo, cada mecanismo que suministra protección desde el complemento ciertamente es beneficioso para un patógeno. Ya que C3 es una molécula clave en el sistema complemento, el ligado de C3 muy probablemente resulta en la regulación de todos los tres trayectos de activación y puede contribuir mucho más a la resistencia al suero.

La importancia del sistema complemento es un mecanismo de defensa primario o principal que es mirado como espejo por el hecho de que los microbios han desarrollado varias estrategias para interferir con y/o neutralizar componentes del sistema complemento. [42, 35, 88] En adición a la *M. catarrhalis*, *S. pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *E. coli* KI, *Candida albicans*, y *N. gonorrhoeae* expresan moléculas de superficie específicas que ligan al C4BP y como consecuencia protegen la bacteria contra el trayecto clásico de complemento. [8, 9, 52, 58, 64, 65, 80] En adición a la inhibición del trayecto clásico, varias bacterias (por ejemplo, *C. albicans*, *N. meningitidis*, *S. pyogenes*, y *S. pneumoniae*; para su revisión ver

[68, 89] el factor de ligado H y la molécula similar al factor H y por lo tanto son parcialmente protegidos contra el trayecto alternativo de complemento.

La UspA1 y A2 absorben a C3 desde el suero y por lo tanto más probablemente inhiben la activación del complemento. Similarmente, la proteína neumococal (PspA) parece inhibir el trayecto alternativo tanto in Vitro como in vivo. El PspA es un factor de virulencia importante para el *S. pneumoniae*. Las cepas neumococales deficientes en PspA son fácilmente clarificadas de la sangre, mientras que las cepas que expresan el PspA sobreviven. [82] Más aún, en un modelo de murina de acteremia, los neumococos deficientes en PspA tienen una virulencia significativamente reducida en comparación con los neumococos que expresan el PspA. [11] Se ha demostrado que más C3b es depositado sobre neumococos negativos en PspA que sobre PspA positivo. [67, 82] Así, la expresión de PspA reduce la clarificación mediada por complemento y la fagocitosis del *S. pneumoniae* mediante limitar la opsonización por C3b. [12, 67] Los neumococos deficientes de PspA que no son virulentos en ratones normales se vuelven virulentos en ratones deficientes de C3 y deficientes del factor B. [82]

Para nuestro conocimiento, hay solamente dos ejemplos de proteínas bacterianas que se ligan de manera no covalente con C3 y por lo tanto interfieren con la función complemento. El primero es la proteína de ligado a fibrinogen extracelular (Efb) del *Staphylococcus aureus*, del cual se encontró que liga al C3b.[44] El Efb inhibe tanto los trayectos clásicos como alternativos independientemente de la conformación de tioéster, es decir, el ligado al C3b no es covalente. El segundo ejemplo es la proteína que liga a la colina neumococal (CbpA), que se ha mostrado que se liga al C3 tratado con metilamina, sugiriendo una interacción no covalente que no es dependiente de la activación de

complemento. [16] El CbpA es un componente de la pared de la célula neumococal, pero puede solamente ligarse tres cuando el CbpA es secretado. Para poder hacer el ensayo de esta hipótesis, que no está firmemente establecido en la literatura, nosotros analizamos 11 aislados diferentes neumococales para el ligado a C3 (C3 tratado con metilamina o NHS-EDTA) mediante citometría de flujo (figuras 12B y tabla 9). Ningún C3 ligado pudo ser detectado sobre la superficie del *S. pneumoniae*. Cuando los lisados del *S. pneumoniae* y los sobrenadantes del cultivo fueron analizados en Western blot usando C3 tratado con metilamina seguido por un pAb de C3 anti-humano, confirmamos los resultados dados por Cheng y sus colaboradores [16] (no mostrado). A la luz del Efb y CbpA, en los cuales ambos son proteínas que ligan al C3 secretados por dos bacterias gram positivas, la *M. catarrhalis* gram negativa es una especie única con proteínas ancladas a la membrana que ligan a C3 que inhibe el trayecto alternativo en la superficie de la bacteria.

La levadura *Candida albicans* se ha mostrado que se liga a la C3b, iC3b y C3d. Sin embargo, el C3b Es ligado con una afinidad considerablemente menor que el iC3b y el C3d. [29] Encontramos una gran diferencia entre ligado de C3 a la *M. catarrhalis* y *C. albicans* (no mostrado); a pesar de que *Candida* se liga al C3met (56 % de células positivass), la intensidad media de fluorescencia (mfi) fue solamente < 2.0 en comparación con el mfi 36.9 para la *M. catarrhalis*. Adicionalmente, no hubo ligado detectable visto cuando el *C. albicans* fue incubado con suero tratado con EDTA. Dos proteínas de ligado a C3d han sido aisladas del *C. albicans* y la proteína más caracterizada es una manoproteína de 60 kDa que inicialmente fue reconocida por un anticuerpo dirigido contra el receptor 2 del complemento humano (CD21). [13] Sin embargo, la UspA1 y A2 del *M. catarrhalis* no fueron reconocidos por un anticuerpo policlonal directamente

contra CD21 (no mostrado). En paralelos con estafilococos y neumococos [52, 64], Una proteína que liga al C3d secretada del *C. albicans* también existe. [72] Finalmente, un receptor de iC3b de la *C. albicans* ha sido aislado y es estructuralmente similar al CR3 humano (CD11b). [3] Los mecanismos mediante los cuales estos receptores pueden participar en la patogénesis no son completamente conocidos.

Los ejemplos anteriores de patógenos que ligan a C3 son notablemente diferentes de la *M. catarrhalis* en que estas especies frecuentemente son aisladas de corrientes sanguíneas. La *M. catarrhalis* es patógeno mucosal con instancias raras de infección bacterénica. Por lo tanto, el ligado y la inactivación de C3 más probablemente ocurre en la superficie mucosal. Esto soportado por el hecho de que existe una activación complemento establecida fuertemente e inflamación consecuente en el estado de enfermedad tal como la otitis media aguda. [57] Las proteínas complemento se cree que son transportadas a la superficie mucosal debido a la exudación del plasma. [26, 62] En efusiones del oído medio (MEE) de niños por ejemplo, concentraciones fuertemente elevadas de productos de C3 pueden también encontrarse. [51] En adición, los factores de complemento en el fluido MEE se ha mos6trado que son importantes en la actividad bactericida contra otros agentes mucosales tales como la *H. influenzae* no tipificable. [75] La *M. catarrhalis* es un patógeno humano estricto. Este no causa enfermedades como la otitis media o la neumonía en animales. Un modelo de clarificación pulmonar en ratón y un modelo de otitis media con conejillos de indias, ha sido usado en varias ocasiones. Sin embargo, ni la otitis media ni la neumonía se desarrollan y las bacterias son clarificadas rápidamente. [19, 83] Por lo tanto es difícil ensayar el significado biológico del ligado de C3 bacteriano in vivo. Ya que la UspA1 y A2 son proteínas multifuncionales [1, 15, 31, 43, 58, 78], sería imposible relacionar

cualquier diferencias en la clarificación del *M. catarrhalis* al ligado con C3. En particular el hecho de que la UspA1 es una adhesina importante de la *M. catarrhalis* y que liga tanto a CEAC AMI como a la fibronectina [31, 78] muy probablemente afectaría la clarificación. Sin embargo, debido a la fuerte activación de complemento en los estados de enfermedad tales como la otitis media, el ligado dependiente de la moraxella de C3 puede representar una vía importante para combatir la defensa mucosal

El hecho de que la *M. catarrhalis* se anida en el sistema inmune humano de varias maneras puede explicar porque la *M. catarrhalis* es un habitante tan común del tracto respiratorio [73]. En conclusión, la *M. catarrhalis* ha desarrollado maneras sofisticadas de combatir tanto los sistemas inmune humorales e innatos. Los datos presentes muestran que la *M. catarrhalis* tiene una capacidad de ligado a C3 única en la superficie de células bacterianas que no se puede encontrar en otras especies bacterianas.

Referencias

1. Aebi C, Lafontaine ER, Cope LD, et al. Phenotypic effect of isogenic uspA1 y uspA2 mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E. Infect Immun 1998; 66: 3113- 9.
2. Aebi C, Maciver I, Latimer JL, et al. A protective epitope of *Moraxella catarrhalis* is encoded by two different genes. Infect Immun 1997; 65: 4367-77.
3. Alaei, S., C. Larcher, C. Ebenbichler, W. M. Prodinger, J. Janatova, y M. P. Dierich. 1993. Isolation y biochemical characterization of the iC3b receptor of *Candida albicans*. Infect. Immun. 61:1395-1399.
4. Amin K, Ekberg-Jansson A, Lofdahl CG y Venge P. Relationship between inflammatory cells y structural changes in the lungs of asymptomatic y never smokers: a biopsy study. Thorax 2003/58:135-42.
5. Attia AS, Lafontaine ER, Latimer JL, Aebi C, Syrogiannopoulos GA y Hansen EJ. The UspA2 protein of *Moraxella catarrhalis* is directly involved in the expression of serum resistance. Infect Immun 2005; 73:2400-10.
6. Bartos LC, Murphy TF. Comparison of the outer membrane proteins of 50 strains of *Branhamella catarrhalis*. J Infect Dis 1988/ 158:761-5.
7. de Bentzmann S, Tristan A, Etienne J, Brousse N, Vandenesch F y Lina G. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind

926

- to basement membrane type I y IV collagens y laminin. J Infect Dis 2004/190:1506-15.
8. Berggard, K., E. Johnsson, F. R. Mooi, y G. Lindahl. 1997. Bordetella pertussis binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. Infect. Immun. 65:3638-3643.
 9. Blom, A. M., A. Rytönen, P. Vasquez, G. Lindahl, B. Dahlback, y A. B. Jonsson. 2001. A novel interaction entre type IV pili of *Neisseria gonorrhoeae* y the human complement regulator C4B-binding protein. J. Immunol. 166:6764-6770.
 10. Bootsma HJ, van der Heide HG, van de Pas S, Schouls LM y Mooi FR. Analysis of *Moraxella catarrhalis* by DNA typing: evidence for a distinct subpopulation associated with virulence traits. J Infect Dis 2000; 181:1376-87.
 11. Briles, D. E., J. Yother, L. S. McDaniel. 1988. Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Rev. Infect. Dis. 10: (Suppl. 2):S372.
 12. Briles, D. E., S. K. Hollingshead, E. Swiatlo, A. Brooks-Walter, A. Szalai, A. Virolainen, L. S. McDaniel, K. A. Benton, P. White, K. Prellner, A. Hermansson, P. C. Aerts, H. Van Dijk, y M. J. Grain. 1997. PspA y PspC: their potentiA1 for use as pneumococcal vaccines. Microb. Drug Resist. 3:401-408.

13. Calderone, R. A., L. Linehan, E. Wadsworth, y A. L. Sandberg. 1988. Identification of C3d receptors on *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 56:252-258.
14. Catlin BW. *Branhamella catarrhalis*: an organism gaining respect as a pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3:293- 320.
15. Chen D, Barniak V, VanDerMeid KR y McMichael JC. The levels and bactericidal capacity of antibodies directed against the UspA1 y UspA2 outer membrane proteins of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* in adults y children. *Infect Immun* 1999; 67: 1310-6.
16. Cheng, Q., D. Finkel, y M. K. Hostetter. 2000. Novel purification scheme y functions for a C3-binding protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem.* 39:5450-5457.
17. Cope LD, Lafontaine ER, Slaughter CA, et al. Characterization of the *Moraxella catarrhalis* uspA1 y uspA2 genes y their encoded products. *J Bacteriol* 1999;181:4026-34.
18. De Saint Jean M, Baudouin C, Di Nolfo M, et al. Comparison of morphological y functional characteristics of primary-cultured human conjunctival epithelium y of Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival cell line. *Exp Eye Res* 2004; 78: 257-74.
19. Fulghum, R. S., y H. G. Marrow. 1996. Experimental otitis media with *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 105:234-241.

20. Forsgren, A., y A. Grubb. 1979. Many bacteria species bind human IgD. J. Immunol 122:1468-1472.
21. Forsgren A, Brant M, Mollenkvist A, et al. Isolation y characterization of a novel IgD-binding protein from *Moraxella catarrhalis*. J Immunol 2001/167:2112-20.
22. Forsgren A, Brant M, Karamehmedovic M y Riesbeck K. The immunoglobulin D-binding protein MID from *Moraxella catarrhalis* is also an adhesin. Infect Immun 2003; 71:3302-9.
23. Forsgren A, Brant M y Riesbeck K. Immunization with the truncated adhesion moraxella catarrhalis immunoglobulin D-binding protein (MID764-913) is protective against *M. catarrhalis* in a mouse model of pulmonary clearance. J Infect Dis 2004; 190: 352-5.
24. Gjorloff-Wingren, A., R. Hadzic, A. Forsgren, y K. Riesbeck. 2002. A novel IgD-binding bacteria protein from *Moraxella catarrhalis* induces human B lymphocyte activation y isotype switching in the presence of Th2 cytokines. J. Immunol. 168:5582-5588.
25. Greenwood FC, Hunter WM y Glover JS. The Preparation of I-131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. Biochem J 1963; 89: 114-23.

220

26. Greiff, D., I. Erjefalt, C. Svensson, P. Wollmer, U. Alkner, M. Andersson, y C. G. Persson. 1993. Plasma exudation y solute absorbtion across the airway mucosa. Clin. Physiol. 13: 219-233.
27. Hanski E, Caparon M. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:6172-6.
28. Hays JP, van der Schee C, Loogman A, et al. TotA1 genome polymorphism y low frequency of intra-genomic variation in the uspA1 y uspA2 genes of *Moraxella catarrhalis* in otitis prone y non-prone children up to 2 years of age. Consequences for vaccine design? Vaccine 2003; 21: 1118-24.
29. Heidenreich, F., y M. P. Dierich. 1985. *Candida albicans* y *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b y C3d but not C3b. Infect. Immun. 50:598-600.
30. Helminen ME, Maciver I, Latimer JL, et al. A large, antigenically conserved protein on the surface of *Moraxella catarrhalis* is a target for protective antibodies. J Infect Dis 1994; 170: 867-72.
31. Hill DJ, Virji M. A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. Mol Microbiol 2003; 48: 117-29.

32. Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A y Heesemann J. Structure y secuencia analysis of Yersinia YadA y Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. EMBO J 2000; 19: 5989-99.
33. Holm MM, Vanlerberg SL, Foley IM, Sledjeski DD y Lafontaine ER. The *Moraxella catarrhalis* porin-like outer membrane protein CD is an adhesin for human lung cells. Infect Immun 2004; 72: 1906-13.
34. Hol, C, C. M. Verduin, E. E. Van Dijke, J. Verhoef, A. Flier, H. van Dijk. 1995. Complement resistance is a virulence factor of Branhamella (Moraxella) catarrhalis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 11:207-211.
35. Hornef, M. W., M. J. Wick, M. Rhen, y S. Normark. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate y adaptive immune responses. Nat. Immunol. 3:1033- 1040.
36. Hostetter, M. K., M. L. Thomas, F. S. Rosen, y B. F. Tack. 1982. Binding of C3b proceeds by a transesterification reaction at the thiolester site. Nature 298:72-75.
37. Hostetter, M. K., R. A. Krueger, y D. J. Schmeling. 1984. The biochemistry of opsonization: central role of the reactive thiolester of the third component of complement. J. Infect. Dis. 150:653-661.
38. Joh D, Wann ER, Kreikemeyer B, Speziale P y Hook M. Role of fibronectinbinding MSCRAMMs in bacteria1 adherence y entry into mammalian cells. Matrix Biol 1999;18:211-23.

39. Joh HJ, House-Pompeo K, Patti JM, Gurusiddappa S y Hook M. Fibronectin receptors from gram-positive bacteria: comparison of active sites. *Biochemistry* 1994;33:6086-92.
40. Karalus R, Campagnari A. *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Microbes Infect* 2000;2:547-59.
41. Kask, L., L. A. Trouw, B. Dahlback, y A. M. Blom. 2004. The C4b-binding protein-protein S complex inhibits the phagocytosis of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 279:23869-23873.
42. Lachmann, P. J. 2002. MicrobiA1 subversion of the immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:8461- 8462.
43. Lafontaine ER, Cope LD, Aebi C, Latimer JL, McCracken GH, Jr. y Hansen EJ. The UspA1 protein y a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. *J Bacteriol* 2000; 182: 1364-73.
44. Lee, L. Y. L., M. Hook, D. Haviland, R. A. Wetsel, E. O. Yonter, P. Syribeys, J. Vernachio, y E. L. Brown. 2004. Inhibition of complement activation by secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J. Infect. Dis.* 190:571- 579.
45. Mack D, Heesemann J y Laufs R. Characterization of different oligomeric species of the *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein YadA. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1994; 183: 217-27.

46. Maheshwari RK, Kedar VP, Bhartiya D, Coon HC y Kang YH. Interferon enhances fibronectin expression in various cell types. *J Biol Regul Homeost Agents* 1990;4:117-24.
47. McGavin MJ, Gurusiddappa S, Lindgren PE, Lindberg M, Raucci G y Hook M. Fibronectin receptors from *Streptococcus dysgalactiae* y *Staphylococcus aureus*. Involvement of conserved residues in ligand binding. *J Biol Chem* 1993; 268: 23946-53.
48. McMichael JC. Vaccines for *Moraxella catarrhalis*. *Vaccine* 2000; 19 Suppl I:SI01-7.
49. McMichael JC, Fiske MJ, Fredenburg RA, et al. Isolation y characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. *Infect Immun* 1998;66:4374-81.
50. Meier PS, Troller R, Grivea IN, Syrogiannopoulos GA y Aebi C. The outer membrane proteins UspA1 y UspA2 of *Moraxella catarrhalis* are highly conserved in nasopharyngeal isolates from young children. *Vaccine* 2002;20:1754-60.
51. Meri, S., T. Lehtinen, y T. PA1va. 1984. Complement in chronic secretory otitis media. C3 breakdown y C3 splitting activity. *Arch. Otolaryngol.* 110:774-778.

52. Meri, T., A. M. Blom, A. Hartmann, D. Lenk, S. Meri, P. F. Zipfel. 2004. The hyphA1 y yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein. *Infect. Immun.* 72:6633-6641.
53. Mollenkvist A, Nordstrom T, Hallden C, Christensen JJ, Forsgren A y Riesbeck K. The *Moraxella catarrhalis* immunoglobulin D-binding protein MID has conserved sequences y is regulated by a mechanism corresponding to phase variation. *J Bacteriol* 2003; 185: 2285-95.
54. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, et al. Fibronectin- binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun* 2002;70:620-30.
55. Murphy TF. *Branhamella catarrhalis*: epidemiology, surface antigenic structure, y immune response. *Microbiol Rev* 1996; 60: 267-79.
56. Murphy TF, Brauer AL, Aebi C y Sethi S. Identification of surface antigens of *Moraxella catarrhalis* as targets of human serum antibody responses in chronic obstructive pulmonary disease. *Infect Immun* 2005; 73: 3471-8.
57. Narkiö-Makela, M., J. Jero, y S. Meri 1999. Complement activation y expression of membrane regulators in the middle ear mucosa in otitis media with effusion. *Clin. Exp. Immunol.* 116:401-409.
58. Nordstrom T, Blom AM, Forsgren A y Riesbeck K. The emerging pathogen *Moraxella catarrhalis* Interacts with complement inhibitor C4b binding

225

- protein through ubiquitous surface proteins A1 y A2. J Immunol 2004;173:4598-606.
59. Nordstrom T, Forsgren A y Riesbeck K. The immunoglobulin D-binding part of the outer membrane protein MID from *Moraxella catarrhalis* comprises 238 amino acids y a tetrameric structure. J Biol Chem 2002;277:34692-9.
60. Nordstrom T, Blom AM, Tan TT, Forsgren A y Riesbeck K. Ionic binding of C3 to the human pathogen *Moraxella catarrhalis* is a unique mechanism for combating innate immunity. J Immunol 2005/ MS#05-2213, in press.
61. Pearson MM, Lafontaine ER, Wagner NJ, St Geme JW, 3rd y Hansen EJ. A hag mutant of *Moraxella catarrhalis* strain O35E is deficient in hemagglutination, autoagglutination, y immunoglobulin D-binding activities. Infect Immun 2002; 70: 4523-33.
62. Persson, C. G., I. Erjefalt, U. Alkner, C. Baumgarten, L. Greiff, B. Gustafsson, A. Luts, U. Pipkorn, F. Sundler, C. Svensson et al. 1991. Plasma exudation as a first line respiratory mucosal defence. Clin. Exp. Allergy 21: 17-24.
63. Plotkowski MC, Tournier JM y Puchelle E. *Pseudomonas aeruginosa* strains possess specific adhesins for laminin. Infect Immun 1996/64:600-5.
64. Prasadaraao, N. V., A. M. Blom, B. O. Villoutreix, y L. C. Linsangan. 2002. A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein

226

- mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1. *J. Immunol.* 169:6352-6360.
65. Ram, S., M. Cullinane, A. M. Blom, S. Gulati, D. P. McQuillen, B. G. Monks, C. O'Connell, R. Boden, C. Elkins, M. K. Pangburn, B. Dahlback, y P. A. Rice. 2001. Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.* 193:281-296.
66. Rautemaa, R., y S. Meri. 1999. Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes Infect.* 1:785-94.
67. Ren, B., A. J. Szalai, S. K. Hollingshead, D. E. Briles. 2004. Effects of PspA y antibodies to PspA on activation y deposition of complement on the pneumococcal A1 surface. *Infect. Immun.* 72:114-122.
68. Rodriguez de Cordoba, S., J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa, y P. Sanchez-Corral. 2004. The human complement factor H: function, roles, genetic variations y disease associations. *Mol. Immunol.* 41:355-367.
69. Roger P, Puchelle E, Bajolet-Laudinat O, et al. Fibronectin y alpha5beta1 integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. *Eur Respir J* 1999; 13: 1301-9.
70. Roggenkamp A, Ackermann N, Jacobi CA, Truelzsch K, Hoffmann H y Heesemann J. Molecular analysis of transport y oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* 2003; 185: 3735- 44.
- /

207

71. Rozalska B, Wadstrom T. Protective opsonic activity of antibodies against fibronectin-binding proteins (FnBPs) of *Staphylococcus aureus*. *Scand J Immunol* 1993; 37: 575- 80.
72. Saxena, A., y R. Calderone. 1990. Purification y characterization of the extracellular C3d-binding protein of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 58:309-314.
73. Schwarz-Linek U, Werner JM, Pickford AR, et al. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature* 2003; 423: 177-81.
74. Sethi, S., y T. F. Murphy. 2001. BacteriA1 infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:336- 363.
75. Shimizu, T., T. Harada, Y. Majima, y Y. Sakakura. 1988. BactericidA1 activity of middle ear effusion on a single isolate of non-typable *Haemophilus influenzae*. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 16:211-217.
76. Tack, B. F., R. A. Harrison, J. Janatova, M. L. Thomas, y J. W. Prahl. 1980. Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 5764- 5768.
77. Talay SR, Valentin-Weigand P, Jerlstrom PG, Timmis KN y ChhatwA1 GS. Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: la secuencia of the

binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect Immun* 1992; 60: 3837-44.

78. Tan, T. T., T. Nordstrom, A. Forsgren, y K. Riesbeck. 2005. The Respiratory Pathogen *Moraxella catarrhalis* Adheres to Epithelial Cells by Interacting with Fibronectin through Ubiquitous Surface Proteins A1 y A2. *J. Infect. Dis.*, MS# 33893, in press.
79. Tenner, A. J., P. H. Lesavre, y N. R. Cooper. 1981. Purification y radiolabeling of human C1q. *J. Immunol.* 127:648-653.
80. Them, A., L. Stenberg, B. Dahlback, y G. Lindahl. 1995. Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* también bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J. Immunol.* 154:375-386.
81. Timpe JM, Holm MM, Vanlerberg SL, Basrur V y Lafontaine ER. Identification of a *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein exhibiting both adhesin y lipolytic activities. *Infect Immun* 2003;71:4341-50.
82. Tu, A. H., R. L. Fulgham, M. A. McCrory, D. E. Briles, A. J. Szalai. 1999. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 67: 4720.
83. Unhanand, M., I. Maciver, O. Ramilo, O. Arencibia- Mireles, J. C. Argyle, G. H. McCracken Jr, y E. J. Hansen. 1992. Pulmonary clearance of *Moraxella catarrhalis* in an animal model. *J. Infect. Dis.* 165:644-650.

84. Verduin CM, Hol C, Fleer A, van Dijk H y van Belkum A. *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 125-44.
85. Walport, M. J. 2001. Complement. First of two parts. N. Engl. J. Med. 344:1058-1066.
86. Walport, M. J. 2001. Complement. Second of two parts. N. Engl. J. Med. 344:1140-1144.
87. Wang H, Liu X, Umino T, et al. Effect of cigarette smoke on fibroblast-mediated gel contraction is dependent on cell density. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003; 284: L205-13.
88. Wurzner, R. 1999. Evasion of pathogens by avoiding recognition or eradication by complement, in part via molecular mimicry. Mol. Immunol. 36:249-260.
89. Zipfel, P. F., C. Skerka, J. Hellwage, S. T. Jokiranta, S. Meri, V. Brade, P. Kraiczy, M. Noris, y G. Remuzzi. 2001. Factor H family proteins: on complement, microbes y human diseases. Biochem. Soc. Trans. 30:971-978.

REIVINDICACIONES

1. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 1, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
2. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 2, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
3. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 3, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
4. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 4, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
5. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 5, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.

231

6. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 6, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
7. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 7, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
8. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 8, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
9. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 9, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
10. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 10, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.

11. El uso de por lo menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la producción de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una infección.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la infección es causada por *Moraxella catarrhalis*.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, para la profilaxis o tratamiento de la otitis media, sinusitis o infecciones del tracto respiratorio inferior.
14. Un ligando que comprende un dominio que liga a la fibronectina, dicho ligando consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de La secuencia ID No. 1 a la secuencia ID No. 3, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
15. Un ligando que comprende un dominio de ligado a la laminina, dicho ligando consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia ID No. 4 a La secuencia ID No. 8, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
16. Un ligando que comprende un dominio de ligado a C3 o C3met, dicho ligando consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo

que consiste de la secuencia ID No. 4, la secuencia ID No. 6, la secuencia ID No. 9 y la secuencia ID No. 10, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otros productos de procesamiento secundario del mismo.

17. Un medicamento que comprende uno o más ligandos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglomerantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.
18. Una vacuna que comprende uno o más ligandos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglomerantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.
19. Un método para tratar o prevenir una infección en un individuo que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de un medicamento o de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 17 o 18.
20. Un método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la infección es causada por *Moraxella catarrhalis*.
21. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un ligado, proteína o péptido de la presente invención, los mismo que homólogos, polimorfismos, degenerados y variantes divididas del mismo.

234

22. Un polipéptido o un polipéptido truncado que comprende por lo menos una de las secuencias conservadas de la secuencia ID No 1 a la secuencia ID No 3 con la capacidad de ligar a la fibronectina.
23. Un polipéptido o un polipéptido truncado que comprende por lo menos una de las secuencias conservadas de la secuencia ID No 4 a la secuencia ID No 8 con la capacidad de ligar a la laminina.
24. Un polipéptido o un polipéptido truncado que comprende por lo menos una de las secuencias conservadas de la secuencia ID No 4, 6, 9, y 10, con la capacidad de ligar al C3 y/o al C3met.
25. Una composición de vacuna que comprende una cantidad efectiva de UspA1 y/o UspA2 en combinación con una cantidad efectiva de proteína MID y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglomerantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.
26. El uso de una cantidad efectiva de UspA1 y/o UspA2 en combinación con una cantidad efectiva de proteína MID para la producción de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una infección.
27. El uso de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la infección es causada por *Moraxella catarrhalis*.

235

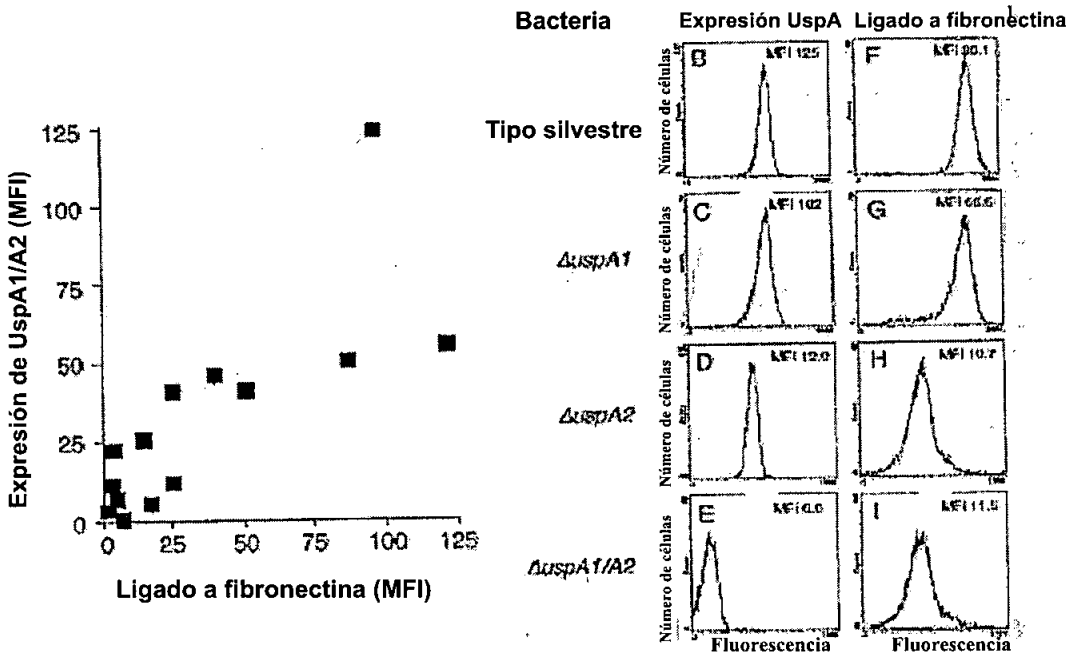
INTERACCIÓN DE LA MORAXELLA CATARRHALIS CON CÉLULAS
EPITELIALES, PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRA CELULAR Y EL
SISTEMA COMPLEMENTO

Resumen

La presente invención se relaciona con proteínas de matriz extracelular de Moraxella Catarrhalis y su capacidad para interactuar con células epiteliales vía fibronectina y laminina asociadas con células, y también a su capacidad para inhibir el sistema complemento. Estas proteínas extracelulares son útiles en la preparación de vacunas. La presente invención suministra péptidos que interactúan con la fibronectina, laminina y sistemas complemento.

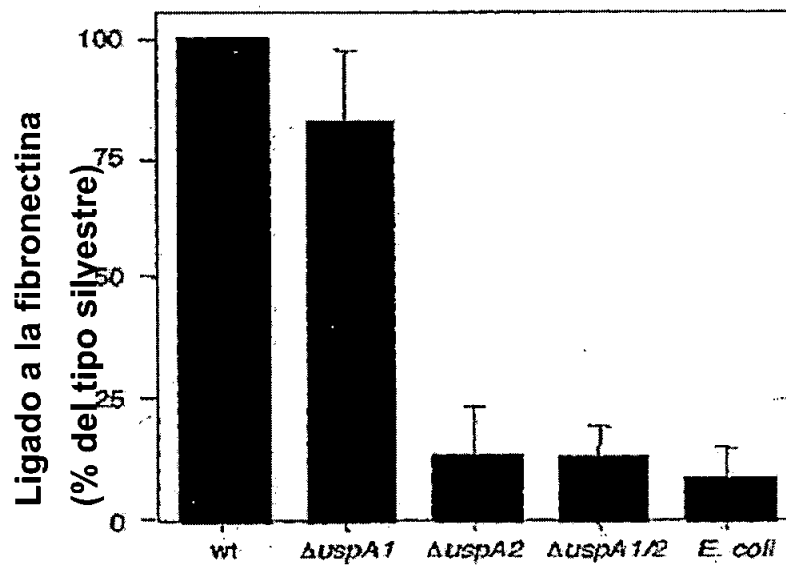
236

Figura 1



237

Figura 2

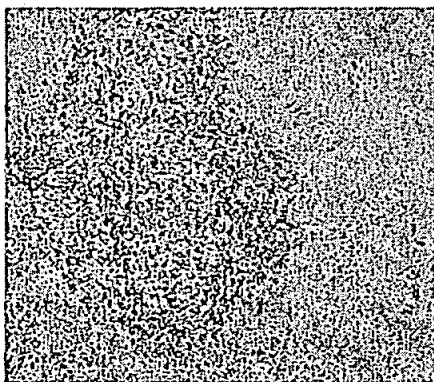


HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

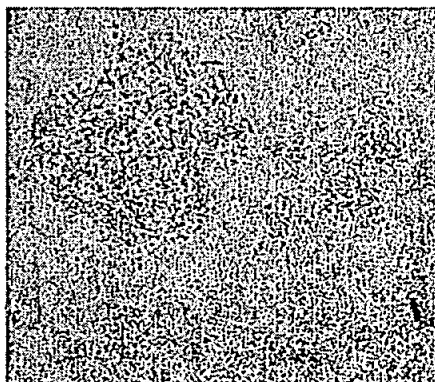
238

Figura 3

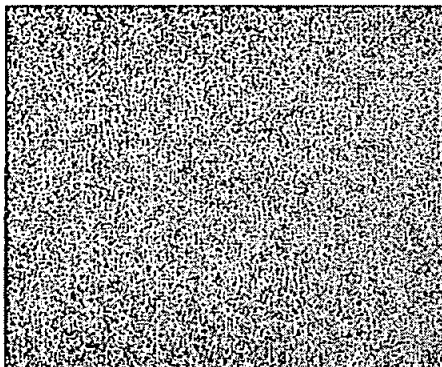
A. *A.M. Catarrhalis* Tipo silvestre



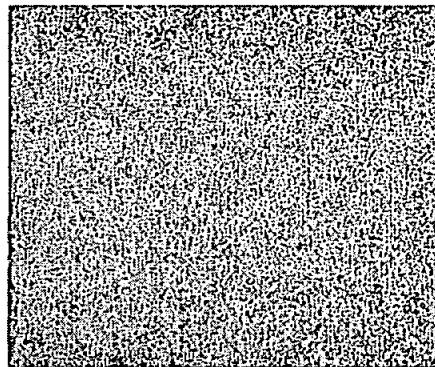
B. Mutante AuspA1



C. Mutante AuspA2



D. Mutante Doble AuspA1/A2



239

Figura 4

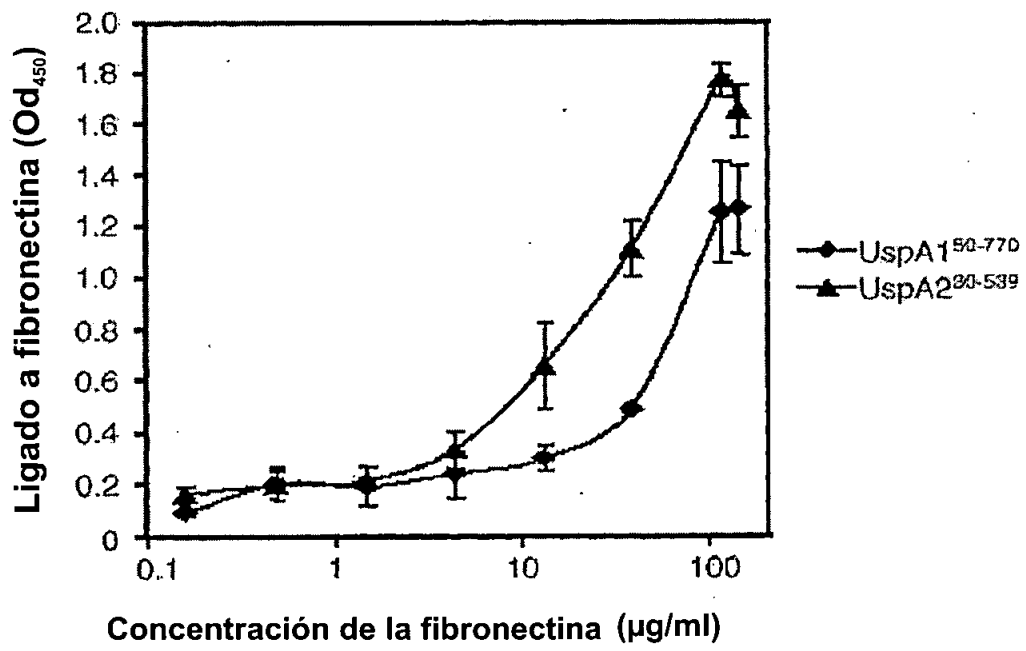
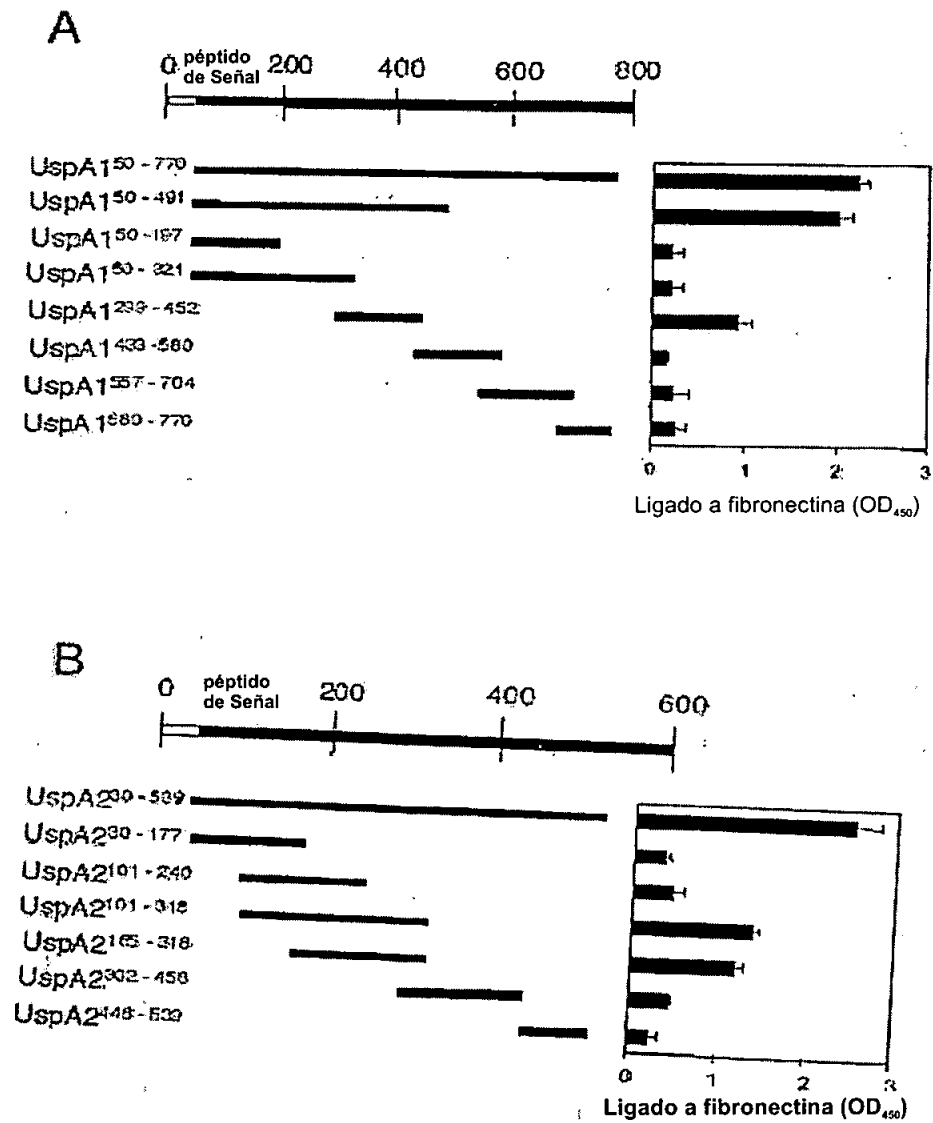


Figura 5



291

Figura 6

UspA1 299-452	TGNGTVSVGKKGKERQIVHVGAGEISDTST
UspA2 165-318	- - KDAIAKNNESIED - LYDFGH - EVAES - -
UspA1 299-452	DAVNGSQLHVLATVVAQNKADIKDLDDDEVG
UspA2 165-318	- - - IG - EIHAWN - - EAQNET - - - - LK - - - G
UspA1 299-452	LLGEEINSLEGEIFNNQDAIAKNQADIKTL
UspA2 165-318	LI - - - TNSIE - - NTNN - - - ITKNKADIQAL
UspA1 299-452	ESNVEEGLLDLSGRLLDQKADIDNNINNIY
UspA2 165-318	EENVVEBLFNLSGRLLDQKADIDNNINNIY
UspA1 299-452	ELAQQDQHS SDIKTLKNNVEEGLLDLSGR
UspA2 165-318	ELAQQDQHS SDIKTLKKNVEEGLLELSDH
UspA1 299-452	LIDQ - - - - -
UspA2 165-318	IIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQYAAQ
UspA1 299-452	-
UspA2 165-318	K

242

Figura 7

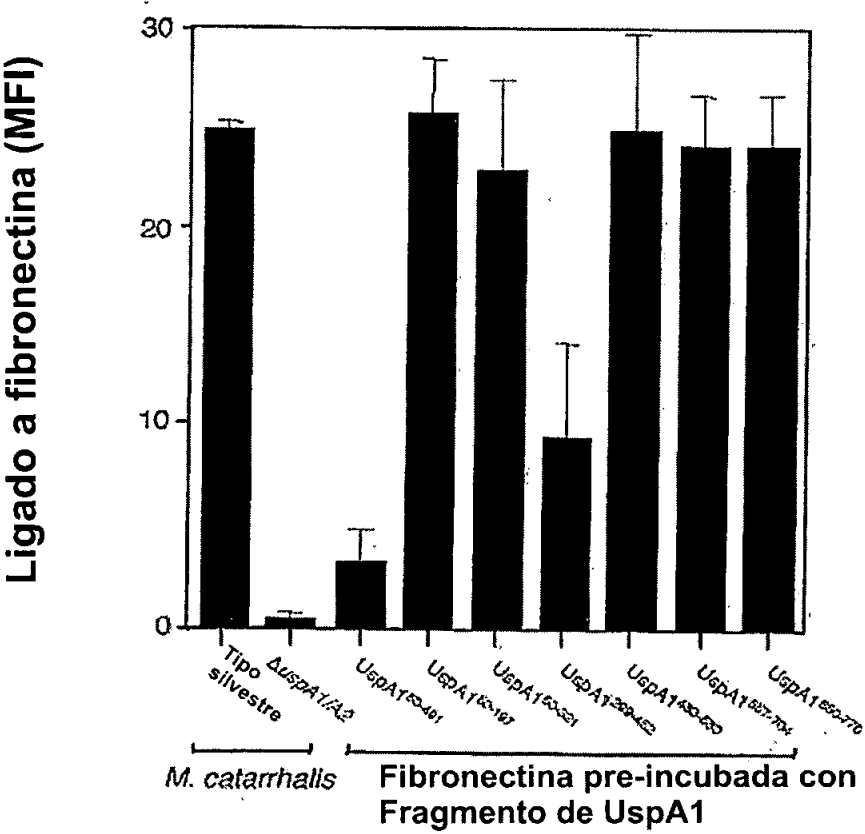
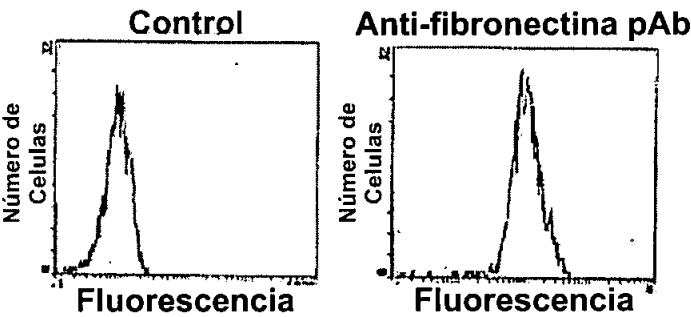
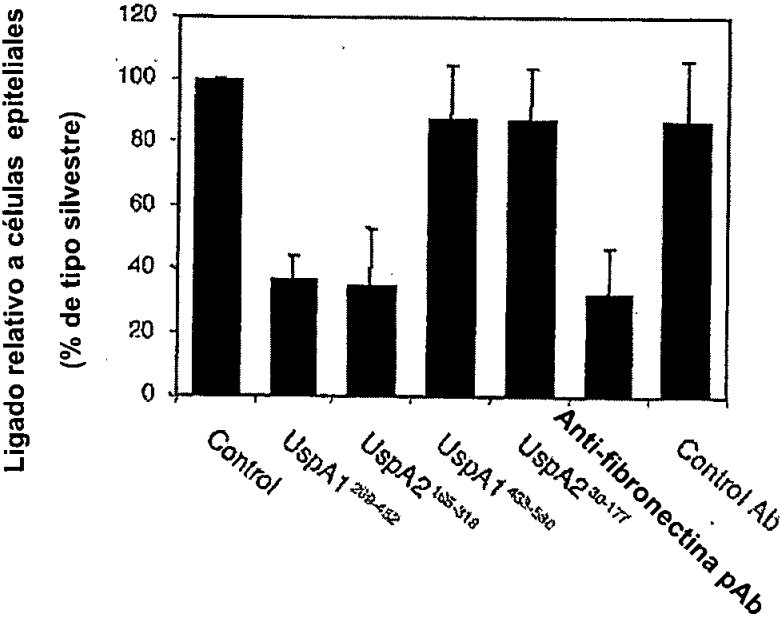


Figura 8

A



B



244

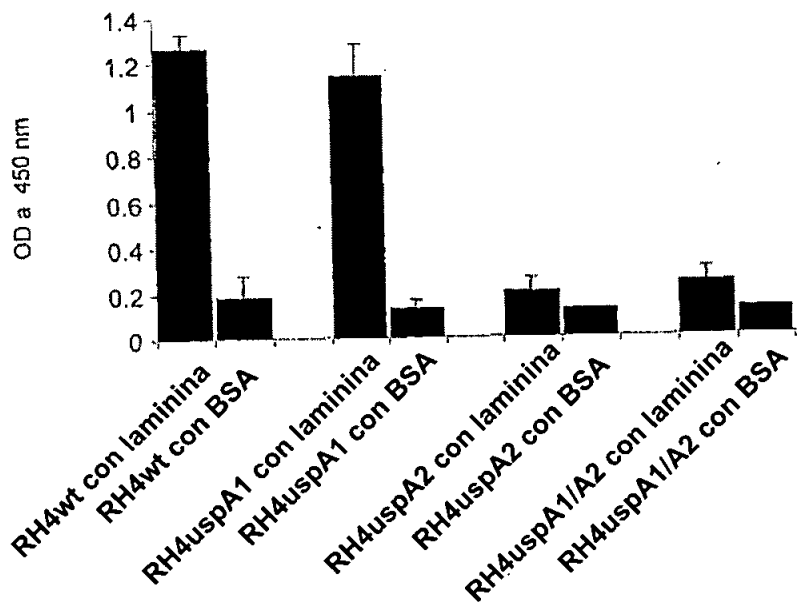


Figura 9A

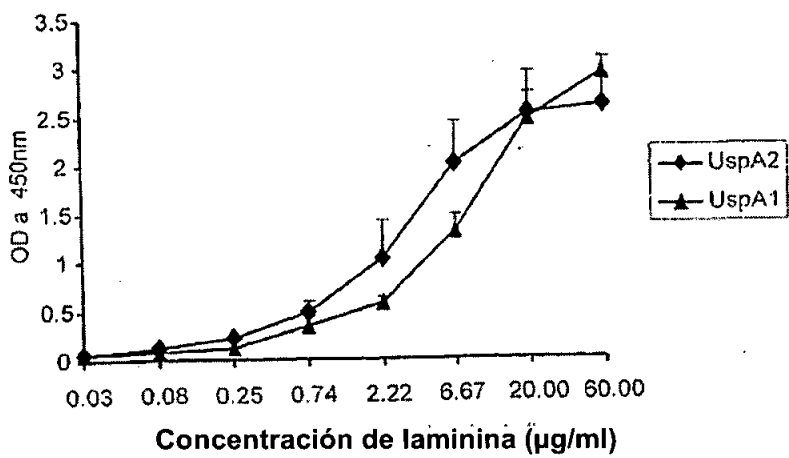


Figura 9B

245

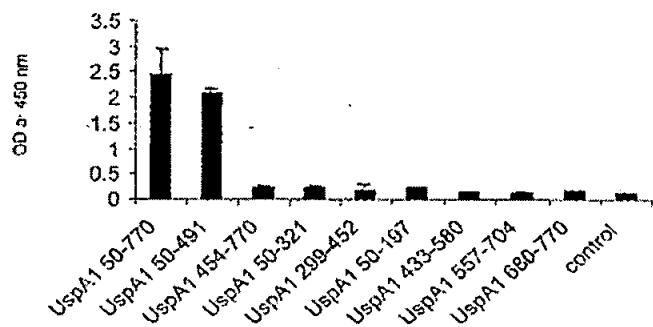


Figura 10A

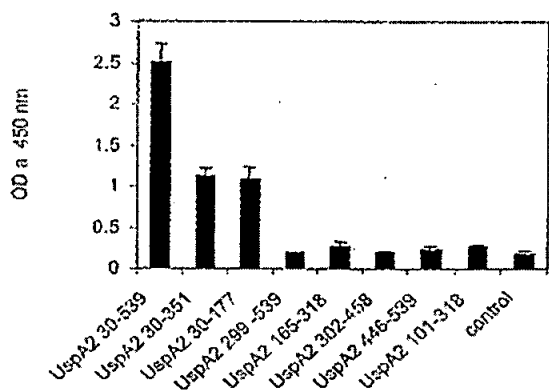
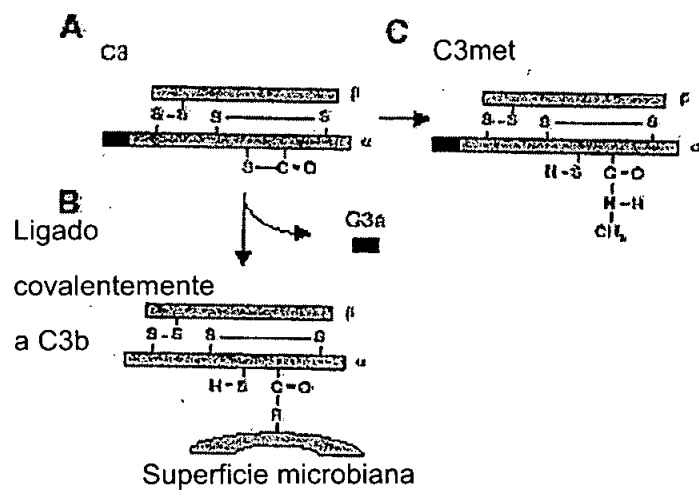


Figura 10

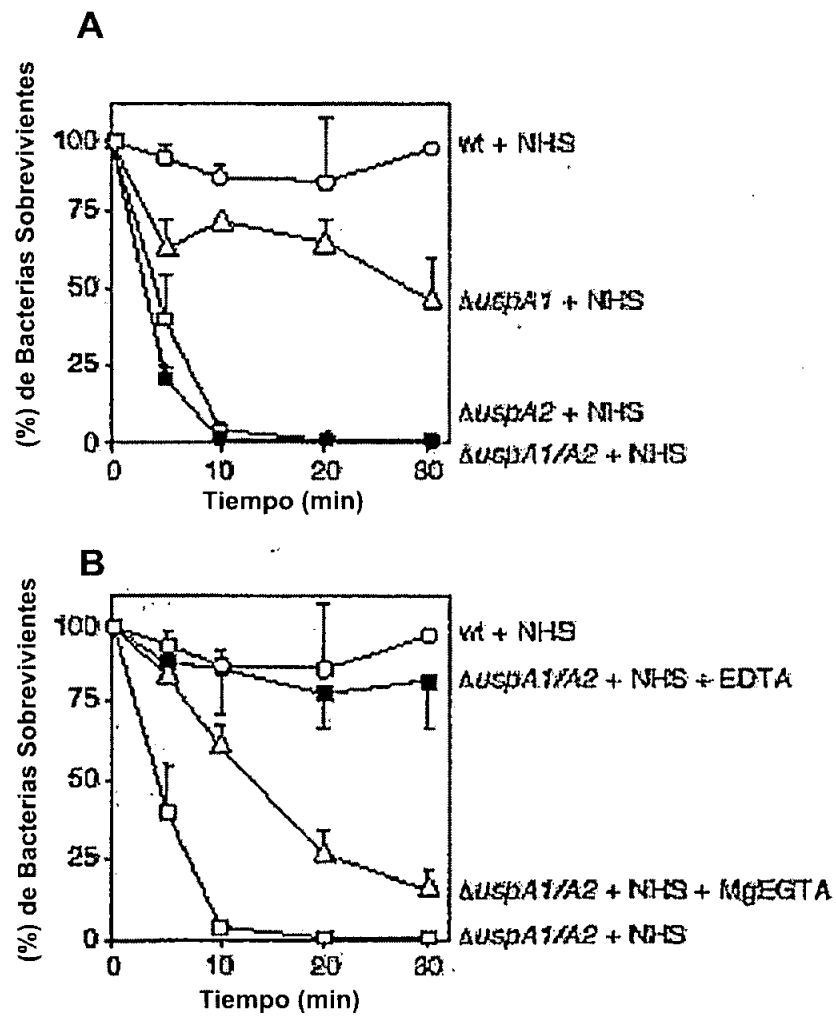
296

Figura 11



247

Figura 33



248

Figura 13

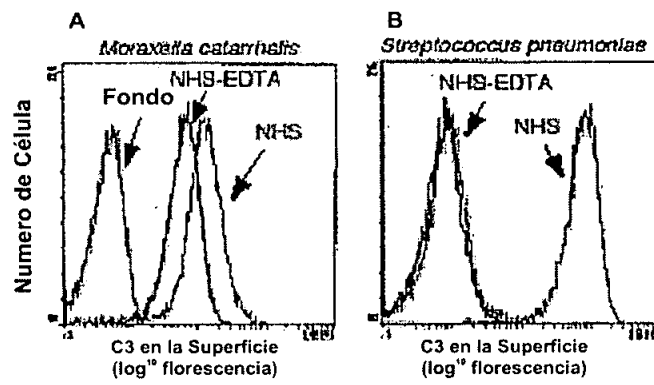


Figura 14

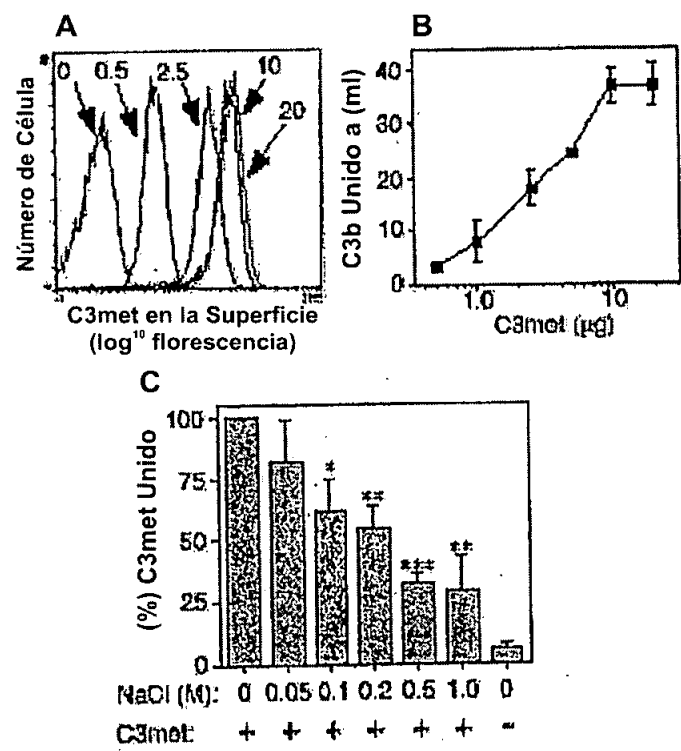


Figura 15

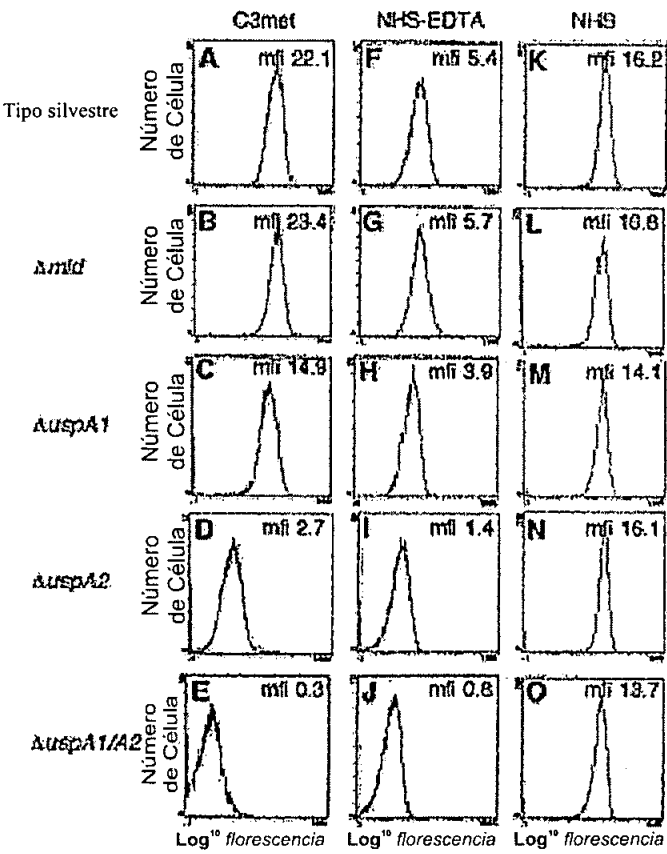
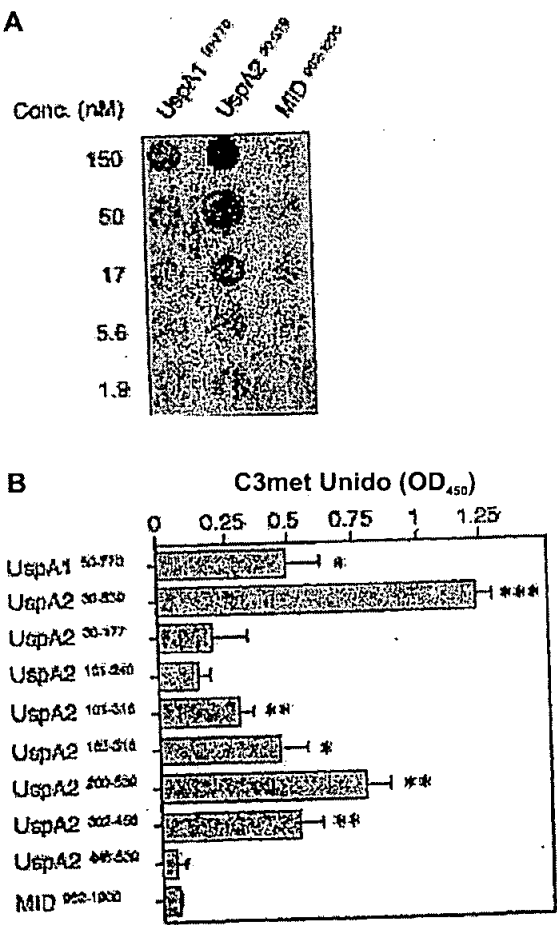
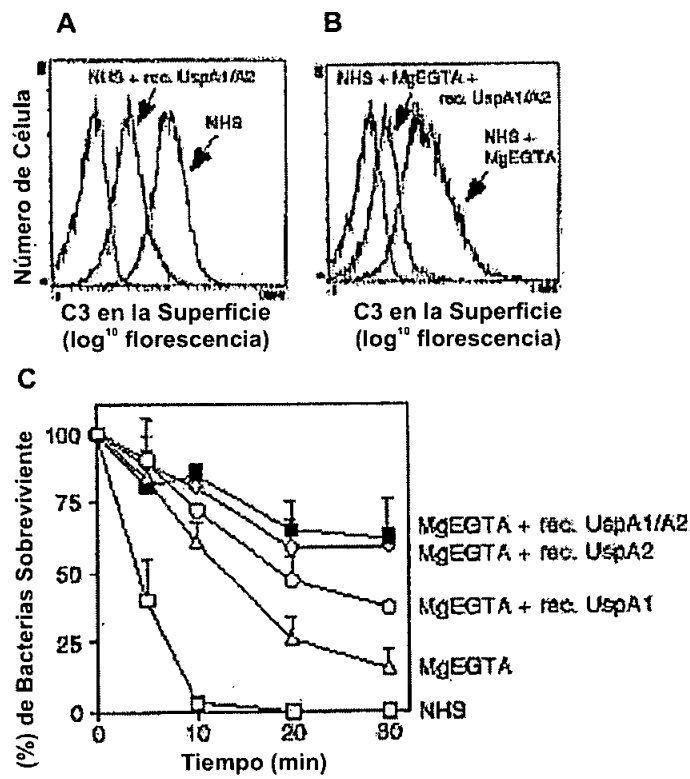


Figura 16



252

Figura 17



253

Figura 18

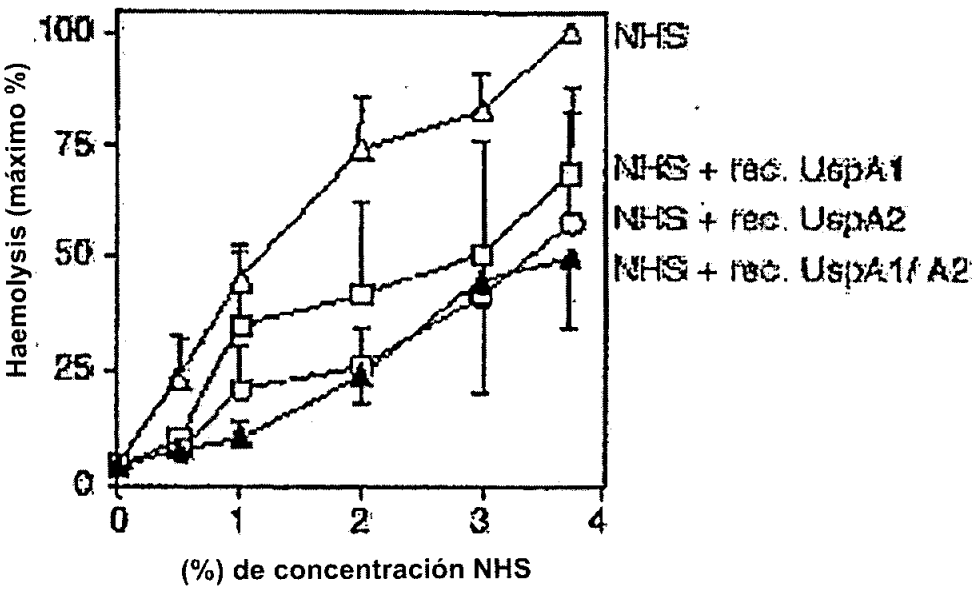


Fig. 19

Apilamiento- Comienzo y fin de dominio de unión de fibronectina marcado con {y}

* 20 40 60 80 100
 USPA1_012E : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTTKAVLGSLLIVGLGMATTASAC : 49
 USPA1_P44 : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTTKAVLGSLLIVGLGMATTASAC : 49
 USPA1_ATCC : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTTKAVLGSLLIVGLGMATTASAC : 49
 USPA1_046E : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTTKAVLGSLLIVGLGMATTASAC : 49
 USPA1_TTA3 : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTTKAVLGSLLIVGLGMATTASAC : 50
 USPA1_035E : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTTKAVLGSLLIVGLGMATTASAC : 49
 USPA1_TTA2 : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTTKAVLGSLLIVGLGMATTASAC : 49
 USPA1_V117 : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTTKAVLGSLLIVGLGMATTASAC : 49
 * 60 80 100
 USPA1_012E : ---KAANTTNQASGRIT---TVGGGDHQAATCMSEFGGGFFNQ : 57
 USPA1_P44 : ---AIN---TGQGT---VVUQ-NGVBAICNMTASGCGDNO : 60
 USPA1_ATCC : ---KVEKATNKISGCDNNTANCTYLTIGGGDYKTGKRAITIGGGANE : 55
 USPA1_046E : ---ATKGCTHIVVDN---KDKAKDSYTAGGCKDEAKGNATVGGGANE : 55
 USPA1_TTA3 : TTAHQGKGHISTIGGGDNDRKANGSYSTVSGGDYSEAKCDSITIGGGANE : 100
 USPA1_035E : ---ATNS---KGTGAHTEVNNHNE : 67
 USPA1_TTA2 : ---HATFDSAQVVKTN---KEGTHPTFSGHNT : 79
 USPA1_V117 : ---QNNQ---KSGKEFFHGGCGNN : 68
 * 120 140
 USPA1_012E : ATEHNLITGGGSGANCAKGNSTIGGGDNNTTCTHSTIEGGDS : 130
 USPA1_P44 : ATEHNLITGGGSGNTPAEGNYSIASGMENTIAENYSTASGGLG : 123
 USPA1_ATCC : ATEHNLITGGGSGYNNKAKNYSITGGGCGYNEATNQYSTIGGGDN : 138
 USPA1_046E : ATEHNLITGGGSGNTPAEGNYSITGGGDNNTTCTHSTIEGGDS : 135
 USPA1_TTA3 : ATEHNLITGGGSGNTPAEGNYSITGGGDNNTTCTHSTIEGGDS : 135
 USPA1_035E : ATEHNLITGGGSGNTPAEGNYSITGGGDNNTTCTHSTIEGGDS : 150
 USPA1_TTA2 : ATEHNLITGGGSGNTPAEGNYSITGGGDNNTTCTHSTIEGGDS : 119
 USPA1_V117 : ATEHNLITGGGSGNTPAEGNYSITGGGDNNTTCTHSTIEGGDS : 122
 * 160 180 200
 USPA1_012E : ---NKABEYHSTIGGGYDNTAKENYSTIVGGGRNNAEGNYSITIG : 172
 USPA1_P44 : ---DTAKCKYSTIVGGGNNAOAREDYSTASGGSSEACGNYSITIG : 165
 USPA1_ATCC : ---DTAKCKYSTIVGGGNNAOAREDYSTASGGSSEACGNYSITIG : 180
 USPA1_046E : ---YSPATIGDSSITIGGGYNNATIGKSTIAGGGRNNAOAGNYSITIG : 180
 USPA1_TTA3 : STIAGGHLITGGGHSSTVAGGHNATNENSTIGGGGRNNAOAGNYSITIG : 200
 USPA1_035E : ---NKABEYHSTIGGGYDNTAKENYSTIVGGGRNNAEGNYSITIG : 152
 USPA1_TTA2 : ---NKABEYHSTIGGGYDNTAKENYSTIVGGGRNNAEGNYSITIG : 164
 USPA1_V117 : ---NKABEYHSTIGGGYDNTAKENYSTIVGGGRNNAEGNYSITIG : 153
 * 220 240
 USPA1_012E : GDSNNAOARENNSTIVGGGSKNOALGSGSFAAGYNNNAOARENNSTIV : 222
 USPA1_P44 : GDSNNAOARENNSTIVGGGSKNOALGSGSFAAGYNNNAOARENNSTIV : 215
 USPA1_ATCC : GDSNNAOARENNSTIVGGGSKNOALGSGSFAAGYNNNAOARENNSTIV : 230
 USPA1_046E : GDSNNAOARENNSTIVGGGSKNOALGSGSFAAGYNNNAOARENNSTIV : 230
 USPA1_TTA3 : GDSNNAOARENNSTIVGGGSKNOALGSGSFAAGYNNNAOARENNSTIV : 250
 USPA1_035E : GDSNNAOARENNSTIVGGGSKNOALGSGSFAAGYNNNAOARENNSTIV : 202
 USPA1_TTA2 : GDSNNAOARENNSTIVGGGSKNOALGSGSFAAGYNNNAOARENNSTIV : 214
 USPA1_V117 : GDSNNAOARENNSTIVGGGSKNOALGSGSFAAGYNNNAOARENNSTIV : 202

	260	280	300	
USPA1_O12E :	GTNSVAIGSNNTVETGKQNVFILGSN--TTHAAGCSVLLGNNTSGKATA :	270		
USPA1_P44 :	GENSVAIGSNNTVETGKQNVFILGSG--TTCVTSNSVLLGNNTSGKATA :	263		
USPA1_ATCC :	GENSVAIGSNNTVKKCQQNVFILGSNTTTHAAGCSVLLGNNTSGKATA :	260		
USPA1_O46E :	GENSVAIGSNNTIDSCKQNVFILGSSTTTHAAGCSVLLGNNTSGKATA :	260		
USPA1_TTA3 :	CKDSVAIGSNNTVETGKQNVFILGS--NKKDAHNSVLLGNNTSGKATA :	298		
USPA1_O35E :	GENSVAIGSNNTVETGKQNVFILGS--GTCVTSNSVLLGNNTSGKATA :	250		
USPA1_TTA2 :	GTNSVAIGSNNTVKKCQQNVFILGSNTTTHAAGCSVLLGNNTSGKATA :	264		
USPA1_V117 :	CKDSVAIGSNNTVETGKQNVFILGS--KTSKASNSVLLGNNTSGKATA :	251		
	320	340		
USPA1_O12E :	VSSAEVVEGLSLRFFACSSQENQA--NSGTVSVGSENNERQIVNVGAGNISA :	319		
USPA1_P44 :	VNDATVNGLEGLKRFACVSGT---GNGTVSVGSENNERQIVNVGAGNISA :	309		
USPA1_ATCC :	VNSAEVVEGLSLRFFACSSQENQA--GNGTVSVGSENNERQIVNVGAGNISA :	326		
USPA1_O46E :	VSSAEVVEGLSLRFFACSSQENQA--GNGTVSVGSENNERQIVNVGAGNISA :	326		
USPA1_TTA3 :	VENAEVVEGLSLRFFACSSQENQA--GNGTVSVGSENNERQIVNVGAGNISA :	346		
USPA1_O35E :	VKNAEVVEGLSLRFFACSSQENQA--GNGTVSVGSENNERQIVNVGAGNISA :	296		
USPA1_TTA2 :	VNNAEVVEGLSLRFFACSSQENQA--GNGTVSVGSENNERQIVNVGAGNISA :	313		
USPA1_V117 :	VENAEVVEGLSLRFFACSSQENQA--GNGTVSVGSENNERQIVNVGAGNISA :	301		
	360	380	400	
USPA1_O12E :	ESTDAVNGSQLHALAPVAKS---QUNILTNRVDIQETK :	355		
USPA1_P44 :	ESTDAVNGSQLHALAPVAKS---SDITKNQAEITLVNEVNIKEDE :	352		
USPA1_ATCC :	ESTDAVNGSQLHALAPVAKS---KADIEDD :	355		
USPA1_O46E :	ESTDAVNGSQLHALAPVAKS---ADENHNALE :	355		
USPA1_TTA3 :	ESTDAVNGSQLHALAPVAKS---DAEFRTIT :	372		
USPA1_O35E :	ESTDAVNGSQLHALAPVAKS---CYDIVNKRADILNQQDDIKDLQNEVVEGD :	346		
USPA1_TTA2 :	ESTDAVNGSQLHALAPVAKS---KSDIKGLNKGVVEED :	349		
USPA1_V117 :	ESTDAVNGSQLHALAPVAKS---VDLUG :	327		
	420	440		
USPA1_O12E :	RKQENDIKEVVENQNAIAEADI---NKNHODDAKAQLAGVAVNEEEDK :	402		
USPA1_P44 :	RKQENDIKEVVENQNAIAEADI---NKNHODDAKAQLAGVAVNEEEDK :	399		
USPA1_ATCC :	DEVG-----ILG :	362		
USPA1_O46E :	KTQN-----TLIEAGE-----AQDAITJAQKQT :	378		
USPA1_TTA3 :	QTQN-----ALIEAGE-----INQELLEGADYTNAQDEKILKNQT :	408		
USPA1_O35E :	NEVGELSRDINSLHDVTDNQD---DKEIKRGVKELDNEVGVEGR :	389		
USPA1_TTA2 :	KEVGYLERDINSLHDVTDNQD---DKEIKRGVKELDNEVGVEGR :	399		
USPA1_V117 :	EEINSLGEIEFNQDATAKNQA---DQATNKTNIETNGSKITNQT :	370		
	460	480	500	
USPA1_O12E :	HVEDLYERTNEQLDKESQLDGAVFNNTQNIEDLAAYNELQDAYAKQTEA :	452		
USPA1_P44 :	HVEDLYERTNEQLDKESQLDGAVFN----- :	424		
USPA1_ATCC :	EEINSLGEIEFN----- :	374		
USPA1_O46E :	DITANKTIEQENFRVTVGFEIEK----- :	403		
USPA1_TTA3 :	DITANKTIEQENFRVTVGFEIEK----- :	433		
USPA1_O35E :	DINSLHEDVADNQDQAKKADIKGLNKEVKELDKVEVG-----VLSRD :	432		
USPA1_TTA2 :	DIGSLHEDVADNQDQAKKADIKGLNKEVKELDKVEVG-----VLSRD :	442		
USPA1_V117 :	LYATVTRVGNNTQGVAPKACIKKNKADIQDLDEVG-----VLSQD :	413		
	520	540		
USPA1_O12E :	ICALNKASSENTQNIAKNSNHTLESNVEBELNLSGRLDQKADIDNN :	502		
USPA1_P44 :	NTQNIAKNSNHTLESNVEBELNLSGRLDQKADIDNN :	464		
USPA1_ATCC :	NQDNIAKNQADITLESNVEBELNLSGRLDQKADIDNN :	414		
USPA1_O46E :	NKKEIAKNQADITLESNVEBELNLSGRLDQKADIDNN :	443		
USPA1_TTA3 :	NKKEIAKNQADITLESNVEBELNLSGRLDQKADIDNN :	473		

USPA1_035E : IGSLEDDVATNQADIAKNTLEINVEELLLSGRLDQKADIDNN : 432
USPA1_TTA2 : IGSLEDDVATNQADIAKNTLEINVEELLLSGRLDQKADIDNN : 432
USPA1_V117 : IGSLEDDVATNQADIAKNTLEINVEELLLSGRLDQKADIDNN : 463

560 580 600
USPA1_012E : INNIYELAQOQDOHSSDIKTLK : 525
USPA1_P44 : INNIYELAQOQDOHSSDIKTLK : 514
USPA1_ATCC : INNIYELAQOQDOHSSDIKTLK : 464
USPA1_046E : INNIYELAQOQDOHSSDIKTLK : 493
USPA1_TTA3 : INNIYELAQOQDOHSSDIKTLK : 523
USPA1_035E : INNIYELAQOQDOHSSDIKTLK : 503
USPA1_TTA2 : INNIYELAQOQDOHSSDIKTLK : 542
USPA1_V117 : INNIYELAQOQDOHSSDIKTLK : 513

620 640
USPA1_012E : NNVEEGLDLSGRLIDQKADIAK : 573
USPA1_P44 : NNVEEGLDLSGRLIDQKADIAK : 564
USPA1_ATCC : NNVEEGLDLSGRLIDQKADIAK : 514
USPA1_046E : NNVEEGLDLSGRLIDQKADIAK : 543
USPA1_TTA3 : NNVEEGLDLSGRLIDQKADIAK : 566
USPA1_035E : NNVEEGLDLSGRLIDQKADIAK : 583
USPA1_TTA2 : NNVEEGLDLSGRLIDQKADIAK : 582
USPA1_V117 : NNVEEGLDLSGRLIDQKADIAK : 563

660 680 700
USPA1_012E : KQTEAIDALNKASSNT : 623
USPA1_P44 : KQTEAIDALNKASSNT : 614
USPA1_ATCC : KQTEAIDALNKASSNT : 564
USPA1_046E : KQTEAIDALNKASSNT : 593
USPA1_TTA3 : KQTEAIDALNKASSNT : 616
USPA1_035E : KQTEAIDALNKASSNT : 572
USPA1_TTA2 : KQTEAIDALNKASSNT : 612
USPA1_V117 : KQTEAIDALNKASSNT : 613

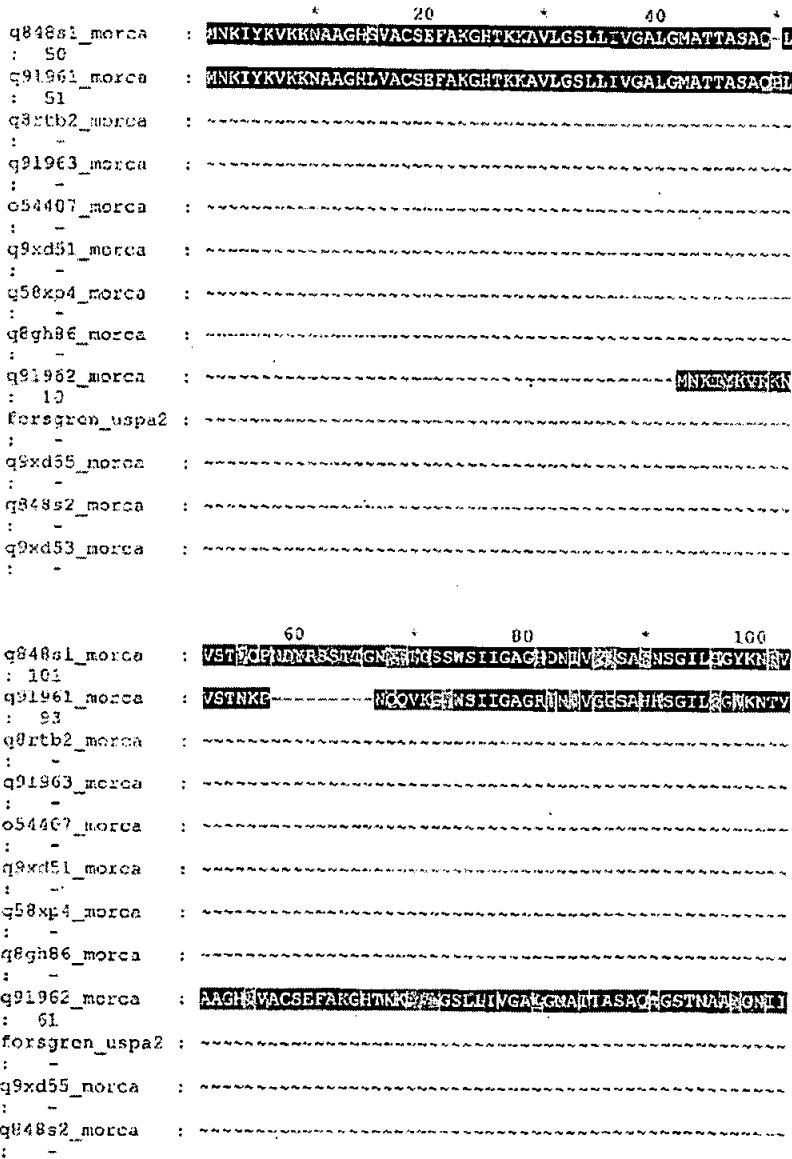
720 740
USPA1_012E : KNOADIAK : 673
USPA1_P44 : KNOADIAK : 664
USPA1_ATCC : KNOADIAK : 614
USPA1_046E : KNOADIAK : 643
USPA1_TTA3 : KNOADIAK : 624
USPA1_035E : KNOADIAK : 583
USPA1_TTA2 : KNOADIAK : 692
USPA1_V117 : KNOADIAK : 663

760 780 800
USPA1_012E : NIKNIYELAQOQDOHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 723
USPA1_P44 : NIKNIYELAQOQDOHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 714
USPA1_ATCC : NIKNIYELAQOQDOHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 664
USPA1_046E : NIKNIYELAQOQDOHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 693
USPA1_TTA3 : NIKNIYELAQOQDOHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 674
USPA1_035E : NIKNIYELAQOQDOHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 633
USPA1_TTA2 : NIKNIYELAQOQDOHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 742
USPA1_V117 : NIKNIYELAQOQDOHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN : 713

820 840

USPA1_012E	:	QNTLIEQGEALVEQNKA	INQ	LEGFAAHAD	ODKQILQ	QADIT	TNKTAI	:	773
USPA1_P44	:	QNTLIEQGEALVEQNKA	INQ	LEGFAAHAD	ODKQILQ	QADIT	TNKTAI	:	764
USPA1_ATCC	:	QNTLIEQGEALVEQNKA	INQ	LEGFAAHAD	ODKQILQ	QADIT	TNKTAI	:	714
USPA1_046E	:	QNTLIEQGEALVEQNKA	INQ	LEGFAAHAD	ODKQILQ	QADIT	TNKTAI	:	743
USPA1_TTA3	:	QNTLIEQGEALVEQNKA	INQ	LEGFAAHAD	ODKQILQ	QADIT	TNKTAI	:	724
USPA1_035E	:	QNTLIEQGEALVEQNKA	INQ	LEGFAAHAD	ODKQILQ	QADIT	TNKTAI	:	683
USPA1_TTA2	:	QNTLIEQGEALVEQNKA	INQ	LEGFAAHAD	ODKQILQ	QADIT	TNKTAI	:	792
USPA1_V117	:	QNTLIEQGEALVEQNKA	INQ	LEGFAAHAD	ODKQILQ	QADIT	TNKTAI	:	763
		860	*	880	*	900			
USPA1_012E	:	EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILO	DRLN	RINETNNH	QDQKID	:	823		
USPA1_P44	:	EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILO	DRLN	RINETNNH	QDQKID	:	814		
USPA1_ATCC	:	EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILO	DRLN	RINETNNH	QDQKID	:	764		
USPA1_046E	:	EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILO	DRLN	RINETNNH	QDQKID	:	793		
USPA1_TTA3	:	EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILO	DRLN	RINETNNH	QDQKID	:	774		
USPA1_035E	:	EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILO	DRLN	RINETNNH	QDQKID	:	733		
USPA1_TTA2	:	EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILO	DRLN	RINETNNH	QDQKID	:	842		
USPA1_V117	:	EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILO	DRLN	RINETNNH	QDQKID	:	813		
		920	*	940	*				
USPA1_012E	:	QLGYALKEQGOHFNRRISAVERTAGGIANAI	AIATLPSPSRAGEHHVLE	:	873				
USPA1_P44	:	QLGYALKEQGOHFNRRISAVERTAGGIANAI	AIATLPSPSRAGEHHVLE	:	864				
USPA1_ATCC	:	QLGYALKEQGOHFNRRISAVERTAGGIANAI	AIATLPSPSRAGEHHVLE	:	814				
USPA1_046E	:	QLGYALKEQGOHFNRRISAVERTAGGIANAI	AIATLPSPSRAGEHHVLE	:	843				
USPA1_TTA3	:	QLGYALKEQGOHFNRRISAVERTAGGIANAI	AIATLPSPSRAGEHHVLE	:	824				
USPA1_035E	:	QLGYALKEQGOHFNRRISAVERTAGGIANAI	AIATLPSPSRAGEHHVLE	:	783				
USPA1_TTA2	:	QLGYALKEQGOHFNRRISAVERTAGGIANAI	AIATLPSPSRAGEHHVLE	:	892				
USPA1_V117	:	QLGYALKEQGOHFNRRISAVERTAGGIANAI	AIATLPSPSRAGEHHVLE	:	863				
		960	*	980	*				
USPA1_012E	:	GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLS	WSDAGGLSGGVGGSYRWW	:	922				
USPA1_P44	:	GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLS	WSDAGGLSGGVGGSYRWW	:	913				
USPA1_ATCC	:	GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLS	WSDAGGLSGGVGGSYRWW	:	863				
USPA1_046E	:	GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLS	WSDAGGLSGGVGGSYRWW	:	892				
USPA1_TTA3	:	GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLS	WSDAGGLSGGVGGSYRWW	:	873				
USPA1_035E	:	GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLS	WSDAGGLSGGVGGSYRWW	:	832				
USPA1_TTA2	:	GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLS	WSDAGGLSGGVGGSYRWW	:	941				
USPA1_V117	:	GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLS	WSDAGGLSGGVGGSYRWW	:	912				

Fig. 20
Alineación múltiple de apilamiento de secuencias de proteína UspA2



259

```
q9xd53_morca : .....
: -

                                *      120      *      140      *
q848s1_morca : NCSTSAIVGGYDNETEGSYTFVGGGYKNLAECHQSPNIGGGYTNNAEGDNAT
: 152
q91961_morca : NCSTSAIVGGYDNETEGSYTFVGGGYKNLAKGNYNIMGGYKNLAEGDNAT
: 144
q8rtb2_morca : .....
: -
q91963_morca : .....
: -
o54407_morca : .....
: -
q9xd51_morca : .....
: -
q58xp4_morca : .....
: -
q8gh86_morca : .....
: -
q91962_morca : SEVGRVQAGGVINIRKGNYSIVGGGYENRAICNYSVITGGGYNNAEGDNAT
: 112
forsgren_uspa2 : .....
: -
q9xd55_morca : .....
: -
q848s2_morca : .....
: -
q9xd53_morca : .....
: -

                                160      *      180      *      200
q848s1_morca : TAGGSFNPAAAGNLSNIEGGYNNNAEGDATTIAGGCHENNAEGNSATGGGYA
: 203
q91961_morca : TAGGSFNLATGNNETIAGGCHENNAEGCHDSIVGGGYNNNAEGSSIVAGGSN
: 195
q8rtb2_morca : .....
: -
q91963_morca : .....
: -
o54407_morca : .....
: -
q9xd51_morca : .....
: -
q58xp4_morca : .....
: -
q8gh86_morca : .....
: -
q91962_morca : TAGGSFNPAAAGNLSNIEGGYNNNAEGDATTIAGGCHENNAEGNSATGGGYA
: 163
forsgren_uspa2 : .....
: -
q9xd55_morca : .....
: -
q848s2_morca : .....
: -
q9xd53_morca : .....
: -
```

```

      220      *      240      *
q848s1_morca : MFAAGDNTFVGGGYENRIRNGNQSAIGGGYANLAECDNATIRGGCEENRACG
: 254
q91961_morca : NLATKSSAIGGCRNEASIEDRSTVSGGYENLALGKSSNIGGGCEENRACG
: 246
q8rtb2_morca :
:
q91963_morca :
:
o54407_morca :
:
q9xd51_morca :
:
q53xp4_morca :
:
q8gh86_morca :
:
q91962_morca : QNTDNAVAILSKNTINGNNSAASSENATVENGKQASMLGRIITNADSGS
: 214
forqgren_uspa2 :
:
q9xd55_morca :
:
q848s2_morca :
:
q9xd53_morca :
:

      260      *      280      *      300
q848s1_morca : NSHVSQGYANDRTEGGSTIAGG-----EENRRCGIDSVVSGGIANRHHAS
: 300
q91961_morca : NATISGGGRNEASERASTVVGIG-----EONVAIGKYSTKSGRIETASRDR
: 292
q8rtb2_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAG-----ARETFLPNLFEDNDY
: 44
q91962_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAGDQKSPKHSIFLPNLFEDNDN
: 43
o54407_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAG-----VVEREFPNLFEDNEN
: 41
q9xd51_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAG-----VVEREFPNLFEDNEN
: 44
q53xp4_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAQDQDQKHSIFLPNLFEDNDY
: 49
q8gh86_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAGVSSPANQRI-----DQK
: 42
q91962_morca : VSLGYSISGSEATAVSRARINGLITLNTFEGVSRQKPGCTIVSV-----SSD
: 258
forqgren_uspa2 : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAQAKN-----DI-----T
: 36
q9xd55_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAQAKN-----DI-----T
: 36
q848s2_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAQAKRSRSDOI-----CTK
: 42
q9xd53_morca : ~MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAQKPRSRSDOI-----QDS
: 42

      *      320      *      340      *
q848s1_morca : SRIAGHYNNHATCESSSTIEGGANNORNGRSTAGGVENARAGQNAHLLH

```

```

: 350
q91961_morca : -SPTAGPQKMTAECKYSNYSCEYPNDAETKQVGPDAETGKAKGDNVAVLAN
: 342
q8rtb2_morca : EETIDDELHYHMLIGDTAII--EDD-T--SNKPYAENSSEVPDSLEFNKMLH
: 89
q91963_morca : EELIDDELHYHNMILGDTAII--EDD-N--SNKPYADDERGVPDSLEFNKMLH
: 95
o51407_morca : HDELDDPYHNMILGDTAII--SNKQD--NSTQLKIFYENDEDEVPDSLEFNKMLH
: 94
q9xd51_morca : HDELDDPYHNMILGDTAII--SNKQD--NSTQLKIFYENDEDEVPDSLEFNKMLH
: 94
q58xp4_morca : EETIDDELHYHNMILGDTAII--EDD-N--SNKPYAENSSEVPDSLEFNKMLH
: 100
q8gh06_morca : IXX-----EKKELRQETKSLPNDLE-----EETIDDELHYHNMILGDTAII
: 73
q91962_morca : GKE-----EETVHVAGAGDTSI--D-----ETDHYNGSEIYALITTA
: 291
forsgren_uspaz2 : LEDLHYLYLTKKIDONEEADIDEDFAIRKYLALSOYGNMLAEGELN
: 81
q9xd55_morca : LEDLHYLYLTKKIDONEEADIDEDFAIRKYLALSOYGNMLAEGELN
: 81
q840s2_morca : LAGLAGKIAAGKSGGGGNNOINONBINKLFESEANHLTMSRLNINAVVW
: 53
q9xd53_morca : LSRIV-----EEDIDILKODQGMHISYLLNGLANTLITDELNINAVVW
: 86

360 * 380 * 400
q848s1_morca : NNTING--ENNEAIGSN--NTYKKNOKNDFTIDDA--DGGGHNENALLSEED
: 396
q91961_morca : NNTING--ENNEAIGSN--NTYKKNOKNVFILTASTDTKQSSSSNIAIET
: 390
q8rtb2_morca : EQOLNGFKEGDTHIELDENGKPVYKLESTENGVKRSVYSVTIKKATADDV
: 140
q91963_morca : EQOLNGFKEGDTHIELDENGKPVYKLESTENGVKRSVYSVTIKKATADDV
: 146
o51407_morca : EQOLNGFKAGDTHIELDENGKPVYKLESTENGVKRSVYSVTIKKATADDV
: 145
q9xd51_morca : EQOLNGFKAGDTHIELDENGKPVYKLESTENGVKRSVYSVTIKKATADDV
: 145
q58xp4_morca : EQOLNGFKAGDTHIELDENGKPVYKLESTENGVKRSVYSVTIKKATADDV
: 151
q8gh06_morca : QDDI---EENCAIDIAKQD-----DIEKNCAIDIAKREVEVLESE---
: 116
q91962_morca : VD-----EACVDIETNOB-----RIKRIKRPVKSLIKREVEVLESD---
: 326
forsgren_uspaz2 : EEL--EETEDDYKKNQV-----DIANLEDEIVETLTKNONRIFASQSEA
: 121
q9xd55_morca : EEL--EETEDDYKKNQV-----DIANLEDEIVETLTKNONRIFASQSEA
: 121
q840s2_morca : SSE--E-EETEDDYKKNQV-----DIANLEDEIVETLTKNONRIFASQSEA
: 134
q9xd53_morca : TNSI---EALGDEIGAGSN-----DIANLEDEIVETLTKNONRIFASQSEA
: 127

* 420 440 * 46
q848s1_morca : TCKRGLSSSESTVVGDI-----SLTGFAGVSKANSEIVAVVSSQERK
: 433
q91961_morca : SKRGLSSSESTVVGDI-----SLTGFAGVSKANSEIVAVVSSQERK
: 432

```



```

                    520          *           540          .           560
q848sl_morca : -----KELDKKKGVLSRDLGALNTDV-----AQNG--SD-
      515
q91961_morca : KNOADIOTILENIVSKELLNLGGRLIQOKAIDNNINHIYELAQQDDQHSDD
      534
q8rtb2_morca : QNQMDIOGLATYNEL-----QDQVAKOKREIADLNTPSSSENTONIAKNSNH
      282
q91963_morca : QNQMDIOGLATYNEL-----QDQVAKOKREIADLNTPSSSENTONIAKNSNH

```

: 207	
o54407_morca	: KD -----
: 242	
q9xd51_morca	: KD -----
: 242	
q58xp4_morca	: QVTEPSQEVADSLGE ----- HTLNKAQNEIACQHTINSVETNNITMKRSD
: 243	
q8gh36_morca	: KNOADIOTLENNVEEGLLELSGHLIDOKADIDNNINHIYELAQQDQHSSE
: 239	
q91962_morca	: KNOADIKTLENNVEEGLLELSGRLIDOKADIDNNINHIYELAQQDQHSSE
: 429	
foragren_uspa2	: KNKADIQALENNVVEELNLSGRLIDOKADIDNNINHIYELAQQDQHSSE
: 269	
q9xd55_morca	: KNKADIQALENNVVEELNLSGRLIDOKADIDNNINHIYELAQQDQHSSE
: 269	
q848s2_morca	: KN ----- KADIDNNINHIYELAQQDQHSSE
: 254	
q9xd53_morca	: KN ----- KADIDNNINHIYELAQQDQHSSE
: 240	
* 580 * 600 *	
q848s1_morca	: IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDOKADLTOKIKALESNVEEGLLD -----
: 558	
q91961_morca	: IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDOKADLTOKIKALESNVEEGLLD -----
: 577	
q8rtb2_morca	: IKTLENNVEEGLLELSGHLIDOKADLTOKIKALESNVEEGLLD -----
: 325	
q91963_morca	: IKTLENNVEEGLLELSGHLIDOKADLTOKIKALESNVEEGLLD -----
: 330	
o54407_morca	: IKTLESNVEEGLLELSGHLIDOKADLTOKIKALESNVEEGLLD -----
: 285	
q9xd51_morca	: IKTLESNVEEGLLELSGHLIDOKADLTOKIKALESNVEEGLLD -----
: 285	
q58xp4_morca	: IQALENNVVEELNLSGRLIDOKADLTOKIKTLESNVEEGLLE -----
: 331	
q8gh36_morca	: IKTLKKNVEEGLLELSGHLIDOKADIAQNAQNIQDLATYNELQDOYAOEQT
: 290	
q91962_morca	: IKTLKKNVEEGLLELSGHLIDOKADIAQNAQNIQDLATYNELQDOYAOEQT
: 479	
foragren_uspa2	: IKTLKKNVEEGLLELSHMLDQKIDITAGN ----- 3
: 299	
q9xd55_morca	: IKTLKKNVEEGLLELSGHLIDOKIDITAGN ----- 3
: 299	
q848s2_morca	: IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDOKADLTOKIKRLE -----
: 238	
q9xd53_morca	: IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDOKADLTOKIKALE -----
: 274	
520 * 540 * 660	
q848s1_morca	: ----- LSGRLIDOKKADIKNQAL
: 576	
q91961_morca	: ----- LSGRLIDOK ----- AD
: 588	
q8rtb2_morca	: ----- LSGRLIDOKKADIKNQAL
: 343	
q91963_morca	: ----- LSGRLIDOK ----- AD
: 341	
o54407_morca	: ----- LSGRLIDOKKADIKNQAL
: 303	

q9xd51_morca	:	-----LSGRLIDQKADIARNOAR
: 303		
q58xp4_morca	:	-----LSGHLIDQKADIARNOAR
: 349		
q8gh86_morca	:	EAIDALNKASSENTONI-----AK-----SN
: 320		
q91962_morca	:	EAIDALNKASSENTONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDAIDALNKASSEN
: 530		
foragzer_uspa2	:	-----AN
: 301		
q9xd55_morca	:	-----AN
: 301		
q848s2_morca	:	-----NN
: 290		
q9xd53_morca	:	-----SN
: 276		
		680 700
q848s1_morca	:	I-----
: 577		
q91961_morca	:	E-----
: 589		
q8rtb2_morca	:	I-----ASNDTEIDDLAAYNELODAYAK
: 366		
q91963_morca	:	I-----DENQANTIEDLAAYNELODAYAK
: 364		
o54407_morca	:	I-----
: 304		
q9xd51_morca	:	IIDLAAAYNELODAYAKQOTEIDAIDALNKASSENENIEDLAAYNELODAYAK
: 354		
q58xp4_morca	:	I-----
: 350		
q8gh86_morca	:	VEE-----GILELSGHLIDQKAD-----LTKDKANESNVEE-----GILBLSCNNEE
: 363		
q91962_morca	:	IIDLAAAYNELODAYAKQOTEIDAIDALNKASSENENIEDLAAYNELODAYAK
: 581		
foragzer_uspa2	:	IID-----LITENELDQKAD-----KOTFAIPAE-----
: 326		
q9xd55_morca	:	IID-----LITENELDQKAD-----KOTFAIPAE-----
: 326		
q848s2_morca	:	VEE-----GILBLSGHLIDQKAD-----LTKDN-----
: 312		
q9xd53_morca	:	VEE-----GILBLSGHLIDQKAD-----LTKDKANESNVEE-----GILBLSCNNEE
: 319		
		720 740 760
q848s1_morca	:	-----ADNOCNIIQDLAAYNELODAYAKQOTEIDAIDALNKASSEN
: 615		
q91961_morca	:	-----ADNOCNIIODLAAYNELODAYAKQOTEIDAIDALNKASSEN
: 627		
q8rtb2_morca	:	EQDEAIDALNKASSENTONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDAIDALNKASSEN
: 417		
q91963_morca	:	QQDEAIDALNKASSENENIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDAIDALNKASSEN
: 415		
o54407_morca	:	-----ADKQTD-----
: 310		
q9xd51_morca	:	QQDEAIDALNKASSENENIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDAIDALNKASSEN
: 405		
q58xp4_morca	:	-----ADNOCNIIQDLAAYNELODAYAKQOTEIDAIDALNKASSEN

: 288
q8gh86_morca : OKADI-----ACNOKNIQDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSEN
: 406
q91962_morca : QOTEIDALNKASSENTQNIQDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSEN
: 632
forsgren_uspa2 : NKAS-----SENQNIQDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSEN
: 368
q9xd55_morca : NKAS-----SENQNIQDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSEN
: 368
q548s2_morca : QADI-----ACNOKNIQDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSEN
: 354
q9xd53_morca : OKADI-----ACNOKNIQDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSEN
: 362

780 500
q848s1_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 666
q91961_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 878
q8rtb2_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 468
q91963_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 466
q54407_morca : ---TDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 358
q9xd51_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 456
q58xp4_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 439
q8gh86_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 457
q91962_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 683
forsgren_uspa2 : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 419
q9xd55_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 419
q848s2_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 405
q9xd53_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSENTQNIKNQADIANNIN
: 413

820 840 860
q848s1_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 717
q91961_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 729
q8rtb2_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 519
q91963_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 517
q54407_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 409
q9xd51_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 507
q58xp4_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 498
q8gh86_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 508

q91952_morca : NIYELAQOQDOHSSDIKTLAKASAANTORIAKNKADADASFETILTKNQNTL
: 734
forsgren_uspa2 : NIYELAQOQDKHRSDIKTLAKESAANTORIAKNKADADASFETILTKNQNTL
: 470
q9xd55_morca : NIYELAQOQDOHSSDIKTLAKASAANTORIAKNKADADASFETILTKNQNTL
: 470
q848s2_morca : NIYELAQOQDOHSSDIKTLAKASAANTORIAKNKADADASFETILTKNQNTL
: 456
q9xd53_morca : NIYELAQOQDOHSSDIKTLAKASAANTNRI-----AJAPEGTAENKRDAC
: 459

q848s1_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 768
q91961_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 780
q8rtb2_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 570
q91963_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 568
c54407_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 460
q9xd51_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 558
q58xp4_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 541
q8gh86_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 559
q91952_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 785
forsgren_uspa2 : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 521
q9xd55_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 521
q848s2_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 507
q9xd53_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 504

q848s1_morca : DLGTRKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 812
q91961_morca : DLGTRKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 824
q8rtb2_morca : DLGTRKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 621
q91963_morca : DLGTRKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 619
c54407_morca : DLGTRKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 511
q9xd51_morca : DLGTRKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 609
q58xp4_morca : DLGTRKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 585
q8gh86_morca : DLGTRKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 603
q91962_morca : DLGTRKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 829
forsgren_uspa2 : DLGTRKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL

: 555	
q9xd55_morca	: DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAAL
: 555	
q848s2_morca	: DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAAL
: 551	
q9xd53_morca	: DLGTVKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAAL
: 548	
	* 980 * 1000 * 1020
q848s1_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 863	
q91961_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 875	
q8rtb2_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 872	
q91963_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 870	
o54407_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 562	
q9xd51_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 660	
q58xp4_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 636	
q8gh86_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 654	
q91962_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 880	
forsgren_uspa2	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 616	
q9xd55_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 516	
q848s2_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 502	
q9xd53_morca	: SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 599	
	*
q848s1_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 877
q91961_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 889
q8rtb2_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 886
q91963_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 684
o54407_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 576
q9xd51_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 674
q58xp4_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 650
q8gh86_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 668
q91962_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 394
forsgren_uspa2	: NKKGSYNIGVNYEF : 630
q9xd55_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 630
q848s2_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 616
q9xd53_morca	: NKKGSYNIGVNYEF : 613

267

Fig. 21

% de identidad en regiones identificadas en secuencia Forsgren

	Unión laminina 30-177	Unión fibronectina 165-318	Unión C3 302-458
q848s1_morca	8	19	74
q9l961_morca	6	41	73
q8rtb2_morca	9	22	67
q9l963_morca	10	23	68
c54407_morca	10	17	53
q9xd51_morca	10	19	66
q58xp4_morca	10	16	75
q8gh86_morca	18	43	69
q9l962_morca	9	36	64
q9xd55_morca	99	98	96
q848s2_morca	35	54	74
q9xd53_morca	29	52	64

21027432(21020135).ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Arne Forsgren AB

<120> INTERACTION OF MORAXELLA CATARRHALIS TO EPITHELIAL CELLS...

<130> 21027432

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> protein fragment from Moraxella catarrhalis (UspA1 405-435 or UspA2 244-274) or synthetic petide

<400> 1

Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu
1 5 10 15Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys
20 25 30

<210> 2

<211> 154

<212> PRT

<213> protein fragment from Moraxella catarrhalis (UspA1 299-452) or synthetic peptide

<400> 2

Thr Gly Asn Gly Thr Val Ser Val Gly Lys Lys Gly Lys Glu Arg Gln
1 5 10 15Ile Val His Val Gly Ala Gly Glu Ile Ser Asp Thr Asp Ala Val Asn
20 25 30

230

21027432(21020135).ST25
 Gly Ser Gln Leu His Val Leu Ala Thr Val Val Ala Gln Asn Lys Ala
 35 40 45

Asp Ile Lys Asp Leu Asp Asp Glu Val Gly Leu Leu Gly Glu Glu Ile
 50 55 60

Asn Ser Leu Glu Gly Glu Ile Phe Asn Asn Gln Asp Ala Ile Ala Lys
 65 70 75 80

Asn Gln Ala Asp Ile Lys Thr Leu Glu Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu
 85 90 95

Leu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Leu Ser Thr Asp Gln Lys Ala Asp Ile
 100 105 110

Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln
 115 120 125

His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys Asn Asn Val Glu Glu Gly Leu
 130 135 140

Leu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp Gln
 145 150

<210> 3

<211> 154

<212> PRT

<213> protein framgent from Moraxella catarrhalis (UspA2 165-318) or synthetic peptide

<400> 3

Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Asn Glu Ser Ile Glu Asp Leu Tyr Asp
 1 5 10 15

Phe Gly His Glu Val Ala Glu Ser Ile Gly Glu Ile His Ala His Asn
 20 25 30

Glu Ala Gln Asn Glu Thr Leu Lys Gly Leu Ile Thr Asn Ser Ile Glu
 35 40 45

Asn Thr Asn Asn Ile Thr Lys Asn Lys Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu
 50 55 60

Asn Asn Val Val Glu Glu Leu Phe Asn Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp
 65 70 75 80

Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala
 85 90 95

231

21027432(21020135).ST25

Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn
 100 105 110

Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Leu Ser Asp His Ile Ile Asp Gln Lys
 115 120 125

Thr Asp Ile Ala Gln Asn Gln Ala Asn Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr
 130 135 140

Asn Glu Leu Gln Asp Gln Tyr Ala Gln Lys
 145 150

<210> 4

<211> 721

<212> PRT

<213> protein fragment from Moraxella catarrhalis (UspA1 50-770) or synthetic peptide

<400> 4

Lys Val Gly Lys Ala Thr Asn Lys Ile Ser Gly Gly Asp Asn Asn Thr
 1 5 10 15

Ala Asn Gly Thr Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Gly Asp Tyr Asn Lys Thr
 20 25 30

Lys Gly Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Leu Phe Asn Glu Ala Thr
 35 40 45

Asn Glu Tyr Ser Thr Ile Gly Ser Gly Gly Tyr Asn Lys Ala Lys Gly
 50 55 60

Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Asn Gln
 65 70 75 80

Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asn Asn Thr Ala Lys Gly Arg Tyr
 85 90 95

Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Ile Glu Asn Ser
 100 105 110

Thr Val Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Gln Ala Lys Gly Arg Asn Ser Thr
 115 120 125

Val Ala Gly Gly Tyr Asn Asn Glu Ala Thr Gly Thr Asp Ser Thr Ile
 130 135 140

Ala Gly Gly Arg Lys Asn Gln Ala Thr Gly Lys Gly Ser Phe Ala Ala
 145 150 155 160

sida 3

272

21027432(21020135).ST25

Gly Ile Asp Asn Lys Ala Asn Ala Asp Asn Ala Val Ala Leu Gly Asn
 165 170 175
 Lys Asn Thr Ile Glu Gly Glu Asn Ser Val Ala Ile Gly Ser Asn Asn
 180 185 190
 Thr Val Lys Lys Gly Gln Gln Asn Val Phe Ile Leu Gly Ser Asn Thr
 195 200 205
 Asp Thr Thr Asn Ala Gln Asn Gly Ser Val Leu Leu Gly His Asn Thr
 210 215 220
 Ala Gly Lys Ala Ala Thr Ile Val Asn Ser Ala Glu Val Gly Gly Leu
 225 230 235 240
 Ser Leu Thr Gly Phe Ala Gly Ala Ser Lys Thr Gly Asn Gly Thr Val
 245 250 255
 Ser Val Gly Lys Lys Gly Lys Glu Arg Gln Ile Val His Val Gly Ala
 260 265 270
 Gly Glu Ile Ser Asp Thr Ser Thr Asp Ala Val Asn Gly Ser Gln Leu
 275 280 285
 His Val Leu Ala Thr Val Val Ala Gln Asn Lys Ala Asp Ile Lys Asp
 290 295 300
 Leu Asp Asp Glu Val Gly Leu Leu Gly Glu Glu Ile Asn Ser Leu Glu
 305 310 315 320
 Gly Glu Ile Phe Asn Asn Gln Asp Ala Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
 325 330 335
 Ile Lys Thr Leu Glu Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser
 340 345 350
 Gly Arg Leu Leu Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn
 355 360 365
 Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys
 370 375 380
 Thr Leu Lys Asn Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser Gly Arg
 385 390 395 400
 Leu Ile Asp Gln Lys Ala Asp Leu Thr Lys Asp Ile Lys Ala Leu Glu
 405 410 415
 Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp
 420 425 430

273

21027432(21020135).ST25

Gln Lys Ala Asp Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp Ile Ala Gln Asn Gln
 435 440 445
 Thr Asp Ile Gln Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala Tyr
 450 455 460
 Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser
 465 470 475 480
 Ala Asn Thr Asp Arg Ile Ala Thr Ala Glu Leu Gly Ile Ala Glu Asn
 485 490 495
 Lys Lys Asp Ala Gln Ile Ala Lys Ala Gln Ala Asn Glu Asn Lys Asp
 500 505 510
 Gly Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp Ile Gln Leu His Asp Lys Lys Ile
 515 520 525
 Thr Asn Leu Gly Ile Leu His Ser Met Val Ala Arg Ala Val Gly Asn
 530 535 540
 Asn Thr Gln Gly Val Ala Thr Asn Lys Ala Asp Ile Ala Lys Asn Gln
 545 550 555 560
 Ala Asp Ile Ala Asn Asn Ile Lys Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln
 565 570 575
 Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Ala Lys Val Ser Ala
 580 585 590
 Ala Asn Thr Asp Arg Ile Ala Lys Asn Lys Ala Glu Ala Asp Ala Ser
 595 600 605
 Phe Glu Thr Leu Thr Lys Asn Gln Asn Thr Leu Ile Glu Gln Gly Glu
 610 615 620
 Ala Leu Val Glu Gln Asn Lys Ala Ile Asn Gln Glu Leu Glu Gly Phe
 625 630 635 640
 Ala Ala His Ala Asp Val Gln Asp Lys Gln Ile Leu Gln Asn Gln Ala
 645 650 655
 Asp Ile Thr Thr Asn Lys Thr Ala Ile Glu Gln Asn Ile Asn Arg Thr
 660 665 670
 Val Ala Asn Gly Phe Glu Ile Glu Lys Asn Lys Ala Gly Ile Ala Thr
 675 680 685
 Asn Lys Gln Glu Leu Ile Leu Gln Asn Asp Arg Leu Asn Arg Ile Asn
 690 695 700

27A

21027432(21020135).ST25

Glu Thr Asn Asn His Gln Asp Gln Lys Ile Asp Gln Leu Gly Tyr Ala
 705 710 715 720

Leu

<210> 5

<211> 443

<212> PRT

<213> protein fragment from *Moraxella catarrhalis* (UspA1 50-491) or synthetic peptide

<400> 5

Lys Val Gly Lys Ala Thr Asn Lys Ile Ser Gly Gly Asp Asn Asn Thr
 1 5 10 15

Ala Asn Gly Thr Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Gly Asp Tyr Asn Lys Thr
 20 25 30

Lys Gly Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Leu Phe Asn Glu Ala Thr
 35 40 45

Asn Glu Tyr Ser Thr Ile Gly Ser Gly Gly Tyr Asn Lys Ala Lys Gly
 50 55 60

Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Asn Gln
 65 70 75 80

Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asn Asn Thr Ala Lys Gly Arg Tyr
 85 90 95

Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Ile Glu Asn Ser
 100 105 110

Thr Val Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Gln Ala Lys Gly Arg Asn Ser Thr
 115 120 125

Val Ala Gly Gly Tyr Asn Asn Glu Ala Thr Gly Thr Asp Ser Thr Ile
 130 135 140

Ala Gly Gly Arg Lys Asn Gln Ala Thr Gly Lys Gly Ser Phe Ala Ala
 145 150 155 160

Gly Ile Asp Asn Lys Ala Asn Ala Asp Asn Ala Val Ala Leu Gly Asn
 165 170 175

Lys Asn Thr Ile Glu Gly Glu Asn Ser Val Ala Ile Gly Ser Asn Asn
 Sida 6

275

21027432(21020135).ST25
180 185 190
Thr Val Lys Lys Gly Gln Gln Asn Val Phe Ile Leu Gly Ser Asn Thr
195 200 205
Asp Thr Thr Asn Ala Gln Asn Gly Ser Val Leu Leu Gly His Asn Thr
210 215 220
Ala Gly Lys Ala Ala Thr Ile Val Asn Ser Ala Glu Val Gly Gly Leu
225 230 235 240
Ser Leu Thr Gly Phe Ala Gly Ala Ser Lys Thr Gly Asn Gly Thr Val
245 250 255
Ser Val Gly Lys Lys Gly Lys Glu Arg Gln Ile Val His Val Gly Ala
260 265 270
Gly Glu Ile Ser Asp Thr Ser Thr Asp Ala Val Asn Gly Ser Gln Leu
275 280 285
His Val Leu Ala Thr Val Val Ala Gln Asn Lys Ala Asp Ile Lys Asp
290 295 300
Leu Asp Asp Glu Val Gly Leu Leu Gly Glu Glu Ile Asn Ser Leu Glu
305 310 315 320
Gly Glu Ile Phe Asn Asn Gln Asp Ala Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
325 330 335
Ile Lys Thr Leu Glu Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser
340 345 350
Gly Arg Leu Leu Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn
355 360 365
Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys
370 375 380
Thr Leu Lys Asn Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser Gly Arg
385 390 395 400
Leu Ile Asp Gln Lys Ala Asp Leu Thr Lys Asp Ile Lys Ala Leu Glu
405 410 415
Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp
420 425 430
Gln Lys Ala Asp Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
435 440

<210> 6

Sida 7

276

21027432(21020135).ST25

<211> 510

<212> PRT

<213> protein fragment from *Moraxella catarrhalis* (UspA2 30-539) or synthetic peptide

<400> 6

Gln Ala Lys Asn Asp Ile Thr Leu Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Lys Ile Asp Gln Asn Glu Leu Glu Ala Asp Ile Gly Asp Ile Thr Ala
20 25 30

Leu Glu Lys Tyr Leu Ala Leu Ser Gln Tyr Gly Asn Ile Leu Ala Leu
35 40 45

Glu Glu Leu Asn Lys Ala Leu Glu Glu Leu Asp Glu Asp Val Gly Trp
50 55 60

Asn Gln Asn Asp Ile Ala Asn Leu Glu Asp Asp Val Glu Thr Leu Thr
65 70 75 80

Lys Asn Gln Asn Ala Phe Ala Glu Gln Gly Glu Ala Ile Lys Glu Asp
85 90 95

Leu Gln Gly Leu Ala Asp Phe Val Glu Gly Gln Glu Gly Lys Ile Leu
100 105 110

Gln Asn Glu Thr Ser Ile Lys Lys Asn Thr Gln Arg Asn Leu Val Asn
115 120 125

Gly Phe Glu Ile Glu Lys Asn Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Asn Glu
130 135 140

Ser Ile Glu Asp Leu Tyr Asp Phe Gly His Glu Val Ala Glu Ser Ile
145 150 155 160

Gly Glu Ile His Ala His Asn Glu Ala Gln Asn Glu Thr Leu Lys Gly
165 170 175

Leu Ile Thr Asn Ser Ile Glu Asn Thr Asn Asn Ile Thr Lys Asn Lys
180 185 190

Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu Asn Asn Val Val Glu Glu Leu Phe Asn
195 200 205

Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile
210 215 220

277

21027432(21020135).ST25
Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp
225 230 235 240
Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Leu Ser
245 250 255
Asp His Ile Ile Asp Gln Lys Thr Asp Ile Ala Gln Asn Gln Ala Asn
260 265 270
Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Gln Tyr Ala Gln
275 280 285
Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser Glu Asn
290 295 300
Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala
305 310 315 320
Tyr Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser
325 330 335
Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu
340 345 350
Gln Asp Ala Tyr Ala Lys Gln Gln Ala Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn
355 360 365
Lys Ala Ser Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
370 375 380
Ile Ala Asn Asn Ile Thr Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp
385 390 395 400
Lys His Arg Ser Asp Ile Lys Thr Leu Ala Lys Thr Ser Ala Ala Asn
405 410 415
Thr Asp Arg Ile Ala Lys Asn Lys Ala Asp Asp Asp Ala Ser Phe Glu
420 425 430
Thr Leu Thr Lys Asn Gln Asn Thr Leu Ile Glu Lys Asp Lys Glu His
435 440 445
Asp Lys Leu Ile Thr Ala Asn Lys Thr Ala Ile Asp Ala Asn Lys Ala
450 455 460
Ser Ala Asp Thr Lys Phe Ala Ala Thr Ala Asp Ala Phe Thr Lys Asn
465 470 475 480
Gly Asn Ala Ile Thr Lys Asn Ala Lys Ser Ile Thr Asp Leu Gly Thr
485 490 495

278

21027432(21020135).ST25
Lys Val Asp Gly Phe Asp Ser Arg Val Thr Ala Leu Asp Thr
500 505 510

<210> 7

<211> 322

<212> PRT

<213> protein fragment from *Moraxella catarrhalis* (UspA2 30-351) or synthetic peptide

<400> 7

Gln Ala Lys Asn Asp Ile Thr Leu Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Lys Ile Asp Gln Asn Glu Leu Glu Ala Asp Ile Gly Asp Ile Thr Ala
20 25 30

Leu Glu Lys Tyr Leu Ala Leu Ser Gln Tyr Gly Asn Ile Leu Ala Leu
35 40 45

Glu Glu Leu Asn Lys Ala Leu Glu Glu Leu Asp Glu Asp Val Gly Trp
50 55 60

Asn Gln Asn Asp Ile Ala Asn Leu Glu Asp Asp Val Glu Thr Leu Thr
65 70 75 80

Lys Asn Gln Asn Ala Phe Ala Glu Gln Gly Glu Ala Ile Lys Glu Asp
85 90 95

Leu Gln Gly Leu Ala Asp Phe Val Glu Gly Gln Glu Gly Lys Ile Leu
100 105 110

Gln Asn Glu Thr Ser Ile Lys Lys Asn Thr Gln Arg Asn Leu Val Asn
115 120 125

Gly Phe Glu Ile Glu Lys Asn Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Asn Glu
130 135 140

Ser Ile Glu Asp Leu Tyr Asp Phe Gly His Glu Val Ala Glu Ser Ile
145 150 155 160

Gly Glu Ile His Ala His Asn Glu Ala Gln Asn Glu Thr Leu Lys Gly
165 170 175

Leu Ile Thr Asn Ser Ile Glu Asn Thr Asn Asn Ile Thr Lys Asn Lys
180 185 190

Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu Asn Asn Val Val Glu Glu Leu Phe Asn
195 200 205

21027432(21020135).ST25

Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile
210 215 220

Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp
225 230 235 240

Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Leu Ser
245 250 255

Asp His Ile Ile Asp Gln Lys Thr Asp Ile Ala Gln Asn Gln Ala Asn
260 265 270

Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Gln Tyr Ala Gln
275 280 285

Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser Glu Asn
290 295 300

Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala
305 310 315 320

Tyr Ala

<210> 8

<211> 148

<212> PRT

<213> protein fragment from Moraxella catarrhalis (UspA2 30-177) or synthetic peptide

<400> 8

Gln Ala Lys Asn Asp Ile Thr Leu Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Lys Ile Asp Gln Asn Glu Leu Glu Ala Asp Ile Gly Asp Ile Thr Ala
20 25 30

Leu Glu Lys Tyr Leu Ala Leu Ser Gln Tyr Gly Asn Ile Leu Ala Leu
35 40 45

Glu Glu Leu Asn Lys Ala Leu Glu Glu Leu Asp Glu Asp Val Gly Trp
50 55 60

Asn Gln Asn Asp Ile Ala Asn Leu Glu Asp Asp Val Glu Thr Leu Thr
65 70 75 80

Lys Asn Gln Asn Ala Phe Ala Glu Gln Gly Glu Ala Ile Lys Glu Asp
85 90 95

sida 11

21027432(21020135).ST25

Leu Gln Gly Leu Ala Asp Phe Val Glu Gly Gln Glu Gly Lys Ile Leu
100 105 110

Gln Asn Glu Thr Ser Ile Lys Lys Asn Thr Gln Arg Asn Leu Val Asn
115 120 125

Gly Phe Glu Ile Glu Lys Asn Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Asn Glu
130 135 140

Ser Ile Glu Asp
145

<210> 9

<211> 340

<212> PRT

<213> protein fragment from Moraxella catarrhalis (UspA2 200-539) or synthetic peptide

<400> 9

Asn Glu Thr Leu Lys Gly Leu Ile Thr Asn Ser Ile Glu Asn Thr Asn
1 5 10 15

Asn Ile Thr Lys Asn Lys Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu Asn Asn Val
20 25 30

Val Glu Glu Leu Phe Asn Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Ala
35 40 45

Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln
50 55 60

Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn Val Glu Glu
65 70 75 80

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

Ala Gln Asn Gln Ala Asn Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr Asn Glu Leu
100 105 110

Gln Asp Gln Tyr Ala Gln Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn
115 120 125

Lys Ala Ser Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr
130 135 140

Asn Glu Leu Gln Asp Ala Tyr Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp
Sida 12

281

21027432(21020135).ST25

145 150 155 160

Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu
165 170 175

Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala Tyr Ala Lys Gln Gln Ala Glu
180 185 190

Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile
195 200 205

Ala Lys Asn Gln Ala Asp Ile Ala Asn Asn Ile Thr Asn Ile Tyr Glu
210 215 220

Leu Ala Gln Gln Gln Asp Lys His Arg Ser Asp Ile Lys Thr Leu Ala
225 230 235 240

Lys Thr Ser Ala Ala Asn Thr Asp Arg Ile Ala Lys Asn Lys Ala Asp
245 250 255

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

Glu Lys Asp Lys Glu His Asp Lys Leu Ile Thr Ala Asn Lys Thr Ala
275 280 285

Ile Asp Ala Asn Lys Ala Ser Ala Asp Thr Lys Phe Ala Ala Thr Ala
290 295 300

Asp Ala Phe Thr Lys Asn Gly Asn Ala Ile Thr Lys Asn Ala Lys Ser
305 310 315 320

Ile Thr Asp Leu Gly Thr Lys Val Asp Gly Phe Asp Ser Arg Val Thr
325 330 335

Ala Leu Asp Thr
340

<210> 10

<211> 157

<212> PRT

<213> protein fragment from *Moraxella catarrhalis* (UspA2 302-458) or synthetic peptide

<400> 10

Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Gln Tyr Ala Gln
1 5 10 15

282

21027432(21020135).ST25
Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser Glu Asn
20 25 30
Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala
35 40 45
Tyr Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser
50 55 60
Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu
65 70 75 80
Gln Asp Ala Tyr Ala Lys Gln Gln Ala Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn
85 90 95
Lys Ala Ser Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
100 105 110
Ile Ala Asn Asn Ile Thr Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp
115 120 125
Lys His Arg Ser Asp Ile Lys Thr Leu Ala Lys Thr Ser Ala Ala Asn
130 135 140
Thr Asp Arg Ile Ala Lys Asn Lys Ala Asp Asp Asp Ala
145 150 155

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2006/000931

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-INTERNAL, WPI DATA, EBI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9828333 A2 (THE BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM), 2 July 1998 (02.07.1998), page 83, line 22; page 84, line 7; page 74, example 3, figure 8 --	1-24
X	DATABASE GENESEQ PATENT [Online] 7 October 1998 (1998-10-07) retrieved from EBI Database accession no. AAW68253 100% identity in 23 aa of SEQ ID NO 65 with SEQ ID NO 1 & WO 98 28333 A (UNIV TEXAS SYSTEM) 2 July 1998 (1998-07-02) the whole document --	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2007

Date of mailing of the international search report

23 -02- 2007

Name and mailing address of the ISA/

Swedish Patent Office

Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM

Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Yvonne Siösteen/Eö

Telephone No. +46 8 782 25 00

284

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2006/000931

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE GENESEQ PATENT [Online] 7 October 1998 (1998-10-07) retrieved from EBI Database accession no. AAW68277 100% identity in 55 aa of SEQ ID NO 98 with SEQ ID NO 2 & WO 98 28333 A (UNIV TEXAS SYSTEM) 2 July 1998 (1998-07-02) the whole document --	2
X	DATABASE UNIPROTKB/TREMBL 1 November 1999 (1999-11-01) retrieved from EBI Database accession no. Q9XD55 abstract --	3
P,X	TAN TONG THUAN ET AL, "The Respiratory Pathogen Moraxella catarrhalis Adheres to Epithelial Cells by Interacting with Fibronectin through Ubiquitous Surface Proteins A1 and A2", Journal of infections diseases 15 September 2005, Vol. 192, p. 1029-1038 --	1-3,11-14, 17-22
A	MCMICHAEL JOHN C. ET AL, "Isolation and Characterization of Two Proteins from Moraxella catarrhalis That Bear a Common Epitope", Infection and immunity, Sept. 1998, Vol. 66, No. 9, p. 4374-4381 --	1-3,11-14, 17-22
A	WO 2004031236 A2 (UNIVERSITY OF BRISTOL), 15 April 2004 (15.04.2004) --	1-3,11-14, 17-22
A	WO 9634960 A1 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED), 7 November 1996 (07.11.1996) --	1-3,11-14, 17-22

285

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2006/000931

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AEBI CHRISTOPH ET AL, "A Protective Epitope of Moraxella catarrhalis Is Encoded by Two Different Genes", Infection and immunity, November 1997, Vol. 65, No. 11, p. 4367-4377 --	1-3,11-14, 17-22
P,X	NORDSTRÖM T ET AL, "Ionic binding of C3 to the human pathogen Moraxella catarrhalis is a unique mechanism for combating innate immunity", J Immunol., 15 september 2005, vol. 175, no. 6, page 3628 - page 3636, abstract from PubMed --	4,6,9-13, 16-21,24
X	NORDSTRÖM, THERESE at Medical Microbiology (Malmö), "Moraxella catarrhalis outer membrane proteins and interactions with the human immune system", Lund University Dissertations, Scripta Academica Lundensia, Medicinsk Mikrobiologi Institutionen för Laboratorie Medicin Universitetssjukhuset MAS Lunds Universitet, page 1 - page 4, Dissertation held 01.04.2005 --	4,6,9-13, 16-21,24
X	NORDSTRÖM, THERESE ET AL, "The Emerging Pathogen Moraxella catarrhalis Interacts with Complement Inhibitor C4b Binding Protein through Ubiquitous Surface Proteins A1 and A2 1", The Journal of Immunology, 2004, vol. 173, page 4598 - page 4606 --	4,6,9-13, 16-21,24
A	BLOM, A. M., "Strategies developed by bacteria and virus for protection from the human complement system", Scand J Clin Lab Invest, 2004, vol. 64, page 479 - page 496; page 486 - page 487 --	4,6,9-13, 16-21,24
A	EP 0163623 A2 (ALFA-LAVAL AGRI INTERNATIONAL AB), 4 December 1985 (04.12.1985) ----- --	4-8,11-13, 15,17-21,23

286

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2006/000931

International patent classification (IPC)

C07K 14/21 (2006.01)
A61K 39/104 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

Download your patent documents at www.prv.se

The cited patent documents can be downloaded at www.prv.se by following the links:

- In English/Searches and advisory services/Cited documents (service in English) or
- e-tjänster/anförda dokument (service in Swedish).

Use the application number as username.

The password is **BQKWQFQRLC**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

287

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2006/000931

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2006/000931

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. ☒ Claims Nos.: 19-20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 19-20 relate to a method of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy, as well as diagnostic
.../...
- 2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1: Claims 1-3 (completely), 11-13 (partially), 14 (completely), 17-21 (partially) and 22 (completely) directed to a fibronectin-binding peptide consisting of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 and their use for treating infections caused by Moraxella catarrhalis.
- 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 - 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
 - 3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-24
 - 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

289

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2006/000931

Box II.1

methods /Rule 39.1(iv). Nevertheless, a search has been executed for this these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds.

Box III

2: Claims 4-8 (completely), 11-13 (partially), 15 (completely), 17-21 (partially) and 23 (completely) directed to a laminin-binding peptide consisting of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8 and their use for treating infections caused by *Moraxella catarrhalis*.

3: Claims 4,6 (completely) and 9-10 (completely), 11-13 (partially), 16 (completely), 17-21 (partially) and 24 (completely) directed to peptides consisting of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 10 which inhibit the complement system and their use for treating infections caused by *Moraxella catarrhalis*.

4: Claims 25-27 directed to a vaccine composition comprising UspA1 and/or UspA2 in combination with the protein MID.

291

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

26/01/2007

International application No.

PCT/SE2006/000931

WO	9828333	A2	02/07/1998	AU	746442	B	02/05/2002
				AU	5720198	A	17/07/1998
				BR	9714160	A	02/05/2000
				CA	2274495	A	02/07/1998
				CN	1159441	C	28/07/2004
				CN	1251611	A	26/04/2000
				EP	0948625	A	13/10/1999
				JP	2001515467	T	18/09/2001
				KR	2000057575	A	25/09/2000
				KR	20000057575	A	25/09/2000
				US	6310190	B	30/10/2001
				US	6753417	B	22/06/2004
				US	20030032772	A	13/02/2003
				US	20050131221	A	16/06/2005
				US	20050137131	A	23/06/2005
WO	2004031236	A2	15/04/2004	AU	2003299131	A	00/00/0000
				BR	0315031	A	16/08/2005
				CA	2500960	A	15/04/2004
				CN	1705678	A	07/12/2005
				EP	1546194	A	29/06/2005
				GB	0222764	D	00/00/0000
				JP	2006516952	T	13/07/2006
				KR	20050067410	A	01/07/2005
				MX	PA05003474	A	18/10/2005
				NO	20052108	A	27/06/2005
				NZ	539575	A	30/06/2006
				PL	376052	A	12/12/2005
				US	20050267028	A	01/12/2005
WO	9634960	A1	07/11/1996	AU	722132	B	20/07/2000
				AU	5394196	A	21/11/1996
				BR	9608241	A	31/07/2001
				CA	2219889	A	07/11/1996
				CN	1189853	A	05/08/1998
				CN	1294264	C	10/01/2007
				EP	0826052	A	04/03/1998
				JP	3771265	B	26/04/2006
				JP	11502415	T	02/03/1999
				US	5808024	A	15/09/1998
				US	6335018	B	01/01/2002
				US	6440424	B	27/08/2002
				US	6440425	B	27/08/2002
				US	6448386	B	10/09/2002
				US	20010014672	A	16/08/2001
				US	20020068070	A	06/06/2002
				US	20030170657	A	11/09/2003
				US	20030171254	A	11/09/2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

26/01/2007

International application No.
PCT/SE2006/000931

EP	0163623	A2	04/12/1985	SE	0163623	T3	
				AT	52543	T	15/05/1990
				AU	600886	B	30/08/1990
				CA	1340401	A,C	23/02/1999
				DE	3577579	D	00/00/0000
				ES	543635	A	01/11/1988
				ES	8900019	A	01/01/1989
				FI	84431	B,C	30/08/1991
				FI	860417	A	29/01/1986
				IE	59203	B	26/01/1994
				IE	851337	L	30/11/1985
				JP	7047541	B	24/05/1995
				JP	61502334	T	16/10/1986
				NO	164992	B,C	27/08/1990
				NO	860321	A	29/01/1986
				NZ	212244	A	29/03/1989
				SE	454403	B,C	02/05/1988
				SE	8402938	A	01/12/1985
				US	5189015	A	23/02/1993
				WO	8505553	A	19/12/1985

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

RECEIVED

2007 -11- 12

AWAPATENT, Malmö

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 21027432	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/IPEA/416	
International application No. PCT/SE2006/000931	International filing date (day/month/year) 08-08-2006	Priority date (day/month/year) 10-08-2005
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC See Supplemental Box		
Applicant Arne Forsgren AB et al		

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:
 - a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of 2 sheets, as follows:
 - ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).
 - ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.
 - b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____, containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).

4. This report contains indications relating to the following items:
- | | | |
|-------------------------------------|--------------|---|
| ☒ | Box No. I | Basis of the report |
| ☐ | Box No. II | Priority |
| ☒ | Box No. III | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| ☐ | Box No. IV | Lack of unity of invention |
| ☒ | Box No. V | Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| ☐ | Box No. VI | Certain documents cited |
| ☐ | Box No. VII | Certain defects in the international application |
| ☒ | Box No. VIII | Certain observations on the international application |

Date of submission of the demand 08-06-2007	Date of completion of this report 05-11-2007
Name and mailing address of the IPEA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 667 72 88	Authorized officer Yvonne Siösteen/EÖ Telephone No. +46 8 782 25 00

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (April 2007)

294

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of: Cover sheet

International patent classification (IPC)

C07K 14/21 (2006.01)

A61K 39/104 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on:

- ☐ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____,
which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
- ☐ publication of the international application (Rule 12.4(a))
- ☐ international preliminary examination (Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the elements of the international application, this report is based on (replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):

- ☐ the international application as originally filed/furnished
- ☒ the description:
- pages 1-92 as originally filed/furnished
- pages* _____ received by this Authority on _____
- pages* _____ received by this Authority on _____
- ☒ the claims:
- pages _____ as originally filed/furnished
- pages* _____ as amended (together with any statement) under Article 19
- pages* 1-2 received by this Authority on 08-06-2007
- pages* _____ received by this Authority on _____
- ☒ the drawings:
- pages 1-33 as originally filed/furnished
- pages* _____ received by this Authority on _____
- pages* _____ received by this Authority on _____
- ☒ a sequence listing and/or any related table(s) – see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
- ☐ any table(s) related to the sequence listing (specify): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
- ☐ any table(s) related to the sequence listing (specify): _____

5. ☐ This report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2(e)).

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 10-11 and 14-16

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 10-11
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See PCT Rule 67.1.(iv): Methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 14-16
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in the Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details.

1. Statement

Novelty (N)	Claims	<u>1-9, 12-13</u>	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	<u>1-9, 13</u>	YES
	Claims	<u>12</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-9, 12-13</u>	YES
	Claims		NO

The claimed subject-matter pertains to extracellular peptides consisting of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3 being isolated from *Moraxella catarrhalis* outer membrane. SEQ ID NO:2 represents a protein fragment from UspA1 299-452 and SEQ ID NO:3 from UspA2 165-318. The peptides have the ability of binding to the extracellular matrix protein fibronectin and are useful for treating infections caused by *Moraxella catarrhalis*.

Reference is made to the following documents:

D1: WO9828333

D2: Database GSP, accession no: AAW68277, retrieved from EBI

D1 refers to UspA1 and UspA2 proteins from *Moraxella catarrhalis* and to their respective genes *uspA1* and *uspA2*. Each protein encompasses a region that is conserved. D1 discloses that UspA1 has fibronectin-binding activity (see fig.8 and page 83, line 22-page 85, line 6 and page 93, line 28). D1 discloses a peptide having 79 amino acids (SEQ ID NO:98) which shows 96% identity with 55 amino acids of the 154 amino acids of the claimed peptide having SEQ ID NO:2 (see D2). The peptide comprises the amino acid sequence NNINNIYELAQQQDQHSSDIKTL which also is enclosed in the two claimed sequences SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3.

The disclosed peptide can be used in vaccines for treating *Moraxella catarrhalis* infections.

...

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of: BOX V

The claimed invention differs from D1 in that the peptides SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3 have slightly different sequences and have been found to be fibronectin-binding.

Consequently, with the background of D1 the problem is to provide truncated UspA1 and UspA2 which retain fibronectin binding properties and are useful in the treatment of *Moraxella catarrhalis* infections.

Although it is known from D1 that Usp1 has a region which binds to fibronectin the authors of D1 were not able to find the region in UspA1 or UspA2 which were responsible for the fibronectin binding (see page 93, line 30).

Thus, a person skilled in the art who is presented with the problem of finding peptides isolated from *Moraxella catarrhalis* which bind to fibronectin will not find such a solution in D1.

Furthermore it is not probable that the known peptide comprising the amino acid sequence NNINNIYELAQQQDQHSSDIKTL being so much shorter than the claimed peptide has the ability of binding to fibronectin and therefore is as suitable as the claimed peptides for treating infections caused by *Moraxella catarrhalis* such as acute otitis, sinusitis and lower respiratory tract infections.

Thus, the subject-matter of claims 1-9 and 13 is considered to involve an inventive step. All claims are considered novel and industrially applicable.

Claim 12 lacks inventive step (and probably also novelty) as it is so broad that it does not restrict the claimed nucleic acid sequences to sequences having the ability to bind to fibronectin. Thus the claimed sequences fail to define the inventive concept (see also box VIII).

289

Box No. VIII - Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claim 3 is not supported by the description as required by Article 6 PCT, as its scope is broader than justified by the description. The reason therefore are the following: it is not probable that the claimed peptides can be used in the treatment of any infection but only for treating infections caused by *Moraxella catarrhalis*.

Claim 12 does not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. It encompasses nucleic acid sequences encoding a ligand, protein or peptide of the present invention as well as homologues, polymorphisms, fragments, degeneratives and splice variants thereof without them being limited to the ability to bind to fibronectin.

CLAIMS

1. Peptide consisting of Sequence ID No. 2, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof which retain fibronectin binding properties.
2. Peptide consisting of Sequence ID No. 3, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof which retain fibronectin binding properties.
3. Use of at least one peptide according to any one of claims 1 to 2 for the production of a medicament for the treatment or prophylaxis of an infection.
4. Use according to claim 3, wherein the infection is caused by *Moraxella catarrhalis*.
5. Use according to claim 3 or 4, for the prophylaxis or treatment of otitis media, sinusitis or lower respiratory tract infections.
6. A ligand comprising a fibronectin binding domain, said ligand consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of Sequence ID No. 2 or Sequence ID No. 3, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof which retain fibronectin binding properties.
7. A fusion protein comprising one or more ligands according to claim 6.
8. A medicament comprising one or more ligands according to claim 6 or 7 and one or more

0 8 -06- 2007

80

pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles,
excipients, binders, carriers, or preservatives.

- 5 9. A vaccine comprising one or more ligands
according to claim 6 or 7 and one or more
pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles,
excipients, binders, carriers, or preservatives.

- 10 10. A method of treating or preventing an infection
in an individual comprising administering a
pharmaceutically effective amount of a medicament or a
vaccine according to claim 8 or 9.

11. A method according to claim 10, wherein the
infection is caused by *Moraxella catarrhalis*.

- 15 12. A nucleic acid sequence encoding a ligand,
protein or peptide of the present invention, as well as
homologues, polymorphisms, fragments, degenerates and
splice variants thereof.

- 20 13. A polypeptide or a polypeptide truncate
comprising at least one of the conserved sequences of
Sequence ID No. 2 or Sequence ID No. 3 or a fragment,
homologue, functional equivalent, derivative, degenerate
or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product
or other secondary processing product thereof with the
ability of binding fibronectin.

- 25 14. A vaccine composition comprising an effective
amount of UspA1 and/or UspA2 in combination with an
effective amount of protein MID and one or more
pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles,
excipients, binders, carriers, or preservatives.

- 30 15. Use of an effective amount of UspA1 and/or UspA2
in combination with an effective amount of protein MID
for the production of a medicament for the treatment or
prophylaxis of an infection.

- 35 16. Use according to claim 15, wherein the infection
is caused by *Moraxella catarrhalis*.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia ID No. 2, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otros productos de procesamiento secundario del mismo que retiene propiedades de ligado a la fibronectina.

2. Un péptido que consiste en la secuencia ID No. 3, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otros productos de procesamiento secundario del mismo que retiene propiedades de ligado a la fibronectina.

3. El uso de por lo menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para la producción de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una infección.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la infección es causada por *Moraxella catarrhalis*.

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, para la profilaxis o tratamiento de la otitis media, sinusitis o infecciones del tracto respiratorio inferior.

6. Un ligando que comprende un dominio que liga a la fibronectina, dicho ligando consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia ID No. 2 o la secuencia ID No. 3, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otros productos de procesamiento secundario del mismo que retiene propiedades de ligado a la fibronectina.

7. Una proteína de fusión que comprende uno o más ligandos de acuerdo con la reivindicación 6.

8. Un medicamento que comprende uno o más ligandos de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglomerantes, portadores o preservantes farmacéuticamente aceptables.

9. Una vacuna que comprende uno o más ligandos de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglomerantes, portadores o preservantes farmacéuticamente aceptables.

10. Un método para tratar o prevenir una infección en un individuo que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de un medicamento o de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 8 o 9.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la infección es causada por *Moraxella catarrhalis*.

12. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un ligado, proteína o péptido de la presente invención, así como homólogos, polimorfismos, fragmentos, degenerados y variantes divididas de los mismos.

13. Un polipéptido o un polipéptido truncado que comprende por lo menos una de las secuencias conservadas de la secuencia ID No. 2 a la secuencia ID No. 3 o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otros productos de procesamiento secundario con la capacidad de ligado a la fibronectina.

14. Una composición de vacuna que comprende una cantidad efectiva de UspA1 y/o UspA2 en combinación con una cantidad efectiva de proteína MID y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglomerantes, portadores o preservantes farmacéuticamente aceptables.

15. El uso de una cantidad efectiva de UspA1 y/o UspA2 en combinación con una cantidad efectiva de proteína MID para la producción de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una infección.

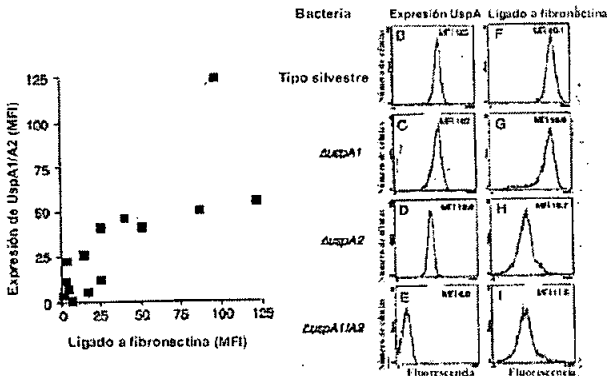
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la infección es causada por *Moraxella catarrhalis*.

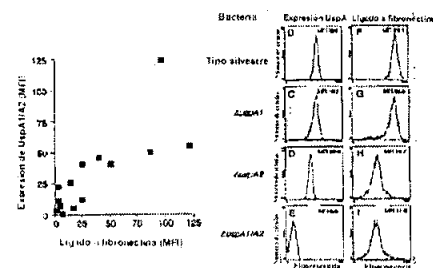
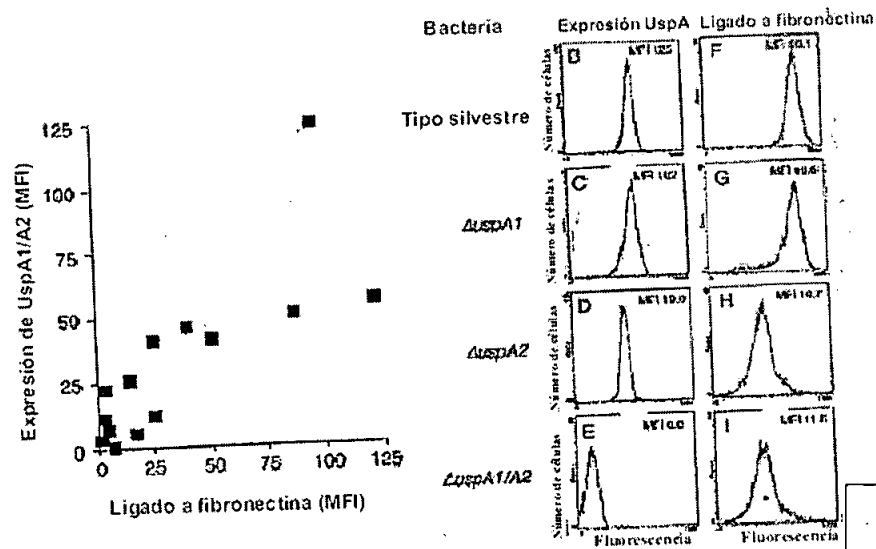
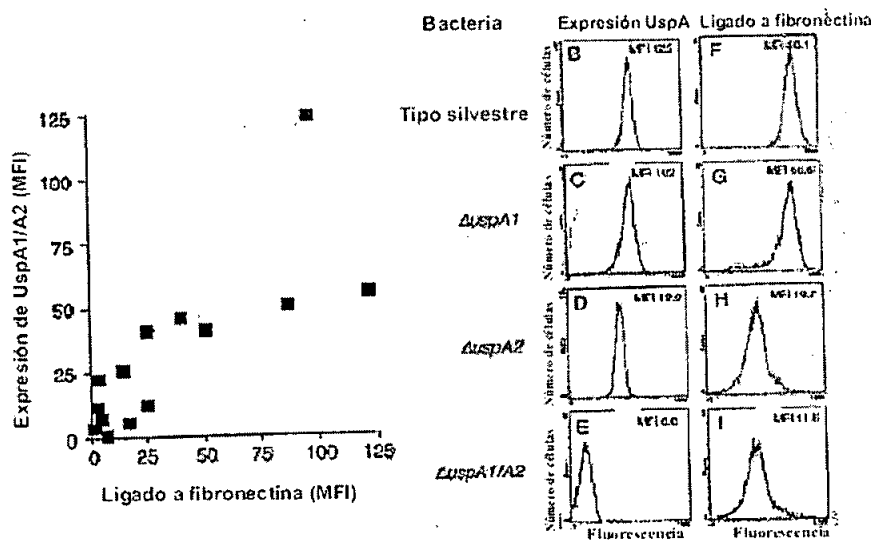
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 60/706,745 10/08/2005 US 60/707,148 11/08/2005 US (51) Int Cl: C07K 014/021 (71) Solicitante(s) ARNE FORSGREN AB (72) Inventor(es) ARNE FORSGREN KRISTIAN RIESBECK (74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 10/03/2008 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 08/08/2006 No. de solicitud PCT/SE2006/000931 (87) Publicación internacional Fecha: 15/02/2007 N° publicación: WO 2007/018463 A2-A3	
(54) Título: INTERACCION DE LA MORAXELLA CATARRHALIS CON CELULAS EPITELIALES, PROTEINAS DE MATRIZ EXTRA CELULAR Y EL SISTEMA COMPLEMENTO	

Reivindicación(es):

1. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 1, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
2. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 2, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
3. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 3, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
4. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 4, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
5. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 5, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
6. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 6, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
7. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 7, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.

8. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 8, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
9. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 9, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
10. Un Péptido que consiste de la secuencia ID No. 10, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o hidroxilación, sulfonación o glicosilación de producto u otros productos de procesamiento secundario del mismo.
11. El uso de por lo menos un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la producción de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una infección.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la infección es causada por *Moraxella catarrhalis*.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, para la profilaxis o tratamiento de la otitis media, sinusitis o infecciones del tracto respiratorio inferior.





308

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 9.460
FECHA : FEBRERO 4 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-011728- -00000-0000

Fecha: 2008-02-06 17:42:55 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 308

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2678327	04/02/2008	51,244,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Cdo 16327-841007-0,

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-011728- -00000-0000

Fecha: 2008-02-06 17:42:55 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 308



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudia M Nena Cortes
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

310

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	8 11728
	Solicitud internacional	PCT/SE2006/000931
	Fecha inicio fase nacional	10/03/2008
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	4178

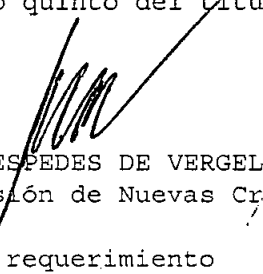
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 29 MAR. 2008
jfernand