

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500837
(P2005-500837A)

(43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 35/14	A 6 1 K 35/14	Z 4 B O 6 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	Z 4 B O 6 5
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	4 C O 8 5
C O 7 K 1/22	C O 7 K 1/22	4 C O 8 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 137 頁)	最終頁に続く

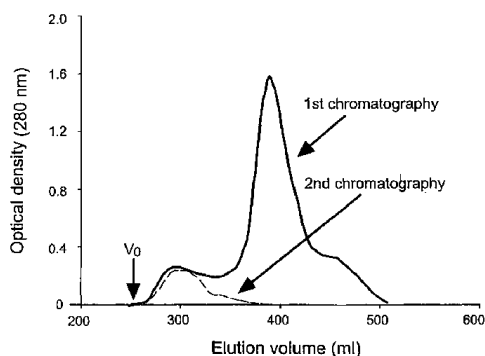
(21) 出願番号	特願2003-510809 (P2003-510809)	(71) 出願人	504003167 フォシユグレン, アルネ スウェーデン国、エス-239 41・フ アルステルボ、ソテンスペーゲン・4・ベ ー
(86) (22) 出願日	平成14年7月1日(2002.7.1)	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月26日(2003.12.26)	(74) 代理人	100113332 弁理士 一入 章夫
(86) 国際出願番号	PCT/SE2002/001299	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(87) 国際公開番号	W02003/004651	(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
(87) 国際公開日	平成15年1月16日(2003.1.16)	(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明
(31) 優先権主張番号	0102410-8		
(32) 優先日	平成13年7月4日(2001.7.4)		
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モラクセラ・カタラーリス由来の新規な表面露出免疫グロブリンD結合タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリス(Moraxella catarrhalis)中で検出され得る表面露出タンパク質、前記表面露出タンパク質の免疫原性またはIgD結合断片、及び前記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片に関する。DNAセグメント、ワクチン、プラスミド及びファージ、非ヒト宿主、組換えDNA分子及び植物、融合タンパク質及びポリペプチド並びに融合産物をも開示する。IgDの検出方法、IgDの分離方法、モラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質の単離方法及び自己免疫疾患の治療方法をも開示する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列、200 kDa の見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 IgD に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*) 中で検出され得ることを特徴とする表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性または IgD 結合断片、または前記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片。

【請求項 2】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得、膜結合または可溶性 IgD に選択的に結合する能力を有することを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性または IgD 結合断片、またはその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体。

10

【請求項 3】

配列番号 10 に記載されているアミノ酸配列を有することを特徴とする請求の範囲第 2 項に記載の免疫原性または IgD 結合断片。

【請求項 4】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に結合する能力を有することを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片。

【請求項 5】

配列番号 8 に記載されているアミノ酸配列を有することを特徴とする請求の範囲第 4 項に記載の免疫原性接着性断片。

20

【請求項 6】

配列番号 2 に記載されており、請求の範囲第 1 項に記載のモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質をコードする DNA 配列、または前記 DNA 配列の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を含むことを特徴とする DNA セグメント。

【請求項 7】

請求の範囲第 2 項に記載の免疫原性または IgD 結合断片をコードする DNA 配列を含むことを特徴とする DNA セグメント。

【請求項 8】

配列番号 11 に記載されており、請求の範囲第 3 項に記載の免疫原性または IgD 結合断片をコードする DNA 配列を含むことを特徴とする請求の範囲第 7 項に記載の DNA セグメント。

30

【請求項 9】

請求の範囲第 4 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片をコードする DNA 配列を含むことを特徴とする DNA セグメント。

【請求項 10】

配列番号 9 に記載されており、請求の範囲第 5 項に記載の免疫原性接着性断片をコードする DNA 配列を含むことを特徴とする請求の範囲第 9 項に記載の DNA セグメント。

【請求項 11】

配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列、200 kDa の見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 IgD に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性または IgD 結合断片、または前記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片を含むことを特徴とするワクチン。

40

【請求項 12】

膜結合または可溶性 IgD に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質の免疫原性または IgD 結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を含むことを特徴とするワクチン。

【請求項 13】

50

請求の範囲第3項に記載の免疫原性またはIgD結合断片を含むことを特徴とする請求の範囲第12項に記載のワクチン。

【請求項14】

請求の範囲第4項に記載のモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片を含むことを特徴とするワクチン。

【請求項15】

請求の範囲第5項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片を含むことを特徴とする請求の範囲第14項に記載のワクチン。

【請求項16】

別のワクチンと組み合わせることを特徴とする請求の範囲第11項～第15項のいずれか1項に記載のワクチン。 10

【請求項17】

別の分子の免疫原性部分と組み合わせることを特徴とする請求の範囲第11項～第16項のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項18】

配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性またはIgD結合断片をコードするDNA配列を含むことを特徴とするプラスミドまたはファージ。 20

【請求項19】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する請求の範囲第1項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性またはIgD結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードするDNA配列を含むことを特徴とするプラスミドまたはファージ。

【請求項20】

請求の範囲第3項に記載の免疫原性またはIgD結合断片をコードするDNA配列を含むことを特徴とする請求の範囲第19項に記載のプラスミドまたはファージ。

【請求項21】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する請求の範囲第1項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードするDNA配列を含むことを特徴とするプラスミドまたはファージ。 30

【請求項22】

請求の範囲第5項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片をコードするDNA配列を含むことを特徴とする請求の範囲第21項に記載のプラスミドまたはファージ。

【請求項23】

請求の範囲第18項～第22項のいずれか1項に記載のプラスミドまたはファージの少なくとも1つを含み、前記タンパク質または変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性またはIgD結合断片、または前記タンパク質の免疫原性接着性断片を産生し得る細菌、酵母及び植物から選択されることを特徴とする非ヒト宿主。 40

【請求項24】

大腸菌であることを特徴とする請求の範囲第23項に記載の宿主。

【請求項25】

配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはIgD結合断片をコードするDNA配列を別の遺伝子に融合して含むことを特徴とする組換えDNA分子。

【請求項26】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、またはその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする D N A 配列を別の遺伝子に融合して含んでいることを特徴とする組換え D N A 分子。

【請求項 27】

請求の範囲第 3 項に記載の免疫原性または I g D 結合断片をコードする D N A 配列を別の遺伝子に融合して含んでいることを特徴とする請求の範囲第 26 項に記載の組換え D N A 分子。

【請求項 28】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする D N A 配列を別の遺伝子に融合して含んでいることを特徴とする組換え D N A 分子。

10

【請求項 29】

請求の範囲第 5 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片をコードする D N A 配列を別の遺伝子に融合して含んでいることを特徴とする請求の範囲第 28 項に記載の組換え D N A 分子。

【請求項 30】

請求の範囲第 25 項～第 29 項のいずれか 1 項に記載の融合 D N A 配列を含むことを特徴とするプラスミドまたはファージ。

20

【請求項 31】

請求の範囲第 30 項に記載のプラスミドまたはファージの少なくとも 1 つを含み、細菌、酵母及び植物から選択されることを特徴とする非ヒト宿主。

【請求項 32】

大腸菌であることを特徴とする請求の範囲第 31 項に記載の宿主。

【請求項 33】

配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列、200 k D a の見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片が請求の範囲第 25 項に記載の組換え D N A 分子を用いて別のタンパク質と組み合わせられていることを特徴とする融合タンパク質またはポリペプチド。

30

【請求項 34】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得、膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、またはその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が請求の範囲第 26 項に記載の組換え D N A 分子を用いて別のタンパク質と組み合わせられていることを特徴とする融合タンパク質またはポリペプチド。

【請求項 35】

請求の範囲第 3 項に記載の免疫原性または I g D 結合断片が請求の範囲第 27 項に記載の組換え D N A 分子を用いて別のタンパク質と組み合わせられていることを特徴とする請求の範囲第 34 項に記載の融合タンパク質またはポリペプチド。

40

【請求項 36】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する請求の範囲第 1 項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が請求の範囲第 28 項に記載の組換え D N A 分子を用いて別のタンパク質と組み合わせられていることを特徴とする融合タンパク質またはポリペプチド。

【請求項 37】

請求の範囲第 5 項に記載の免疫原性接着性断片が請求の範囲第 29 項に記載の組換え D N

50

A分子を用いて別のタンパク質と組み合わされていることを特徴とする請求の範囲第36項に記載の融合タンパク質またはポリペプチド。

【請求項38】

配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはIgD結合断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合していることを特徴とする融合産物。

【請求項39】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する請求の範囲第2項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性またはIgD結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合していることを特徴とする融合産物。

10

【請求項40】

請求の範囲第3項に記載の免疫原性またはIgD結合断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合していることを特徴とする請求の範囲第39項に記載の融合産物。

【請求項41】

モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する請求の範囲第2項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合していることを特徴とする融合産物。

20

【請求項42】

請求の範囲第5項に記載の免疫原性接着性断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合していることを特徴とする請求の範囲第41項に記載の融合産物。

【請求項43】

場合により標識されていたり及び/またはマトリックスに結合していてもよい、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはIgD結合断片を用いてIgDを検出する方法。

30

【請求項44】

場合により標識されていたり及び/またはマトリックスに結合していてもよい、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する請求の範囲第2項に記載の表面露出タンパク質の免疫原性またはIgD結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いてIgDを検出する方法。

40

【請求項45】

場合により標識されていたり及び/またはマトリックスに結合していてもよい、膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する請求の範囲第3項のモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、または前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体の免疫原性またはIgD結合断片を用いてIgDを検出する請求の範囲第44項に記載の方法。

【請求項46】

場合によりマトリックスに結合していてもよい、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力

50

を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはI g D結合断片を用いてI g Dを分離する方法。

【請求項47】

場合によりマトリックスに結合していてもよい、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有する請求の範囲第2項の表面露出タンパク質の免疫原性またはI g D結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いてI g Dを分離する方法。

【請求項48】

場合により標識されていたり及び/またはマトリックスに結合していてもよい、膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有する請求の範囲第3項に記載のモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、または前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体の免疫原性またはI g D結合断片を用いてI g Dを分離する請求の範囲第47項に記載の方法。 10

【請求項49】

配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはI g D結合断片の単離方法であって、

a) 任意にEDTAの存在下で双イオン性またはノニオン性界面活性剤を添加することによりモラクセラ・カタラーリスの懸濁液を抽出するステップ、 20

b) ステップa)からのモラクセラ・カタラーリスのI g D結合タンパク質を含む抽出物を吸着カラムにかけるステップ、

c) I g D結合タンパク質を溶離するステップ、及び

d) I g D結合タンパク質を分離するステップ

を含むことを特徴する前記方法。

【請求項50】

界面活性剤がエンピゲン(登録商標)、n-オクチル-D-グルコシド及びトリトンX-100+0.01M EDTAからなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第49項に記載の方法。 30

【請求項51】

ステップa)における界面活性剤の濃度が0.1~5%、好ましくは約3%であることを特徴とする請求の範囲第49項または第50項に記載の方法。

【請求項52】

血液からI g Dを除去するために前記血液を請求の範囲第1項に記載の表面露出タンパク質または請求の範囲第2項または第3項に記載のその断片を含む材料中に体外循環させることを特徴とする自己免疫疾患の治療方法。

【請求項53】

配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはI g D結合断片の免疫原性部分に特異的であることを特徴とする精製抗体。 40

【請求項54】

膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有する請求の範囲第3項に記載の免疫原性またはI g D結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体に特異的であることを特徴とする請求の範囲第48項に記載の精製抗体。

【請求項55】

赤血球及び上皮細胞に結合する能力を有している請求の範囲第5項に記載の免疫原性または接着性断片に特異的であることを特徴とする請求の範囲第48項に記載の精製抗体。 50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*) 中で検出され得、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質、前記表面露出タンパク質の免疫原性またはIgD結合断片、及び前記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片に関する。

【背景技術】

【0002】

モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*) は、長年気道において比較的無害な片利共生生物と見做されてきたグラム陰性双球菌である。現在、モラクセラ・カタラーリスは中耳炎の原因の中で3番目に多く、肺疾患を患っている成人における副鼻腔炎及び下気道感染の重大な原因菌でもある。モラクセラ・カタラーリスは健康な小児の咽頭の最も一般的な常住菌の1つでもある。

【0003】

20年前、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) 及びモラクセラ・カタラーリスは可溶性及び表面結合ヒトIgDに対して強いアフィニティーを示すことが判明した(1)。IgD-結合は、インフルエンザ菌及びモラクセラ・カタラーリスによるヒトリンパ球に対する強い分裂促進効果を説明する現象である表面結合IgDとの類似相互作用に細胞レベルで類似しているようである(2-4)。インフルエンザ菌からのIgD結合外膜タンパク質(タンパク質D)を分離し、クローン化し、重要な病原性因子であることが分かった(5)。しかしながら、タンパク質Dは試験したIgDミエローマの大部分に結合せず、血清型bのカプセル化インフルエンザ菌は別のIgD受容体を発現することが示唆された(6)。

【0004】

初期の研究では、多種多様なモラクセラ単離物コレクション由来の外膜タンパク質(OMP)が高度の類似性を示すことが立証された(7)。研究者たちの研究の主眼は特定群のタンパク質に向けられていた。最近の研究では、Us p AまたはHMW-OMPと称される高分子量表面抗原が実際には2種のタンパク質から構成されていることが立証された。これらのタンパク質はUs p A 1及びUs p A 2と名付けられている(8, 9, 10)。上記OMPの見かけ分子量はSDS-PAGE分析で測定して250kDa以上である。ギ酸で還元すると、約120~140kDaのバンドが生じたことから、Us p Aタンパク質が数個のモノマーサブユニットから構成されるオリゴマー複合体を形成していることが示唆された(11)。クローン化遺伝子から推定して各タンパク質の推定分子量はUs p A 1及びUs p A 2のそれぞれについて88kDa及び62kDaである。推定分子量及びSDS-PAGEを用いて測定した分子量の違いは予想される渦巻状コイル構造に起因すると考えられる(9)。

【0005】

最近の特許文献では、約200kDaの分子量を有するモラクセラ・カタラーリスの外膜タンパク質が単離された(12)。約200kDaのタンパク質をコードする配列も提供された。前記タンパク質は免疫原性であることが分かったが、それ以上の生物学的機能は記載されていなかった。更に、200kDaのタンパク質は赤血球凝集モラクセラ・カタラーリスと関連している(13, 14)。

【0006】

Co p Bは、中程度の抗原保存を示す80kDa表面露出主要OMPである。更に、OMP C Dは多数の表面露出エピトープを有する46kDa高保存タンパク質であり、OMP Eは各種の異種株で検出される47kDaタンパク質である。ラクトフェリン結合(L b p A及びB)及びトランスフェリン結合(T b p A及びB)タンパク質はそれぞれ99~111kDa及び74~105kDaの分子サイズを有する。

10

20

30

40

50

【0007】

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) のある株は、いずれも食中毒及びトキシンショック症候群 (TSS) に関連するトキシンショック症候群トキシン-1 (TSST-1)、ブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA)、SEB及びSECのような免疫刺激エキソトキシンを生ずる。これらのエキソトキシンはTリンパ球を高頻度で活性化する能力を有するためにスーパー抗原 (SAg) と呼ばれてきた。SAgは未プロセスタンパク質としてAPC上のHLAクラスII分子に結合し、特定のTCr V鎖を発現するT細胞をオリゴクローンのに活性化する。過剰量のSAgをインビボで接触させると、強いサイトカインが産生し、トキシックショック様症候群に関連するIL-2、TNF-及びINF-が含まれる。

10

【0008】

1966年に免疫グロブリン結合細菌タンパク質の黄色ブドウ球菌タンパク質A (SpA) が初めて発見されて以来、このタンパク質の性質が徹底的に調べられた。SpAがIgGのFc部分に結合する能力は公知であるが、SpAは特定重鎖の可変領域との相互作用を表す所謂“選択的”結合のためにすべてのクラスのIgG分子のフラクションにも結合する。黄色ブドウ球菌のすべてのIgG結合能力はSpAにより媒介されると考えられてきた。しかしながら、黄色ブドウ球菌中にIg結合タンパク質をコードする第2遺伝子の存在も報告された。

【0009】

化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyrogenes*) 及びペプトストレプトコッカス・マグヌス (*Peptostreptococcus magnus*) はIg結合細菌の他の例である。化膿連鎖球菌はタンパク質のMファミリーに属するタンパク質Hを産生し、IgGのFc領域に対して強いアフィニティーを有する。幾つかの株が発現するタンパク質はIgGではなくIgAに結合するかまたはIgGとIgAの両方に結合する。タンパク質BacまたはB-抗原はグループBストレプトコッカスのある株が発現するIgA結合タンパク質である。最後に、ペプトストレプトコッカス・マグヌスはIg軽鎖、特に軽鎖に対して高く特異的なアフィニティーを示し、よってすべてのクラスのIgと相互作用するタンパク質Lを発現する。

20

【0010】

IgDは可溶性形態及び免疫結合形態の両方で存在するユニークな免疫グロブリンである。いずれの形態も同一遺伝子によりコードされ、スプライシング産物である。すべての成熟Bリンパ球は膜結合IgD及びIgMから構成されるB細胞受容体 (BCR) を有する。可溶性IgDは血清Igの全量の約0.25%を占める。IgDの主要な機能は、B細胞漸増及び急速アフィニティー成熟を最適化するためにB細胞上に抗原受容体として存在すると見られる。抗原はエンドサイトーシスによりIgDを介して吸収された後細胞内劣化及びT細胞に対するMHCクラスIIでの提示が生じ、よって活性化され、サイトカインを産生する。多数のサイトカイン (例えば、インターロイキン-4) 及び同時刺激分子 (例えば、CD28) を含めたT細胞ヘルプが得られる。

30

【0011】

マクロファージ、樹枝細胞及びB細胞はすべてTリンパ球に対する抗原を提示し得るが、B細胞は表面上の抗原提示免疫グロブリンの重要性のために100倍以上有効である。免疫化を増強するための魅力的な方法はB細胞受容体に対して抗原を直接標的することである。抗-IgDモノクローナル抗体にコンジュゲートさせたウシ血清アルブミン (BSA) に対するマウス抗体応答は抗体なしにBSAを投与したときに比して100倍強いことは以前判明している。同時に、マウスミエローマ抗原を表面結合IgDに標的させた抗-IgD抗体の定常領域に導入すると、MHCクラスII上での抗原提示は最高100倍有効となる (15)。

40

【0012】

追加のT細胞ヘルプなしにIgD BCRによりB細胞を活性化することにより、実験的に耐性を誘導し得る。B細胞アネルギーを誘導することにより自己免疫疾患を治療するこ

50

と、よって自己抗体の産生を抑制することも可能であろう。実際、デキストラン結合抗-IgD抗体を投与したSLE傾向マウスは自己免疫の遅い発現を示す。別の研究で、IgDを介するB細胞活性化はTヘルパー2誘導IgE応答を低下させることが判明し、このことから重篤なアレルギー患者における抗体応答をTh2応答からTh1応答へ変更することによりIgE産生を低下させる治療が示唆された。B細胞受容体IgDに対して抗原を標的することにより、刺激、トランス及びIgE産生からの切り替えが達成され得る。加えて、ポリクローナル活性化が報告された。結果は使用する実験モデルに依存する。各種反復IgD-結合セグメントを含めた各種構築物により、応答を調節することができる。

【0013】

腫瘍特異性抗原を認識するので、T細胞は抗腫瘍応答において重大な役割を果たす。しかしながら、全身免疫抑制のためにガン患者では重要なT細胞は通常弱い活性を示す。従って、Tヘルパー細胞のトリガーは非常に有効であろう。抗原提示細胞(APC)を用いる腫瘍に対するワクチン接種が最近認められている(17)。エキソピボで腫瘍抗原(ペプチド)をパルスしたAPCを用いる免疫化プロトコルが細胞毒性T細胞に対する有効なMHCクラスI提示を誘導することが判明している。また、EBV形質転換したB細胞は腫瘍浸潤リンパ球(TLC)に対するメラノーマ抗原を提示し得ることも立証された。実験モデルでは、B細胞上に豊富にある受容体のMHCクラスII及びB7表面分子をトランスフェクトした腫瘍細胞は腫瘍ワクチン接種のための実行可能なアプローチであろうことも分かった。驚くことに、対応細胞株からの腫瘍ライゼートをパルスしたB細胞を注射したB16メラノーマ担持マウスはIFN- γ 産生T細胞が増加するために長い生存を示した。誘導したTヘルパー細胞は充実性腫瘍に対してより強い細胞毒性応答を示したことも立証された。IgDに標的したミエローマ抗原はT細胞応答を誘発するので、特定腫瘍抗原にコンジュゲートしたIgD結合細菌タンパク質を用いる示唆されているアプローチは実行可能であろう。

【0014】

体液及び細胞免疫応答をトリガーすべく抗原(例えば、微生物または特定腫瘍から誘導したペプチド)をIgD担持B細胞に標的するためには、IgD結合タンパク質またはより短いIgD結合ペプチドが非常に有用なベクターであろう。同様のアプローチ手段を有する有効な戦略の例は幾つか存在する。抗-IgDモノクローナル抗体にコンジュゲートしたウシ血清アルブミン(BSA)に対するマウスの体液性免疫応答は、BSAを単独で投与したときに比較して100倍強い。最近のLundeらの文献(15)には、ミエローマ誘導ペプチドを抗-IgD Fab'断片の定常領域に取り込み、マウスに注入したとき問題の抗原に対する抗原提示は1,000倍以上効率的であることが記載されている(15)。また、コレラ毒素に融合した黄色ブドウ球菌タンパク質AのIg結合断片はコレラ毒素に対する全身及び粘膜免疫応答を10~100倍増加させる(16)。最後に、実験的に十分に規定されたB16メラノーマからなるマウス腫瘍モデルでは、エキソピボで腫瘍組織から誘導したペプチドをパルスした活性化Bリンパ球はインピボでより強い抗腫瘍応答を惹起し得、その結果生存を延長させ得る(17)。

【発明の開示】

【0015】

1つの態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*)中で検出され得、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性またはIgD結合断片、または前記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片に関する。

【0016】

別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得、膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性またはIgD

10

20

30

40

50

結合断片、またはその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体に関する。

【0017】

更なる態様で、本発明は、配列番号10に記載されているアミノ酸配列を有する上記免疫原性またはIgD結合断片に関する。

【0018】

更なる態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得、赤血球及び上皮細胞に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片に関する。

【0019】

更なる態様で、本発明は、配列番号8に記載されているアミノ酸配列を有する上記免疫原性接着性断片に関する。

10

【0020】

1つの態様で、本発明は、配列番号2に記載されており、上記のモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質をコードするDNA配列、または前記DNA配列の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を含むDNAセグメントに関する。

【0021】

別の態様で、本発明は、上記免疫原性またはIgD結合断片をコードするDNA配列を含むDNAセグメントに関する。

【0022】

更なる態様で、本発明は、配列番号11に記載されており、上記免疫原性またはIgD結合断片をコードするDNA配列を含むDNAセグメントに関する。

20

【0023】

更なる態様で、本発明は、上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片をコードするDNA配列を含むDNAセグメントに関する。

【0024】

更なる態様で、本発明は、配列番号9に記載されており、上記免疫原性接着性断片をコードするDNA配列を含むDNAセグメントに関する。

【0025】

更なる態様で、本発明は、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性またはIgD結合断片、または前記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片を含むワクチンに関する。

30

【0026】

更なる態様で、本発明は、膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質の免疫原性またはIgD結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を含むワクチン、好ましくは配列番号10に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性またはIgD結合断片を含むワクチンに関する。

【0027】

更に別の態様で、本発明は、上記モラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片を含むワクチン、好ましくは配列番号8に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性接着性断片を含むワクチンに関する。

40

【0028】

1つの好ましい実施態様では上記ワクチンは別のワクチンと組み合わせられ、別の好ましい実施態様では上記ワクチンは別の分子の免疫原性部分と組み合わせられる。

【0029】

1つの態様で、本発明は、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性IgDに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはIgD結合断片をコードするD

50

N A 配列を含むプラスミドまたはファージに関する。

【0030】

別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする D N A 配列を含むプラスミドまたはファージ、好ましくは配列番号 10 に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性または I g D 結合断片をコードする D N A 配列を含むプラスミドまたはファージに関する。

【0031】

更に別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする D N A 配列を含むプラスミドまたはファージ、好ましくは配列番号 8 に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性接着性断片をコードする D N A 配列を含むプラスミドまたはファージに関する。

10

【0032】

更に別の態様で、本発明は、上記したプラスミドまたはファージの少なくとも 1 つを含み、前記タンパク質または変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片、または前記タンパク質の免疫原性接着性断片を産生し得る細菌、酵母及び植物から選択される非ヒト宿主に関する。1 つの実施態様で、宿主は大腸菌である。

20

【0033】

1 つの態様で、本発明は、配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列、200 k D a の見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片をコードする D N A 配列を別の遺伝子に融合して含む組換え D N A 分子に関する。

【0034】

別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、またはその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする D N A 配列を別の遺伝子に融合して含む組換え D N A 分子、好ましくは配列番号 10 に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性または I g D 結合断片をコードする D N A 配列を含む組換え D N A 分子に関する。

30

【0035】

更に別の態様で、本発明は、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体をコードする D N A 配列を別の遺伝子に融合して含む組換え D N A 分子、好ましくは配列番号 8 に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性接着性断片をコードする D N A 配列を含む組換え D N A 分子に関する。

40

【0036】

更に別の態様で、本発明は上記融合 D N A 配列を含むプラスミドまたはファージに関する。

【0037】

更なる態様で、本発明は、上記プラスミドまたはファージの少なくとも 1 つを含み、細菌、酵母及び植物から選択される非ヒト宿主に関する。1 つの実施態様で、宿主は大腸菌である。

【0038】

1 つの態様で、本発明は、配列番号 1 に記載されているアミノ酸配列、200 k D a の見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・

50

カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはI g D結合断片が上記した組換えDNA分子を用いて別のタンパク質と組み合わされている融合タンパク質またはポリペプチドに関する。

【0039】

更なる態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得、膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質の免疫原性またはI g D結合断片、またはその天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が上記組換えDNA分子を用いて別のタンパク質と組み合わされている融合タンパク質またはポリペプチドに関する。

10

【0040】

更に別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を上記組換えDNA分子を用いて別のタンパク質と組み合わされている融合タンパク質またはポリペプチドに関する。

【0041】

更に別の態様で、本発明は、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはI g D結合断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合している融合産物に関する。

20

【0042】

更なる態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質の免疫原性またはI g D結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合している融合産物に関する。

【0043】

更に別の態様で、本発明は、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ赤血球及び上皮細胞に選択的に結合する能力を有する上記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合している融合産物に関する。好ましい融合産物では、配列番号10に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性またはI g D結合断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合している。好ましい融合産物では、配列番号8に記載されているアミノ酸配列を有する免疫原性接着性断片が共有結合によるかまたは他の手段によりタンパク質、炭水化物またはマトリックスに結合している。

30

【0044】

1つの態様で、本発明は、場合により標識されている及び/またはマトリックスに結合していてもよい、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性またはI g D結合断片を用いてI g Dを検出する方法に関する。

40

【0045】

更なる態様で、本発明は、場合により標識されている及び/またはマトリックスに結合していてもよい、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性I g Dに選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質の免疫原性またはI g D結合断片、

50

前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いて I g D を検出する方法に関する。

【0046】

別の態様で、本発明は、場合により標識されている及び/またはマトリックスに結合していてもよい、配列番号10に記載されているアミノ酸配列及び膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いて I g D を検出する方法に関する。

【0047】

更なる態様で、本発明は、場合によりマトリックスに結合していてもよい、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片を用いて I g D を分離する方法に関する。

【0048】

更に別の態様で、本発明は、場合によりマトリックスに結合していてもよい、モラクセラ・カタラーリス中で検出され得且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いて I g D を分離する方法に関する。

【0049】

別の態様で、本発明は、場合により標識されているか及び/またはマトリックスに結合していてもよい、配列番号10に記載されているアミノ酸配列且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体を用いて I g D を分離する方法に関する。

【0050】

1つの態様で、本発明は、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、前記タンパク質の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片の単離方法に関する。前記方法は、

- a) 任意に EDTA の存在下で双イオン性またはノニオン性界面活性剤を添加することによりモラクセラ・カタラーリスの懸濁液を抽出するステップ、
 - b) ステップ a) からのモラクセラ・カタラーリスの I g D 結合タンパク質を含む抽出物を吸着カラムにかけるステップ、
 - c) I g D 結合タンパク質を溶離させるステップ、及び
 - d) I g D 結合タンパク質を分離させるステップ
- を含む。

【0051】

別の実施態様で、ステップ a) における界面活性剤の濃度が 0.1 ~ 5%、好ましくは 3% である。

【0052】

更に別の態様で、本発明は、血液から I g D を除去するために前記血液を上記表面露出タンパク質またはその上記断片を含む材料中に体外循環させることを含む自己免疫疾患の治療方法に関する。

【0053】

1つの態様で、本発明は、配列番号1に記載されているアミノ酸配列、200kDaの見かけ分子量且つ膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有するモラクセラ・カタラーリスの表面露出タンパク質、その天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体、または前記タンパク質または変異体の免疫原性または I g D 結合断片の免疫原性断片

に特異的な精製抗体に関する。

【0054】

別の態様で、本発明は、膜結合または可溶性 I g D に選択的に結合する能力を有する上記免疫原性または I g D 結合断片、または前記断片の天然に存在するかまたは人工的に修飾した変異体に特異的である上記精製抗体に関する。

【0055】

更に別の態様で、本発明は、上記免疫原性または接着性断片に対して特異的であり、赤血球及び上皮細胞に結合する能力を有する上記精製抗体に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0056】

M I D は、既に十分に特性づけられているモラクセラ・カタラーリスの外膜タンパク質とは同一でない。M I D は U s p A または C o p B 外膜抗原に対するモノクローナル抗体により認識されない。M I D はまた、S D S - P A G E において異なる移動パターンを有し、アミノ酸及び D N A 配列分析により示すように異なる組成を有している。M I D は推定アミノ酸配列からの M w に相当する 200 k D a バンドとして現れるが、1,000 k D a 以上の推定分子量を有するエキストラバンドとしても現れる。エキストラバンドは、天然 M I D が U s p A と同様にオリゴマー複合体であることを示している(11)。このことは、S e p h a c r y l S - 400 カラムからのボイド容量の直後に M I D が最高 8,000 k D a の分画範囲で溶離されるという事実によっても更に裏付けられる。M I D のアミノ酸配列はモラクセラ・カタラーリス由来の U S P A 1 及び U S P A 2 外膜タンパク質とそれぞれ 11.1%、6.7% との同一性を示す(図7)。

【0057】

最近の特許文献で、約 200 k D a の分子量を有するモラクセラ・カタラーリスの外膜タンパク質が単離された(12)。約 200 k D a のタンパク質をコードする配列も提供された。しかしながら、前記タンパク質配列は本出願人が提示した配列とは同一でなく、M I D との同一性は 45.9 ~ 54.4% でしかなかった(図7)。タンパク質が免疫原性であることは分かったが、更なる生物学的機能は明らかにされていない。更に、200 k D a のタンパク質は赤血球凝集モラクセラ・カタラーリスに関連している(13, 14)。

【実施例】

【0058】

ヒト I g D に対してアフィニティーを有するモラクセラ・カタラーリスの M I D と呼ばれる新規な I g D 結合タンパク質、前記表面露出タンパク質の免疫原性または I g D 結合断片、及び前記表面露出タンパク質の免疫原性接着性断片の単離、精製、性質決定、クローニング及び発現について調べる。

【0059】

(材料及び方法)

細菌及びプラスミド

モラクセラ・カタラーリス菌株 B c 5 は本発明者らの部門の鼻咽頭スワブ培養物からの臨床単離物である。血液、鼻咽喉及び痰から単離した 118 個の株をスウェーデン国、デンマーク国、フィンランド国、ハンガリー国、日本国及び米国から入手した。発現のために使用した配列決定した株及びプラスミドを表 I に示す。

【0060】

【表1】

10

20

30

40

表I
本研究で使用した細菌株及びプラスミド

細菌株または プラスミド	詳細 (単離場所)	文献またはソース
<u>細胞株</u>		
DH5 α	大腸菌	Novagen
BL21DE3	大腸菌	Novagen
BBH17	モラクセラ・カタール (痰)	Christensen(デンマーク)
Bc5	モラクセラ・カタール (鼻咽頭)	臨床微生物部 (スウェーデン, マルメ)
NCTC 4103	モラクセラ・カタール (鼻咽頭)	CCUG (スウェーデン, ゴーセンハーグ)
RH1	モラクセラ・カタール(血液)	Christensen(デンマーク)
RH4	モラクセラ・カタール(血液)	Christensen(デンマーク)
<u>プラスミド</u>		
pET16(b)	発現ベクター	Novagen
pET16-MID	midのORFを有 するPET16(b)	本研究

10

20

【0061】

細菌を栄養ブイヨン(英国ベーシングストーク - ハンプシャーに所在のOxoid)において一晚増殖させ、収集し、リン酸緩衝食塩液(PBS, pH7.2)において遠心することにより洗浄した。

【0062】

免疫グロブリン、血清及び他のタンパク質

Ig調製物のIgG1()、IgG1()、IgG2()、IgG2()、IgG3()、IgG3()、IgG4()、IgG4()、IgA1()、IgA1()、IgA2()、IgA2()、IgM()、IgM()、IgD()、IgD()及びIgE()はすべてヒト起源であり、英国パーミンガムに所在のThe Binding Siteから購入した。IgDミエローマ血清IgD()及びIgD()は同一会社から購入し、IgD標準血清OTRD 02/03はドイツ国マールブルクに所在のBohringwerke AGから購入した。ミエローマ血清IgD()A、IgD()B、IgGA、IgGB、IgGC、IgM、IgAA及びIgABはスウェーデン国マルメに所在のDepartment of Clinical Chemistryから入手した。各免疫グロブリンの濃度は製造業者に従った。

30

40

【0063】

抗体

ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合ヤギ抗 - ヒトIgDはカリフォルニア州カマリロに所在のBiosourceから入手した。フルオレセインイソチオシアネート(FITC)結合マウス抗 - ヒトIgD、非標識家兔抗 - ヒトIgD及びHRP標識家兔抗 - マウスIgはデンマーク国ゲントフテに所在のDakopattsから購入した。ヤギ抗 - ヒトIgD及びHRP結合家兔抗 - ヒト多価免疫グロブリンはミズーリ州セントルイトに所在のSigmaから入手した。フィコエリトリン(RPE)結合マウス抗 - ヒトCD3及びCD19はカリフォルニア州サンノゼに所在のBecton Dickinsonから入手した。マウスモノクローナル抗体17C7(UspsA)及び10F3(

50

C o p B) はテキサス州ダラスに所在のテキサス大学の微生物部門の E r i c J . H a n s e n 博士から好意により提供された。

【 0 0 6 4 】

抗血清

フロイント完全アジュバンド (D i f c o , ドイツ国ハイデルベルクに所在の B e c t o n D i c k i n s o n) 中に乳化させた 2 0 0 μ g の精製 M I D (F o r s g r e n ら , 2 0 0 1) 、 組換え M I D 断片または組換え U s p A 1 を家兎に筋肉注射して免疫化した後 1 8 日目と 3 6 日目にフロイント不完全アジュバンド中の同一用量のタンパク質を用いて追加免疫した。2 ~ 3 週後に採血した。ウェスタンブロット検査から、抗 - U s p A 1 ポリクローナル抗体は組換え U s p A 1 及び U s p A 2 の両方と反応した。

10

【 0 0 6 5 】

S D S - P A G E 及び膜でのタンパク質の検出 (ウェスタンブロット)

S D S - P A G E を、1 0 % B i s - T r i s ゲル、ランニング (M E S) 、 サンプル (L D S) 及び移動緩衝液からなる市販の電気泳動システムを用い、ブロッティング装置 (カリフォルニア州サンジェゴに所在の N o v e x) を用いて実施した。簡単に説明すると、サンプルを 1 0 分間煮沸した後、室温においてタンパク質 I I 垂直スラブ電気泳動セル (N o v e x) を用いて 1 5 0 定電圧下で電気泳動した。ゲルをクーマシーブリリアントブルー R - 2 5 0 (スウェーデン国スンドビーベリーに所在の B i o - R a d) で染色した。更に、タンパク質バンドのゲルから I m m o b i l o n - P 膜 (マサチューセッツ州ベッドフォードに所在の M i l l i p o r e) への電気泳動移動を 3 0 V で 2 ~ 3 時間実施した。移動後、I m m o b i l o n - P 膜を 5 % 粉ミルク含有 0 . 0 5 % ツイーン 2 0 を添加した P B S (P B S - ツイーン) でブロックした。P B S - ツイーンで数回洗浄した後、膜を室温において 2 % 粉ミルク含有 P B S - ツイーン中で精製 I g D ミエローマタンパク質 (0 . 5 μ g / m l , h u I g D () ミエローマ ; 英国バーミングガムに所在の T h e B i n d i n g s i t e) とインキュベートした。P B S - ツイーンで数回洗浄後同一緩衝液で 1 / 1 0 0 0 希釈した H R P 結合ヤギ抗 - ヒト I g D を添加した。幾つかの実験では、I g D ミエローマタンパク質の代わりに他の免疫グロブリンクラスのミエローマタンパク質を用い、第 2 層として H R P 標識抗 - ヒト多価免疫グロブリン (S i g m a) を用いた。モラクセラ外膜タンパク質 U s p A 1 、 2 及び C o p B を検出するためにそれぞれマウス m A b 1 7 C 7 及び 1 0 F 3 を用いた (7 , 8) 。これらの実験では、第 2 層として H R P 標識家兎抗 - マウス免疫グロブリンを用いた。室温で 4 0 分間インキュベートし、P B S - ツイーンを用いて更に数回洗浄した後、E C L ウェスタンブロットティング検出試薬 (スウェーデン国ウブサラに所在の A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) を用いて展開した。ウェスタンブロットを P e r s o n a l M o l e c u l a r I m a g e r F X (B i o - R a d) を用いて分析した。

20

30

【 0 0 6 6 】

酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)

E L I S A を用いて免疫グロブリン D - 結合タンパク質を定量した。0 . 1 M トリス H C l (p H 9 . 0) で 5 倍数希釈したモラクセラ・カタラーリス抽出物を 1 0 0 μ l 容量で微量滴定プレート (F 9 6 M a x i s o r b , デンマーク国ロスキレに所在の N u n c - I m m u n o m o d u l e) に添加した。このプレートを密封し、4 で一晩インキュベートした。プレートを P B S - ツイーンで 4 回洗浄した後、ブロッキング緩衝液として 1 . 5 % オボアルブミン含有 P B S - ツイーンを添加した。プレートを室温で 1 時間インキュベートし、更に P B S - ツイーンで 4 回洗浄した。各ウェルに 1 . 5 % オボアルブミン含有 P B S - ツイーン 1 0 0 μ l 中に 0 . 0 5 μ g の I g D () ミエローマタンパク質を添加し、室温で 1 時間インキュベートした後プレートを P B S - ツイーンで 4 回洗浄した。同一緩衝液で 1 / 1 0 0 0 希釈した H R P 結合ヤギ抗 - ヒト I g D と 1 時間インキュベートし、その後 P B S - ツイーンで洗浄した後、過酸化水素 (最終濃度 0 . 0 0 2 %) と混合した 0 . 1 M クエン酸カリウム溶液 (p H 4 . 2 5) 中テトラメチルベン

40

50

ジジン (20 mM) を添加した。30 分後、2 M 硫酸を添加して酵素反応を停止した。次いで、光学密度 (OD) を自動 ELISA リーダー (Multiskan Plus, フィンランド国に所在の Labsystems) を用いて 450 nm で測定した。

【0067】

ドットプロットアッセイ

0.1 M トリス-HCl (pH 9.0) 中の精製 MID (0.0005 ~ 0.2 μg) を 100 μl の容量でドットプロット装置 (ドイツ国デセルに所在の Schleicher & Schuell) を用いてニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell) に手で加えた。飽和後、膜を室温において 1% オボアルブミン及び 5% 粉ミルク含有 PBS-ツイーン中で 2 時間インキュベートし、PBS-ツイーンで 4 回洗淨した。PBS-ツイーン (100 μl) 中のヒトミエローマタンパク質 (0.5 μg) を添加し、2 時間インキュベートし、PBS-ツイーンで数回洗淨した後、1/200 希釈した HRP 標識抗-ヒト軽鎖 (及び) (Dakopatts) を第 2 抗体として使用した。ウェスタンプロットについて上記したように展開した。別の実験では、まず 0.1 M トリス-HCl (pH 9.0) 中のヒトミエローマ血清の希釈物を 100 μl の容量で膜に適用した。飽和後、インキュベーションステップ、ブロッキングステップ及び洗淨ステップを上記したように実施した。その後、PBS-ツイーン中の [¹²⁵I] 標識タンパク質 MID プロブ (5 ~ 10 × 10⁵ cpm/ml) を添加した。一晚インキュベートした後、膜を PBS-ツイーンで 4 回洗淨し、風乾し、-70 °C においてコダック X-Omat レギュラー増感スクリーン (ニューヨーク州ロチェスターに所在の Eastman Kodak) を用いてコダック CE A.C X 線フィルムに露出させた。

【0068】

IgD 結合タンパク質の抽出

モラクセラ・カタラーリス (1 ~ 5 × 10¹¹ コロニー形成単位 (cfu) / ml) を 0.1 ~ 5% Empigen (マサチューセッツ州ベッドフォードに所在の Calbiochem Novabiochem) 含有 0.05 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.8) に懸濁させた。幾つかの実験では、Empigen の代わりに CHAPS (Sigma)、n-オクチル-p-D-グルコシド (スイス国ブーベンドルフに所在の Bachem) またはトリトン X-100 (Sigma) を用いた。いずれの界面活性剤も 0.1 ~ 5% で場合により 0.01 M EDTA と共に試験した。細菌懸濁液を 37 °C において 2 時間磁気攪拌して混合した。4 °C において 8000 × g で 20 分間遠心後、上清を滅菌フィルター (0.45 μm; Millipore の Sterivex-HV) を用いて濾過した。

【0069】

IgD 結合タンパク質の精製

3% Empigen (登録商標) 中のモラクセラ・カタラーリス抽出物を、0.1% Empigen (登録商標) 含有 0.05 M トリス-HCl (pH 8.8) で平衡化した Q-セファロースカラム (Amersham Pharmacia Biotech) に適用した。カラムを同一緩衝液中 0.1 M NaCl の直線勾配を用いて溶離させた。ELISA 及びウェスタンプロットで検出して多くの IgD 結合活性を示すフラクションをプールし、Spectraphor 膜チューブ (分子量カットオフ 25,000; カリフォルニア州ラグーナヒルズに所在の Spectrum) を用いて 0.05 M トリス-HCl (pH 8.8) に対して透析し、YM100 ディスク膜 (分子量カットオフ 100,000; マサチューセッツ州ピバリーに所在の Amicon) 上で濃縮した後ゲルクロマトグラフィーにかけた。IgD 結合タンパク質のゲル濾過を、0.1% Empigen (登録商標) 含有 0.05 M トリス-HCl (pH 8.8) で平衡化した Sephacryl S-400 高解像カラム (20 × 900 mm; Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実施した。最高の IgD 結合活性を含むフラクションを上記したように濃縮し、再度クロマトグラフィーにかけた。

【0070】

ペプチド開裂及びアミノ酸配列分析

0.1% Emphigen (登録商標) 含有 0.05 M トリス-HCl (pH 8.8) 中の精製 MID を 37 において 1:10 の酵素/タンパク質比でトリプシンまたはキモトリプシンで一晩処理した。開裂混合物を SDS-PAGE に向け、Immobilon 膜に移したペプチドバンドを自動的に配列決定したり、上記したウェスタンブロット分析にかけた。タンパク質の N 末端配列を得るために、無傷の MID を存在し得るピログルタメート基から脱ブロックするように試みた。2つの異なるプロトコルを使用して可溶性タンパク質及び膜結合タンパク質の両方を脱ブロックした。Applied Biosystems (カリフォルニア州フォスターシティ) 470A 気液固相シーケンサーを用いて自動化アミノ酸配列分析を実施し、遊離したアミノ酸フェニルチオヒダントイン誘導体を Applied Biosystems モデル 120A PTHアナライザを用いてオンライン検出した。

10

【0071】

タンパク質 MID の標識

精製 MID をラクトペルオキシダーゼを用いて高比活性まで放射性ヨウ素化した ($[^{125}\text{I}]$; 英国バッキンガムシャーに所在の Amersham)。調製物はタンパク質 1 モルあたり約 0.05 モルのヨウ素を含んでいた。標準プロトコルを用いて精製 MID に FITC (Sigma) をコンジュゲートさせた。簡単に説明すると、0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) 中の MID (2 mg/ml) を DMSO 中で可溶化した 0.15 $\mu\text{g/ml}$ の FITC とインキュベートした。室温で 45 分間一定攪拌した後、サンプルを希釈し、PBS (pH 7.4) で予め平衡した pD10 カラム (Pharmacia Biotech) にかけた。生じた MID-FITC を結合研究のために使用した。

20

【0072】

DNA 単離及び配列決定

ゲノム DNA を表 I に示す 5 つのモラクセラ・カタラーリス株からゲノム DNA 作成キット (ドイツ国ヒルデンに所在の Qiagen) を用いて抽出した後、PCR による MID 遺伝子の増幅のための鋳型として使用した。4 つのペプチド断片のアミノ末端配列に従って縮重プライマーを合成した (表 II)。

【0073】

【表 2】

30

表 II

プロテアーゼ消化後の十分精製した MID 由来のアミノ酸配列

ペプチド配列	プロテアーゼ
TAQANTESSIAVG	トリプシン
GNTATNFSVNSGDDNALIN	トリプシン
QGINEDNAFVKGLEK	トリプシン
PSTVKADN	キモトリプシン

40

【0074】

幾つかの PCR 反応 (高適合度 PCR システム; スウェーデン国ブロンマに所在の Roche) では、特定プライマーを上記した縮重プライマーと一緒に使用した。ペプチド断片の起源である遺伝子の中心領域に隣接する DNA 配列を逆 PCR (IPCR) を用いて単離した。簡単に説明すると、ゲノム DNA を以下の制限酵素を別々に用いて開裂した。スタートコドン単離のために EcoRV、SphI 及び PstI、ストップコドン配列を単離するために AccI、AsuI、最後に HincII。生じた断片をそれぞれ自体に再結紮し (Roche の迅速 DNA 結紮キット)、DNA を IPCR に用いた。遺伝子のスタート及びストップコドン領域を増幅させるために、特定プライマーを設計し、長鋳型 PCR (LTPCR) (Roche の拡張長鋳型 PCR システム) で使用した。すべての P

50

CR産物をpPCR-Script-Amp(カリフォルニア州ラホヤに所在のStratagene)にクローン化し、Big Dye Cycle Sequencing Ready Reactionキット(英国ウォリントンに所在のApplied Biosystems)を用いて再度配列決定した。ゲノムDNAを増幅させるためのプライマーをオリゴプライマー分析ソフトウェア(Molecular Biology Insights, Cascade, Co)を用いて設計した。シグナルペプチドを、生物学的配列分析のためのシグナルP V1.1ワールドワイドウェブ予測サーバーセンター(SignalP V1.1 World Wide Web Prediction Server Center for Biological Sequence Analysis)(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)を用いて推定した。

10

【0075】

mid遺伝子のPCR増幅

mid遺伝子の完全6.4kbオープンリーディングフレームを鋳型としてモラクセラ・カタラーリスBc5株ゲノムDNAを用いてPCRにより増幅させた。BamHI制限酵素認識配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーは5'-cgggatccgatggccgtggcggaaatagcc-3'(プライマーA,配列番号3)及び5'-cgggatccgaaaagtgaaaaacctgcaccactgctgc-3'(プライマーB,配列番号4)であり、6391塩基対のPCR産物を得た。BamHI消化インサートをpET16(b)に結紮し、生じたプラスミドpET16-MIDをDH5に形質転換した。クローン化PCR産物の両方の鎖を配列決定した。

20

【0076】

他のモラクセラ・カタラーリス株中の完全長mid遺伝子を試験するために、プライマーA及びBを用いた。更に、シグナルペプチドをコードする配列を狭めるために使用したプライマーはプライマーAまたは5'-tgtcagcatgtatcatttttttaaggtaaacccaccatg-3'(プライマーC;上部スタートコドンを検出する,配列番号5)を5'-catcaattgcgatatgtctgggatcttg-3'(プライマーD;シグナルペプチドの丁度外側の保存領域に位置する,配列番号6)であり、それぞれ192塩基対及び266塩基対の長さのPCR産物(鋳型としてBc5ゲノムDNAを用いる)を得た。更に、mid遺伝子の存在を確認するために、プライマーAまたはCを5'-cttcaccccatcagtgccatagacc-3'(プライマーE,配列番号7)を用い、それぞれ1355塩基対及び1429塩基対の長さの断片を得た。すべての反応で延長長鋳型PCRシステムを用い、条件は製造業者(スウェーデン国ブロンマに所在のRoche)が推奨する通りであった。

30

【0077】

大腸菌におけるmid遺伝子産物の発現及び細胞フラクション

mid遺伝子産物を発現させるために、pET16-MIDをlacUV5コントロール下でT7RNAポリメラーゼ遺伝子の染色体コピーを含む発現宿主BL21DE3に形質転換した。2%グルコース及びアンピシリンを補充したLB培地において組換え細菌を増殖させた。0.6のOD₆₀₀で対数成長相まで細胞を増殖させた後1mM IPIGを添加することにより過剰発現させた。4時間の誘導後、細菌を標準プロトコルに従って音波処理し、生じたタンパク質をSDS-PAGEにより分析した。

40

【0078】

pET16-MID由来の組換えタンパク質の局在化を公知の浸透圧ショックにより実施した。簡単に説明すると、誘導細胞及び非誘導細胞のプロス培養物を収集し、20%スクロース含有30mM トリス-HCl(pH8)中に再懸濁した。1mMの最終濃度となるようにEDTAを添加し、溶液を室温においてゆっくり10分間攪拌した。4において10,000gで10分間遠心した後、細胞を氷冷5mM MgSO₄中に再懸濁し、氷上で10分間攪拌した。このステップ中にペリプラズムタンパク質が緩衝液中に遊離した。ペリプラズムフラクションを含む上清を遠心により回収した。細菌を100mg/mlの最終濃度でリゾチームにより完全に溶解させた後音波処理した。最後に、可溶性細胞

50

質フラクシオン及び不溶性膜フラクシオンを回収した。

【0079】

切端MID誘導組換えタンパク質

タンパク質を作製させるための異なるサイズ及びプライマーを有する各種切端部MID断片(A~Iと称される)を図10に示す。(pET26-MID中の)モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のオープンリーディングフレーム(Forsgenera, 2001)を鋳型として使用した。MID367-590(C)を除くすべてのMID構築物を、BamHI及びHindIII制限酵素部位を導入する特定プライマーを用いてPCRにより増殖した。断片C中の内部HindIII制限酵素部位のために、3'末端にHindIIIの代わりにXhoIを用いた。MID1616-2139(I)を除くすべてのPCR産物をpET26(ウィスコンシン州マディソンに所在のNovagen)にクローン化した。断片IをコードするPCR産物をpMAL-c2(マサチューセッツ州ビバリーに所在のNew England Biolabs)にクローン化した。推定毒性を避けるために、生じたプラスミドをまず非発現宿主の大腸菌DH5に形質転換した。その後、断片A~D、G及びHをコードするプラスミドを大腸菌BL21(DE3)に形質転換し、宿主BL21(DE3)-pLysSは断片E及びFを含むベクターのために使用した。いずれの大腸菌菌株もカナマイシンの存在下でインキュベートしたのに対して、BL21(DE3)-pLysS形質転換体を使用したときにはクロラムフェニコールをも補充した。断片IはDHにおいて発現させた。細菌を中間log相まで増殖させた後1mM イソプロピル-1-チオ-D-ガラクトシド(IPTG)を導入した。3.5時間後、形質転換体を音波処理し、過剰発現タンパク質を製造業者の指示に従って精製した。ヒスチジntagを有するかまたはマルトース結合タンパク質に融合させた、得られた組換えタンパク質をそれぞれニッケルまたはアミロースを含有する樹脂を用いて精製した。溶離タンパク質の濃度をBCAタンパク質アッセイキット(Pierce)を用いて測定した。その後、組換えタンパク質をSDS-PAGE及びウェスタンブロットにより分析した。

10

20

【0080】

赤血球凝集

ヒト赤血球を採血したばかりのヘパリン処理ヒト血液から得た。赤血球をPBS(pH7.2)で2回洗浄し、最終濃度が1%となるようにPBS中に懸濁させた。栄養ブイヨクにおいて培養した細菌を遠心により収集し、洗浄し、 $1 \sim 2 \times 10^9$ / mlまでPBS中に懸濁させた。細菌及び赤血球懸濁液(それぞれ50µl)を丸底微量滴定プレート(ノースカロライナ州ニュートンに所在のSarstedt)において混合した。幾つかの実験では、赤血球をPBS(150µl)中でMID-セファロースまたはBSA-セファロースと混合した。凝集を肉眼で観察した。

30

【0081】

細胞株及び接着アッセイ

肺癌細胞株A549(II型肺胞上皮細胞; CCL-185)はATCCから入手した。細胞を、10% ウシ胎仔血清、2mM L-グルタミン及び12µg/ml ゲンタマイシンを補充したRPMI 1640培地(英国スコットランドのペーズリーに所在のGibco BRL, Life Technologies)("培地"と呼ぶ)において培養した。接着実験の前日に、細胞を収集し、ゲンタマイシン非含有RPMI 1640で2回洗浄し、ゲンタマイシン非含有培地(2.0ml)中に 1×10^4 細胞/ウェルの濃度で12ウェル組織培養プレート(デンマーク国ロスキレに所在のNunc)に添加した。その後、細胞を37、5% CO₂において一晩インキュベートした。実験日に、0.15%ゼラチン(Sigma)含有PBS中のモラクセラ・カタラーリス(約 2×10^8)を単層上に接種した。特定抗血清を用いる中和実験では、細菌を予めポリクローナル抗体(1/250希釈)とインキュベートした。4において1時間後、細菌を上皮細胞に添加した。すべての実験で、組織培養プレートを3,000gで5分間遠心し、37、5% CO₂においてインキュベートした。30分後、感染させた単層をゆっくり

40

50

振盪させながら0.15%ゼラチン含有PBSで2回洗浄して非接着細菌を除去し、トリプシン-EDTA(0.05%トリプシン, 0.5mMEDTA)で処理して単層をプラスチック支持体から遊離させた。その後、生じた細胞/細菌懸濁液を1.1%イソビタレックス、7.8%ヒト血液及び0.9%プロテオースペプトンを含む寒天プレートに接種した。2つの培地からデータを計算した。

【0082】

フローサイトメトリー分析

健康なドナーから採取したヘパリン処理血液をFicoll-Isopaque(Lymphoprep, スウェーデン国ウプサラに所在のPharmacia)の段階勾配で遠心することによりヒト末梢血リンパ球(PBL)を単離した。フローサイトメトリー分析のために、一般的な染色プロトコルをPBS緩衝液中0.5%BSA(w/v)と一緒に用いた。PBL(100 μ l中 2.5×10^5)を製造業者の指示に従って抗-CD3または抗-CD19 mAbを場合によりFITC結合抗-IgD mAbと併用して氷上で30分間標識した。ブロック実験では、リンパ球を予め抗-IgD免疫グロブリンと30分間インキュベートした。2回洗浄後、10 μ g/mlの精製FITC結合MIDを細胞に補充し、氷上で45分間インキュベートした。過剰の0.5%BSA含有PBSで4回洗浄後、各サンプルにつき 10^5 細胞をEPICS(登録商標)XL-MCLフローサイトメトリー(フロリダ州ハイアリーアに所在のCoulter)で分析した。適当ならば、家兎及びヤギ前免疫血清並びにマウスIgG1及びIgG2a(Dakopatts)をネガティブコントロールとして含めた。

10

20

【0083】

(結果)

MIDの抽出及び精製

MIDの可溶化は精製プロセスにおける大きな障害であった。ELISA及びウェスタンブロットで推定して、試験した数種の界面活性剤の中で3%の最終濃度のEmpigen(登録商標)及びn-オクチル-b-D-グルコシドのみがモラクセラ・カタラーリス懸濁液からMIDを効率的に可溶化した。2つの界面活性剤は同等に有効であった。トリトンX-100のみではMIDを可溶化しなかったが、トリトンX-100と0.01MEDTAはMIDを効率的に可溶化した。CHAPS単独、CHAPSとEDTAの組合せまたはEDTAのみではMIDを可溶化しなかった。以下の実験では、MIDの可溶化及びその後の精製のためにEmpigen(登録商標)抽出を使用した。モラクセラ・カタラーリスのEmpigen(登録商標)抽出物をQ-セファロースカラムに適用したとき、すべてのIgD結合物質が0.05Mトリス-HCl(pH8.8)中0.1%Empigen(登録商標)でカラムから溶離した。同一カラムに対して1MまでのNaCl勾配を適用してもIgD結合物質を更に溶離させることはできなかった。Q-セファロースでの分離後得られたIgD結合物質を濃縮した後、Sephacryl S-400カラムを用いて0.1%Empigen(登録商標)の存在下でゲル濾過すると抽出物が分画化した(図1)。殆どのIgD結合物質がボイド容量直後の第1ピーク中に溶離された。同一条件下で第1ピークを再クロマトグラフィーにかけることによりMIDを更に精製した。

30

40

【0084】

図2は、精製後MIDが2つのバンドとして現れたことを示している。第1は200kDaのバンドであり、第2は1,000kDa以上の見かけ分子量を有していた。MIDが従来公知の見かけ分子量が350~720kDaの外膜タンパク質UspA1及び2(8-10)または80kDaの分子量を有するCopBと同一でないことを確認するためにウェスタンブロット実験を実施した。モラクセラ・カタラーリスの粗なEmpigen(登録商標)抽出物またはMIDの部分精製調製物をSDS-PAGEにかけ、Immobilonフィルターに移し、モラクセラタンパク質に対する抗体及びヒトIgDを用いてブロットした。図2に示すように、MID(IgD結合により示されるように)は外膜タンパク質UspA及びCopBと同一ではない。

50

【0085】

精製M I Dのアミノ末端アミノ酸配列を調べるために3つの試みを実施した。それぞれ約1000ピコモルのM I Dを自動アミノ酸シーケンサーに適用した。アミノ酸フェニルチオヒダントイン誘導体が得られない限り、好ましくはシグナルM I Dポリペプチド鎖のアミノ末端をブロックした。最近、エドマン分解に対する耐性をも有するモラクセラU s p A 1及び2がピログルタミル残基を含んでおり、これらの残基はピログルタメートアミノペプチダーゼで処理することにより除去されたことが判明した。しかしながら、モラクセラ・カタラーリスから精製したM I Dまたは組換えM I Dを2つの異なるプロトコル(各方法につき2回)に従ってこの酵素で処理し、エドマン分解にかけたときには、N末端アミノ酸配列は得られなかった。

10

【0086】

M I DのI g D結合性

モラクセラ・カタラーリスの粗なE m p i g e n (登録商標)抽出物及びS D S - P A G Eにかけ、フィルターに移した高精製M I DをすべてのヒトI gクラス及びサブクラスの十分に精製した市販I g調製物に接触させた(表I I I)。

【0087】

【表3】

表I I I

十分精製した市販ミエローマ免疫グロブリンD調製物のモラクセラ・カタラーリスの粗E m p i g e n ^(R)抽出物及び高精製M I Dに対する結合特異性を示すウェスタンブロット及びドットブロット分析の要約

20

免疫グロブリン	粗抽出物中の 200kDaタンパク質	精製M I D
I g D (κ), I g D (α)	+	+
I g G 1 (κ), I g G 1 (α)	-	-
I g G 2 (κ), I g G 2 (α)	-	-
I g G 3 (κ), I g G 3 (α)	-	-
I g G 4 (κ), I g G 4 (α)	-	-
I g A 1 (κ), I g A 1 (α)	-	-
I g A 2 (κ), I g A 2 (α)	-	-
I g M (κ), I g M (α)	-	-
I g E (κ),	-	-

30

【0088】

2つのI g D調製物のみが図2にI g Dについて示したと同様に200kDa位置でM I Dバンドと相互作用した。ドットブロット実験を実施し、異なる希釈度の精製M I Dを膜に添加し、その後精製ヒトミエローマタンパク質及び第2抗体を適用したとき、2つのI g DミエローマのみがM I Dと相互作用した。2つのミエローマの1つが膜上でM I Dの0.001μgほどの微量で検出された。更に、M I DとI g Dの相互作用の特異性を他のドットブロット実験で放射性標識M I Dを用いて確認した。図3では、M I Dが4つのI g Dミエローマ血清に効果的に結合することが示されている。0.03~4μgのI g Dで明らかな反応が検出され得た。I g D標準血清(B.W.)の場合、かなりの低濃度でも反応性が見られた(示さず)。対照的に、I g G、I g A及びI g Mの6種のI gミエローマ血清は4μgでもM I Dと目に見える反応を示さなかった。

40

【0089】

ドット及びウェスタンブロットで明らかなように精製M I Dはヒト可溶性I g Dを特異的に誘引した(図2及び3、表I I I)。M I Dが表面発現B細胞受容体(B C R)I g D

50

に結合するかを調べるために、ヒト末梢血リンパ球 (PBL) を単離した。FITCをMIDにコンジュゲートした後氷上でPBLと45分間インキュベートした。PBLをT細胞マーカーCD3またはB細胞特異的表面抗原CD19に対するRPE結合mAbで標識し、その後フローサイトメトリーにより分析した(図4)。驚くことに、大部分のCD19⁺リンパ球は大量のMID-FITCに結合した(図4A)のに対して、T細胞(CD3⁺リンパ球)は非特異的バックグラウンド結合しか示さなかった(図4D)。MID-FITCシグナルはIgD-ポジティブB細胞を示す抗-IgD mAbとインキュベートしたCD19⁺細胞とうまく対応していた(図4B)。IgD担持CD19⁺リンパ球に対するMID-FITC結合の特異性を更に解明するために、PBLを家兔抗-ヒトIgD免疫グロブリンフラクシオンと前沈殿させた。インキュベートし、洗浄した後、MID-FITC結合を標準プロトコルに従ってフローサイトメトリーにより分析した。前免疫した血清とインキュベートした細胞と比較して、前記抗血清はIgD BCRへの特異的MID-FITC結合をほぼ完全に抑制した。平均蛍光強度は79.2任意単位から14.6任意単位に低下した。IgDに対するヤギ免疫グロブリンでも同様の結果が得られた(データ示さず)。よって、IgD-発現B細胞は表面発現BCR IgDに対する特異的MID-FITC結合を促進した。

10

【0090】

MIDをコードする遺伝子のクローニング及びDNA配列分析

MIDを起源とする4つのペプチド断片の得られたアミノ末端配列(表II)に従って縮重プライマーを設計し、可能性あるすべての組合せでPCRにおいて使用した。縮重プライマー対2629+/3693-で作成した特徴的なPCR産物の推定配列を用いて特定プライマー2982+及び3692-(図5)を合成した。特定プライマーと縮重プライマー(718+及び5772-)を併用したPCR反応により、全部でMIDをコードする遺伝子の5054bpが生じた。mid遺伝子のコアを取り巻く隣接配列を逆PCR(IPCR)により得た。EcoRV-及びAsuI/AccI-消化モラクセラ・カタラーリスゲノムDNAをそれぞれプライマー対2982+/945-及び3668+/1200-を用いてIPCRすると、スタートコドン領域の配列が得られた。更に、HincII消化モラクセラゲノムDNAをプライマー対5898+/5511-を用いてIPCRすると、ストップコドンを含む3'配列が得られた。モラクセラ・カタラーリスBc5中のMIDをコードする遺伝子の完全ヌクレオチド配列を配列番号2に示し、生じたアミノ酸配列を配列番号1に示す。2つの選択的オープンリーディングフレームが明らかとなり、アミノ酸No.1及び17に示す(図6参照)。その結果、mid遺伝子産物の長さは2123または2139アミノ酸であった。推定リボソーム結合部位(AAAG)、-10(TAATA)及び-35(TTGAAT)に加えて、コンセンサス配列ボックスを同定した。更に、TAAストップコドン下流の62塩基に転写停止のために必要なステム-ループ形成の可能性がある逆方向反復配列が見られた。異なるmid遺伝子間の類似性及び同一性を調べるために、5つのORF MIDタンパク質の配列を分析した。4つの株で、同一性及び類似性はそれぞれ75.8%及び78.3%であった(図7)。対照的に、第5単離物(RH4)では、僅かに低い値65.3%及び71.2%が得られた。Us p A 1との同一性及び類似性はそれぞれ5.5~11.1%及び8.3~17.9%であり、Us p A 2との同一性及び類似性はそれぞれ6.5~7.5%及び11.1~12.4%であった。

20

30

40

【0091】

mid遺伝子はすべてのモラクセラ・カタラーリス株中で検出され得る

PCR分析により、118個のモラクセラ・カタラーリス株中でmid-1遺伝子が検出されたのに対して、モラクセラ(nesceria)関連コントロールはネガティブであった。加えて、mid-1遺伝子のサイズをスタートコドン及びストップコドンを含めた遺伝子全体に及ぶプライマーを用いて確認した。

【0092】

MIDの推定アミノ酸配列の分析はUs p A 1、Us p A 2及び米国特許第5,808,

50

024号明細書に記載されているタンパク質と異なる

オープンリーディングフレームは、SDS-PAGEにより判明した約200kDaの実験値に容易に対応する丁度220kDa以下の分子量計算値を有するタンパク質を規定した。N末端アミノ酸配列は、アミノ酸66と67の間に潜在的な開裂部位を有するシグナルペプチドの典型的な特徴を示した。シグナルペプチダーゼ開裂部位の後の第1アミノ酸が恐らくグルタミン残基であるにも関わらず、エドマン分解により配列は決定できなかった。更に、ピログルタメートアミノペプチダーゼ処理後アミノ酸配列は得られなかった。推定されるアミノ酸配列もKyte及びDoolittleの方法による疎水性プロファイル分析にかけたところ、強疎水性である推定シグナルペプチドを除いて主に親水性を示した。MIDの推定アミノ酸配列は米国特許第5,808,024号明細書に記載されているタンパク質ともUspA-タンパク質のアミノ酸配列とも有意に異なっている(図7及び8)。

【0093】

mid遺伝子はすべてのモラクセラ・カタラーリス株に分布している。mid遺伝子がすべてのモラクセラ・カタラーリス株中に存在しているか否かを調べるために、オープンリーディングフレーム(ORF)の上流の保存領域及びストップコドン配列を含めた下流の保存領域(Forsgrenら,2001)に基づいてプライマーを選択した。mid遺伝子は86臨床単離物のすべてにおいて検出され、7タイプの株を分析したところ、ゲノムmid DNAの長さは約6,000塩基対であった。遺伝子の3'末端から選択した配列を含むプローブを用いるサザンブロットにより、その存在が更に確認された。サザンブロット実験は、モラクセラ株は1つのmid遺伝子のみを含んでいることを示した。

【0094】

大腸菌における組換えMIDの発現

クローン化mid遺伝子が精製IgD結合タンパク質に相当することを確認するために、予想シグナル配列及びスタートコドンを含む遺伝子を発現ベクターpET16(b)にT7プロモーターのコントロール下でサブクローン化した。その後、生じたpET16-MIDを大腸菌BL21DE3に形質転換し、IPTGを用いて誘導した。細菌細胞を溶解し、細分画化し、組換えMIDをプローブとしてヒトIgDを用いるウェスタンブロットにより局在化させた。MIDの重要な特徴は発現実験から明らかとなった(図9)。第1に、誘導後pET16-MIDを含む細胞は組換えMIDを産生することができ、遺伝子の正しいリーディングフレームを確認した。第2に、(SDS-PAGEにより示すように)組換えMIDは約200kDaの分子量を示し、これはアミノ酸配列から計算した217kDaという値に対応していた。第3に、IgD結合表現型がウェスタンブロット分析により確認されたので、組換えタンパク質は実際大腸菌におけるmid遺伝子産物であった。インサートなしの誘導pET16(b)ベクターを含む大腸菌からの総タンパク質はIgD結合能力を示さなかった(データ示さず)。第4に、組換えタンパク質の細胞下局在化は、MIDが細胞質及び膜フラクシオン中に均等に見られるがペリプラズモスペースには見られなかったことを示した。膜フラクシオンにおけるMIDの局在化はモラクセラ・カタラーリスにおける公知の外膜局在化に非常にうまく関連していた。

【0095】

IgD結合はMIDの238アミノ酸中に保存される

MID IgD結合領域を詳細に調べるために、完全長MIDから誘導した9個の配列をpET26b(+)にクローン化し、大腸菌において発現させた。組換えタンパク質は全MID配列をカバーしており、それぞれの長さ及び位置は図10に示した通りであった。MIDのアミノ酸残基69-1111または1011-2139を含む組換えタンパク質はウェスタン及びドットブロットで明らかのようにIgDに結合しなかった。対照的に、タンパク質MID902-1200(タンパク質断片F1)はIgDを誘引し、このことからMIDの1つのIgD結合領域が特定配列内にあったことが強く示唆された。

【0096】

IgD結合に関与する配列を正確に特定するために、切端MID902-1200をN末

端及びC末端で対称的に短くした(図11)。等モル濃度の各種組換えタンパク質をモラクセラ・カタラーリスから単離した天然の完全長MID1-2139と比較した。各種組換えタンパク質を4倍数希釈し、膜に添加し、ヒトIgDとインキュベートした。モル基準で、本質的に保存されるIgD結合能力がアミノ酸残基962~1200の切端MIDタンパク質で検出された。IgDと相互作用する最短の切端タンパク質はMID985とMID1142の間に局在化していた(断片F6)。N末端をMID1000残基に短縮したとき(断片F4)、C末端をMID1130に短縮したとき(断片F7)にはIgD結合能力はなくなった。最後に、(MID985-1200; F3と比較して)より長いN末端及びより短いC末端を有する断片(MID902-1130; F8)も製造し、分析した。しかしながら、この切端MIDはIgDと相互作用せず、結合能力はより長いC末端に依存することが示唆された。

【0097】

特異的MID依存性IgD結合を更に特徴づけるために、IgD ELISAをベートとしてヒトIgDを用いて構築した。組換え切端MID断片のすべてをELISAにかけた後、MID902-1200に対する特異的家兎抗血清とインキュベートした。ELISAをHRP-結合ヤギ抗-家兎ポリクローナル抗体を用いて展開した。ドットプロット(図11)と同一のパターンが観察された。すなわち、断片F4、F7及びF8は固相IgDに誘引しなかったのに対して、他の断片は完全長MIDとは異なる程度で結合した(データ示さず)。

【0098】

最適なMID962-1200とIgDの相互作用はテトラマー構造に依存する

最適なIgD結合を得るためのテトラマー構造の必要性を解明するために、MID962-1200(F2, 配列番号10)を60または100でインキュベートした後SDS-PAGE及びウェスタンブロットにより分析した。60で予備処理後MID962-1200はモノマー及びテトラマーを形成した(図12A)。しかしながら、テトラマー構造は100で分裂し、モノマー形態となった。ウェスタンブロットで調べたときこのモノマー形態のIgDに対する結合はかなり弱かった(図12A及びB)。モノマー形態と比較したテトラマーのIgD結合能力を調べるために、MID962-1200断片(配列番号10)を60において6種の実験で分析した。熱処理したタンパク質をSDS-PAGEにかけ、IgD結合活性をウェスタンブロットにより分析した。生じたゲル及びフィルターをデンストメトリーにより分析し、モノマーのタンパク質濃度(密度)を対応のテトラマー濃度で割った。得られた値(%)はゲルに充填した総タンパク質の濃度(μg)に関連する。驚くことに、テトラマー形態に対するIgD結合をモノマー形態と比較したところ、テトラマーMID962-1200では23倍高いIgD結合が見られた(図12C)。

【0099】

モラクセラ・カタラーリスIgD結合タンパク質(MID)はヒト赤血球を凝集する

MIDの赤血球凝集における予想される関与を調べるために、MIDを発現するかまたは相変異によりmid遺伝子を切り離した一連の臨床単離物を選択した。驚くことに、MIDを発現した21単離物のすべてがヒト赤血球を凝集したのに対して、MID-ネガティブ株(n=21)のうち4つしか赤血球細胞を凝集しなかった。赤血球凝集能力とMID発現との間にほぼ完全な相関関係が認められた。USPA1/2発現は同様であり、MID発現と無関係であった。

【0100】

この初期実験に続けて、モデル菌株モラクセラ・カタラーリスBc5(Forsgrenら, 2001)由来の精製MIDタンパク質が赤血球を凝集するか否かを調べた。細菌表面を模擬するために、MIDをセファロースビーズにコンジュゲートし、ヒト赤血球とインキュベートした。セファロースに結合したウシ血清アルブミン(BSA)をネガティブコントロールとして含めた。驚くことに、ヒト赤血球はMID-セファロースの存在下で凝集したのに対して、BSA-セファロースは赤血球と干渉しなかった(データ示さず)

。

【0101】

M I D の赤血球凝集ドメインはアミノ酸残基アラニン764とセリン913の間に位置する

分子を精査し、赤血球凝集に関与した分子の特定部位を正確に定めるために、一連の m i d 遺伝子の切端 D N A 断片をクローン化し、大腸菌において組換え発現させた（図10）。家兎において切端 M I D タンパク質に対するポリクローナル抗体を作成し、E L I S A で使用した。予備実験で、M I D 及び M I D 誘導タンパク質に対する抗体を滴定して、各抗原について E L I S A で試験したときと同じ値を得た。次いで、切端 M I D タンパク質の溶解赤血球への結合能力を特定抗体を適当な濃度で用いて E L I S A で測定した。M I D または M I D 7 6 4 - 9 1 3（断片 E）は他の切端 M I D タンパク質に比較してより高い（4～16倍）E L I S A 値を示した。よって、M I D の赤血球凝集構造は M I D アミノ酸残基764-913内にあるようである（配列番号8）。

10

【0102】

M I D 7 6 4 - 9 1 3（断片 E，配列番号8）は直接赤血球及び I I 型肺胞上皮細胞に結合する

接着としての M I D 7 6 4 - 9 1 3 の重要性を更に確認するために、M I D 及び特定の切端 M I D 誘導タンパク質を放射性標識し、ヒト赤血球及び肺胞上皮細胞との直接結合実験で試験した（図13）。[¹²⁵I]-M I D 及び [¹²⁵I]-M I D 7 6 4 - 9 1 3 はいずれも赤血球に強く結合したのに対して、切端 M I D 断片の M I D 3 6 7 - 5 9 0（断片 C）、M I D 9 0 2 - 1 2 0 0（断片 F）、M I D 1 0 1 1 - 1 4 4 6（断片 G）及び M I D 1 6 1 6 - 2 1 3 9（断片 I）はバックグラウンドレベル以上で結合しなかった（図13A）。同時に、肺胞上皮細胞 A 5 4 9 も完全長 [¹²⁵I]-標識 M I D 及び切端 M I D 7 6 4 - 9 1 3 の両方を誘引した（図13B）。他の断片はすべて上皮細胞に結合しなかった。これらを勘案すると、断片 M I D 7 6 4 - 9 1 3（配列番号8）が哺乳動物細胞への接着を媒介する接着 M I D の重要な部分であった。

20

【0103】

完全長 M I D 1 - 2 1 3 9 及び M I D 7 6 4 - 9 1 3 に対する抗体はモラクセラ・カタラーリスの I I 型肺胞上皮細胞への接着を阻害する

I I 型肺胞上皮細胞へのモラクセラ・カタラーリス接着に対する完全長 M I D 及び M I D 7 6 4 - 9 6 3 の影響を更に分析するために、M I D 発現及び M I D 欠乏モラクセラ・カタラーリス株を予め M I D に対する抗体とインキュベートした後、接着のために肺胞上皮細胞に添加した。図14に示すように、M I D 発現単離物の場合完全長 M I D 1 - 2 1 3 9 及び M I D 7 6 3 - 9 1 3（断片 E，配列番号8）に対するポリクローナル抗体は接着を効果的に阻害した。対照的に、前免疫血清及び M I D 1 0 1 1 - 1 4 6 6（断片 G）に対する p A b は殆ど接着と干渉しなかった。

30

【0104】

【表4】

参考文献

1. Forsgren,A. and Grubb,A. (1979) Many bacterial species bind human IgD. *J. Immunol.* 122, 1468-1472.
2. Banck,G. and Forsgren,A. (1978) Many bacterial species are mitogenic for human blood lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 8, 347-354.
3. Calvert,J.E. and Calogeres,A. (1986) Characteristics of human B cells responsive to the T-independent mitogen *Branhamella catarrhalis*. *Immunology* 58, 37-41.
4. Forsgren,A., Penta,A., Schlossman,S.F. and Tedder,T.F. (1988) *Branhamella catarrhalis* activates human B lymphocytes following interactions with surface IgD and class I major histocompatibility complex antigens. *Cell. Immunol.* 112, 78-88. 10
5. Janson,H., Carlén,B., Cervin,A., Forsgren,A., Björk-Magnusdottir,A., Lindberg,S. and Runer, T. (1999) Effects on the ciliated epithelium of protein D-producing and -nonproducing nontypeable *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal tissue cultures. *J. Infect. Dis.* 180, 737-746.
6. Sasaki,K. and Munson Jr.,R.S. (1993) Protein D of *Haemophilus influenzae* is not a universal immunoglobulin D-binding protein. *Infect. Immun.* 61, 3026-3031. 20
7. Helminen,M.E., Beach,R., Maciver,I., Jarosik,G., Hansen,E.J. and Leinonen,M. (1995) Human immune response against outer membrane proteins of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* determined by immunoblotting and enzyme immunoassay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 35-39.
8. Aebi,C., Maciver,I., Latimer,J.L., Cope,L.D., Stevens,M.K., Thomas,S.E., McCracken,G.H. and Hansen,E.J. (1997) A protective epitope of *Moraxella catarrhalis* is encoded by two different genes. *Infect. Immun.* 65, 4367-4377. 30
9. Cope,L.D., Lafontaine,E.R., Slaughter,C.A., Hase-
mann,C.A.Jr., Aebi,C., Henderson,F.W., McCracken,G.H.Jr
and Hansen,E.J. (1999) Characterization of *Moraxella*

catarrhalis uspA1 and uspA2 genes and their encoded products. J Bacteriol 181, 4026-4034.

10. Klingman, K.L. and Murphy, T.F. (1994) Purification and characterization of a high-molecular-weight outer membrane protein of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. Infect. Immun. 62, 1150-1155.

11. WO 98/28333

12. Sasaki, K., Harkness, R.E., Loosmoore, S.M. and Klein, M.H. (1998) United States Patent 5,808,024.

13. Fitzgerald, M., Mulcahy, R., Murphy, S., Keane, C., Coakley, D. and Scott, T. (1997) A 200 kDa protein is associated with haemagglutinating isolates of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. FEMS Immun. Med. Microbiol. 18, 209-216.

14. Tucker, K., Plosila, L., and Samuel, J. (1994) Correlation between hemagglutination and globotetraosylceramide binding by *Branhamella catarrhalis*. Abstract 117 of the 94th General meeting of the American Society for Microbiology.

15. Lunde E, Munthe LA, Vabo A, Sandlie I, Bogen B. (1999) Antibodies engineered with IgD specificity efficiently deliver integrated T-cell epitopes for antigen presentation by B cells. Nat Biotechnol. 17, 670-675.

16. Lycke N. (2001) The B-cell targeted CTA1-DD vaccine adjuvant is highly effective at enhancing antibody as well as CTL responses. Curr. Opin. Mol. Ther. 3, 37-44.

17. Ito O, Harada M, Takenoyama M, Tamada K, Li T, Abe K, Fujie H, Nomoto K. 1998 Vaccination with activated B cells pulsed with tumor-lysates can induce tumor-specific CD4+ T cells in vivo. Immunobiol. 199, 133-147.

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】イオン交換クロマトグラフィー後のモラクセラ・カタラーリスからの *Empigen* (登録商標) 可溶性抽出物の *Sephacryl S-400* カラムでのクロマトグラフィー及び再クロマトグラフィー。実線は第1クロマトグラフィーのタンパク質含量を示し、破線は第1ピークの再クロマトグラフィーを示す。Voはボイド容量である。

【図2】MIDの各種精製ステップを表すフラクションのSDS-PAGE分析。Q-セファロースカラムでのイオン交換クロマトグラフィー後、*Sephacryl S-400* カラムでの第1回及び第2回ゲル濾過後の3% *Empigen* (登録商標) 中の粗抽出物についてのフラクションを示す。2つのゲルを同時に流し、1つはクーマシーブルー (染色剤) で染色し、1つはImmobilon-P膜にプロットし、ヒトIgD () ミエローマタンパク質 (IgD)、抗-UspA (Usp) または抗-CopB (B) モノクローナル抗体を用いてプローブし、その後適当なホースラディッシュペルオキシダーゼ結合第2抗体とインキュベートした。マーカータンパク質の分子量を左側に表示する。

【図3】各種免疫グロブリンクラスを表すヒトミエローマ血清に対するMIDの結合。すべての血清を倍数希釈 (4 ~ 0.3 µg) し、ニトロセルロース膜に適用した。飽和、洗浄及びブロッキング後、 $[^{125}\text{I}]$ -MID標識プローブを添加した。一晚インキュベートし、更に洗浄した後、特異的MID-IgD結合をオートラジオグラフィーにより可視化した。

【図4】FITC結合MIDに特異的に結合したIgD担持B細胞。CD19+ (A)またはCD3+ (D)に対するRPE結合mAbで染色した後MID-FITCとインキュベーションしたPBLを抗-IgD-mAb (B)及び抗-CD19 mAbとインキュベートしたPBLと比較した。CD3+及び抗-IgD-mAbを用いる2重染色を(E)に示す。(C)では、予めヒトIgDに対する家兎免疫グロブリンフラクシオンとインキュベートした後抗-CD19 mAb及びMID-FITCを添加したPBLのパネルを示す。抗体もMID-FITCも含まないコントロールサンプルも含める(F)。PBLをヘパリン処理したヒト血液からLymphoprep1ステップ勾配を用いて単離した。リンパ球(2.5×10^5)を適当な抗体とインキュベートし、洗浄し、更にMID-FITC ($10 \mu\text{g/ml}$)とインキュベートした。インキュベーションはすべて氷上で実施し、最終洗浄後PBLをフローサイトメトリーにより分析した。この特別実験では、総リンパ球集団の68%をゲーティングし、分析した。ネガティブコントロールとしてイソマッチmAbを含めたときには細胞の2%未満が標識された。前免疫した家兎血清はIgD BCRに対するMID-FITCの結合を殆ど阻止しなかった(示さず)。分析した3つの別々のドナーの内の典型的なドナーについての実験を示す。

10

【図5】クローニング戦略を示すmid遺伝子の概略マップ。DNA増幅のために使用したオリゴヌクレオチドプライマーを関連配列の上(PCR)及び下(逆PCR [IPCR])の矢印で示す。表IIに概説したアミノ酸配列に基づく縮重プライマー及び特定プライマーをそれぞれ破線及び実線で示す。

【図6-1】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35, -10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

20

【図6-2】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35, -10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-3】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35, -10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

30

【図6-4】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35, -10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-5】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35, -10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-6】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35, -10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

40

【図6-7】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35, -10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-8】モラクセラ・カタラーリスBc5由来のmid遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定-35, -10領域、考えられるリボソーム結合部位(RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸No. 1及び17の2つの

50

選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-9】モラクセラ・カタラーリス Bc5 由来の mid 遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定 - 35, - 10 領域、考えられるリボソソーム結合部位 (RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸 No. 1 及び 17 の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-10】モラクセラ・カタラーリス Bc5 由来の mid 遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定 - 35, - 10 領域、考えられるリボソソーム結合部位 (RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸 No. 1 及び 17 の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図6-11】モラクセラ・カタラーリス Bc5 由来の mid 遺伝子のヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列。推定 - 35, - 10 領域、考えられるリボソソーム結合部位 (RBS)、逆方向反復配列、予測シグナルペプチド、及びアミノ酸 No. 1 及び 17 の2つの選択的スタートコドンを示す。ストップコドン及び逆方向反復配列も示す。

【図7】モラクセラ・カタラーリス菌株から単離した MID と ATCC 25238 由来の UspA1 及び A2 との間の同一度及び類似度。同一性及び類似性はソフトウェア Needle を用いて計算した。

【図8-1】MID のアミノ酸配列と米国特許第 5, 808, 024 号明細書に記載されているタンパク質との比較。

【図8-2】MID のアミノ酸配列と米国特許第 5, 808, 024 号明細書に記載されているタンパク質との比較。

【図8-3】MID のアミノ酸配列と米国特許第 5, 808, 024 号明細書に記載されているタンパク質との比較。

【図8-4】MID のアミノ酸配列と米国特許第 5, 808, 024 号明細書に記載されているタンパク質との比較。

【図8-5】MID のアミノ酸配列と米国特許第 5, 808, 024 号明細書に記載されているタンパク質との比較。

【図9】組換え発現させた MID はその IgD 結合能力を保持していた。左図はクーマシーブリリアントブルー染色したゲル、右図はヒト IgD でプローブしたウェスタンブロットを示す。天然 MID タンパク質 (MID) を流し、細胞質フラクション (C)、ペリプラズマフラクション (P) 及び膜フラクション (M) と比較した。左側の数字は分子量標準を指す。pET16-MID を含む大腸菌 BL21DE3 を IPTG により 4 時間誘導した。細胞フラクションを集め、タンパク質を平行に並べた 2 つの SDS-PAGE により分離し、それぞれクーマシーブリリアントブルーで染色するかまたは Immunoblotting-P 膜にブロットした。膜をヒト IgD でプローブした後ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合第 2 抗体とインキュベートした。

【図10】MID 764-913 (断片 E) 及び MID 902-1200 (断片 F) はそれぞれ赤血球凝集及び IgD 結合に関わる。一連の切端 MID タンパク質 (A~I と称する) を製造した。C 末端にヒスチジンタグを含む組換えタンパク質 (A~H) またはマルトース結合タンパク質に融合した組換えタンパク質 (I) を大腸菌において産生し、それぞれニッケル及びアミロース樹脂カラムを用いて精製した。

【図11】MID 962-1200 (断片 F2) は完全長 MID 1-2139 に比較して保存 IgD 結合能力を有している。等モル濃度 (240~0.06 ナノモル) の精製完全長 MID 1-2139 及び 8 個の切端 MID 断片 (F1~F8) をドットブロットにより IgD 結合について分析した。タンパク質 MID 902-1130 (F8)、MID 985-1130 (F7) 及び MID 1000-1200 (F4) は IgD を誘引しなかったが、他の断片はすべて IgD に結合した。複数の切端 MID タンパク質をコードする DNA を発現ベクター pET26b (+) にクローン化し、大腸菌において産生した。ヒスチジンタグを含む組換えタンパク質を精製し、ニトロセルロース膜にドットブロットした。この膜をヒト IgD でプローブした後、検出のために使用した第 2 HRP 結合ポリクローナル抗体でプローブした。

【図12】M I D 9 6 2 - 1 2 0 0 (F 2) のテトラマー構造は最適 I g D 結合のために必須である。(A) : 6 0 で処理後 M I D 9 6 2 - 1 2 0 0 の S D S - P A G E によりモノマー及びテトラマーを分離した。1 0 0 で熱処理後モノマーのみが検出され得る。(B) : プローブとして I g D を用いる対応のウェスタンブロットはモノマーに対する弱い I g D 結合を示す。(C) : 6 種の実験でのテトラマー及びモノマーに対する平均 I g D 結合。I g D 結合はタンパク質 1 μ g 当たりの任意単位で示す。M I D 9 6 2 - 1 2 0 0 を S D S - サンプル緩衝液において 6 0 または 1 0 0 で 1 0 分間処理し、S D S - P A G E 及びウェスタンブロット分析にかけた。生じたクーマシー染色ゲル及びウェスタンブロットをデンシトメトリーにより分析した。テトラマーまたはモノマーとして移動するタンパク質の%を計算し、I g D 結合能力を比較した。

10

【図13】[^{1 2 5} I] 標識組換え M I D 7 6 4 - 9 1 3 (断片 E) は赤血球及び上皮細胞に特異的に誘引される。[^{1 2 5} I] 標識 M I D 及び一連の切端 [^{1 2 5} I] - M I D 断片 (C 、 E 、 F 、 G 及び I) をヒト赤血球に添加した (A) 。組換え [^{1 2 5} I] 標識 M I D 断片を上皮細胞にも添加した (B) 。(断片 I を除く) すべての切端 M I D タンパク質を大腸菌において産生し、ニッケル樹脂を用いて精製した。断片 I は M B P との融合タンパク質であり、よってアミロース樹脂を用いて精製した。組換えタンパク質を [^{1 2 5} I] で標識し、赤血球または上皮細胞株 A 5 4 9 に添加した。数回洗浄後、結合放射能をガンマカウンターで測定した。データを 2 回ずつ実施した 2 つの実験の平均値として示す。誤差バーは S D を指す。

【図14】M I D 発現モラクセラ・カタラーリスの上皮細胞への接着はアミノ酸残基 M I D 7 6 4 - 9 1 3 (断片 E) に依存する。家兎抗 - M I D 1 - 2 1 3 9 または抗 - M I D 7 6 4 - 9 1 3 ポリクローナル抗体をコートした M I D 発現細菌で、上皮細胞への接着が前免疫血清または抗 - M I D 1 0 1 1 - 1 4 6 6 (断片 G) p A b と比較して低下していた。細菌を前免疫血清または特定の抗血清と 4 で 1 時間インキュベートした。上皮細胞に細菌を添加した後遠心し、3 7 において 3 0 分間インキュベートした。洗浄後、細胞をトリプシン - E D T A で処理し、懸濁液を血液寒天プレートにおいて平板培養した。一晚インキュベートした後コロニー形成単位をカウントした。接着率 (添加した c f u / 接着した c f u) を計算した。2 回ずつ実施した 4 つの別個の実験の平均値として示す。誤差バーは S D を指す。* * * P 0 . 0 0 1 、* * P 0 . 0 1 、及び * P 0 . 0 5 。

20

【 図 1 】

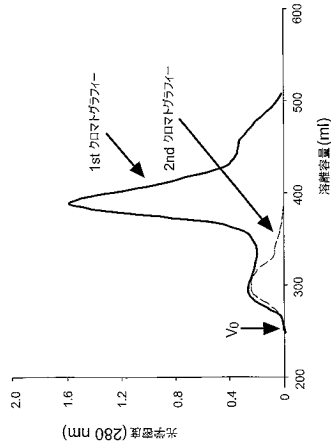


Fig 1

【 図 2 】

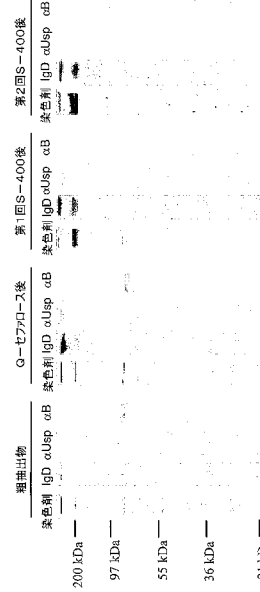


Fig 2

【 図 3 】

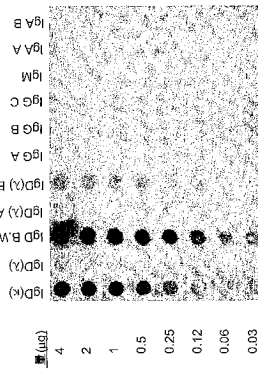


Fig 3

【 図 4 】

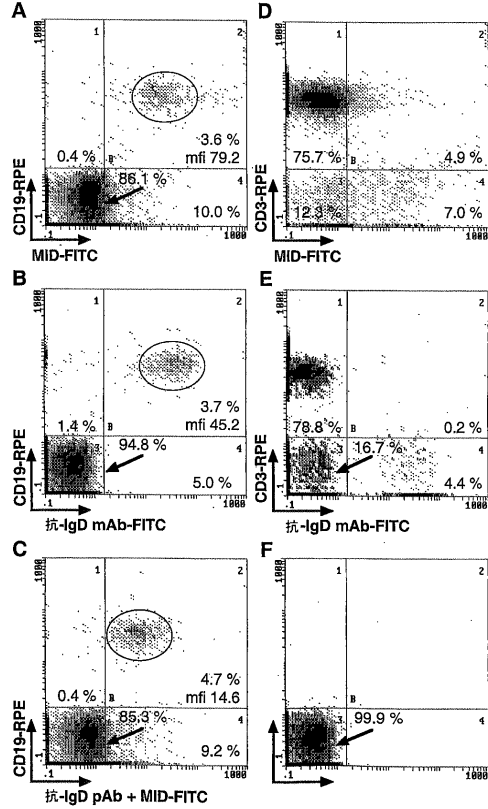


Fig 4

【 5 】

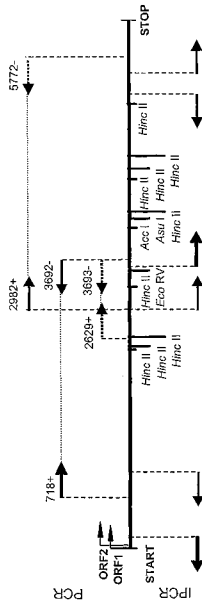


Fig 5

【 6 - 1 】

-250
ACTCTATTATTTGATATGTTTTGAAACTAATCTATTGACTTAAATCACCATATGGTTATAAT

TTAGCATATGGTAGGCTTTTTGTA AAAAATCACATCGCAATATTGTTCTACTGTTACTACCA
-35
TGCTTCGAATGACGATCCCAATCATCAGATTCATCAAGTGATGTGTTGTATACGCATCATTT

-10
TACCCCTAATTAATTC AATCGAAATGCCTATGTCAGCATGTATCATTTTTTAAAGGTAAACCA
1/1 31/11
CC ATG AAT CAC ATC TAT AAA GTC ATC TTT AAC AAA GCC ACA GGC ACA
Met asn his ile tyr lys val ile phe asn lys ala thr gly thr
61/21
TTT ATG GCC GTG GCG GAA TAT GCC AAA TCC CAC AGC ACG GGG GGT
phe **Met** ala val ala glu tyr ala lys ser his ser thr gly gly
91/31 121/41
AGC TGT GCT ACA GGG CAA GTT GGC AGT GTA TGC ACT CTG AGC TTT
ser cys ala thr gly gln val gly ser val cys thr leu ser phe
151/51
GCC CGT GTT GCC GCG CTC GCT GTC CTC GTG ATC GGT GCG ACG CTC
ala arg val ala ala leu ala val leu val ile gly ala thr leu
181/61 211/71
AAT GGC AGT GCT TAT GCT CAA CAA GAT CCC AGA CAT ATC GCA ATT
asn gly ser ala tyr ala gln gln asp pro arg his ile ala ile
241/81
GAT GGC AAC AGC TCG AAC ACA TCC TCA GGC ACT GCC CGT GCG ACA
asp gly asn ser ser asn thr ser ser gly thr ala arg ala thr
271/91 301/101
GGT GAT CGA GCC ATT GCT CTT GGT GAA AAT GCT AAT GCA GAG GGC
gly asp arg ala ile ala leu gly glu asn ala asn ala glu gly
331/111
GGT CAA GCC ATC GCC ATC GGT AGT AGC AAT AAA ACA GGT GGT AGA
gly gln ala ile ala ile gly ser ser asn lys thr gly gly arg
361/121 391/131
AAC GCG CTG AAT ATA GGT ACC GAT GCC AAA GGT GAG GAG TCC ATC
asn ala leu asn ile gly thr asp ala lys gly glu glu ser ile
421/141
GCC ATC GGT GGT GAT GTA GTG GCT GAG GGT ACT GCC TCG ATT GCC
ala ile gly gly asp val val ala glu gly thr ala ser ile ala
451/151 481/161
ATC GGT GGT GAT GAC TTA CAT TTG TGG GAT GAA CCA AAT AAG CAA
ile gly gly asp asp leu his leu trp asp glu pro asn lys gln

Fig 6

【 6 - 2 】

511/171
AAG TTC CTC GAC CCA AAA GTT AAA GAA TTG ATT TTA AAA CAT CAA
lys phe leu asp pro lys val lys glu leu ile leu lys his gln
541/181 571/191
GAA TTA AAC AAC ATA TAC AAA CTG CCT GAT GGT AGT CCT CAA AGA
glu leu asn asn ile tyr lys leu pro asp gly ser pro gln arg
601/201
TAT TTT CGC ACA TAC GCA AAG GGA CAC GCC AGT ATT GCA CTA GGA
tyr phe arg thr tyr ala lys gly his ala ser ile ala leu gly
631/211 661/221
ACC ATG ACA CAG GCA GAG GGT CAT TTT GCC AAC GCC TTT GGT ACA
thr met thr gln ala glu gly his phe ala asn ala phe gly thr
691/231
CGG GCA ACA GCT AAA GGC AAC TAT TCC TTG GCA GTG GGT CTT ACC
arg ala thr ala lys gly asn tyr ser leu ala val gly leu thr
721/241 751/251
GCC CAA GCC AAC ACA GAA TCT TCA ATC GCT GTT GGT TCT AAT GCA
ala gln ala asn thr glu ser ser ile ala val gly ser asn ala
781/261
CAA GCT AAC GGG TTT GCA GCG ACA GCC ATT GGT GGA GGT ACT AAA
gln ala asn gly phe ala ala thr ala ile gly gly gly thr lys
811/271 841/281
GCT GAT TTG GGT CGA AGC ATA GCC CTA GGT TTT GGT TCT CAG ATC
ala asp leu gly arg ser ile ala leu gly phe gly ser gln ile
871/291
CTT ACT AAG GAG AAG GAT AGT CAT AAC AAT ACC AAT GTC TAT GTA
leu thr lys glu lys asp ser his asn asn thr asn val tyr val
901/301 931/311
CCA CAA GGT GAA ATA TTA GAA CAG CGG TAT AAA GCC ACC GAA AAC
pro gln gly glu ile leu glu glu arg tyr lys ala thr glu asn
961/321
GGT CAG TCG CCT AAT AAG GTA GTG GAT ATA TTT TCC ATT GGT AGT
gly gln ser pro asn lys val asp ile phe ser ile gly ser
991/331 1021/341
AGC TCT ATC AAA CGT AAA ATC ATC AAT GTC GGT GCG GGT TCT CAG
ser ser ile lys arg lys ile ile asn val gly ala gly ser gln
1051/351
GAG ACC GAT GCG GTC AAT GTG GCA CAG CTT AAA TTG GTG GAG CCG
glu thr asp ala val asn val ala gln leu lys leu val glu arg

Fig 6 (つづき)

【 6 - 3 】

1081/361 1111/371
GTG GCT AAG CGT CAA ATT ACT TTT CAG GGT GAT GAT AGC AAT AAT
val ala lys arg gln ile thr phe gln gly asp asp ser asn asn
1141/381
AGC GTA AAA AAA GGT TTG GGT CAG ACT TTA ACT ATT AAA GGT GGT
ser val lys lys gly leu gly gln thr leu thr ile lys gly gly
1171/391 1201/401
AAA ACA GAG ACC GGT GAA CTA ACC GAA AAT AAC ATC GGT GTG GTA
lys thr glu thr gly glu leu thr glu asn asn ile gly val val
1231/411
CAA GAT GAT AAT GGT AAT GGT CTG AAA GTT AAA CTT GCT AAA GAT
gln asp asp asn gly asn gly leu lys val lys leu ala lys asp
1261/421 1291/431
CTG ACT GGT TTG ACC AAG GTT GCA GTA AAT GGT AAT GGT GCT AAC
leu thr gly leu thr lys val ala val asn gly asn gly ala asn
1321/441
AAC GCC GAG CTA CTA AAC GGT GGT CTG ACC TTT TCG ACA TCA GGT
asn ala glu leu leu asn gly gly leu thr phe ser thr ser gly
1351/451 1381/461
GCC AAT GCA GGC AAA ACG GTC TAT GGC ACT GAT GGG GTG AAG TTT
ala asn ala gly lys thr val tyr gly thr asp gly val lys phe
1411/471
ACT AAT AAT ACA GGA ACA GGA ACA GGA ACG GCA ATA CCC GAC ACT
thr asn asn thr gly thr gly thr gly thr ala ile pro asp thr
1441/481 1471/491
ACT CGT ATT ACC AAA AAT AAA ATT GGC TTT GCT GGG GCT GAT GAA
thr arg ile thr lys asn lys ile gly phe ala gly ala asp glu
1501/501
CAA GTT GAT GAA AGC AAA CCT TAT CTT GAC AAC GAA AAG CTA AAA
gln val asp glu ser lys pro tyr leu asp asn glu lys leu lys
1531/511 1561/521
GTT GGC ACA GTT GAG ATT AAA AAA ACT GGC ATC AAT GCA GGT AAT
val gly thr val glu ile lys lys thr gly ile asn ala gly asn
1591/531
CAA GAA ATT ACC AAG GTC AAA TCT GCC ATT GTT GAT GCA GTT AAT
gln glu ile thr lys val lys ser ala ile val asp ala val asn
1621/541 1651/551
GGA CAA GCA AAT CAA AGC TTT GTG AAC CTT CTA GAA ACA GCA GGC
gly gln ala asn gln ser phe val asn leu leu glu thr ala gly
1681/561
ACA AAC ACC AAC AAA CAA AAC TCT GCC GCC ACG GTT AAA GAC TTA
thr asn thr asn lys gln asn ser ala ala thr val lys asp leu

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 4 】

1711/571 1741/581
TAC GAC CTA TCA CAA TCA CCG CTG ACC TTT ACA GGT GAT AGC GGT
tyr asp leu ser gln ser pro leu thr phe thr gly asp ser gly
1771/591
AAC GTT AAG AGA AAA CTG GGT CAG ACT TTA ACC ATC ACA GGC GGA
asn val lys arg lys leu gly gln thr leu thr ile thr gly gly
1801/601 1831/611
CAA ACA AAG ACC GAT CAA TTA ACC GAC AAT AAC ATC GGT GTG GTA
gln thr lys thr asp gln leu thr asp asn asn ile gly val val
1861/621
GCA GGT ACT AAT GGC TTA ACC GTT AAA CTT GCT AAA ACT TTA AAC
ala gly thr asn gly leu thr val lys leu ala lys thr leu asn
1891/631 1921/641
AGT CTT ACT GAA GTT AAT ACG GCT ACA TTA AAC GCC ACC AAT AAA
ser leu thr glu val asn thr ala thr leu asn ala thr asn lys
1951/651
GTT AAG GTA GAT AAT AGT ACT GGT AAT ACG GCT GAA TTA TTA AAC
val lys val asp asn ser thr gly asn thr ala glu leu leu asn
1981/661 2011/671
AAT GGT TTA ACC TTT ACC CAA ACA ACA GGT GCA AAT TCA GGT AAA
asn gly leu thr phe thr gln thr thr gly ala asn ser gly lys
2041/681
ACC GTC TAT GGC AAT GAT GGC TTG AAG TTT ACT AAT AGT GCT AAT
thr val tyr gly asp gly leu lys phe thr asn ser ala asn
2071/691 2101/701
AAA GCA CTT GGC GGC ACA ACT TAC ATC ACC AAA GAT CAA GTT GGT
lys ala leu gly gly thr thr tyr ile thr lys asp gln val gly
2131/711
TTT AGC AAT CAA GAT GGC TTA CTT GAT GAA AGC AAA CCG TAT CTT
phe ser asn gln asp gly leu leu asp glu ser lys pro tyr leu
2161/721 2191/731
AAC CGA GAA AAG CTA AAA GTT GGT AAA ATT GAG ATT AAA GAC AGT
asn arg glu lys leu lys val gly lys ile glu ile lys asp ser
2221/741
GGC ATT AAT GCA GGT GGT AAA GCC ATC ACA GGA CTG CCC TCA ACA
gly ile asn ala gly gly lys ala ile thr gly leu pro ser thr
2251/751 2281/761
CTG CCC AAC ACT ACC TAT ACT GCA CCT GGC GTG CAT ACT GCA CTA
leu pro asn thr thr tyr thr ala pro gly val his thr ala leu
2311/771
CAT GGC AGT ACA ATT TCT AAC GAC GAC AAA ACC CGT GCC GCC AGT
his gly ser thr ile ser asn asp asp lys thr arg ala ala ser

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 5 】

2341/781 2371/791
ATC GCC GAT GTG CTA AAC GCA GGC TTT AAC TTG GAA GGT AAT GGT
ile ala asp val leu asn ala gly phe asn leu glu gly asn gly
2401/801
GAA GCG GTT GAC TTT GTC TCC ACT TAT GAC ACC GTC AAC TTT GCC
glu ala val asp phe val ser thr tyr asp thr val asn phe ala
2431/811 2461/821
GAT GGC AAT GCC ACC ACC GCT AAG GTA ACT TAT GAT AAC AAA ACC
asp gly asn ala thr thr ala lys val thr tyr asp asn lys thr
2491/831
AGT AAA GTG GCG TAT GAT GTC AAT GTG GAT GGT ACA ACC ATT CAT
ser lys val ala tyr asp val asn val asp gly thr thr ile his
2521/841 2551/851
CTA ACA GGC ACT AAT GGC AAG AAA AAC CAA ATT GGC GTA AAA ACC
leu thr gly thr asn gly lys lys asn gln ile gly val lys thr
2581/861
ACC ACA CTG ACC ACA AAA CGT GCT AAA GGT AAT ACA GCA ACT AAT
thr thr leu thr thr lys arg ala lys gly asn thr ala thr asn
2611/871 2641/881
TTT AGT GTT AAC TCT GGT GAT GAC AAT GCC CTT ATT AAC GCC AAA
phe ser val asn ser gly asp asp asn ala leu ile asn ala lys
2671/891
GAC ATC GCC GAC AAT CTA AAC ACC CTA GCT GGT GAA ATT CGC ACC
asp ile ala asp asn leu asn thr leu ala gly glu ile arg thr
2701/901 2731/911
GCC AAA GGC ACA GCA AGC ACC GCC CTA CAA ACC TTC TCT ATT ATT
ala lys gly thr ala ser thr ala leu gln thr phe ser ile ile
2761/921
GAT GAA CAA GGT AAT AAC TTT ATG GTC GGT AAC CTT TAC TCT GGT
asp glu gln gly asn asn phe met val gly asn leu tyr ser gly
2791/931 2821/941
TAT GAC ACC TCA AAT ACC TCT GAG ACC GTC ACC TTT GTA GGT GAA
tyr asp thr ser asn thr ser glu thr val thr phe val gly glu
2851/951
AAC GGC ATT ACC ACC AAG GTA AAT AAA GGT AAA GTC AAA GTT GGT
asn gly ile thr thr thr lys val asn lys lys val lys val gly
2881/961 2911/971
ATT GAC CAA ACC AAA GGC TTA ACC ACG CCT AAG CTG ACC GTG GGT
ile asp gln thr lys gly leu thr thr pro lys leu thr val gly
2941/981
AGT AGT AAT GGC AAA GGC ATT GTC ATT GAC AGT AAA GAT GGT CAA
ser ser asn gly lys gly ile val ile asp ser lys asp gly gln

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 6 】

2971/991 3001/1001
AAT ACC ATC ACA GGA CTA AGC AAC ACT CTA ACC GAT GCC ACC AAC
asn thr ile thr gly leu ser asn thr leu thr asp ala thr asn
3031/1011
GCA ACA ACA GGG CAT GTC AGT GAA ATC CAG GGC TTG GCA CAA GGT
ala thr thr gly his val ser glu ile gln gly leu ala gln gly
3061/1021 3091/1031
GCA AAC AAA ACC CGT GCC GCC AGC ATT GGT GAT GTA CTA AAC GCA
ala asn lys thr arg ala ala ser ile gly asp val leu asn ala
3121/1041
GGC TTT AAC TTG CAA GGC AAT GGT GAA GCC AAA GAC TTT GTC TCC
gly phe asn leu gln gly asn gly glu ala lys asp phe val ser
3151/1051 3181/1061
ACT TAT GAC ACC GTC AAC TTT ATC GAT GGC AAT GCC ACC ACC GCT
thr tyr asp thr val asn phe ile asp gly asn ala thr thr ala
3211/1071
AAG GTG ACC TAT GAT GAC ACG AAA CAG ACC AGC ACA GTA ACT TAT
lys val thr tyr asp asp thr lys gln thr ser thr val thr tyr
3241/1081 3271/1091
GAT GTC AAT GTG GAT AAT AAA ACC CTT GAA GTG ACA GGC GAT AAA
asp val asn val asp asn lys thr leu glu val thr gly asp lys
3301/1101
AAA CTT GGC GTC AAA ACC ACC ACA CTG ACC AAA ACA AGT GCT AAT
lys leu gly val lys thr thr thr leu thr lys thr ser ala asn
3331/1111 3361/1121
GGT AAT GCA ACC AAA TTT AGT GCC GCC GAT GGC GAT GCC CTT GTT
gly asn ala thr lys phe ser ala ala asp gly asp ala leu val
3391/1131
AAA GCC AGT GAT ATC GCC ACC CAT CTA AAT ACC TTG GCT GGC GAC
lys ala ser asp ile ala thr his leu asn thr leu ala gly asp
3421/1141 3451/1151
ATC CAA ACC GCC AAA GGA GCA AGC CAA GCA AGC AGC TCA GCA AGC
ile gln thr ala lys gly ala ser gln ala ser ser ser ala ser
3481/1161
TAT GTG GAT GCT GAT GGC AAC AAG GTC ATC TAT GAC AGT ACC GAT
tyr val asp ala asp gly asn lys val ile tyr asp ser thr asp

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 7 】

3511/1171 3541/1181
AAG AAG TAC TAT CAA GCC AAA AAT GAT GGC ACA GTT GAT AAA ACC
lys lys tyr tyr gln ala lys asn asp gly thr val asp lys thr
3571/1191
AAA GAA GTT GCC AAA GAC AAA CTG GTC GCC CAA GCC CAA ACC CCA
lys glu val ala lys asp lys leu val ala gln ala gln thr pro
3601/1201 3631/1211
GAT GGC ACA TTG GCT CGA ATG AAT GTC AAA TCA GTC ATT AAC AAA
asp gly thr leu ala arg met asn val lys ser val ile asn lys
3661/1221
GAA CAA GTA AAT GAT GCC AAT AAA AAG CAA GGC ATC AAC GAA GAC
glu gln val asn asp ala asn lys lys gln gly ile asn glu asp
3691/1231 3721/1241
AAC GCC TTT GTT AAA GGA CTT GAA AAA GCC GCT TCT GAT AAC AAA
asn ala phe val lys gly leu glu lys ala ala ser asp asn lys
3751/1251
ACC AAA AAC GCC GCA GTA ACT GTG GGT GAT TTA AAT GCC GTT GCC
thr lys asn ala ala val thr val gly asp leu asn ala val ala
3781/1261 3811/1271
CAA ACA CCG CTG ACC TTT GCA GGC GAT ACA GGC ACA CCG GCT AAA
gln thr pro leu thr phe ala gly asp thr gly thr thr ala lys
3841/1281
AAA CTG GGC GAG ACT TTG ACC ATC AAA GGT GGC CAA ACA GAC ACC
lys leu gly glu thr leu thr ile lys gly gly gln thr asp thr
3871/1291 3901/1301
AAT AAG CTA ACC GAT AAT AAC ATC GGT GTG GTA GCA GGT ACT GAT
asn lys leu thr asp asn asn ile gly val val ala gly thr asp
3931/1311
GGC TTC ACT GTC AAA CTT GCC AAA GAC CTA ACC AAT CTT AAC AGC
gly phe thr val lys leu ala lys asp leu thr asn leu asn ser
3961/1321 3991/1331
GTT AAT GCA GGT GGC ACC AAA ATT GAT GAC AAA GGC GTG TCT TTT
val asn ala gly gly thr lys ile asp asp lys gly val ser phe
4021/1341
GTA GAC GCA AAC GGT CAA GCC AAA GCA AAC ACC CCT GTG CTA AGT
val asp ala asn gly gln ala lys ala asn thr pro val leu ser
4051/1351 4081/1361
GCC AAT GGC CTG GAC CTG GGT GGC AAA CGC ATC AGT AAC ATC GGT
ala asn gly leu asp leu gly gly lys arg ile ser asn ile gly

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 8 】

4111/1371
GCA GCT GTT GAT GAT AAC GAT GCG GTG AAC TTT AAG CAG TTT AAT
ala ala val asp asp asn asp ala val asn phe lys gln phe asn
4141/1381 4171/1391
GAA GTT GCC AAA ACG GTC AAC AAC CTA AAC AAC CAA AGT AAC TCA
glu val ala lys thr val asn asn leu asn asn gln ser asn ser
4201/1401
GGT GCG TCA TTG CCC TTT GTA GTA ACC GAT GCC AAT GGC AAG CCC
gly ala ser leu pro phe val val thr asp ala asn gly lys pro
4231/1411 4261/1421
ATC AAT GGC ACC GAT GAC AAG CCC CAA AAA GCC ATC AAG GGC GCC
ile asn gly thr asp asp lys pro gln lys ala ile lys gly ala
4291/1431
GAT GGT AAA TAC TAT CAC GCC AAC GCC AAC GGC GTA CCT GTG GAC
asn gly lys tyr tyr his ala asn ala asn gly val pro val asp
4321/1441 4351/1451
AAA GAT GGC AAC CCC ATC ACC GAT GCG GAC AAA CTT GCC AAT CTG
lys asp gly asn pro ile thr asp ala asp lys leu ala asn leu
4381/1461
GCA GCT CAT GGC AAA CCC CTT GAT GCA GGT CAT CAA GTG GTG GCA
ala ala his gly lys pro leu asp ala gly his gln val val ala
4411/1471 4441/1481
AGC CTA GGC GGC AAC TCA GAT GCC ATC ACC CTA ACC AAC ATC AAG
ser leu gly gly asn ser asp ala ile thr leu thr asn ile lys
4471/1491
TCC ACT TTG CCA CAA ATT GAC ACA CCA AAC ACA GGT AAT GCC AAT
ser thr leu pro gln ile asp thr pro asn thr gly asn ala asn
4501/1501 4531/1511
GCA GGG CAA GCC CAA AGT CTG CCC AGC CTA TCA GCA GCA CAG CAA
ala gly gln ala gln ser leu pro ser leu ser ala ala gln gln
4561/1521
AGT AAT GCT GCC AGT GFC AAA GAT GTG CTA AAT GTA GGC TTT AAC
ser asn ala ala ser val lys asp val leu asn val gly phe asn
4591/1531 4621/1541
TTG CAG ACC AAT CAC AAT CAA GTG GAC TTT GTC AAA GCC TAT GAT
leu gln thr asn his asn gln val asp phe val lys ala tyr asp
4651/1551
ACC GTC AAC TTT GTC AAT GGT ACA GGT GCC GAC ATC ACA AGC GTG
thr val asn phe val asn gly thr gly ala asp ile thr ser val

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 9 】

4681/1561 4711/1571
CGT AGT GCT GAT GGC ACG ATG AGT AAC ATC ACC GTC AAC ACC GCC
arg ser ala asp gly thr met ser asn ile thr val asn thr ala
4741/1581
TTA GCA GCG ACC GAT GAT GAT GGC AAT GTG CTT ATC AAA GCC AAA
leu ala ala thr asp asp asp gly asn val leu ile lys ala lys
4771/1591 4801/1601
GAT GGT AAG TTC TAC AAA GCA GAC GAC CTC ATG CCA AAC GGC TCA
asp gly lys phe tyr lys ala asp asp leu met pro asn gly ser
4831/1611
CTA AAA GCA GGC AAA TCA GCC AGT GAT GCC AAA ACT CCA ACT GGT
leu lys ala gly lys ser ala ser asp ala lys thr pro thr gly
4861/1621 4891/1631
CTA AGC CTT GTC AAC CCC AAT GCT GGT AAA GGC AGT ACA GGC GAT
leu ser leu val asn pro asn ala gly lys gly ser thr gly asp
4921/1641
GCA GTG GCT CTT AAT AAC TTA TCA AAA GCG GTA TTT AAA TCC AAA
ala val ala leu asn asn leu ser lys ala val phe lys ser lys
4951/1651 4981/1661
GAT GGT ACA ACT ACT ACC ACA GTA AGC TCT GAT GGC ATC AGT ATC
asp gly thr thr thr thr val ser ser asp gly ile ser ile
5011/1671
CAA GGC AAA GAT AAC AGC AAC ATC ACC CTA AGC AAA GAT GGG CTG
gln gly lys asp asn ser asn ile thr leu ser lys asp gly leu
5041/1681 5071/1691
AAT GTA GGC GGT AAG GTC ATC AGC AAT GTG GGT AAA GGC ACA AAA
asn val gly gly lys val ile ser asn val gly lys gly thr lys
5101/1701
GAC ACC GAC GCT GCC AAT GTA CAA CAG TTA AAC CGA AGT ACG CAA
asp thr asp ala ala asn val gln gln leu asn arg ser thr gln
5131/1711 5161/1721
CTT GTT GGG TCT TGG GTA ATG GCT GGT AAT GAT AAC GCT GAC GGC
leu val gly ser trp val met ala gly asn asp asn ala asp gly
5191/1731
AAT CAG GTA AAC ATT GCC GAC ATC AAA AAA GAC CCA AAT TCA GGT
asn gln val asn ile ala asp ile lys lys asp pro asn ser gly
5221/1741 5251/1751
TCA TCA TCT AAC CGC ACT GTC ATC AAA GCA GGC ACG GTA CTT GGC
ser ser ser asn arg thr val ile lys ala gly thr val leu gly
5281/1761
GGT AAA GGT AAT AAC GAT ACC GAA AAA CTT GCC ACT GGT GGT GTA
gly lys gly asn asn asp thr glu lys leu ala thr gly gly val

Fig 6 (つづき)

【 図 6 - 10 】

5311/1771 5341/1781
CAA GTG GGC GTG GAT AAA GAC GGC AAC GCT AAC GGC GAT TTA AGC
gln val gly val asp lys asp gly asn ala asn gly asp leu ser
5371/1791
AAT GTT TGG GTC AAA ACC CAA AAA GAT GGC AGC AAA AAA GCC CTG
asn val trp val lys thr gln lys thr lys thr lys ala leu
5401/1801 5431/1811
CTC GCC ACT TAT AAC GCC GCA GGT CAG ACC AAC TAT TTG ACC AAC
leu ala thr tyr asn ala ala gly gln thr asn tyr leu thr asn
5461/1821
AAC CCC GCA GAA GCC ATT GAC AGA ATA AAT GAA CAA GGT ATC CGC
asn pro ala glu ala ile asp arg ile asn glu gln gly ile arg
5491/1831 5521/1841
TTC TTC CMT GTC AAC GAT GGC AAT CAA GAG CCT GTG GTA CAA GGG
phe phe his val asn asp gly asn gln glu pro val val gln gly
5551/1851
CGT AAC GGC ATT GAC TCA AGT GCC TCA GGC AAG CAC TCA GTG GCG
arg asn gly ile asp ser ser ala ser gly lys his ser val ala
5581/1861 5611/1871
GTC GGT TAT AAG GCC AAG GCA GAT GGT GAA GCC GCC GTT GCC ATA
val gly tyr lys ala lys ala asp gly glu ala ala val ala ile
5641/1881
GGC AGA CAA ACC CAA GCA GGC AAC CAA TCC ATC GCC ATC GGT GAT
gly arg gln thr gln ala gly asn gln ser ile ala ile gly asp
5671/1891 5701/1901
AAC GCA CAA GCC ACA GGC GAT CAA TCC ATC GCC ATC GGT ACA GGC
asn ala gln ala thr gly asp gln ser ile ala ile gly thr gly
5731/1911
AAT GTG GTA GCA GGT AAG CAC TCT GGT GCC ATC GGC GAC CCA AGC
asn val val ala gly lys his ser gly ala ile gly asp pro ser
5761/1921 5791/1931
ACT GTT AAG GCT GAT AAC AGT TAC AGT GTG GGT AAT AAC AAC CAG
thr val lys ala asp asn ser tyr ser val gly asn asn asn gln
5821/1941
TTT ACC GAT GCC ACT CAG AGC GAT GTC TTT GGT GTG GGC AAT AAC
phe thr asp ala thr gln thr asp val phe gly val gly asn asn
5851/1951 5881/1961
ATC ACC GTG ACC GAA AGT AAC TCG GTT GCC TTA GGT TCA AAC TCT
ile thr val thr glu ser asn ser val ala leu gly ser asn ser

Fig 6 (つづき)

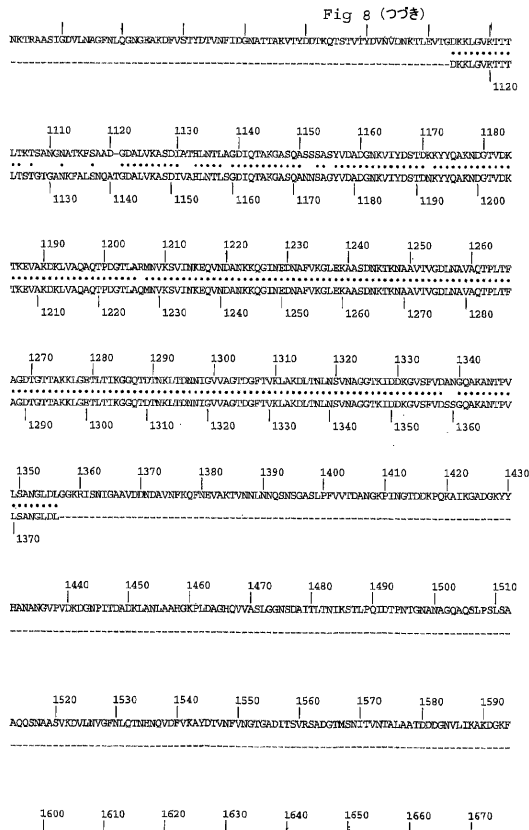
【 図 6 - 11 】

5911/1971
GCC ATC AGT GCA GGC ACA CAC GCA GGC ACA CAA GCC AAA AAA TCT
ala ile ser ala gly thr his ala gly thr gln ala lys lys ser
5941/1981 5971/1991
GAC GGC ACA GCA GGT ACA ACC ACC ACA GCA GGT GCA ACA GGT ACG
asp gly thr ala gly thr thr thr thr thr thr thr thr thr thr
6001/2001
GTT AAA GGC TTT GCT GGA CAA ACG GCG GTT GGT GCG GTC TCC GTG
val lys gly phe ala gly gln thr ala val gly ala val ser val
6031/2011 6061/2021
GGT GCC TCA GGT GCT GAA CGC CGT ATC CAA AAT GTG GCA GCA GGT
gly ala ser gly ala glu arg arg ile gln asn val ala ala gly
6091/2031
GAG GTC AGT GCC ACC AGC ACC GAT GCG GTC AAT GGT AGC CAG TTG
glu val ser ala thr ser thr asp ala val asn gly ser gln leu
6121/2041 6151/2051
TAC AAA GCC ACC CAA AGC ATT GCC AAC GCA ACC AAT GAG CTT GAC
tyr lys ala thr gln ser ile ala asn ala thr asn glu leu asp
6181/2061
CAT CGT ATC CAC CAA AAC GAA AAT AAA GCC AAT GCA GGG ATT TCA
his arg ile his gln asn glu asn lys ala asn ala gly ile ser
6211/2071 6241/2081
TCA GCG ATG GCG ATG GCG TCC ATG CCA CAA GCC TAC ATT CCT GGC
ser ala met ala met ala ser met pro gln ala tyr ile pro gly
6271/2091
AGA TCC ATG GTT ACC GGG GGT ATT GCC ACC CAC AAC GGT CAA GGT
arg ser met val thr gly gly ile ala thr his asn gly gln gly
6301/2101 6331/2111
GCG GTG GCA GTG GGA CTG TCG AAG CTG TCG GAT AAT GGT CAA TGG
ala val ala val gly leu ser lys leu ser asp asn gly gln trp
6361/2121
GTA TTT AAA ATC AAT GGT TCA GCC GAT ACC CAA GGC CAT GTA GGG
val phe lys ile asn gly ser ala asp thr gln gly his val gly
6391/2131
GCA GCA GTT GGT GCA GGT TTT CAC TTT TAA GCCATAAATCCG
ala ala val gly ala gly phe his phe ストップ
AGATTTTACTTTAAAAAATCAATCTCACCATAGTTGTATAAAACAGCATCA

逆方向反復単位 6505
GCATCAGTCATATTACTGTGCTTGATGGTTTTTATTACTTAAACCATTTTA

Fig 6 (つづき)

【 図 8 - 4 】



【 図 9 】

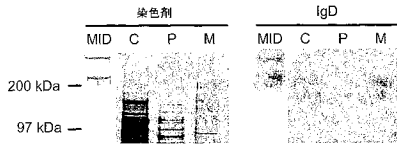
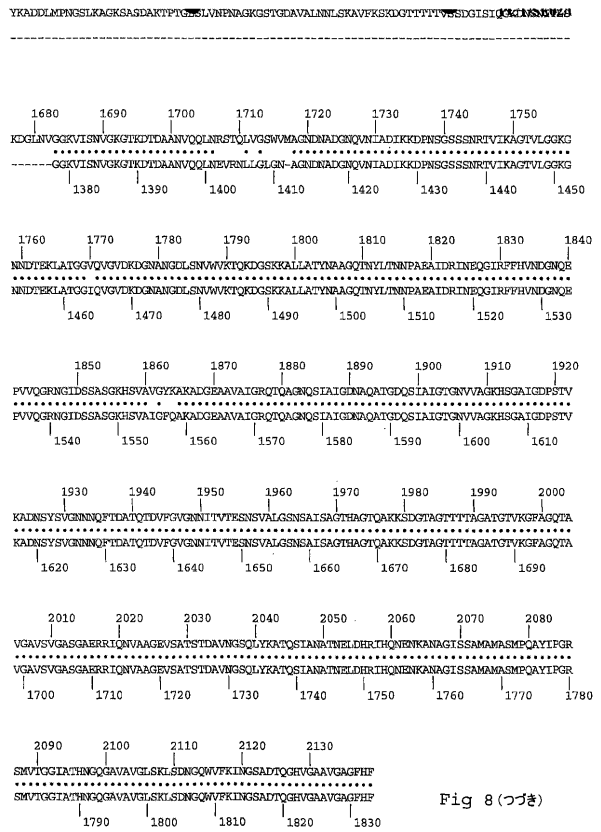


Fig 9

【 図 8 - 5 】



【 図 10 】

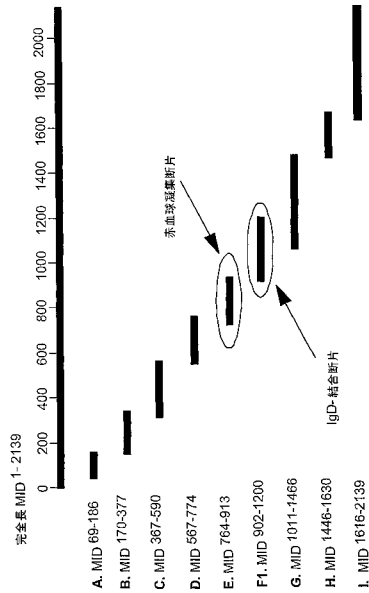


Fig 10

【 図 1 1 】

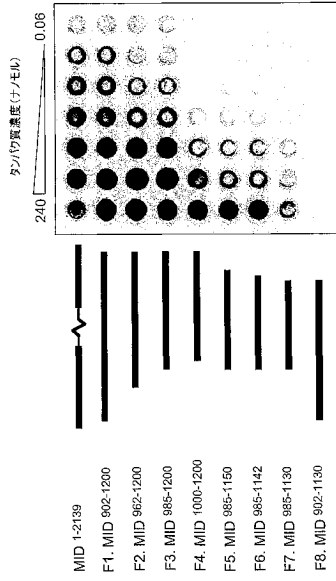


Fig. 11

【 図 1 2 】

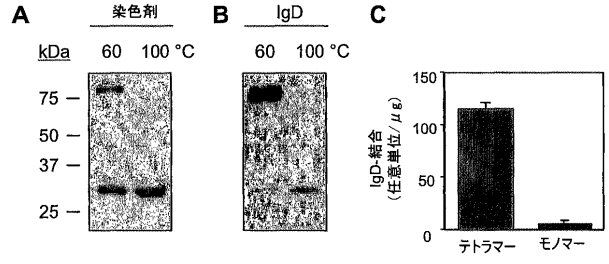


Fig 12

【 図 1 3 】

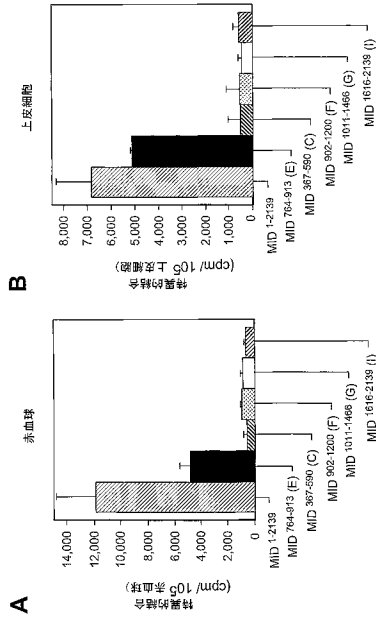


Fig 13

【 図 1 4 】

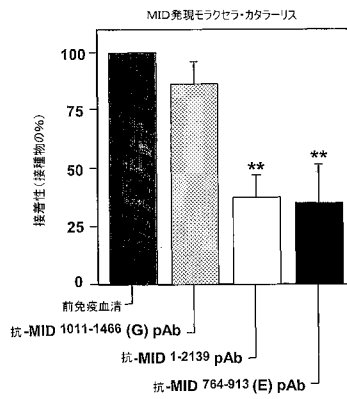


Fig 14

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 January 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/004651 A1

(51) International Patent Classification: C12N 15/31, JANSON, Håkan [SE/SE]; Trädgårdsgatan 6B, S-223-53
C07K 14/22 // C12N 15/62 Lund (SE).

(21) International Application Number: PCT/SE02/01299 (74) Agent: AWAPATENT AB; Box 5117, S-200 71 Malmö
(SE).

(22) International Filing Date: 1 July 2002 (01.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0102410-8 4 July 2001 (04.07.2001) SE

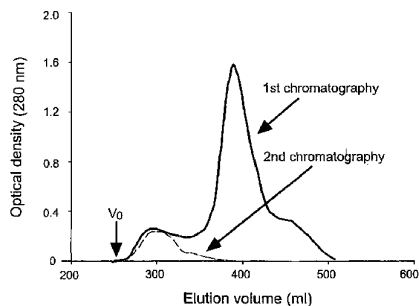
(71) Applicant and
(72) Inventor: FORSGREN, Arne [SE/SE]; Sotthönsvägen
4B, S-239 41 Falksterbo (SE).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), FI, ES, H (utility model), H, GB, GD, GI, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, U, U, U), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, SI, SK).

[Continued on next page]

(54) Title: NOVELL SURFACE EXPOSED IMMUNOGLOBULIN D-BINDING PROTEIN FROM MORAXILLA CATARRHALIS



(57) Abstract: The present invention relates to a surface exposed protein, which can be detected in Moraxella catarrhalis, having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, to an immunogenic or IgD-binding fragment of said surface exposed protein, and to an immunogenic and adhesive fragment of said surface exposed protein. DNA segments, vaccines, plasmids and phages, non human hosts, recombinant DNA molecules and plants, fusion proteins and polypeptides and fusion products are also described. A method of detecting IgD, a method of separating IgD, a method of isolation of a surface exposed protein of Moraxella catarrhalis and a method for treatment of an autoimmune disease is also disclosed.

WO 03/004651 A1

WO 03/004651 A1 

TR), OAPI parent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

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.

Published:

— with international search report

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

NOVEL SURFACE EXPOSED IMMUNOGLOBULIN D-BINDING PROTEIN
FROM MORAXELLA CATARRHALIS

Field of the invention

The present invention relates to a surface exposed protein, which can be detected in *Moraxella catarrhalis*, having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, and to an immunogenic or IgD-binding fragment of said surface exposed protein, and to an immunogenic and adhesive fragment of said surface exposed protein.

10 Background of the invention

Moraxella catarrhalis is a Gram-negative diplococcus that for a long time was considered a relatively harmless commensal in the respiratory tract. At present, it is the third most frequent cause of otitis media and also a significant agent in sinusitis and lower respiratory tract infections in adults with pulmonary disease. *M. catarrhalis* is also one of the most common inhabitants of the pharynx of healthy children.

Two decades ago, *Haemophilus influenzae* and *M. catarrhalis* were shown to display a strong affinity for both soluble and surface-bound human IgD (1). The IgD-binding seems to be paralleled by a similar interaction with surface-bound IgD at the cellular level, a phenomenon that explains the strong mitogenic effects on human lymphocytes by *H. influenzae* and *M. catarrhalis* (2-4). An IgD-binding outer membrane protein from *H. influenzae* (protein D) was isolated and cloned, and shown to be an important pathogenicity factor (5). However, protein D does not bind to the majority of IgD myelomas tested, and it was suggested that encapsulated *H. influenzae* of serotype b expresses an additional IgD receptor (6).

Early studies demonstrated that the outer membrane proteins (OMPs) from a diverse collection of *Moraxella*

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

2

isolates exhibit a high degree of similarity (7). Investigators have primarily focused their research efforts on a selected group of proteins. Recent studies have demonstrated that the high-molecular-weight surface antigen, termed UspA or HMW-OMP, is actually comprised of two different proteins. These proteins are named UspA1 and UspA2 (8,9,10). The apparent molecular masses of these OMPs are greater than 250 kDa as determined by SDS-PAGE analysis. Reduction with formic acid yields bands of approximately 120 to 140 kDa, suggesting that the UspA proteins form an oligomeric complex composed of several monomeric subunits (11). The predicted mass of each protein, as deduced from the cloned genes, is 88 kDa and 62 kDa for UspA1 and UspA2, respectively. It is thought that the difference in the deduced mass and the mass determined using SDS-PAGE is due to a predicted coiled coil structure (9).

In a recent patent publication, an outer membrane protein of *M. catarrhalis* with a molecular mass of approximately 200 kDa was isolated (12). A sequence encoding a protein of approximately 200 kDa was also provided. The protein was shown to be immunogenic, but no further biological functions were presented. In addition, a 200 kDa protein is associated with hemagglutinating *M. catarrhalis* (13,14).

CopB is an 80 kDa surface exposed major OMP that shows a moderate antigenic conservation. In addition, OMP CD is a 46 kDa highly conserved protein with numerous surface exposed epitopes and OMP E a 47 kDa protein detected on a variety of heterologous strains. The lactoferrin-binding (LbpA and B) and transferrin-binding (TbpA and B) proteins have molecular sizes of 99-111 and 74-105 kDa, respectively.

Certain strains of *Staphylococcus aureus* produce immunostimulatory exotoxins such as toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), staphylococcal enterotoxin A (SEA), SEB and SEC, all of which are associated with food poisoning and toxic shock syndrome (TSS). These exotoxins have been

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

3

denominated as superantigens (SAg) due to their ability to activate a high frequency of T lymphocytes. SAg bind as unprocessed proteins to HLA class II molecules on APC and oligoclonally activate T cells expressing particular TCR V β chains. In vivo exposure to excessive amounts of SAg results in a strong cytokine production and includes IL-2, TNF- α and IFN- γ , which are associated with a toxic shock like syndrome.

Since the discovery of the first immunoglobulin-binding bacterial protein, *S. aureus* protein A (SpA) in 1966, this protein has been extensively characterized. The ability of SpA to bind the Fc part of IgG is well known, but SpA also binds a fraction of Ig-molecules of all classes due to the so called 'alternative' binding, which represents an interaction with the variable region of certain heavy chains. All IgG-binding capacity of *S. aureus* has been considered to be mediated by SpA. However, the existence of a second gene in *S. aureus* encoding an Ig-binding protein has also been reported.

Streptococcus pyogenes and *Peptostreptococcus magnus* are other examples of Ig-binding bacteria. *S. pyogenes* produces protein H belonging to the M family of proteins, and has strong affinity for the Fc region of IgG. Proteins expressed by some strains bind IgA instead of IgG or both IgG and IgA. Protein Bac or the B-antigen is an IgA-binding protein expressed by certain strains of group B streptococci. Finally, *P. magnus* expresses protein L that shows high and specific affinity for Ig light chains, especially k light chains, and thereby interacts with all classes of Ig.

IgD is a unique immunoglobulin that exists in both a soluble and a surface-bound form. Both forms are encoded by the same gene and are splicing products. All mature B lymphocytes have B cell receptors (BCR) consisting of membrane-bound IgD and IgM. Soluble IgD comprises approximately 0.25 % of the total amount of serum-Ig. The main function of IgD seems to be as an antigen-receptor on the

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

4

B cell surface in order to optimize B cell recruitment and accelerated affinity maturation. Antigen is taken up through IgD by endocytosis followed by intracellular degradation and presentation on MHC class II for T cells, which in turn are activated and produce cytokines. Hereby, T cell help is obtained including numerous cytokines (e.g. interleukin-4) and co-stimulatory molecules such as CD28.

Despite macrophages, dendritic cells, and B cells all can present antigens to T lymphocytes, the B cells are 100-fold more efficient due to the importance of the antigen-presenting immunoglobulin on the surface. An attractive strategy in order to potentiate immunization is to directly target an antigen to the B cell receptor. It was early shown that the mouse antibody-response against bovine serum albumin (BSA) conjugated to anti-IgD monoclonal antibodies was 100-fold stronger compared to BSA administration without any antibody. In parallel, it has been demonstrated that a mouse myeloma antigen incorporated into the constant region of anti-IgD-antibodies targeted to the surface-bound IgD results in an up to 1000-fold more efficient antigen presentation on MHC class II (15).

Tolerance induction can be achieved experimentally by B cell activation through the IgD BCR without any additional T cell help. It would also be possible to treat autoimmune diseases by inducing B cell anergy and thus inhibit the production of auto-antibodies. In fact, SLE-prone mice administered dextran-conjugated anti-IgD antibodies exhibit a delayed development of autoimmunity. In yet another study it was shown that B cell activation via IgD decreases a T helper 2-induced IgE response suggesting a therapy for diminishing the IgE production in severely allergic individuals by displacing the antibody response from a Th2- to a Th1-response. By targeting antigens to the B cell receptor IgD, stimulation, tolerance, and a switch from IgE-production can be achieved.

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

5

In addition, polyclonal activation has been reported. The outcome is depending on the experimental model used. With different constructs including various repeating IgD-binding segments, it is possible to tailor the response.

5 The T cell is a significant player in the anti-tumour response since it recognizes tumour-specific antigens. However, the important T cells display commonly depressed activity in the cancer patient due to a general immunosuppression. A triggering of T helper cells would
10 therefore be very beneficial. Vaccination against tumours using antigen presenting cells (APC) has recently been acknowledged (17). Immunization protocols with APC pulsed ex vivo with tumor antigens (peptides) have been shown to induce effective MHC class I presentation for cytotoxic T
15 cells. It has also been demonstrated that EBV-transformed B cells are able to present melanoma antigens for tumour-infiltrating lymphocytes (TIL). In experimental models, it has also been shown that tumour cells transfected with MHC class II and B7 surface molecules, receptors that are
20 abundant on B cells, would be a feasible approach for tumour vaccination. Interestingly, B16 melanoma bearing mice that were injected with B cells pulsed with a tumour lysate from the corresponding cell line showed a prolonged survival due to an increase in IFN- γ producing T
25 cells. It was also demonstrated that the induced T helper cells evoked a stronger cytotoxic response against the solid tumours. Since myeloma antigen targeted to IgD induces a T cell response, the suggested approach using IgD-binding bacterial proteins conjugated to specific
30 tumour antigens would be feasible.

To target an antigen (e.g. peptide derived from a microbe or a specific tumour) to IgD-bearing B cells in order to trigger both humoral and cellular immune responses a IgD-binding protein or a shorter IgD-binding peptide would be a very feasible vector. Several examples of
35 successful strategies with a similar angle of approach exist. The humoral immune response in mice against bovine

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

6

serum albumin (BSA) conjugated to anti-IgD monoclonal antibodies is 100-fold stronger compared to when BSA is administered alone. A recent publication by Iunde et al. (15) describes that when a myeloma-derived peptide is integrated in the constant region of anti-IgD Fab' fragments and injected into mice, a 1,000-fold more efficient antigen presentation is achieved against the antigen in question (15). In parallel, the Ig-binding fragment of *S. aureus* protein A fused with cholera toxin significantly increases both systemic and mucosal immune responses 10- to 100-fold against the cholera toxin (16). Finally, in a mouse tumour model consisting of the experimentally well defined B16 melanoma, activated B lymphocytes that are pulsed ex vivo with peptides derived from the tumour tissue can evoke a stronger anti-tumour response in vivo and consequently a prolonged survival (17).

Summary of the invention

In one aspect the present invention relates to a surface exposed protein, which can be detected in *Moraxella catarrhalis*, having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, or an immunogenic and adhesive fragment of said surface exposed protein.

In another aspect the present invention relates to an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein as defined above, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis*, having a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof.

In a further aspect the present invention relates to an immunogenic or IgD-binding fragment as described

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

7

above, having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 10.

In still a further aspect the present invention relates to an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined above, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis*, having a capacity of binding erythrocytes and epithelial cells.

In still another aspect the present invention relates to an immunogenic and adhesive fragment as defined above, having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 8.

In one aspect the present invention relates to a DNA segment comprising a DNA sequence, as shown in SEQ ID NO 2, which DNA sequence codes for a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis* as defined above, or naturally occurring or artificially modified variants of said DNA sequence.

In yet another aspect the present invention relates to a DNA segment comprising a DNA sequence which codes for an immunogenic or IgD-binding fragment as defined above.

In a further aspect the present invention relates to a DNA segment as defined above, comprising a DNA sequence, as shown in SEQ ID NO 11, which DNA sequence codes for an immunogenic or IgD-binding fragment as defined above.

In still a further aspect the present invention relates to a DNA segment comprising a DNA sequence, which codes for an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined above.

In another aspect the present invention relates to a DNA segment as above, comprising a DNA sequence, as shown in SEQ ID NO 9, which DNA sequence codes for an immunogenic and adhesive fragment as defined above.

In a further aspect the present invention relates to a vaccine containing a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

8

sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said protein, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, or an immunogenic and adhesive fragment of said surface exposed protein.

In another aspect the present invention relates to a vaccine containing an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, which has a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, preferably a vaccine containing an immunogenic or IgD-binding fragment having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 10.

In still another aspect the present invention relates to a vaccine containing an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis* as defined above, preferably a vaccine containing an immunogenic and adhesive fragment having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 8.

In one preferred embodiment said vaccines are combined with another vaccine and in another preferred embodiment said vaccines are combined with an immunogenic portion of another molecule.

In one aspect the present invention relates to a plasmid or phage comprising a DNA sequence, which codes for a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants.

In another aspect the present invention relates to a plasmid or phage comprising a DNA sequence, which codes

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

9

for a an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, preferably a plasmid or phage comprising a DNA sequence, which codes for a an immunogenic or IgD-binding fragment having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 10.

10 In still another aspect the present invention relates to a plasmid or phage comprising a DNA sequence, which codes for an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined above, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding erythrocytes and epithelial cells or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, preferably a plasmid or phage comprising a DNA sequence, which codes for a an immunogenic and adhesive fragment having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 8.

20 In yet another aspect the present invention relates to a non human host comprising at least one plasmid or phage as defined above, and capable of producing said protein or variants, or said immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, or said immunogenic and adhesive fragment of said protein, which host is chosen among bacteria, yeast and plants. In one embodiment the host is *E. coli*.

30 In one aspect the present invention relates to a recombinant DNA molecule comprising a DNA sequence coding for a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, or for an immunogenic or IgD-

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

10

binding fragment of said protein, or variants, which DNA sequence is fused to another gene.

In another aspect the present invention relates to a recombinant DNA molecule comprising a DNA sequence coding for an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, which DNA sequence is fused to another gene, preferably a recombinant DNA molecule comprising a DNA sequence coding for an immunogenic or IgD-binding fragment having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 10.

In still another aspect the present invention relates to a recombinant DNA molecule comprising a DNA sequence coding for an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as above, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding erythrocytes and epithelial cells, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, which DNA sequence is fused to another gene, preferably a recombinant DNA molecule comprising a DNA sequence coding for an immunogenic and adhesive fragment having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 8.

In yet another aspect the present invention relates to a plasmid or phage comprising said fused DNA sequence as defined above.

In a further aspect the present invention relates to a non-human host comprising at least one plasmid or phage as defined above, which host is chosen among bacteria, yeast and plants. In one embodiment the host is *E. coli*.

In one aspect the present invention relates to a fusion protein or polypeptide, in which a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

11

binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, is combined with another protein by the use of a recombinant DNA molecule as defined above.

In another aspect the present invention relates to a fusion protein or polypeptide, in which an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis*, which has a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, is combined with another protein by the use of a recombinant DNA molecule as defined above.

In still another aspect the present invention relates to a fusion protein or polypeptide in which an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined above, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding erythrocytes and epithelial cells, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, is combined with another protein by the use of a recombinant DNA molecule as defined in above.

In yet another aspect the present invention relates to a fusion product, in which a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said protein, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, is covalently or by any other means bound to a protein, carbohydrate or matrix.

In a further aspect the present invention relates to a fusion product in which an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

12

of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, is covalently or by any other means bound to a protein, carbohydrate or matrix.

5 In still another aspect the present invention relates to a fusion product in which an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined above, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding
10 erythrocytes and epithelial cells, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, is covalently, or by any other means, bound to a protein, carbohydrate or matrix. Preferably, a fusion product in which an immunogenic or IgD-binding fragment, having an
15 amino acid sequence described in SEQ ID NO 10, is covalently, or by any other means, bound to a protein, carbohydrate or matrix. Preferably, a fusion product in which an immunogenic and adhesive fragment, having an amino acid sequence described in SEQ ID NO 8, is covalently, or
20 by any other means, bound to a protein, carbohydrate or matrix.

In one aspect the present invention relates to a method of detecting IgD using a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino
25 acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said protein, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said
30 protein or variants, optionally labelled and/or bound to a matrix.

In a further aspect the present invention relates to a method of detecting IgD using an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein, which
35 fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

13

fied variants of said fragment, optionally labelled and/or bound to a matrix.

In another aspect the present invention relates to a method of detecting IgD using an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 10, and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, optionally labelled and/or bound to a matrix.

In a further aspect the present invention relates to a method of separating IgD using a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said protein, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, optionally bound to a matrix.

In yet another aspect the present invention relates to method of separating IgD using an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, optionally bound to a matrix.

In another aspect the present invention relates to a method of separating IgD using an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 10, and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, optionally labelled and/or bound to a matrix.

In one aspect the present invention relates to a method of isolation of a surface exposed protein of

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

14

Moraxella catarrhalis, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or
5 artificially modified variants of said protein, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants. Said method comprises the steps:

- a) subjecting a suspension of Moraxella catarrhalis to an extraction process by adding a zwitterionic or non-
10 ionic detergent, optionally in the presence of EDTA;
- b) applying the extract comprising the IgD-binding protein of Moraxella catarrhalis from step a) to an adsorption column;
- c) eluting the IgD-binding protein; and
- 15 d) separating the IgD-binding protein.

In another embodiment the concentration of the detergent in step a) of the method is within the range 0.1-5%, preferably 3%.

In yet another aspect the present invention relates
20 to a method for treatment of an autoimmune disease comprising extra corporal circulation of the blood through a material comprising a surface exposed protein as defined above, or a fragment thereof as defined above, for removal of IgD from the blood.

In one aspect the present invention relates to a purified antibody which is specific to an immunogenic portion of a surface exposed protein Moraxella catarrhalis, said protein having an amino acid sequence as described
25 in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, or an immunogenic or IgD-binding
30 fragment of said protein or variants.

In another aspect the present invention relates to a
35 purified antibody as described above, which is specific to an immunogenic or IgD-binding fragment as defined above, having a capacity of selectively binding membrane

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

15

bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment.

In still another aspect the present invention relates to a purified antibody as described above, which is
5 specific to an immunogenic or adhesive fragment as defined above, having a capacity of binding erythrocytes and epithelial cells.

Description of the figures

Fig. 1. Chromatography and rechromatography on a
10 Sephacryl S-400 column of Empigen® soluble extract from *M. catarrhalis* after ion exchange chromatography. The solid line indicates protein content of the first chromatography and the broken line rechromatography of the first peak. V_0 specifies the void volume.

15 Fig. 2. Analysis on SDS-PAGE of fractions representing different purification steps of MID. The fractions are shown for crude extract in 3 % Empigen®, after an ion-exchange chromatography on Q-sepharose column, and after the 1st and 2nd gel filtrations on a Sephacryl S-400
20 column. Two gels were run simultaneously, one was stained with Coomassie blue (Stain) and one was blotted onto Immobilon-P membranes, probed with human IgD(κ) myeloma protein (IgD), anti-UspA (α Usp), or anti-CopB (α B) monoclonal antibodies followed by incubation with appropriate
25 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Molecular weights of marker proteins are indicated to the left.

Fig. 3. Binding of MID to human myeloma sera representing different immunoglobulin classes. All sera were
30 diluted in two-fold steps (4 to 0.3 μ g) and applied to a nitrocellulose membrane. After saturation, washing and blocking, an [125 I]-MID-labeled probe was added. After overnight incubation and additional washings, specific MID-IgD binding was visualized by autoradiography.

35 Fig. 4. IgD-bearing B cells specifically bound FITC-conjugated MID. PBLs stained with RPE-conjugated mAbs against CD19+ (A) or CD3+ (D) followed by incubation with

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

16

MID-FITC were compared to PBLs incubated with anti-CD19 mAb in addition to an anti-IgD mAb (B). Double staining with CD3+ and anti-IgD mAb is demonstrated in (E). In (C), a panel with PBLs pre-incubated with a rabbit immunoglobulin fraction against human IgD followed by addition of anti-CD19 mAb and MID-FITC is shown. A control sample with no antibodies or MID-FITC is also included (F). PBLs were isolated from heparinized human blood using Lymphoprep one-step gradients. Lymphocytes (2.5 x 10⁵) were incubated with the appropriate antibodies, washed and further incubated with MID-FITC (10 µg/ml). All incubations were performed on ice and after final washings, PBLs were analysed by flow cytometry. In this particular experiment, 68 % of the total lymphocyte population was gated and analysed. Less than 2 % of the cells were labeled when isomatched mAbs were included as negative controls. A pre-immune rabbit serum did not significantly block MID-FITC binding to the IgD BCR (not shown). An experiment with a typical donor out of three separate ones analysed is shown.

Fig. 5. Schematic map of the *mid* gene showing the cloning strategy. Oligonucleotide primers used for DNA amplification are indicated by arrows placed above (PCR) and below (inverse PCR [IPCR]) the relevant sequences. Degenerated primers based upon the amino acid sequences outlined in Table II and specific primers are shown by broken and solid lines, respectively.

Fig. 6. Nucleotide sequence of the *mid* gene from *M. catarrhalis* Bc5 together with the deduced amino acid sequence. Putative -35, -10 regions, a possible ribosome binding site (RBS), inverted repeat, the predicted signal peptide, and two alternative start-codons at amino acid positions 1 and 17 are indicated. The stop-codon and the inverted repeat is also shown.

Fig. 7. The degrees of identity and similarity between MID isolated from five *M. catarrhalis* strains and UspA1 and A2 from ATCC 25238 are demonstrated. The iden-

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

17

tity and similarity were calculated using the software Needle.

Fig 8. Comparison of the amino acid sequence of MID with the protein presented in US 5,808,024.

5 Fig. 9. Recombinantly expressed MID retained its IgD-binding capacity. The left panel shows a Coomassie brilliant blue stained gel and the right panel a Western blot probed with human IgD. Native MID protein (MID) was run and compared to cytoplasmic (C), periplasmic (P), and
10 membrane (M) fractions. Numbers on the left indicate a molecular weight standard. *E. coli* BL21DE3 containing pET16-MID were induced for 4 h by IPTG. Cellular fractions were collected and proteins were separated by two SDS-PAGE that was run in parallel and either stained with
15 Coomassie brilliant blue or blotted onto an Immobilon-P membrane. The membrane was probed with human IgD followed by incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody.

Fig. 10. MID764-913 (fragment E) and MID902-1200
20 (fragment F) is responsible for erythrocyte hemagglutination and IgD-binding, respectively. A series of truncated MID proteins (designated A to I) were manufactured. Recombinant proteins containing histidine tags in their C-terminals (A to H) or fused with maltose binding protein (I) were produced in *E. coli* and purified on nickel
25 and amylose resin columns, respectively.

Fig. 11. MID962-1200 (fragment F2) has a conserved IgD-binding capacity compared with full length MID1-2139. Equimolar concentrations (range 240 to 0.06 nmol) of
30 purified full length MID1-2139 and 8 truncated MID fragments (F1 to F8) were analysed for IgD-binding by dot blots. The proteins MID902-1130 (F6), MID985-1130 (F7), and MID1000-1200 (F4) did not attract IgD, whereas all other fragments bound IgD. DNA encoding for the various
35 truncated MID proteins were cloned into the expression vector pET26b(+) and produced in *E. coli*. The recombinant proteins containing His-tags were purified and dot blot-

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

18

ted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was probed with human IgD followed by secondary HRP-conjugated polyclonal antibodies that were used for detection.

Fig. 12. A tetrameric structure of MID962-1200 (F2) is a prerequisite for optimal IgD-binding. (A), SDS-PAGE of MID962-1200 after treatment at 60 °C separates monomers and tetramers. After heat treatment at 100 °C monomers only can be detected. (B), Corresponding Western blot with IgD as probe reveals weak IgD-binding to monomers. (C), Mean IgD-binding to tetramers and monomers, respectively in 6 different experiments. IgD-binding is shown as arbitrary units/ μ g protein. MID962-1200 was treated in SDS-sample buffer at 60 °C or 100 °C for 10 min, and subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis. The resulting Coomassie-stained gel and Western blot were analysed by densitometry. The percentage of protein migrating as tetramer or monomer was calculated and compared with the IgD-binding capacity.

Fig. 13. [125I]-labelled recombinant MID764-913 (fragment E) is specifically attracted to erythrocytes and epithelial cells. [125I]-labelled MID and a series of truncated [125I]-MID fragments (C, E, F, G, and I) were added to human erythrocytes (A). The recombinant [125I]-labelled MID fragments were also added to epithelial cells (B). All truncated MID proteins (except fragment I) were produced in *E. coli* followed by purification on nickel resins. Fragment I was a fusion protein with MBP and consequently purified on an amylose resin. The recombinant proteins were labelled with [125I] and added to erythrocytes or the epithelial cell line A549. After several washings, bound radioactivity was measured in a γ -counter. Data are presented as mean values of 2 experiments with duplicates. Error bars indicate SD.

Fig. 14. Adhesion of MID-expressing *M. catarrhalis* to epithelial cells depends on the amino acid residues MID764-913 (fragment E). A decreased adhesion to epithelial cells was observed with MID-expressing bacteria coa-

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

19

ted with rabbit anti-MID1-2139 or anti-MID764-913 polyclonal antibodies compared to a pre-immune serum or anti-MID1011-1446 (fragment G) pAb. Bacteria were pre-incubated with the pre-immune serum or specific antisera for 1 h at 4 °C. Bacteria were added to the epithelial cells followed by centrifugation and incubation for 30 min at 37 °C. After washings, cells were treated with trypsin-EDTA and the suspensions were plated on blood agar plates. Colony forming units were counted after an overnight incubation. The adherence ratio (cfu added/ cfu adhered) was calculated. Results are shown as mean values of 4 separate experiments with duplicates. Error bars indicate SD. *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ and * $P \leq 0.05$.

Description of the invention

MID is not identical to previously well characterized outer membrane proteins of *M. catarrhalis*. It is not recognized by monoclonal antibodies derived against the UspA or CopB outer membrane antigens. MID also has a different migration pattern in SDS-PAGE and a different composition as shown by amino acid and DNA sequence analysis. MID appears as a 200 kDa band in accordance with the Mw from the deduced amino acid sequence, but also as an extra band with an estimated molecular mass of more than 1,000 kDa. The extra band indicates that native MID is an oligomeric complex in a similar fashion as UspA (11). This is further supported by the fact that MID was eluted immediately after the void volume from a Sephacryl S-400 column with a fractionation range of up to 8,000 kDa. The amino acid sequences for MID shows 11.1 and 6.7% identity, respectively, with the USPA1 and USPA2 outer membrane proteins from *M. catarrhalis* (Fig 7).

In a recent patent publication, an outer membrane protein of *M. catarrhalis* with a molecular mass of approximately 200 kDa was isolated (12). A sequence encoding a protein of approximately 200 kDa was also provided. However, that protein sequence is not identical to the sequence provided by us and shows only 45.9 to 54.4% iden-

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

20

tity with MID (Fig 7). The protein was shown to be immunogenic, but no further biological functions were presented. In addition, a 200 kDa protein is associated with hemagglutinating *M. catarrhalis* (13,14).

5 Experimental part

The present investigation describes the isolation, purification, characterization, cloning and expression of the novel Ig-binding protein named MID of *M. catarrhalis*, which has affinity for human IgD, of an immunogenic or
 10 IgD-binding fragment of said surface exposed protein, and of an immunogenic and adhesive fragment of said surface exposed protein.

Materials and methods

Bacteria and plasmids

15 *M. catarrhalis*, strain Bc5, was a clinical isolate from a nasopharyngeal swab culture at our Department. 118 strains isolated from blood, nasopharynx, and sputum were obtained from Sweden, Denmark, Finland, Hungary, Japan, and USA. Sequenced strains and plasmids used for expres-
 20 sion are shown in Table I.

Tabell I: Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or plasmid	Description (site of isolation)	Reference or source
<u>Strains</u>		
DH5 α	<i>E. coli</i>	Novagen
BL21DE3	<i>E. coli</i>	Novagen
BBH17	<i>M. catarrhalis</i> (sputum)	Christensen (Denmark)
Bc5	<i>M. catarrhalis</i> (nasopharynx)	Dept. Clinical Microbiology, Malmö, Sweden)
NCTC 4103	<i>M. catarrhalis</i> (nasopharynx)	CCUG (Gothenburg, Sweden)

25

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

21

Strains or plasmid	Description (site of isolation)	Reference or source
RH1	<i>M. cararrhalis</i> (blood)	Christensen (Denmark)
RH4	<i>M. cararrhalis</i> (blood)	Christensen (Denmark)
<u>Plasmid</u>		
pET16(b)	Expression vector	Novagen
pET16-MID	PET16(b) with the ORF of mid	This study

Bacteria were grown overnight in Nutrient Broth (Oxoid, Basingstoke Hampshire, England), harvested and washed in phosphate-balanced saline (PBS), pH 7.2 by centrifugation.

Immunoglobulins, sera and other proteins

The Ig preparations IgG1(κ), IgG1(λ), IgG2(κ), IgG2(λ), IgG3(κ), IgG3(λ), IgG4(κ), IgG4(λ), IgA1(κ), IgA1(λ), IgA2(κ), IgA2(λ), IgM(κ), IgM(λ), IgD(κ), IgD(λ) and IgE(κ) were all of human origin and purchased from The Binding Site (Birmingham, England). IgD myeloma sera IgD(κ) and IgD(λ) were from the same company and IgD-standard serum OTRD 02/03 was from Behringwerke AG (Munich, Germany). Myeloma sera IgD(λ)A, IgD(λ) B, IgG A, IgG B, IgG C, IgM, IgA A and IgA B were obtained from the Department of Clinical Chemistry, Malmö, Sweden. The concentration of respective immunoglobulins was according to the suppliers.

Antibodies

Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human IgD was from Biosource (Camarillo, CA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human IgD, unlabelled rabbit anti-human IgD, and HRP-labelled rabbit anti-mouse Ig were purchased from Dakopatts (Gentofte, Denmark). Goat anti-human IgD and HRP-conjugated rabbit anti-human polyvalent immunoglobulins was from Sigma (St. Louis, MO). Phycoerythrin (RPE)-conjugated mouse anti-human CD3 and CD19 were from Becton Dickinson

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

22

(San José, CA). Mouse monoclonal antibodies 17C7 (UspA) and 10F3 (CopB) were kindly provided by Dr. Eric J. Hansen, Department of Microbiology, University of Texas (Dallas, TX).

5 Antisera

Rabbits were immunized intramuscularly with 200 µg of purified MID (Forsgren et al., 2001), recombinant MID fragments, or recombinant UspA1 emulsified in complete Freund's adjuvans (Difco, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and boosted on days 18 and 36 with the same dose of protein in incomplete Freund's adjuvans. Blood was drawn 2 to 3 weeks later. The anti-UspA1 polyclonal antibodies reacted with both recombinant UspA1 and UspA2 as examined by Western blots.

15 *SDS-PAGE and detection of proteins on membranes (Western blot)*

SDS-PAGE was run using a commercial electrophoresis system consisting of 10 % Bis-Tris gels with running (MES), sample (LDS), and transfer buffer as well as a blotting instrument (Novex, San Diego, CA). Briefly, samples were boiled for 10 min followed by electrophoresis at room temperature using Protein II vertical slab electrophoresis cells (Novex) at 150 constant voltage. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, Sundbyberg, Sweden). In addition, electrophoretic transfer of protein bands from the gel to an Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA) was carried out at 30 V for 2-3 h. After transfer, the Immobilon-P membrane was blocked in PBS with 0.05% Tween 20 (PBS-Tween) containing 5% milk powder. After several washings in PBS-Tween, the membrane was incubated for 1 h in room temperature with purified IgD myeloma protein (0.5 µg/ml, hu IgD(κ) myeloma; The Bindingsite, Birmingham, UK) in PBS-Tween including 2 % milk powder. HRP-conjugated goat anti-human IgD diluted 1/1000 in the same buffer was added after several washings in PBS-Tween. In some experiments, IgD myeloma protein was replaced by myeloma

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

23

protein of other immunoglobulin classes and HRP-labeled anti-human polyvalent immunoglobulins (Sigma) was used as a secondary layer. Mouse mAbs 17C7 and 10F3 were used to detect *Moraxella* outer membrane proteins UspA1, 2 and Cop B, respectively (7,8). In these experiments, HRP-labeled rabbit anti-mouse immunoglobulins were used as a secondary layer. After incubation for 40 min at room temperature and several additional washings in PBS-Tween, development was performed with ECL Western blotting detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Western blots were analysed by a Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad).

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA was used to quantitate the immunoglobulin D-binding protein. Extracts of *M. catarrhalis* diluted in five-fold steps in 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0 were added in 100 µl volumes to microtiter plates (F96 Maxisorb, Nunc-Immuno module, Roskilde, Denmark), which were sealed and incubated at 4 °C overnight. After washing the plate four times in PBS-Tween, blocking buffer PBS-Tween containing 1.5 % ovalbumin, was added. The plate was incubated for 1 h at room temperature and further washed four times with PBS-Tween. IgD(κ) myeloma protein, 0.05 µg in 100 µl PBS-Tween containing 1.5% ovalbumin was added to each well and after incubation for 1 h at room temperature the plate was washed four times with PBS-Tween. After 1 h incubation with HRP-conjugated goat anti-human IgD diluted 1/1000 in the same buffer and subsequent washing with PBS-Tween, tetramethylbenzidine (20 mM) in 0.1 M potassium citrate solution, pH 4.25, mixed with hydrogen peroxide (final concentration 0.002%) was added. After 30 min, the enzymatic reaction was stopped by adding 2 M sulphuric acid. The optical density (OD) was then measured at 450 nm in an automated ELISA reader (Multiskan Plus, Labsystems, Finland).

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

24

Dot blot assay

Purified MID (0.0005-0.2 µg) in a volume of 100 µl in 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0 were manually applied to nitro-cellulose membranes (Schleicher & Schuell, Dessel, Ger-
5 many) by using a dot blot apparatus (Schleicher & Schuell). After saturation, the membranes were incubated for 2 h at room temperature in PBS-Tween containing 1% ovalbumin and 5% milk powder and washed four times with PBS-Tween. Human myeloma protein 0.5 µg in 100 µl PBS-
10 Tween was added and after 2 h of incubation, followed by several washings in PBS-Tween, HRP-labelled anti-human light chains (κ and λ) (Dakopatts) in dilution 1/200 was used as a secondary antibody. Development was performed as described above for the Western blots. In another set
15 of experiments, dilutions of human myeloma sera in a volume of 100 µl in 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0 was first applied to the membranes. After saturation, incubations, blocking, and washing steps were performed as described above. Thereafter, [¹²⁵I]-labeled protein MID probe (5 to
20 10 x 10⁵ cpm/ ml) in PBS-Tween was added. After overnight incubation, the membrane was washed four times with PBS-Tween, air dried, and exposed to Kodak CEA.C x-ray films at -70 °C using Kodak X-Omat regular intensifying screen (Eastman Kodak, Rochester, NY).

25 *Extraction of IgD-binding protein*

M. catarrhalis bacteria (1-5 x 10¹¹ colony forming units (cfu)/ ml) were suspended in 0.05 M Tris-HCl-buffer (pH 8.8) containing 0.1-5 % Empigen (Calbiochem Novabio-
30 chem, Bedford, MA). In some experiments Empigen was replaced by CHAPS (Sigma), n-Octyl-p-D-glucoside (Bachem, Budendorf, Switzerland) or Triton X-100 (Sigma). All these detergents at a concentration of 0.1-5 % were tested with or without 0.01 M EDTA. The bacterial suspen-
35 sions were mixed by magnetic stirring for 2 h at 37°C. After centrifugation at 8000 x g for 20 min at 4°C, the supernatants were filtrated with sterile filters (0.45 µm; Sterivex-HV, Millipore).

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

25

Purification of IgD-binding protein

M. catarrhalis extract in 3 % Empigen® was applied to a Q-sepharose column (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl (pH 8.8) containing 0.1 % Empigen®. The column was eluted using a 0 to 1 M NaCl linear gradient in the same buffer. Fractions showing most IgD-binding activity as detected by ELISA and Western Blot were pooled, dialyzed in Spectraphor membrane tubes (molecular weight cut off 25,000; Spectrum, Laguna hills, CA) against 0.05 M Tris-HCl, pH 8.8, concentrated on YML00 disc membranes (molecular weight cut off 100,000; Amicon, Beverly, MA) and then applied to gel-chromatography. The gel-filtration of IgD-binding protein was done on a Sephacryl S-400 high resolution column (20 by 900 mm; Amersham Pharmacia Biotech), equilibrated with 0.05 M Tris-HCl, pH 8.8 containing 0.1% Empigen®. Fractions containing the strongest IgD-binding activity were concentrated and re-chromatographed as described above.

Peptide cleavage and amino acid sequence analysis

Purified MID in 0.05 M Tris-HCl (pH 8.8) containing 0.1% Empigen® was treated with trypsin or chymotrypsin in an enzyme-protein-ratio of 1:10 at 37°C overnight. The cleavage mixtures were subjected to SDS-PAGE and peptide bands transferred to Immobilon membranes were automatically sequenced or exposed to Western blot analysis as described above. In order to get an N-terminal sequence of the protein, deblocking of intact MID from a possible pyroglutamate group was attempted. Two different protocols were used to deblock both soluble and membrane-bound protein. Automated amino acid sequence analysis was performed with an Applied Biosystems (Foster City, CA) 470A gas-liquid solid phase sequenator with on-line detection of the released amino acid phenylthiohydantoin derivatives by Applied Biosystems model 120A PTH analyser.

Labeling of protein MID

Purified MID was radioiodinated (^{125}I ; Amersham, Buckinghamshire, England) to high specific activity with

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

26

lactoperoxidase. The preparations contained approximately 0.05 mol iodine per mol protein. FITC (Sigma) was conjugated to purified MID using a standard protocol. Briefly, MID (2 mg/ml) in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.5, was incubated with 0.15 µg/ml FITC solubilized in DMSO. After 45 min at room temperature and constant stirring, the sample was diluted and subjected to a PD10 column (Pharmacia Biotech) pre-equilibrated with PBS, pH 7.4. The resulting MID-FITC was used for binding studies.

10 DNA isolation and sequencing

Genomic DNA was extracted from five *M. catarrhalis* strains (see Table I) using a genomic DNA preparation kit (Qiagen, Hilden, Germany) and was subsequently used as template for amplification of the MID gene by PCR. Degenerate primers were synthesized according to the amino terminal sequences of the four peptide fragments (Table II).

Table II. Amino acid sequences derived from highly purified MID after protease digestions.

20	Peptide sequence	Protease
	TAQANTESSIAVG	Trypsin
	GNTAINFVNSGDDNALIN	Trypsin
25	QGINEDNAFVKGLEK	Trypsin
	PSTVKADN	Chymotrypsin

In some of the PCR reactions (High Fidelity PCR System; Roche, Bromma, Sweden), specific primers were used in combination with the degenerate ones. DNA sequences flanking the central region of the gene, where the peptide fragments originated from, were isolated using inverse PCR (IPCR). Briefly, genomic DNA was cleaved with the following restriction enzymes used separately; *EcoRV*, *SphI* and *PstI* for the isolation of the start codon, and *AccI*, *AsuI* and finally *HincII* for the isolation of the stop codon sequences. The resulting fragments were reli-

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

27

gated upon themselves (Rapid DNA Ligation Kit; Roche) and the DNA was used in IPCR. To amplify the start and stop codon areas of the gene, specific primers were designed and used in a long template PCR (LTPCR) (Expand Long
5 Template PCR System; Roche). All PCR products were cloned into pPCR-Script-Amp (Stratagene, La Jolla, CA) and sequenced using the Big Dye Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Warrington, England). Primers for amplification of genomic DNA were designed using the
10 Oligo Primer Analysis software (Molecular Biology Insights, Cascade, Co). The signal peptide was deduced using the SignalP V1.1 World Wide Web Prediction Server Center for Biological Sequence Analysis (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

15 *PCR amplification of the mid gene*

The complete 6.4 kb open reading frame of the *mid* gene was amplified by PCR using *M. catarrhalis* Bc5 strain genomic DNA as template. The oligonucleotide primers containing *Bam*HI restriction enzyme recognition sequences
20 were 5'-cgggatccgatggcgcgtggcggaatagcc-3' (primer A, SEQ ID NO 3) and 5'-cgcgatccgaaaagtgaaaacctgcaccaactgctgc-3' (primer B, SEQ ID NO 4) generating a PCR product of 6391 base pairs. *Bam*HI-digested insert was ligated into
25 pET16(b) and the resulting plasmid pET16-MID was transformed into DH5 α . Both strands of the cloned PCR product were sequenced.

To examine the full length *mid* gene in other *M. catarrhalis* strains, the primers A and B were used. In addition, primers used for narrowing down the sequence encoding the signal peptide were either primer A or 5'-
30 tgctcagcatgtatcattttttaaggtaaccaccatg-3' (primer C; detecting the upper start codon, SEQ ID NO 5) in combination with 5'-catcaattgcgatatgtctgggatcttg-3' (primer D; located at a conserved region just outside the signal
35 peptide, SEQ ID NO 6) generating 192- and 266-base pair long PCR products (using Bc5 genomic DNA as template), respectively. Furthermore, primer A or C in combination

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

28

with 5'-cttcaccccatcagtgccatagacc-3' (primer E, SEQ ID NO 7) were used for confirming the existence of the *mid* gene resulting in 1355- and 1429-base pair long fragments, respectively. The expand long template PCR system was used in all reactions and conditions were as recommended by the manufacturer (Roche, Bromma, Sweden).

Expression of the mid gene product in E. coli and cell fraction

To express the *mid* gene product, pET16-MID was transformed into the expression host BL21DE3, containing a chromosomal copy of the T7 RNA polymerase gene under *lacUV5* control. The recombinant bacteria were grown in LB medium supplemented with 2% of glucose and ampicillin. Overexpression was achieved by growing cells to logarithmic-growth phase at OD₆₀₀ of 0.6 followed by addition of 1 mM IPTG. After 4 h of induction, bacteria were sonicated according to a standard protocol and the resulting proteins were analysed by SDS-PAGE.

Localisation of recombinant protein from pET16-MID was carried out by osmotic shock as described. Briefly, broth cultures of induced and uninduced cells were harvested and resuspended in 30 mM Tris-HCl, pH 8, containing 20% sucrose. EDTA was added to a final concentration of 1 mM and the solution was slowly stirred at room temperature for 10 min. After centrifugation at 10,000g for 10 min at 4°C, cells were resuspended in ice-cold 5 mM MgSO₄ and stirred for 10 min on ice. During this step, the periplasmic proteins were released into the buffer. The supernatant containing the periplasmic fraction was collected by centrifugation. Bacteria were completely lysed by lysozyme at a final concentration of 100 mg/ml followed by sonication. Finally, the soluble cytoplasmic and insoluble membrane fractions were collected.

Truncated MID-derived recombinant proteins

The different truncated MID fragments designated A to I with their specific sizes and primers for generating the proteins are shown in Figure 10. The open reading

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

29

frame of the *mid* gene from *M. catarrhalis* Bc5 (in pET26-MID) (Forsgren et al., 2001) was used as template. All MID constructs, except for MID367-590 (C), were amplified by PCR using specific primers introducing *Bam*HI and

5 *Hind*III restriction enzyme sites. Due to an internal *Hind*III restriction enzyme site in fragment C, an *Xho*I site was used instead of *Hind*III at the 3' end. All PCR products, except for MID1616-2139 (I), were cloned into pET26 (Novagen, Madison, WI). The PCR product encoding

10 for the I fragment was cloned into pMAL-c2 (New England Biolabs, Beverly, MA). To avoid presumptive toxicity, the resulting plasmids were first transformed into the non-expressing host *E. coli* DH5 α . Thereafter, plasmids encoding for fragments A to D, G and H were transformed

15 into *E. coli* BL21(DE3), whereas the host BL21(DE3)-pLysS was used for vectors containing fragments E and F. Both *E. coli* strains were incubated in the presence of kanamycin, whereas chloramphenicol also was supplemented when BL21(DE3)-pLysS transformants were used. Fragment I was

20 expressed in DH5 α . Bacteria were grown to mid-log phase followed by induction with 1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactoside (IPTG). After 3.5 h, transformants were sonicated and the overexpressed proteins were purified according to the manufacturers' instructions. Resulting recom-

25 binant proteins having a histidine tag or fused to maltose binding protein were purified on resins containing nickel amylose, respectively. The concentrations of the eluted proteins were determined using the BCA Protein Assay Kit (Pierce). Thereafter, recombinant proteins were

30 analysed by SDS-PAGE and Western blots.

Hemagglutination

Human erythrocytes were obtained from freshly drawn heparinized human blood. The erythrocytes were washed twice in PBS (pH 7.2) and suspended in PBS at a final

35 concentration of 1 %. Bacteria cultured in Nutrient Broth were harvested by centrifugation, washed and suspended to 1-2 x 10⁹/ml in PBS. Bacteria and erythrocyte suspension

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

30

(50 µl of each) were mixed in round bottom microtiter plates (Sarstedt, Newton, NC). In some experiments, erythrocytes were mixed with MID-Sepharose or BSA-Sepharose in 150 µl PBS. Agglutination was read by the naked eye.

5

Cell line and adherence assay

The lung carcinoma cell line A549 (type II alveolar epithelial cells; CCL-185) was obtained from ATCC. The cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) supplemented with 10 % fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, and 12 µg/ml gentamicin (referred to as culture medium). On the day before adherence experiments, cells were harvested, washed twice in gentamicin-free RPMI 1640 and added to 12-well tissue culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) at a concentration of 1×10^4 cells/well in 2.0 ml gentamicin free culture medium. Cells were thereafter incubated overnight at 37 °C in 5 % CO₂. On the day of experiments, *M. catarrhalis* ($\approx 2 \times 10^8$) in PBS, 0.15 % gelatin (Sigma) was inoculated onto the monolayers. In neutralization experiments with specific antisera, bacteria were pre-incubated with polyclonal antibodies (dilution 1/250). After 1 h at 4 °C, bacteria were added to the epithelial cells. In all experiments, tissue culture plates were centrifuged at 3,000g for 5 min and incubated at 37 °C, 5 % CO₂. After 30 min, the infected monolayers were rinsed twice with PBS, 0.15 % gelatin with gentle rocking to remove nonadherent bacteria and then treated with trypsin-EDTA (0.05% trypsin, 0.5 mM EDTA) to release them from the plastic support. Thereafter, the resulting cell/bacteria suspension was seeded to agar plates containing 1.1 % isovitalax, 7.8 % human blood, and finally 0.9 % proteose peptone. Data was calculated from duplicate cultures.

25

Flow cytometry analysis

Human peripheral blood lymphocytes (PBLs) were isolated from heparinized blood from healthy donors by cen-

30

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

31

trifugation on a step gradient of Ficoll-Isopaque (Lymphoprep; Pharmacia, Uppsala, Sweden). For flow cytometry analyses, a standard staining protocol was used with 0.5% BSA (w/v) in PBS as buffer. PBLs (2.5×10^5 in 100 μ l) were labeled with anti-CD3 or anti-CD19 mAbs with or without FITC-conjugated anti-IgD mAb on ice for 30 min according to the manufacturer's instructions. In blocking experiments, lymphocytes were also pre-incubated with anti-IgD immunoglobulins for 30 min. After two washes, 10 μ g/ml of purified FITC-conjugated MID was supplemented to the cells followed by incubation for 45 min on ice. After 4 final washes with excess PBS 0.5% BSA, 105 cells for each sample were analysed in an EPICS^{XL}-MCL flow cytometer (Coulter, Hialeah, Florida). Where appropriate, rabbit and goat pre-immune sera and mouse IgG1 and IgG2a were included as negative controls (Dakopatts).

Results

Extraction and purification of MID

Solubilization of MID was a major obstacle in the process of purification. Amongst several detergents tested, only Empigen[®] and n-Octyl-b-D glucoside alone at a final concentration of 3% solubilized MID from a suspension of *M. catarrhalis* efficiently as estimated by ELISA and Western blot. The two detergents were equally efficient. Triton X-100 alone did not solubilize MID, but Triton X-100 plus 0.01 M EDTA solubilized MID efficiently. C HAPS alone or CHAPS with EDTA or EDTA alone did not solubilize MID. In the following experiments, Empigen[®] extraction was used for solubilization and subsequent purification of MID. When the Empigen[®] extract of *M. catarrhalis* was applied to a Q-sepharose column, all IgD-binding material was eluted from the column with 0.1 % Empigen[®] in 0.05 M Tris HCl, pH 8.8. No additional IgD-binding material could be eluted when a NaCl-gradient up to 1 M was applied to the same column. After concentration of the IgD-binding material obtained after separation on Q-sepharose, fractionation of the extract was

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

32

achieved by gel filtration in the presence of 0.1% Em-
pigen® on a Sephacryl S-400 column (Fig 1). Most IgD-
binding material was eluted in this first peak immedi-
ately after the void volume. MID was further purified by
5 rechromatography of the first peak under the same condi-
tions.

Fig 2 shows that after purification MID appeared as
two bands, one 200 kDa-band and a second band with an
apparent molecular mass of more than 1,000 kDa. Western
10 blot experiments were performed to confirm that MID was
not identical to the previously described outer membrane
proteins UspA1 and 2 with an apparent molecular mass
varying from 350 to 720 kD (8-10) or CopB with a mole-
cular weight of 80 kDa. The crude Empigen® extract of *M.*
15 *catarrhalis* or partly purified preparations of MID were
subjected to SDS-PAGE, transferred to Immobilon filters
and blotted with antibodies to those *Moraxella* proteins
and also with human IgD. As can be seen in Fig 2, MID (as
revealed by IgD-binding) is not identical with the outer
20 membrane proteins UspA and Cop B.

Three attempts were made to determine the amino-
terminal amino acid sequence of purified MID. Approxima-
tely 1000 pmol of MID was applied each time in an auto-
mated amino acid sequencer. Inasmuch as no amino acid
25 phenylthiohydantoin derivatives were obtained, the amino-
terminal end of the single MID polypeptide chain was pro-
bably blocked. It was recently determined that the *moraxella*
UspA1 and UspA2 proteins, which are also resistant
to Edman degradation, contained a pyroglutamyl residue
30 that was removed by the treatment with pyroglutamate
aminopeptidase. However, when MID purified from *M. ca-*
tarrhalis or recombinant MID was treated with this enzyme
according to two different protocols (twice for each
method) and then subjected to Edman degradation, no N-
35 terminal amino acid sequence was obtained.

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

33

IgD-binding properties of MID

Crude Empigen® extracts of *M. catarrhalis* and highly purified MID subjected to SDS-PAGE and transferred to filters were exposed to highly purified commercially available Ig-preparations representing all human Ig-classes and subclasses (Table III).

5 available Ig-preparations representing all human Ig-classes and subclasses (Table III).

Table III. Summary of Western Blot and dot blot analyses showing the binding specificity of highly purified commercially available myeloma immunoglobulin D preparations against a crude Empigen® extract of *M. catarrhalis* and highly purified MID.

Immunoglobulin	200 kDa-protein in crude extract	Purified MID
IgD (κ), IgD (λ)	+	+
IgG1 (κ), IgG1 (λ)	-	-
IgG2 (κ), IgG2 (λ)	-	-
IgG3 (κ), IgG3 (λ)	-	-
15 IgG4 (κ), IgG4 (λ)	-	-
IgA1 (κ), IgA1 (λ)	-	-
20 IgA2 (κ), IgA2 (λ)	-	-
IgM; (κ), IgM (λ)	-	-
IgE (κ)	-	-

25 Only the two IgD preparations interacted with the MID-band in the 200 kDa-position in a similar fashion as shown for IgD in Fig 2. When dot blot experiments were performed and purified MID in dilutions was first added

30 to membranes and purified human myeloma proteins and secondary antibodies were subsequently applied, only the two IgD myelomas interacted with MID. One of the two myelomas detected as little as 0.001 µg of MID on the membrane. The specificity of the interaction between MID

35 and IgD was further verified by using radiolabeled MID in other dot blot experiments. In Fig 3, it is demonstrated that MID effectively bound four IgD myeloma sera. A

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

34

distinct reaction could be detected in the range 0.03-4 μ g of IgD. For the IgD standard serum (B.W.) reactivity was seen at even lower concentrations (not shown). In contrast, 6 different Ig myeloma sera representing IgG, IgA and IgM showed no visible reaction with MID at 4 μ g.

Purified MID specifically attracted human soluble IgD as revealed in dot and Western blots (Fig 2 and 3, Table III). To test whether MID bound to the surface-expressed B cell receptor (BCR) IgD, human peripheral blood lymphocytes (PBLs) were isolated. FITC was conjugated to MID followed by incubation with PBLs for 45 min on ice. In parallel, PBLs were labeled with RPE-conjugated mAbs directed against the T cell marker CD3 or the B cell specific surface antigen CD19 and subsequently analysed by flow cytometry (Fig 4). Interestingly, a large fraction of CD19⁺ lymphocytes bound significant amounts of MID-FITC (Fig 4A), whereas T cells (CD3⁺ lymphocytes) only displayed a non-specific background binding (Fig 4D). The MID-FITC signal corresponded well with CD19⁺ cells incubated with anti-IgD mAbs revealing IgD-positive B cells (Fig 4B). To further elucidate the specificity of MID-FITC binding to IgD bearing CD19⁺ lymphocytes, PBLs were preincubated with a rabbit anti-human IgD immunoglobulin fraction. After incubation and washings, MID-FITC binding was analysed by flow cytometry according to the standard procedure. The antiserum almost completely inhibited specific MID-FITC binding to the IgD BCR when compared to cells incubated with the pre-immune serum. Mean fluorescence intensity decreased from 79.2 to 14.6 arbitrary units. Similar results were obtained with goat immunoglobulins raised against IgD (not shown). Thus, IgD-expressing B cells promoted specific MID-FITC binding to the surface-expressed BCR IgD.

Cloning of the gene encoding MID and DNA sequence analysis

Degenerate primers were designed according to the obtained amino terminal sequences of four peptide frag-

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

35

ments originating from MID (Table II) and were used in PCRs in all possible combinations. The specific primers 2982+ and 3692- (Fig 5) were synthesized using the deduced sequence of a distinctive PCR product generated with the degenerate primer pair 2629+/ 3693-. A PCR reaction using the specific primers in combination with the degenerate ones (718+ and 5772-) resulted in totally 5054 bp of the gene coding for MID. Flanking sequences surrounding the core of the *mid* gene were obtained by inverse PCR (IPCR). IPCR on *EcoRV*- and *AsuI*/ *AccI*-digested *M. catarrhalis* genomic DNA with the primer-pairs 2982+/ 945- and 3668+/ 120-, respectively, provided the sequence for the start-codon area. In addition, IPCR on *HincII*-digested *Moraxella* genomic DNA with the primer-pair 5898+/ 5511- generated the 3' sequence including the stop-codon. The complete nucleotide sequence of the gene encoding MID in *M. catarrhalis* Bc5 is shown in SEQ ID NO 2 and the resulting amino acid sequence is shown in SEQ ID NO 1. Two alternative open reading frames were revealed and are indicated at amino acid positions 1 and 17, see Fig 6). Consequently, the length of the *mid* gene product was either 2123 or 2139 amino acids. In addition to a putative ribosome-binding site (AAGG), -10 (TAATTA) and -35 (TTGAAT) consensus sequence boxes were identified. Furthermore, 62 bases downstream of the TAA stop-codon an inverted repeat was found with the potential of stem-loop formation that is necessary for transcriptional termination. To get an overview of the similarity and identity between different *mid* genes, the sequences of the five ORF MID proteins were analysed. For 4 strains, the degree of identity and similarity was ≥ 75.8 % and ≥ 78.3 %, respectively (Fig. 7). In contrast, slightly lower values, ≥ 65.3 % and ≥ 71.2 %, respectively, were obtained for the fifth isolate (RH4). Identity and similarity with UspA1 was 5.5-11.1 % and 8.3-17.9 %, respectively, and with UspA2 6.5-7.5 % respectively 11.1-12.4 %.

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

36

The *mid* gene can be detected in all *M. catarrhalis* strains

By PCR analyses, the *mid-1* gene was detected in all 118 *M. catarrhalis* strains, whereas the *Moraxella* (nonseria)-related controls were negative. In addition, the size of the *mid-1* gene was confirmed using primers spanning the whole gene including the start and stop codons. Analysis of the deduced amino acid sequence of MID differs from *UspA1*, *UspA2* and the protein described in US 5,808,024

The open reading frame defined a protein with a calculated molecular mass of just below 220 kDa that readily corresponded to the empirical value of approximately 200 kDa found by SDS-PAGE. The N-terminal amino acid sequence showed the typical characteristics of a signal peptide with a potential cleavage site between amino acids 66 and 67. Despite that the first amino acid after the signal peptidase cleavage site most likely was a glutamine residue, any sequence could not be determined by Edman degradation. Furthermore, no amino acid sequence was obtained after pyroglutamate aminopeptidase treatment. The predicted amino acid sequence was also subjected to a hydrophobicity profile analysis by the method of Kyte and Doolittle and showed mainly hydrophilic properties except for the putative signal peptide that was strongly hydrophobic. The deduced amino acid sequence for MID differs significantly from those for the protein described in US 5,808,024 and also from the *UspA*-proteins (Fig 7 and 8).

The *mid* gene is distributed in all *M. catarrhalis* strains. To investigate whether or not the *mid* gene existed in all *M. catarrhalis* strains, primers were chosen based upon a conserved area upstream of the open reading frame (ORF) and a conserved area downstream including the stop codon sequence (Forsgren et al., 2001). The *mid* gene was detected in all 86 clinical isolates and 7 type strains analysed, and the length of the genomic

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

37

mid DNA was approximately 6,000 base pairs. The existence was further verified by Southern blots using a probe containing a sequence selected from the 3'-end of the gene. Southern blot experiments revealed that the moraxella strains contained only one *mid* gene.

Expression of recombinant MID in E. coli

To confirm that the cloned *mid* gene corresponded to the purified IgD-binding protein, the gene including the predicted signal sequence and start codon was subcloned into the expression vector pET16(b) and thereby under the control of a T7 promoter. The resulting pET16-MID was subsequently transformed into *E. coli* BL21DE3 followed by induction with IPTG. Bacterial cells were lysed and sub-fractionated, and recombinant MID was localized by Western blots using human IgD as a probe. Important verifying characteristics of MID were provided from the expression experiments (Figure 9). Firstly, following induction, cells containing pET16-MID were able to produce recombinant MID confirming the correct reading frame of the gene. Secondly, recombinant MID (as shown by SDS-PAGE) displayed a molecular mass of approximately 200 kDa, corresponding to the 217 kDa calculated value from the amino acid sequence. Thirdly, the recombinant protein was indeed the *mid* gene product in *E. coli* as its IgD-binding phenotype was confirmed by Western blot analysis. Total protein from *E. coli* containing induced pET16(b)vector without insert did not display any IgD-binding capacity (data not shown). Fourthly, the subcellular localization of the recombinant protein showed that MID was equally located in the cytoplasmic and the membrane fractions, but not in the periplasmic space. The localization of MID's in the membrane fraction correlated very well with the known outer membrane localization in *M. catarrhalis*. *IgD-binding is preserved in 238 amino acids of MID.*

To in detail determine the MID IgD-binding region, 9 sequences derived from the full length MID were cloned into pET26b(+) and expressed in *E. coli*. The recombinant

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

38

proteins covered the entire MID sequence and their individual lengths and positions were as demonstrated in Fig 10. The recombinant proteins comprising amino acid residues 69-1111 or 1011-2139 of MID did not bind IgD as revealed in Western and dot blots. In contrast, the protein MID902-1200 (protein fragment F1) attracted IgD, strongly suggesting that the single IgD-binding region of MID was within that particular sequence.

To pinpoint the sequence responsible for the IgD-binding, the truncated MID902-1200 was systematically shortened at the N- and C-terminal ends (Fig 11). Equimolar concentrations of the various recombinant proteins were compared to native full length MID1-2139 isolated from *M. catarrhalis*. The different recombinant proteins were diluted in four-fold steps, added to membranes and incubated with human IgD. On a molar basis, an essentially preserved IgD-binding capacity was detected for the truncated MID protein stretching from amino acid residue 962 to 1200. The shortest truncated protein still interacting with IgD was localized between MID985 and MID1142 (fragment F6). The IgD-binding property was lost when the N-terminus was reduced to the MID1000 residue (fragment F4) or when the C-terminal was shortened to MID1130 (fragment F7). Finally, a fragment (MID902-1130; F8) with a longer N-terminal and a shorter C-terminal (compared to MID985-1200; F3) was also manufactured and analysed. However, this truncated MID did not interact with IgD, suggesting that the binding capacity was depending on a longer C-terminal.

To further characterize the specific MID-dependent IgD-binding, an IgD ELISA was constructed using human IgD as biate. All the recombinant truncated MID fragments were subjected to ELISA followed by incubation with a specific rabbit anti-serum directed against MID902-1200. The ELISA was developed using HRP-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibodies. The same pattern as with the dot blot (Fig 11) was observed, i.e. fragments F4, F7, and F8 was

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

39

not attracted to the solid phase IgD, whereas the other fragments bound to a variable degree compared to full length MID (not shown).

Optimal MID962-1200 - IgD interaction is depending on a tetramer structure

5 To shed light upon the need for a tetramer structure in order to obtain an optimal IgD-binding, MID962-1200 (F2, SEQ ID NO 10) was incubated at 60 or 100 °C followed by analysis on SDS-PAGE and Western blots. MID962-1200
10 formed both a monomer and a tetramer after pre-treatment at 60 °C (Fig 12A). The tetrameric structure was, however, disrupted at 100 °C and resulted in a monomeric form, which displayed a considerably weaker binding to IgD when examined in Western blots (Fig 12A and B). To
15 investigate the capability of the tetramer to bind IgD in comparison with the monomeric form, the MID962-1200 fragment, SEQ ID NO 10, was subjected to analysis at 60 °C in 6 different experiments. The heat-treated protein was subjected to SDS-PAGE and the IgD-binding activity
20 was analysed by Western blots. Resulting gels and filters were analysed by densitometry and the protein concentration (density) of the monomer was divided with the corresponding tetramer concentration. The obtained value (%) was related to the concentration (µg) of total
25 protein loaded on the gels. Interestingly, when IgD-binding to the tetrameric respectively monomeric forms were compared, a 23-fold more efficient binding to IgD was found with the tetrameric MID962-1200 (Fig 12C).

M. catarrhalis IgD-binding protein (MID) hemagglutinates human erythrocytes

30 To investigate a putative involvement of MID in hemagglutination, a series of clinical isolates that either expressed MID or by phase variation had shut off the *mid* gene was selected. Interestingly, all out of 21 isolates
35 expressing MID hemagglutinated human erythrocytes, whereas only four out of the MID-negative strains (n=21) hemagglutinated the red blood cells. An almost full

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

40

correlation between hemagglutinating capacity and MID expression was observed. UspA1/2 expression was similar and irrespective of the MID expression.

These initial experiments prompted us to examine whether or not purified MID protein from the model strain *M. catarrhalis* Bc5 (Forsgren et al., 2001) hemagglutinates erythrocytes. To mimic the bacterial surface, MID was conjugated to Sepharose beads and incubated with the human erythrocytes. Bovine serum albumin (BSA) linked to Sepharose was included as a negative control. Interestingly, the human erythrocytes were hemagglutinated in the presence of MID-Sepharose, whereas BSA-Sepharose did not interfere with the erythrocytes (data not shown). *The hemagglutinating domain of MID is located between amino acid residues Alanine764 and Serine913*

To dissect the molecule and pin-point the specific site of the molecule that was responsible for the hemagglutination, a series of truncated DNA fragments of the *mid* gene was cloned and recombinantly expressed in *E. coli* (Fig. 10). Polyclonal antibodies against the truncated MID proteins were raised in rabbits and used in an ELISA. In preparatory experiments, antibodies to MID and the MID-derived proteins were titrated to give similar values when tested in ELISA against respective antigens. The capacity of the truncated MID proteins to bind to lysed erythrocytes was then measured in ELISA using the specific antibodies at appropriate concentrations. MID or MID764-913 (fragment E) gave higher ELISA values (4 to 16 times) as compared to the other truncated MID proteins. Thus, the hemagglutinating structure of MID seemed to be located within amino acid residues 764-913 of MID (SEQ ID NO 8).

MID764-913 (fragment E, SEQ ID NO 8) binds directly to both erythrocytes and type II alveolar epithelial cells

To further confirm the importance of MID764-913 as an adhesin, MID and a selection of the truncated MID-derived proteins were radiolabelled and tested in direct

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

41

binding experiments with human erythrocytes and alveolar epithelial cells (Fig. 13). Both [125I]-MID and [125I]-MID764-913 strongly bound to erythrocytes, whereas the truncated MID fragments MID367-590 (fragment C), MID902-1200 (F), MID1011-1446 (G), and MID1616-2139 (I) did not bind above background levels (Fig. 13A). In parallel, the alveolar epithelial cell line A549 also attracted both the full length [125I]-labelled MID and the truncated MID764-913 (Fig. 13B). All the other fragments did not bind to the epithelial cells. Taken together, the fragment MID764-913 (SEQ ID NO 8) was the crucial part of the adhesin MID that mediated the attachment to mammalian cells.

Antibodies to full length MID1-2139 and MID764-913 inhibit adherence of M. catarrhalis to type II alveolar epithelial cells

To further analyse the influence of full length MID and MID764-963 on *M. catarrhalis* adherence to type II alveolar epithelial cells, a MID-expressing and a MID-deficient *M. catarrhalis* strain were preincubated with antibodies to MID and subsequently added to alveolar epithelial cells for adherence. As demonstrated in Fig. 14, polyclonal antibodies directed against full length MID1-2139 and MID763-913 (fragment E, SEQ ID NO 8) effectively inhibited adherence for the MID-expressing isolate. In contrast, pre-immune serum and a pAb directed against MID1011-1466 (fragment G) did not significantly interfere with adhesion.

30

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

42

References

1. Forsgren, A. and Grubb, A. (1979) Many bacterial species bind human IgD. *J. Immunol.* 122, 1468-1472.
2. Banck, G. and Forsgren, A. (1978) Many bacterial species are mitogenic for human blood lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 8, 347-354.
3. Calvert, J.E. and Calogeres, A. (1986) Characteristics of human B cells responsive to the T-independent mitogen *Branhamella catarrhalis*. *Immunology* 58, 37-41.
4. Forsgren, A., Penta, A., Schlossman, S.F. and Tedder, T.F. (1988) *Branhamella catarrhalis* activates human B lymphocytes following interactions with surface IgD and class I major histocompatibility complex antigens. *Cell. Immunol.* 112, 78-88.
5. Janson, H., Carlén, B., Cervin, A., Forsgren, A., Björk-Magnusdóttir, A., Lindberg, S. and Runer, T. (1999) Effects on the ciliated epithelium of protein D-producing and -nonproducing nontypeable *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal tissue cultures. *J. Infect. Dis.* 180, 737-746.
6. Sasaki, K. and Munson Jr., R.S. (1993) Protein D of *Haemophilus influenzae* is not a universal immunoglobulin D-binding protein. *Infect. Immun.* 61, 3026-3031.
7. Helminen, M.E., Beach, R., Maciver, I., Jarosik, G., Hansen, E.J. and Leinonen, M. (1995) Human immune response against outer membrane proteins of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* determined by immunoblotting and enzyme immunoassay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 35-39.
8. Aebi, C., Maciver, I., Latimer, J.L., Cope, L.D., Stevens, M.K., Thomas, S.E., McCracken, G.H. and Hansen, E.J. (1997) A protective epitope of *Moraxella catarrhalis* is encoded by two different genes. *Infect. Immun.* 65, 4367-4377.
9. Cope, L.D., Lafontaine, E.R., Slaughter, C.A., Hase-
mann, C.A. Jr., Aebi, C., Henderson, F.W., McCracken, G.H. Jr. and Hansen, E.J. (1999) Characterization of *Moraxella*

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

43

catarrhalis uspA1 and uspA2 genes and their encoded products. J Bacteriol 181, 4026-4034.

10. Klingman, K.L. and Murphy, T.F. (1994) Purification and characterization of a high-molecular-weight outer membrane protein of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. Infect. Immun. 62, 1150-1155.
11. WO 98/28333
12. Sasaki, K., Harkness, R.E., Loosmoore, S.M. and Klein, M.H. (1998) United States Patent 5,808,024.
13. Fitzgerald, M., Mulcahy, R., Murphy, S., Keane, C., Coakley, D. and Scott, T. (1997) A 200 kDa protein is associated with haemagglutinating isolates of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. FEMS Immun. Med. Microbiol. 18, 209-216.
14. Tucker, K., Flosila, L., and Samuel, J. (1994) Correlation between hemagglutination and globotetraosylceramide binding by *Branhamella catarrhalis*. Abstract 117 of the 94th General meeting of the American Society for Microbiology.
15. Lunde E, Munthe LA, Vabo A, Sandlie I, Bogen B. (1999) Antibodies engineered with IgD specificity efficiently deliver integrated T-cell epitopes for antigen presentation by B cells. Nat Biotechnol. 17, 670-675.
16. Lycke N. (2001) The B-cell targeted CTLA1-DD vaccine adjuvant is highly effective at enhancing antibody as well as CTL responses. Curr. Opin. Mol. Ther. 3, 37-44.
17. Ito O, Harada M, Takenoyama M, Tamada K, Li T, Abe K, Fujie H, Nomoto K. 1998 Vaccination with activated B cells pulsed with tumor-lysates can induce tumor-specific CD4+ T cells in vivo. Immunobiol. 199, 133-147.

35

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

44

CLAIMS

1. A surface exposed protein, which can be detected in *Moraxella catarrhalis*, having an amino acid sequence
5 as described in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, or an
10 immunogenic and adhesive fragment of said surface exposed protein.
2. An immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein as defined in claim 1, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis*, having a
15 capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof.
3. An immunogenic or IgD-binding fragment according to claim 2, having an amino acid sequence as described in
20 SEQ ID NO 10.
4. An immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined in claim 1, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis*, having a capacity of binding erythrocytes and epithelial cells.
- 25 5. An immunogenic and adhesive fragment according to claim 4, having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 8.
6. A DNA segment comprising a DNA sequence, as shown in SEQ ID NO 2, which DNA sequence codes for a surface
30 exposed protein of *Moraxella catarrhalis* as defined in claim 1, or naturally occurring or artificially modified variants of said DNA sequence.
7. A DNA segment comprising a DNA sequence which codes for an immunogenic or IgD-binding fragment as defined in claim 2.
35
8. A DNA segment according to claim 7, comprising a DNA sequence, as shown in SEQ ID NO 11, which DNA sequen-

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

45

ce codes for an immunogenic or IgD-binding fragment as defined in claim 3.

9. A DNA segment comprising a DNA sequence, which codes for an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined in claim 4.

10. A DNA segment according to claim 9, comprising a DNA sequence, as shown in SEQ ID NO 9, which DNA sequence codes for an immunogenic and adhesive fragment as defined in claim 5.

11. A vaccine containing a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said protein, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, or an immunogenic and adhesive fragment of said surface exposed protein.

12. A vaccine containing an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, having a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment.

13. A vaccine according to claim 12 containing an immunogenic or IgD-binding fragment as defined in claim 3.

14. A vaccine containing an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis* as defined in claim 4.

15. A vaccine according to claim 14 containing an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined in claim 5.

16. A vaccine according to any one of claims 11-15, combined with another vaccine.

17. A vaccine according to any one of claims 11-16, combined with an immunogenic portion of another molecule.

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

46

18. A plasmid or phage comprising a DNA sequence, which codes for a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 5 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants.
19. A plasmid or phage comprising a DNA sequence, 10 which codes for an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein as defined in claim 1, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment. 15
20. A plasmid or phage according to claim 19 comprising a DNA sequence, which codes for an immunogenic or IgD-binding fragment as defined in claim 3.
21. A plasmid or phage comprising a DNA sequence, 20 which codes for an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined in claim 1, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding erythrocytes and epithelial cells or naturally occurring or artificially 25 modified variants of said fragment.
22. A plasmid or phage according to claim 21 comprising a DNA sequence, which codes for an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined in claim 5.
- 30 23. A non human host comprising at least one plasmid or phage as defined in any one of claims 18-22, and capable of producing said protein or variants, or said immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, or said immunogenic and adhesive fragment of 35 said protein, which host is chosen among bacteria, yeast and plants.
24. A host according to claim 23, which is *E. coli*.

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

47

25. A recombinant DNA molecule comprising a DNA sequence coding for a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, which DNA sequence is fused to another gene.
26. A recombinant DNA molecule comprising a DNA sequence coding for an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein as defined in claim 1, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, which DNA sequence is fused to another gene.
27. A recombinant DNA molecule according to claim 26 comprising a DNA sequence, which codes for an immunogenic or IgD-binding fragment as defined in claim 3, which DNA sequence is fused to another gene.
28. A recombinant DNA molecule comprising a DNA sequence coding for an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined in claim 1, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding erythrocytes and epithelial cells, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, which DNA sequence is fused to another gene.
29. A recombinant DNA molecule according to claim 28 comprising a DNA sequence, which codes for an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined in claim 5, which DNA sequence is fused to another gene.
30. A plasmid or phage comprising a fused DNA sequence as defined in any one of claims 25-29.

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

48

31. A non-human host comprising at least one plasmid or phage as defined in claim 30, which host is chosen among bacteria, yeast and plants.

32. A host according to claim 31, which is *E. coli*.

5 33. A fusion protein or polypeptide, in which a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble
10 IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, is combined with another protein by the use of a recombinant DNA molecule as defined in claim 25.

15 34. A fusion protein or polypeptide in which an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein as defined in claim 1, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis*, having a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or
20 naturally occurring or artificially modified variants thereof, is combined with another protein by the use of a recombinant DNA molecule as defined in claim 26.

25 35. A fusion protein or polypeptide according to claim 34 in which an immunogenic or IgD-binding fragment as defined in claim 3, is combined with another protein by the use of a recombinant DNA molecule as defined in claim 27.

30 36. A fusion protein or polypeptide in which an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined in claim 1, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding erythrocytes and epithelial cells, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, is combined with another protein by the
35 use of a recombinant DNA molecule as defined in claim 28.

37. A fusion protein or polypeptide according to claim 36 in which an immunogenic and adhesive fragment as

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

49

defined in claim 5, is combined with another protein by the use of a recombinant DNA molecule as defined in claim 29.

38. A fusion product, in which a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said protein, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, is covalently, or by any other means, bound to a protein, carbohydrate or matrix.

39. A fusion product in which an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein as defined in claim 2, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, is covalently, or by any other means, bound to a protein, carbohydrate or matrix.

40. A fusion product according to claim 39 in which an immunogenic or IgD-binding fragment as defined in claim 3 is covalently, or by any other means, bound to a protein, carbohydrate or matrix.

41. A fusion product in which an immunogenic and adhesive fragment of a surface exposed protein as defined in claim 2, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding erythrocytes and epithelial cells, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, is covalently, or by any other means, bound to a protein, carbohydrate or matrix.

42. A fusion product according to claim 41 in which an immunogenic and adhesive fragment as defined in claim 5 is covalently, or by any other means, bound to a protein, carbohydrate or matrix.

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

50

43. A method of detecting IgD using a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said protein, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, optionally labelled and/or bound to a matrix.

44. A method of detecting IgD using an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein as defined in claim 2, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment, optionally labelled and/or bound to a matrix.

45. A method of detecting IgD according to claim 44 using an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis* as defined in claim 3, and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said protein, optionally labelled and/or bound to a matrix.

46. A method of separating IgD using a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said protein, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, optionally bound to a matrix.

47. A method of separating IgD using an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein as defined in claim 2, which fragment can be detected in *Moraxella catarrhalis* and has a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally oc-

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

51

curing or artificially modified variants of said fragment, optionally bound to a matrix.

48. A method of separating IgD according to claim 47 using an immunogenic or IgD-binding fragment of a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis* as defined in claim 3, having a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said protein, optionally labelled and/or bound to a matrix.

49. A method of isolation of a surface exposed protein of *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said protein, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants, said method comprising the steps:

a) subjecting a suspension of *Moraxella catarrhalis* to an extraction process by adding a zwitterionic or non-ionic detergent, optionally in the presence of EDTA;

b) applying the extract comprising the IgD-binding protein of *Moraxella catarrhalis* from step a) to an adsorption column;

c) eluating the IgD-binding protein; and

d) separating the IgD-binding protein.

50. A method according to claim 49, wherein the detergent is selected from the group comprising Empigen[®], n-Octyl- β -D glucoside and Triton X-100+0,01M EDTA.

51. A method according to claim 49 or 50, wherein the concentration of the detergent in step a) is within the range of 0,1-5%, preferably about 3%.

52. A method for treatment of an autoimmune disease comprising extra corporal circulation of the blood through a material comprising a surface exposed protein as defined in claim 1, or a fragment thereof as defined in claims 2 or 3, for removal of IgD from the blood.

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

52

53. A purified antibody which is specific to an immunogenic portion of a surface exposed protein *Moraxella catarrhalis*, said protein having an amino acid sequence as described in SEQ ID NO 1, an apparent molecular weight of 200 kDa and a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants thereof, or an immunogenic or IgD-binding fragment of said protein or variants.

54. A purified antibody according to claim 48, which is specific to an immunogenic or IgD-binding fragment as defined in claim 3, having a capacity of selectively binding membrane bound or soluble IgD, or naturally occurring or artificially modified variants of said fragment.

55. A purified antibody according to claim 48, which is specific to an immunogenic or adhesive fragment as defined in claim 5, having a capacity of binding erythrocytes and epithelial cells.

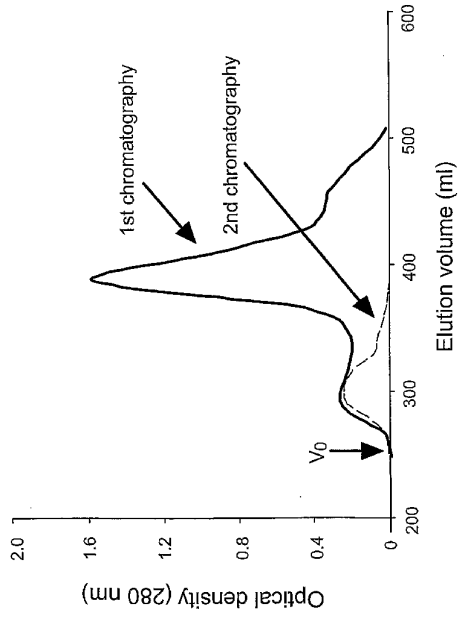


Fig 1

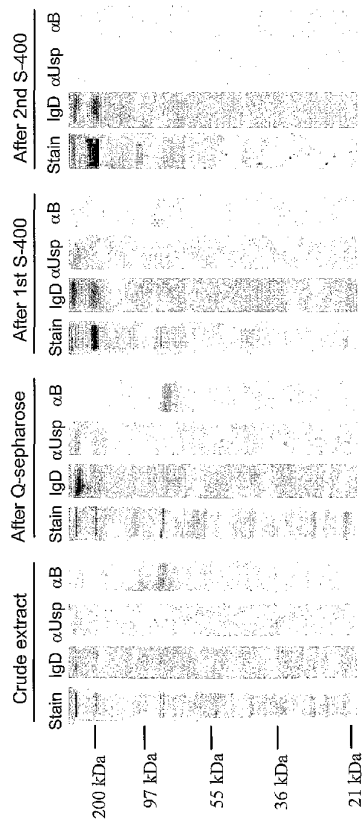


Fig 2

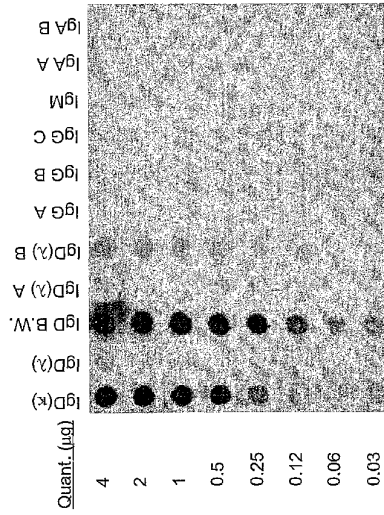


Fig 3

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

4/28

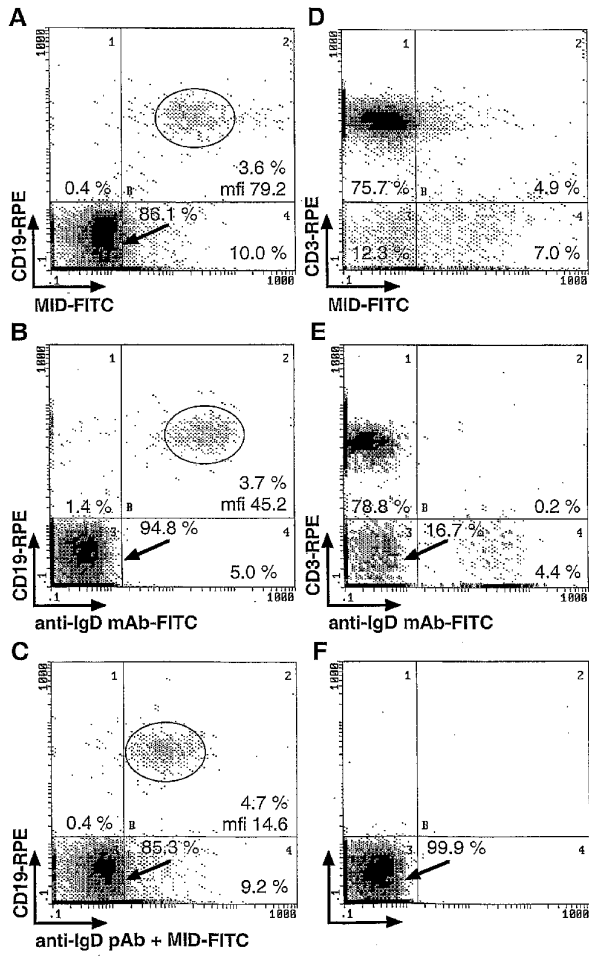


Fig 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

6/28

-250
ACTCTATTATTGATATGTTTTGAACTAATCTATTGACTTAAATCACCATATGGTTATAAT

TTAGCATAATGGTAGGCITTTTTGTA AAAATCACATCGCAATATTGTTCTACTGTTACTACCA
-35
TGCTTGAATGACGATCCCAATCATCAGATTTCATTC AAGTGATGTGTTTGTATACGCATCATT
-10 rbs
TACCCTAATTAATTTCAATCGAAATGCCATATGTCAGCATGTATCATTTTTTTAAGGTAAACCA
1/1 31/11
CC ATG AAT CAC ATC TAT AAA GTC ATC TTT AAC AAA GCC ACA GGC ACA
Met asn his ile tyr lys val ile phe asn lys ala thr gly thr
61/21
TTT ATG GCC GTG GCG GAA TAT GCC AAA TCC CAC AGC ACG GGG GGT
phe Met ala val ala glu tyr ala lys ser his ser thr gly gly
91/31 121/41
AGC TGT GCT ACA GGG CAA GTT GGC AGT GTA TGC ACT CTG AGC TTT
ser cys ala thr gly gln val gly ser val cys thr leu ser phe
151/51
GCC CGT GTT GCC GCG CTC GCT GTC CTC GTG ATC GGT GCG ACG CTC
ala arg val ala ala leu ala val leu val ile gly ala thr leu
181/61 211/71
AAT GGC AGT GCT TAT GCT CAA CAA GAT CCC AGA CAT ATC GCA ATT
asn gly ser ala tyr ala gln gln asp pro arg his ile ala ile
241/81
GAT GGC AAC AGC TCG AAC ACA TCC TCA GGC ACT GCC CGT GCG ACA
asp gly asn ser ser asn thr ser ser gly thr ala arg ala thr
271/91 301/101
GGT GAT CGA GCC ATT GCT CTT GGT GAA AAT GCT AAT GCA GAG GGC
gly asp arg ala ile ala leu gly glu asn ala asn ala glu gly
331/111
GGT CAA GCC ATC GCC ATC GGT AGT AGC AAT AAA ACA GGT GGT AGA
gly gln ala ile ala ile gly ser ser asn lys thr gly gly arg
361/121 391/131
AAC GCG CTG AAT ATA GGT ACC GAT GCC AAA GGT GAG GAG TCC ATC
asn ala leu asn ile gly thr asp ala lys gly glu glu ser ile
421/141
GCC ATC GGT GGT GAT GTA GTG GCT GAG GGT ACT GCC TCG ATT GCC
ala ile gly gly asp val val ala glu gly thr ala ser ile ala
451/151 481/161
ATC GGT GGT GAT GAC TTA CAT TTG TGG GAT GAA CCA AAT AAG CAA
ile gly gly asp asp leu his leu trp asp glu pro asn lys gln

Fig 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

7/28

511/171
AAG TTC CTC GAC CCA AAA GTT AAA GAA TTG ATT TTA AAA CAT CAA
lys phe leu asp pro lys val lys glu leu ile leu lys his gln
541/181 571/191
GAA TTA AAC AAC ATA TAC AAA CTG CCT GAT GGT AGT CCT CAA AGA
glu leu asn asn ile tyr lys leu pro asp gly ser pro gln arg
601/201
TAT TTT CGC ACA TAC GCA AAG GGA CAC GCC AGT ATT GCA CTA GGA
tyr phe arg thr tyr ala lys gly his ala ser ile ala leu gly
631/211 661/221
ACC ATG ACA CAG GCA GAG GGT CAT TTT GCC AAC GCC TTT GGT ACA
thr met thr gln ala glu gly his phe ala asn ala phe gly thr
691/231
CGG GCA ACA GCT AAA GGC AAC TAT TCC TTG GCA GTG GGT CTT ACC
arg ala thr ala lys gly asn tyr ser leu ala val gly leu thr
721/241 751/251
GCC CAA GCC AAC ACA GAA TCT TCA ATC GCT GTT GGT TCT AAT GCA
ala gln ala asn thr glu ser ser ile ala val gly ser asn ala
781/261
CAA GCT AAC GGG TTT GCA GCG ACA GCC APT GGT GGA GGT ACT AAA
gln ala asn gly phe ala ala thr ala ile gly gly gly thr lys
811/271 841/281
GCT GAT TTG GGT CGA AGC ATA GCC CTA GGT TTT GGT TCT CAG ATC
ala asp leu gly arg ser ile ala leu gly phe gly ser gln ile
871/291
CTT ACT AAG GAG AAG GAT AGT CAT AAC AAT ACC AAT GTC TAT GTA
leu thr lys glu lys asp ser his asn asn thr asn val tyr val
901/301 931/311
CCA CAA GGT GAA ATA TTA GAA GAG CGG TAT AAA GCC ACC GAA AAC
pro gln gly glu ile leu glu glu arg tyr lys ala thr glu asn
961/321
GGT CAG TCG CCT AAT AAG GTA GTG GAT ATA TTT TCC ATT GGT AGT
gly gln ser pro asn lys val val asp ile phe ser ile gly ser
991/331 1021/341
AGC TCT ATC AAA CGT AAA ATC ATC AAT GTC GGT GCG GGT TCT CAG
ser ser ile lys arg lys ile ile asn val gly ala gly ser gln
1051/351
GAG ACC GAT GCG GTC AAT GTG GCA CAG CTT AAA TTG GTG GAG CGG
glu thr asp ala val asn val ala gln leu lys leu val glu arg

Fig 6 cont

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

8/28

1081/361 1111/371
 GTG GCT AAG CGT CAA ATT ACT TTT CAG GGT GAT AGC AAT AAT
 val ala lys arg gln ile thr phe gln gly asp asp ser asn asn
 1141/381
 AGC GTA AAA AAA GGT TTG GGT CAG ACT TTA ACT ATT AAA GGT GGT
 ser val lys lys gly leu gly gln thr leu thr ile lys gly gly
 1171/391 1201/401
 AAA ACA GAG ACC GGT GAA CTA ACC GAA AAT AAC ATC GGT GTG GTA
 lys thr glu thr gly glu leu thr glu asn asn ile gly val val
 1231/411
 CAA GAT GAT AAT GGT AAT GGT CTG AAA GTT AAA CTT GCT AAA GAT
 gln asp asp asn gly asn gly leu lys val lys leu ala lys asp
 1261/421 1291/431
 CTG ACT GGT TTG ACC AAG GTT GCA GTA AAT GGT AAT GGT GCT AAC
 leu thr gly leu thr lys val ala val asn gly asn gly ala asn
 1321/441
 AAC GCC GAG CTA CTA AAC GGT GGT CTG ACC TTT TCG ACA TCA GGT
 asn ala glu leu leu asn gly gly leu thr phe ser thr ser gly
 1351/451 1381/461
 GCC AAT GCA GGC AAA ACG GTC TAT GGC ACT GAT GGG GTG AAG TTT
 ala asn ala gly lys thr val tyr gly thr asp gly val lys phe
 1411/471
 ACT AAT AAT ACA GGA ACA GGA ACA GGA ACG GCA ATA CCC GAC ACT
 thr asn asn thr gly thr gly thr gly thr ala ile pro asp thr
 1441/481 1471/491
 ACT CGT ATT ACC AAA AAT AAA ATT GGC TTT GCT GGG GCT GAT GAA
 thr arg ile thr lys asn lys ile gly phe ala gly ala asp glu
 1501/501
 CAA GTT GAT GAA AGC AAA CCT TAT CTT GAC AAC GAA AAG CTA AAA
 gln val asp glu ser lys pro tyr leu asp asn glu lys leu lys
 1531/511 1561/521
 GTT GGC ACA GTT GAG ATT AAA AAA ACT GGC ATC AAT GCA GGT AAT
 val gly thr val glu ile lys lys thr gly ile asn ala gly asn
 1591/531
 CAA GAA ATT ACC AAG GTC AAA TCT GCC ATT GTT GAT GCA GTT AAT
 gln glu ile thr lys val lys ser ala ile val asp ala val asn
 1621/541 1651/551
 GGA CAA GCA AAT CAA AGC TTT GTG AAC CTT CTA GAA ACA GCA GGC
 gly gln ala asn gln ser phe val asn leu leu glu thr ala gly
 1681/561
 ACA AAC ACC AAC AAA CAA AAC TCT GCC GCC ACG GTT AAA GAC TTA
 thr asn thr asn lys gln asn ser ala ala thr val lys asp leu

Fig 6 cont

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

9/28

1711/571 1741/581
TAC GAC CTA TCA CAA TCA CCG CTG ACC TTT ACA GGT GAT AGC GGT
tyr asp leu ser gln ser pro leu thr phe thr gly asp ser gly
1771/591
AAC GTT AAG AGA AAA CTG GGT CAG ACT TTA ACC ATC ACA GGC GGA
asn val lys arg lys leu gly gln thr leu thr ile thr gly gly
1801/601 1831/611
CAA ACA AAG ACC GAT CAA TTA ACC GAC AAT AAC ATC GGT GTG GTA
gln thr lys thr asp gln leu thr asp asn asn ile gly val val
1861/621
GCA GGT ACT AAT GGC TTA ACC GTT AAA CTT GCT AAA ACT TTA AAC
ala gly thr asn gly leu thr val lys leu ala lys thr leu asn
1891/631 1921/641
AGT CTT ACT GAA GTT AAT ACG GCT ACA TTA AAC GCC ACC AAT AAA
ser leu thr glu val asn thr ala thr leu asn ala thr asn lys
1951/651
GTT AAG GTA GAT AAT AGT ACT GGT AAT ACG GCT GAA TTA TTA AAC
val lys val asp asn ser thr gly asn thr ala glu leu leu asn
1981/661 2011/671
AAT GGT TTA ACC TTT ACC CAA ACA ACA GGT GCA AAT TCA GGT AAA
asn gly leu thr phe thr gln thr thr gly ala asn ser gly lys
2041/681
ACC GTC TAT GGC AAT GAT GGC TTG AAG TTT ACT AAT AGT GCT AAT
thr val tyr gly asn asp gly leu lys phe thr asn ser ala asn
2071/691 2101/701
AAA GCA CTT GGC GGC ACA ACT TAC ATC ACC AAA GAT CAA GTT GGT
lys ala leu gly gly thr thr tyr ile thr lys asp gln val gly
2131/711
TTT AGC AAT CAA GAT GGC TTA CTT GAT GAA AGC AAA CCG TAT CTT
phe ser asn gln asp gly leu leu asp glu ser lys pro tyr leu
2161/721 2191/731
AAC CGA GAA AAG CTA AAA GTT GGT AAA ATT GAG ATT AAA GAC AGT
asn arg glu lys leu lys val gly lys ile glu ile lys asp ser
2221/741
GGC ATT AAT GCA GGT GGT AAA GCC ATC ACA GGA CTG CCC TCA ACA
gly ile asn ala gly gly lys ala ile thr gly leu pro ser thr
2251/751 2281/761
CTG CCC AAC ACT ACC TAT ACT GCA CCT GGC GTG CAT ACT GCA CTA
leu pro asn thr thr tyr thr ala pro gly val his thr ala leu
2311/771
CAT GGC AGT ACA ATT TCT AAC GAC GAC AAA ACC CGT GCC GCC AGT
his gly ser thr ile ser asn asp asp lys thr arg ala ala ser

Fig 6 cont

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

1.0/28

2341/781 2371/791
 ATC GCC GAT GTG CTA AAC GCA GGC TTT AAC TTG GAA GGT AAT GGT
 ile ala asp val leu asn ala gly phe asn leu glu gly asn gly
 2401/801
 GAA GCG GTT GAC TTT GTC TCC ACT TAT GAC ACC GTC AAC TTT GCC
 glu ala val asp phe val ser thr tyr asp thr val asn phe ala
 2431/811 2461/821
 GAT GGC AAT GCC ACC ACC GCT AAG GTA ACT TAT GAT AAC AAA ACC
 asp gly asn ala thr thr ala lys val thr tyr asp asn lys thr
 2491/831
 AGT AAA GTG GCG TAT GAT GTC AAT GTG GAT GGT ACA ACC ATT CAT
 ser lys val ala tyr asp val asn val asp gly thr thr ile his
 2521/841 2551/851
 CTA ACA GGC ACT AAT GGC AAG AAA AAC CAA ATT GGC GTA AAA ACC
 leu thr gly thr asn gly lys lys asn gln ile gly val lys thr
 2581/861
 ACC ACA CTG ACC ACA AAA CGT GCT AAA GGT AAT ACA GCA ACT AAT
 thr thr leu thr thr lys arg ala lys gly asn thr ala thr asn
 2611/871 2641/881
 TTT AGT GTT AAC TCT GGT GAT GAC AAT GCC CTT ATT AAC GCC AAA
 phe ser val asn ser gly asp asp asn ala leu ile asn ala lys
 2671/891
 GAC ATC GCC GAC AAT CTA AAC ACC CTA GCT GGT GAA ATT CGC ACC
 asp ile ala asp asn leu asn thr leu ala gly glu ile arg thr
 2701/901 2731/911
 GCC AAA GGC ACA GCA AGC ACC GCC CTA CAA ACC TTC TCT ATT ATT
 ala lys gly thr ala ser thr ala leu gln thr phe ser ile ile
 2761/921
 GAT GAA CAA GGT AAT AAC TTT ATG GTC GGT AAC CTT TAC TCT GGT
 asp glu gln gly asn asn phe met val gly asn leu tyr ser gly
 2791/931 2821/941
 TAT GAC ACC TCA AAT ACC TCT GAG ACC GTC ACC TTT GTA GGT GAA
 tyr asp thr ser asn thr ser glu thr val thr phe val gly glu
 2851/951
 AAC GGC ATT ACC ACC AAG GTA AAT AAA GGT AAA GTC AAA GTT GGT
 asn gly ile thr thr lys val asn lys gly lys val lys val gly
 2881/961 2911/971
 ATT GAC CAA ACC AAA GGC TTA ACC ACG CCT AAG CTG ACC GTG GGT
 ile asp gln thr lys gly leu thr thr pro lys leu thr val gly
 2941/981
 AGT AGT AAT GGC AAA GGC ATT GTC ATT GAC AGT AAA GAT GGT CAA
 ser ser asn gly lys gly ile val ile asp ser lys asp gly gln

Fig 6 cont

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

11/28

2971/991 3001/1001
 AAT ACC ATC ACA GGA CTA AGC AAC ACT CTA ACC GAT GCC ACC AAC
 asn thr ile thr gly leu ser asn thr leu thr asp ala thr asn
 3031/1011
 GCA ACA ACA GGG CAT GTC AGT GAA ATC CAG GGC TTG CAA GGT
 ala thr thr gly his val ser glu ile gln gly leu ala gln gly
 3061/1021 3091/1031
 GCA AAC AAA ACC CGT GCC GCC AGC ATT GGT GAT GTA CTA AAC GCA
 ala asn lys thr arg ala ala ser ile gly asp val leu asn ala
 3121/1041
 GGC TTT AAC TTG CAA GGC AAT GGT GAA GCC AAA GAC TTT GTC TCC
 gly phe asn leu gln gly asn gly glu ala lys asp phe val ser
 3151/1051 3181/1061
 ACT TAT GAC ACC GTC AAC TTT ATC GAT GGC AAT GCC ACC ACC GCT
 thr tyr asp thr val asn phe ile asp gly asn ala thr thr ala
 3211/1071
 AAG GTG ACC TAT GAT GAC ACG AAA CAG ACC AGC ACA GTA ACT TAT
 lys val thr tyr asp asp thr lys gln thr ser thr val thr tyr
 3241/1081 3271/1091
 GAT GTC AAT GTG GAT AAT AAA ACC CTT GAA GTG ACA GGC GAT AAA
 asp val asn val asp asn lys thr leu glu val thr gly asp lys
 3301/1101
 AAA CTT GGC GTC AAA ACC ACC ACA CTG ACC AAA ACA AGT GCT AAT
 lys leu gly val lys thr thr thr leu thr lys thr ser ala asn
 3331/1111 3361/1121
 GGT AAT GCA ACC AAA TTT AGT GCC GCC GAT GGC GAT GCC CTT GTT
 gly asn ala thr lys phe ser ala ala asp gly asp ala leu val
 3391/1131
 AAA GCC AGT GAT ATC GCC ACC CAT CTA AAT ACC TTG GCT GGC GAC
 lys ala ser asp ile ala thr his leu asn thr leu ala gly asp
 3421/1141 3451/1151
 ATC CAA ACC GCC AAA GGA GCA AGC CAA GCA AGC AGC TCA GCA AGC
 ile gln thr ala lys gly ala ser gln ala ser ser ser ala ser
 3481/1161
 TAT GTG GAT GCT GAT GGC AAC AAG GTC ATC TAT GAC AGT ACC GAT
 tyr val asp ala asp gly asn lys val ile tyr asp ser thr asp

Fig 6 cont

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

12/28

3511/1171 3541/1181
 AAG AAG TAC TAT CAA GCC AAA AAT GAT GGC ACA GTT GAT AAA ACC
 lys lys tyr tyr gln ala lys asn asp gly thr val asp lys thr
 3571/1191

AAA GAA GTT GCC AAA GAC AAA CTG GTC GCC CAA GCC CAA ACC CCA
 lys glu val ala lys asp lys leu val ala gln ala gln thr pro
 3601/1201 3631/1211
 GAT GGC ACA TTG GCT CGA ATG AAT GTC AAA TCA GTC ATT ARC AAA
 asp gly thr leu ala arg met asn val lys ser val ile asn lys
 3661/1221

GAA CAA GTA AAT GAT GCC AAT AAA AAG CAA GGC ATC AAC GAA GAC
 glu gln val asn asp ala asn lys lys gln gly ile asn glu asp
 3691/1231 3721/1241
 AAC GCC TTT GTT AAA GGA CTT GAA AAA GCC GCT TCT GAT AAC AAA
 asn ala phe val lys gly leu glu lys ala ala ser asp asn lys
 3751/1251

ACC AAA AAC GCC GCA GTA ACT GTG GGT GAT TTA AAT GCC GTT GCC
 thr lys asn ala ala val thr val gly asp leu asn ala val ala
 3781/1261 3811/1271
 CAA ACA CCG CTG ACC TTT GCA GGG GAT ACA GGC ACA ACG GCT AAA
 gln thr pro leu thr phe ala gly asp thr gly thr thr ala lys
 3841/1281

AAA CTG GGC GAG ACT TTG ACC ATC AAA GGT GGG CAA ACA GAC ACC
 lys leu gly glu thr leu thr ile lys gly gly gln thr asp thr
 3871/1291 3901/1301
 AAT AAG CTA ACC GAT AAT AAC ATC GGT GTG GTA GCA GGT ACT GAT
 asn lys leu thr asp asn asn ile gly val val ala gly thr asp
 3931/1311

GGC TTC ACT GTC AAA CTT GCC AAA GAC CTA ACC AAT CTT AAC AGC
 gly phe thr val lys leu ala lys asp leu thr asn leu asn ser
 3961/1321 3991/1331
 GTT AAT GCA GGT GGC ACC AAA ATT GAT GAC AAA GGC GTG TCT TTT
 val asn ala gly gly thr lys ile asp asp lys gly val ser phe
 4021/1341

GTA GAC GCA AAC GGT CAA GCC AAA GCA AAC ACC CCT GTG CTA AGT
 val asp ala asn gly gln ala lys ala asn thr pro val leu ser
 4051/1351 4081/1361
 GCC AAT GGG CTG GAC CTG GGT GGC AAA CCG ATC AGT AAC ATC GGT
 ala asn gly leu asp leu gly gly lys arg ile ser asn ile gly

Fig 6 cont

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

13/28

4111/1371

GCA GCT GTF GAT GAT AAC GAT GCG GTG AAC TTT AAG CAG TTT AAT
 ala ala val asp asp asn asp ala val asn phe lys gln phe asn
 4141/1381 4171/1391

GAA GTT GCC AAA ACG GTC AAC AAC CTA AAC AAC CAA AGT AAC TCA
 glu val ala lys thr val asn asn leu asn asn gln ser asn ser
 4201/1401

GGT GCG TCA TTG CCC TTT GTA GTA ACC GAT GCC AAT GGC AAG CCC
 gly ala ser leu pro phe val val thr asp ala asn gly lys pro
 4231/1411 4261/1421

ATC AAT GGC ACC GAT GAC AAG CCC CAA AAA GCC ATC AAG GGC GCC
 ile asn gly thr asp asp lys pro gln lys ala ile lys gly ala
 4291/1431

GAT GGT AAA TAC TAT CAC GCC AAC GCC AAC GGC GTA CCT GTG GAC
 asp gly lys tyr tyr his ala asn ala asn gly val pro val asp
 4321/1441 4351/1451

AAA GAT GGC AAC CCC ATC ACC GAT GCG GAC AAA CTT GCC AAT CTG
 lys asp gly asn pro ile thr asp ala asp lys leu ala asn leu
 4381/1461

GCA GCT CAT GGC AAA CCC CTT GAT GCA GGT CAT CAA GTG GTG GCA
 ala ala his gly lys pro leu asp ala gly his gln val val ala
 4411/1471 4441/1481

AGC CTA GGC GGC AAC TCA GAT GCC ATC ACC CTA ACC AAC ATC AAG
 ser leu gly gly asn ser asp ala ile thr leu thr asn ile lys
 4471/1491

TCC ACT TTG CCA CAA ATT GAC ACA CCA AAC ACA GGT AAT GCC AAT
 ser thr leu pro gln ile asp thr pro asn thr gly asn ala asn
 4501/1501 4531/1511

GCA GGG CAA GCC CAA AGT CTG CCC AGC CTA TCA GCA GCA CAG CAA
 ala gly gln ala gln ser leu pro ser leu ser ala ala gln gln
 4561/1521

AGT AAT GCT GCC AGT GTC AAA GAT GTG CTA AAT GTA GGC TTT AAC
 ser asn ala ala ser val lys asp val leu asn val gly phe asn
 4591/1531 4621/1541

TTG CAG ACC AAT CAC AAT CAA GTG GAC TTT GTC AAA GCC TAT GAT
 leu gln thr asn his asn gln val asp phe val lys ala tyr asp
 4651/1551

ACC GTC AAC TTT GTC AAT GGT ACA GGT GCC GAC ATC ACA AGC GTG
 thr val asn phe val asn gly thr gly ala asp ile thr ser val

Fig 6 cont

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

14/28

4681/1561 4711/1571
 CGT AGT GCT GAT GGC ACG ATG AGT AAC ATC ACC GTC AAC ACC GCC
 arg ser ala asp gly thr met ser asn ile thr val asn thr ala
 4741/1581

TTA GCA GCG ACC GAT GAT GAT GGC AAT GTG CTT ATC AAA GCC AAA
 leu ala ala thr asp asp asp gly asn val leu ile lys ala lys
 4771/1591 4801/1601
 GAT GGT AAG TTC TAC AAA GCA GAC GAC CTC ATG CCA AAC GGC TCA
 asp gly lys phe tyr lys ala asp asp leu met pro asn gly ser
 4831/1611

CTA AAA GCA GGC AAA TCA GCC AGT GAT GCC AAA ACT CCA ACT GGT
 leu lys ala gly lys ser ala ser asp ala lys thr pro thr gly
 4861/1621 4891/1631
 CTA AGC CTT GTC AAC CCC AAT GCT GGT AAA GGC AGT ACA GGC GAT
 leu ser leu val asn pro asn ala gly lys gly ser thr gly asp
 4921/1641

GCA GTG GCT CTT AAT AAC TTA TCA AAA GCG GTA TTT AAA TCC AAA
 ala val ala leu asn asn leu ser lys ala val phe lys ser lys
 4951/1651 4981/1661
 GAT GGT ACA ACT ACT ACC ACA GTA AGC TCT GAT GGC ATC AGT ATC
 asp gly thr thr thr thr val ser ser asp gly ile ser ile
 5011/1671

CAR GGC AAA GAT AAC AGC AAC ATC ACC CTA AGC AAA GAT GGG CTG
 gln gly lys asp asn ser asn ile thr leu ser lys asp gly leu
 5041/1681 5071/1691
 AAT GTA GGC GGT AAG GTC ATC AGC AAT GTG GGT AAA GGC ACA AAA
 asn val gly gly lys val ile ser asn val gly lys gly thr lys
 5101/1701

GAC ACC GAC GCT GCC AAT GTA CAA CAG TTA AAC CGA AGT ACG CAA
 asp thr asp ala ala asn val gln gln leu asn arg ser thr gln
 5131/1711 5161/1721
 CTT GTT GGG TCT TGG GTA ATG GCT GGT AAT GAT AAC GCT GAC GGC
 leu val gly ser trp val met ala gly asn asp asn ala asp gly
 5191/1731

AAT CAG GTA AAC ATT GCC GAC ATC AAA AAA GAC CCA AAT TCA GGT
 asn gln val asn ile ala asp ile lys lys asp pro asn ser gly
 5221/1741 5251/1751
 TCA TCA TCT AAC CGC ACT GTC ATC AAA GCA GGC ACG GTA CTT GGC
 ser ser ser asn arg thr val ile lys ala gly thr val leu gly
 5281/1761
 GGT AAA GGT AAT AAC GAT ACC GAA AAA CTT GCC ACT GGT GGT GTA
 gly lys gly asn asn asp thr glu lys leu ala thr gly gly val

Fig 6 cont

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

15/28

5311/1771 5341/1781
 CAA GTG GGC GTG GAT AAA GAC GGC AAC GCT AAC GGC GAT TTA AGC
 gln val gly val asp lys asp gly asn ala asn gly asp leu ser
 5371/1791

AAT GTT TGG GTC AAA ACC CAA AAA GAT GGC AGC AAA AAA GCC CTG
 asn val trp val lys thr gln lys asp gly ser lys lys ala leu
 5401/1801 5431/1811

CTC GCC ACT TAT AAC GCC GCA GGT CAG ACC AAC TAT TTG ACC AAC
 leu ala thr tyr asn ala ala gly gln thr asn tyr leu thr asn
 5461/1821

AAC CCC GCA GAA GCC ATT GAC AGA ATA AAT GAA CAA GGT ATC CGC
 asn pro ala glu ala ile asp arg ile asn glu gln gly ile arg
 5491/1831 5521/1841

TTC TTC CAT GTC AAC GAT GGC AAT CAA GAG CCT GTG GTA CAA GGG
 phe phe his val asn asp gly asn gln glu pro val val gln gly
 5551/1851

CGT AAC GGC ATT GAC TCA AGT GCC TCA GGC AAG CAC TCA GTG GGC
 arg asn gly ile asp ser ser ala ser gly lys his ser val ala
 5581/1861 5611/1871

GTC GGT TAT AAG GCC AAG GCA GAT GGT GAA GCC GCC GTT GCC ATA
 val gly tyr lys ala lys ala asp gly glu ala ala val ala ile
 5641/1881

GGC AGA CAA ACC CAA GCA GGC AAC CAA TCC ATC GCC ATC GGT GAT
 gly arg gln thr gln ala gly asn gln ser ile ala ile gly asp
 5671/1891 5701/1901

AAC GCA CAA GCC ACA GGC GAT CAA TCC ATC GCC ATC GGT ACA GGC
 asn ala gln ala thr gly asp gln ser ile ala ile gly thr gly
 5731/1911

AAT GTG GTA GCA GGT AAG CAC TCT GGT GCC ATC GGC GAC CCA AGC
 asn val val ala gly lys his ser gly ala ile gly asp pro ser
 5761/1921 5791/1931

ACT GTT AAG GCT GAT AAC AGT TAC AGT GTG GGT AAT AAC AAC CAG
 thr val lys ala asp asn ser tyr ser val gly asn asn asn gln
 5821/1941

TTT ACC GAT GCC ACT CAG ACC GAT GTC TTT GGT GTG GGC AAT AAC
 phe thr asp ala thr gln thr asp val phe gly val gly asn asn
 5851/1951 5881/1961

ATC ACC GTG ACC GAA AGT AAC TCG GTT GCC TTA GGT TCA AAC TCT
 ile thr val thr glu ser asn ser val ala leu gly ser asn ser

Fig 6 cont

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

16/28

5911/1971

GCC ATC AGT GCA GGC ACA CAC GCA GGC ACA CAA GCC AAA AAA TCT
 ala ile ser ala gly thr his ala gly thr gln ala lys lys ser
 5941/1981 5971/1991

GAC GGC ACA GCA GGT ACA ACC ACC ACA GCA GGT GCA ACA GGT ACG
 asp gly thr ala gly thr thr thr thr ala gly ala thr gly thr
 6001/2001

GTT AAA GGC TTT GCT GGA CAA ACG GCG GTT GGT GCG GTC TCC GTG
 val lys gly phe ala gly gln thr ala val gly ala val ser val
 6031/2011 6061/2021

GGT GCC TCA GGT GCT GAA CGC CGT ATC CAA AAT GTG GCA GCA GGT
 gly ala ser gly ala glu arg arg ile gln asn val ala ala gly
 6091/2031

GAG GTC AGT GCC ACC AGC ACC GAT GCG GTC AAT GGT AGC CAG TTG
 glu val ser ala thr ser thr asp ala val asn gly ser gln leu
 6121/2041 6151/2051

TAC AAA GCC ACC CAA AGC ATT GCC AAC GCA ACC AAT GAG CTT GAC
 tyr lys ala thr gln ser ile ala asn ala thr asn glu leu asp
 6181/2061

CAT CGT ATC CAC CAA AAC GAA AAT AAA GCC AAT GCA GGG ATT TCA
 his arg ile his gln asn glu asn lys ala asn ala gly ile ser
 6211/2071 6241/2081

TCA GCG ATG GCG ATG GCG TCC ATG CCA CAA GCC TAC ATT CCT GGC
 ser ala met ala met ala ser met pro gln ala tyr ile pro gly
 6271/2091

AGA TCC ATG GTT ACC GGG GGT ATT GCC ACC CAC AAC GGT CAA GGT
 arg ser met val thr gly gly ile ala thr his asn gly gln gly
 6301/2101 6331/2111

GCG GTG GCA GTG GGA CTG TCG AAG CTG TCG GAT AAT GGT CAA TGG
 ala val ala val gly leu ser lys leu ser asp asn gly gln trp
 6361/2121

GTA TTT AAA ATC AAT GGT TCA GCC GAT ACC CAA GGC CAT GTA GGG
 val phe lys ile asn gly ser ala asp thr gln gly his val gly
 6391/2131

GCA GCA GTT GGT GCA GGT TTT CAC TTT TAA GCCATAAATCGC
 ala ala val gly ala gly phe his phe stop

AGATTTTAACTTAAAAATCAATCTCACCATAGTTGTATAAAACAGCATCA

inverted repeat 6505
GCATCAGTCATATTACTGATGCTTGATGGTTTTATTACTTAAACCATTTTA

Fig 6 cont

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

17/28

		MID		ATCC 25238; UspA1		ATCC 25238; UspA2	
Bc5	BH17	Perez112	RH1	RH4	Bc5	BH17	Perez112
100 %	83.5 %	79.2 %	75.8 %	95.6 %	11.1 %	6.7 %	12.1 %
100 %	88.1 %	82.6 %	80.2 %	71.3 %	17.9 %	12.1 %	12.1 %
100 %	100 %	78.3 %	76.3 %	95.3 %	9.5 %	6.7 %	11.1 %
100 %	100 %	81.4 %	79.6 %	71.2 %	14.9 %	11.1 %	11.1 %
100 %	100 %	100 %	85.0 %	68.0 %	11.1 %	7.5 %	12.4 %
100 %	100 %	100 %	89.1 %	72.9 %	17.5 %	12.4 %	12.4 %
100 %	100 %	100 %	100 %	67.7 %	5.5 %	7.3 %	12.4 %
100 %	100 %	100 %	100 %	71.7 %	8.3 %	12.4 %	12.4 %
100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	10.0 %	6.5 %	11.1 %
100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	28.8 %	38.3 %
100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Fig 7

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

18/28

MIP-1 (Be5) protein(top), patent US 5808024(bottom)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
MNHIIYKVIENKKAIGTEWAVAEYAKSHSTGSSCATGQVGSVCTLSPARVAALAVLVIGRTLNGSAYAQQDPRHIAIDGNSSENT
      90      100     110     120     130     140     150     160
SSGTRATGDPRAIALGENANAEQQQAIALGSSNKTCGRNALNIGTIDAKGEEBETAIIGGVVAEGTASIAIGGDDLLHLDENPK
      170     180     190     200     210     220     230     240
QKFLDPKVKELILKHELNILVKLPDQSPQRFRTYAKGHASIALGTMVQAECHFANAFCGTRATARGNYSIAVGLIQAQANTE
      10      20      30
      MSYAQQHPSNAFCGTRATAKSAIYSLAVGLAATAEQQ
      250     260     270     280     290     300     310     320
SSIAVGSNAQANGPAATAIGGGTKADLGRSTALGFGSQILTRKKDSEHNTNIVVYVQGEILLBERYKATFMNGQSENKVVDFPST
      40      50      60      70      80      90     100     110
STIAIGSDATSSSLGALALGAGTRAQLQGSIALGQSSVVIQSDMNSRPAVTFNTQALDPKFQATNNTKAGPLSIGSN-----
      330     340     350     360     370     380     390     400
GSSSTIRKRLINVGAGSOETDAVNVVAQLKLVKRVAKRQ-ITFQEDDNNNSVKKGLGQTLTIKGGKTEIGELTENNIGVVQEDN
      120     130     140     150     160     170
-----STIRKRLINVGAGVNRKTDVAVNVVAQLRAVVVWAKERRITFQEDDNNSTVKKIGLDNITLTIKGGATINA-----
      410     420     430     440     450     460     470     480     490
GNGLKVKLAKDLVGLTKVAVNGNANNAFLNGGLTFSTSGANAGKTVVGLDGVKFINNITGTGIVGTALPDITRIIRKNIKGFPA
-----
      500     510     520     530     540     550     560     570
GADRFQVDESKPYLDNEKLVQTVVEIKKIGINAGNOETTRVKSALVDAVNGQANQSFVNLLETAGTININKNSAMTVKDLXDL
-----

```

Fig 8

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

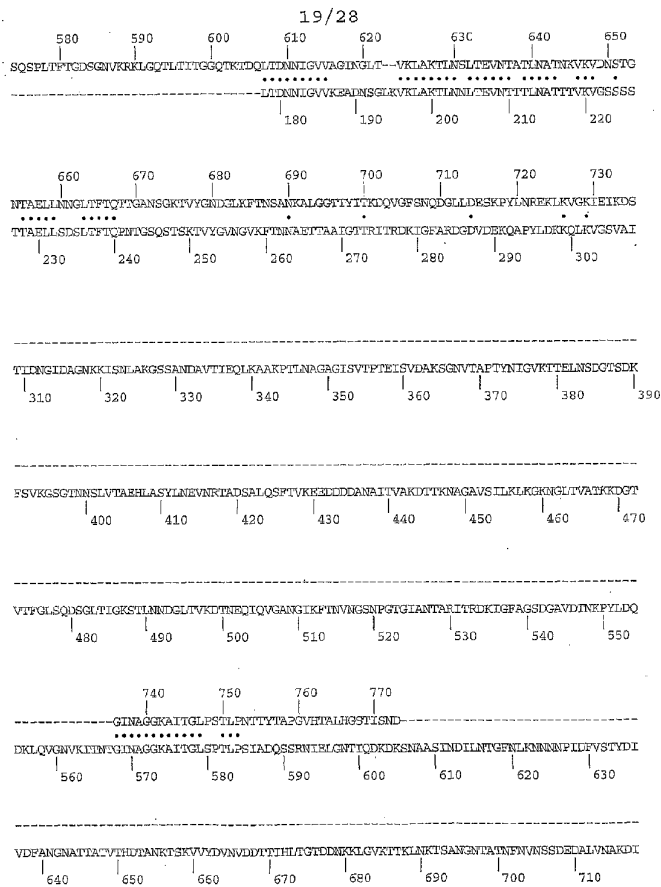


Fig 8 cont

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

20/28 Fig 8 cont

 AENLNLAKGIIHTYKGTADTALQPTTVKRVDERNNADANALTVGGQNNANQVNTL/LKGGKLNKIKDKNGTVTFGLNPLS
 720 730 740 750 760 770 780 790 800

 GLKAGRSTLNDGGLSTKPNPTGSEQLQVQADGVKPAKVNNGVVGAGIDGTRITRDEIGPTGNGSLDKSKPHLSKDGINAG
 810 820 830 840 850 860 870 880

 GKKIINTIQSGEYANSHDAVTKGKIYDLKLELNKLSSTAKTACNSLHEPSVADEQCINPTVGNFYSSYLTSTKTSIDWITFAG
 890 900 910 920 930 940 950 960

-----DKTR
 ENGITPTVNRKGVVRVCGIDOTKGLTTEKLTVGNNGKGLVLDSONGONTITGLSNLLANVINDKGSVRYTECGNLIKDEBKTR
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

780 790 800 810 820 830 840 850
 AASIAVLIANGPNLBCNGEAVDFVSTYDINFPADGNATPAKVVYINKTSKV--AMDVNVVQPTLHLVIGDKGKNLIGVKRITP

 AASIVDVLGAGNLCNGEAVDFVSTYDINFPADGNATPAKVVYDDTSKTSKVYVDVNVDDTTELVK-----
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110

860 870 880 890 900 910 920 930
 LITTKRAKGNIAINPFSVNSGDDNALINAKDIADNLVILAGELIAPKGTASTALQTFSTIDEQGNFEMVGNLYSGYDTSNTSET

940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020
 VTFVGHNGITPKVNRGKVKVGTIDQTKGLTTEKLTVGNNGKGLVLDSONGONTITGLSNLLANVINDKGSVRYTECGNLIKDEBKTR

1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

21/28 Fig 8 cont

```

NKTRAASTGDFLNGGNLQNGEERAKDFVSTPTVNFIDGHAUTAKVYLDLTKQTSVTVYDYNVINKKLELVVGGKLLGVKPTT
.....
-----DKKLSVKTPT
1120

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180
LTKPSANGNAIKPKFAAD-QDALVKA.SDIPFA.NVLASGDTQTPAGASQASSSASVYDADGKVIYDSTDKKYQAKNECHPEK
.....
LTSYTGQANKPALSNQATGDALVKA.SDIVALE.NL.SGDIQTAKGASQAMNNGAVYDADGKVIYDSTDKKYQAKNLSGVYK
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
TKEVAKKLVVAQCPDPTLQAMMFKSVINKEGVNDANKKQGINEDNAPFKLEKASADNKTKDAAVTVGDLNVAVACTPLTF
.....
TKEVAKKLVVAQCPDPTLQAMMFKSVINKEGVNDANKKQGINEDNAPFKLEKASADNKTKDAAVTVGDLNVAVACTPLTF
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340
AGDITGPTAKKLSKSLITIKGGQVDINRGLIDMNIQVAGTIDGPTVYKLAQDILNLSVWAGGKYLDKGGVSEVYDANGQAKNPTV
.....
AGDITGPTAKKLSKSLITIKGGQVDINRGLIDMNIQVAGTIDGPTVYKLAQDILNLSVWAGGKYLDKGGVSEVYDANGQAKNPTV
1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360

1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430
LSPANGLDLGGKRI.SNIGA.VELDADAVNRFQFNEVAVTVNLANQSNESASLPPVUTDANGKFTNGTIDOKPKRAIKGADGKY
.....
LSPANGLDL
1370

1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510
HBNXKVPVDRDQHPITDAKRLANLAHGKPLDRGHQVVASLGGNSDAITL/NIKSTL.PQITPTNIGSNVAGQAQSLP.SA
-----

1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590
AQQSRAASVVKDLNIVGFLCTMHNQVDFYKAVDYVNFVNGTGDITSVRSADGIMSNITVNTALASTDDGNVLIKADKGF
-----

1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670

```

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

22/28

YKADDLMPHNSLXKAGKSASDAKPTG.....SLVNFNAGKSGSTGDAVALANLNSKAVFESXDOTPTTPTVSDGISTG.....KALNSMVA

1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 KCGLNVGGKVISNMGKFKDIDDAANVQQLNRSTQLVGSVVMAGNDNAADGNQVNTADIKKDPNSGSSSNRTVIKAGTVLGGKG
 -----CGKVISNMGKFKDIDDAANVQQLNEVRNLLGLGN-AGNLDNADGKVVNIADIKKDPNSGSSSNRTVIKAGTVLGGKG
 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440 1450

1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840
 NNDTEKLAITGGVQVGVDFKGNANGDLSNWWVTKQKDGSKKALLATYNAAGQTNVLTNNPFAEADRINBQGIKRFPHVNDGNQE

 NNDTEKLAITGGVQVGVDFKGNANGDLSNWWVTKQKDGSKKALLATYNAAGQTNVLTNNPFAEADRINBQGIKRFPHVNDGNQE
 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530

1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 FVVQGRNGIDSSASGKHSVAVGYKAKADGEAAVAIGRQTQAGNQSIAIGDPAQATGDQSTAIAGTGNVAVGKHSQAIGDPSIV

 FVVQGRNGIDSSASGKHSVAVGYKAKADGEAAVAIGRQTQAGNQSIAIGDPAQATGDQSTAIAGTGNVAVGKHSQAIGDPSIV
 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 KADNSYSVGNINQPTDATTQDFVGVGNNTVVTESNSVALGNSNSAISAGTHAGTQAKKSDGTAGTITPAGATGTVKGFAGQTA

 KADNSYSVGNINQPTDATTQDFVGVGNNTVVTESNSVALGNSNSAISAGTHAGTQAKKSDGTAGTITPAGATGTVKGFAGQTA
 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080
 VGAVSVGASGARRRITQNVAAAGEVSAATSDAVNGSGLYKATQSIANRATNELDHRHQENKANKAGTSSAMAMASMPQAYLPER

 VGAVSVGASGARRRITQNVAAAGEVSAATSDAVNGSGLYKATQSIANRATNELDHRHQENKANKAGTSSAMAMASMPQAYLPER
 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780

2090 2100 2110 2120 2130
 SMVTGGIATHNGGAVAVGLSKLSDNQCQWVFKINGSADTQCHVGAAVGAGPHE

 SMVTGGIATHNGGAVAVGLSKLSDNQCQWVFKINGSADTQCHVGAAVGAGPHE
 1790 1800 1810 1820 1830

Fig 8 cont

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

23/28

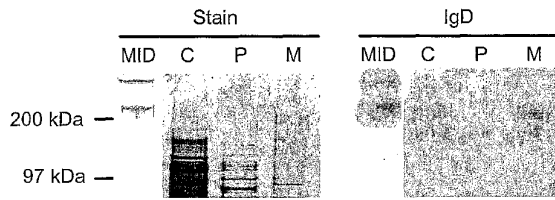


Fig 9

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

24/28

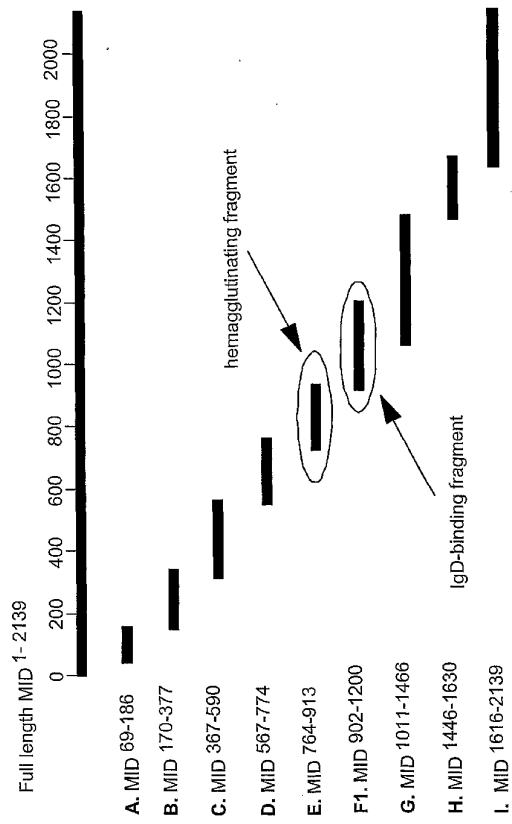


Fig 10

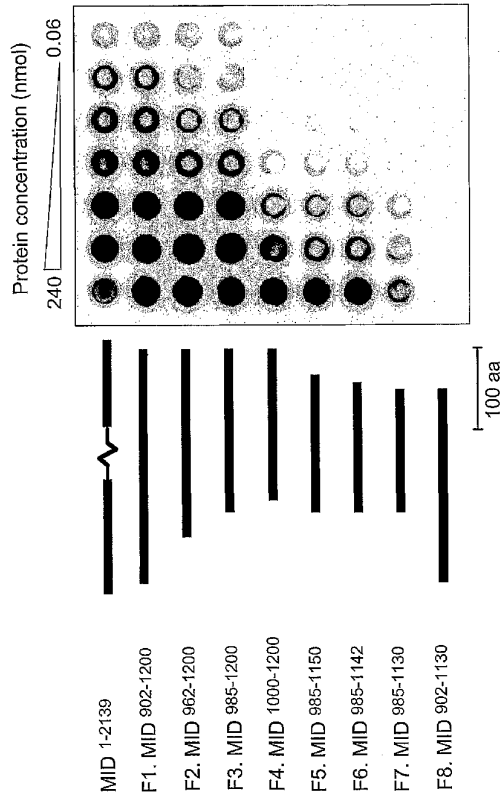


Fig 11

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

26/28

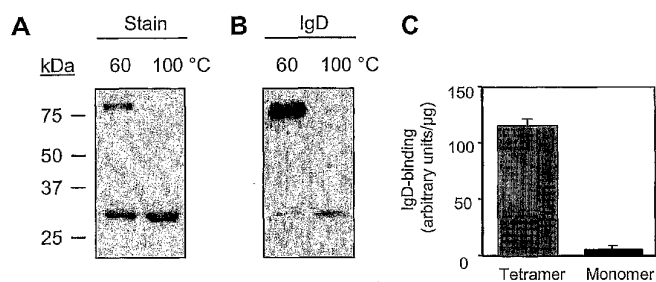


Fig 12

27/28

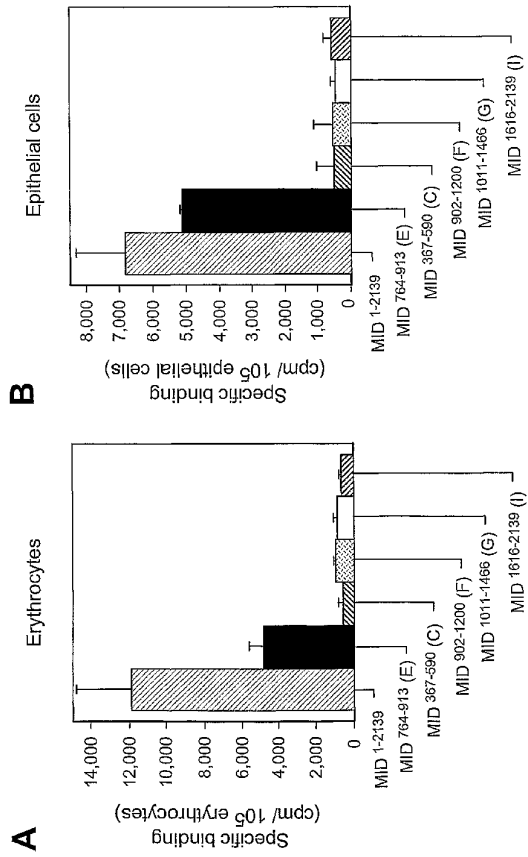


Fig 13

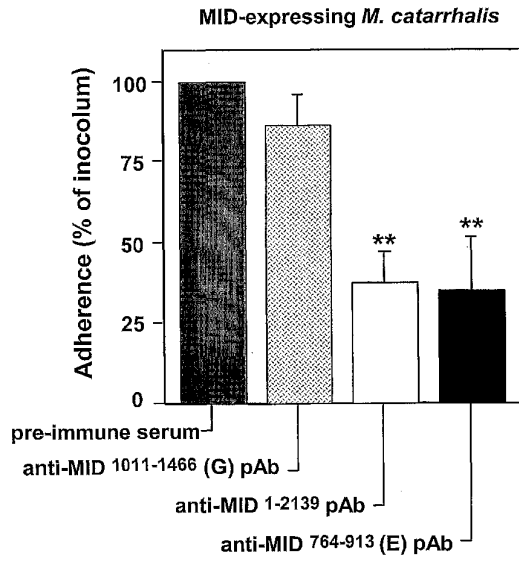


Fig 14

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

1

SEQUENCE LISTING

<110> Forsgren, Arne

<120> Novel surface exposed IgD-binding protein from
Moraxella catarrhalis

<130> 2021373

<150> SE 0102410-8

<151> 2001-07-04

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2139

<212> PRT

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 1

```

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

```

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

2

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

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

3

Thr Lys Val Lys Ser Ala Ile Val Asp Ala Val Asn Gly Gln Ala Asn
 530 535 540
 Gln Ser Phe Val Asn Leu Leu Glu Thr Ala Gly Thr Asn Thr Asn Lys
 545 550 555 560
 Gln Asn Ser Ala Ala Thr Val Lys Asp Leu Tyr Asp Leu Ser Gln Ser
 565 570 575
 Pro Leu Thr Phe Thr Gly Asp Ser Gly Asn Val Lys Arg Lys Leu Gly
 580 585 590
 Gln Thr Leu Thr Ile Thr Gly Gly Gln Thr Lys Thr Asp Gln Leu Thr
 595 600 605
 Asp Asn Asn Ile Gly Val Val Ala Gly Thr Asn Gly Leu Thr Val Lys
 610 615 620
 Leu Ala Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Val Asn Thr Ala Thr Leu
 625 630 635 640
 Asn Ala Thr Asn Lys Val Lys Val Asp Asn Ser Thr Gly Asn Thr Ala
 645 650 655
 Glu Leu Leu Asn Asn Gly Leu Thr Phe Thr Gln Thr Thr Gly Ala Asn
 660 665 670
 Ser Gly Lys Thr Val Tyr Gly Asn Asp Gly Leu Lys Phe Thr Asn Ser
 675 680 685
 Ala Asn Lys Ala Leu Gly Gly Thr Thr Tyr Ile Thr Lys Asp Gln Val
 690 695 700
 Gly Phe Ser Asn Gln Asp Gly Leu Leu Asp Glu Ser Lys Pro Tyr Leu
 705 710 715 720
 Asn Arg Glu Lys Leu Lys Val Gly Lys Ile Glu Ile Lys Asp Ser Gly
 725 730 735
 Ile Asn Ala Gly Gly Lys Ala Ile Thr Gly Leu Pro Ser Thr Leu Pro
 740 745 750
 Asn Thr Thr Tyr Thr Ala Pro Gly Val His Thr Ala Leu His Gly Ser
 755 760 765
 Thr Ile Ser Asn Asp Asp Lys Thr Arg Ala Ala Ser Ile Ala Asp Val
 770 775 780
 Leu Asn Ala Gly Phe Asn Leu Glu Gly Asn Gly Glu Ala Val Asp Phe
 785 790 795 800
 Val Ser Thr Tyr Asp Thr Val Asn Phe Ala Asp Gly Asn Ala Thr Thr
 805 810 815
 Ala Lys Val Thr Tyr Asp Asn Lys Thr Ser Lys Val Ala Tyr Asp Val
 820 825 830
 Asn Val Asp Gly Thr Thr Ile His Leu Thr Gly Thr Asn Gly Lys Lys
 835 840 845

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

4

Asn Gln Ile Gly Val Lys Thr Thr Thr Leu Thr Thr Lys Arg Ala Lys
 850 855 860
 Gly Asn Thr Ala Thr Asn Phe Ser Val Asn Ser Gly Asp Asp Asn Ala
 865 870 875 880
 Leu Ile Asn Ala Lys Asp Ile Ala Asp Asn Leu Asn Thr Leu Ala Gly
 885 890 895
 Glu Ile Arg Thr Ala Lys Gly Thr Ala Ser Thr Ala Leu Gln Thr Phe
 900 905 910
 Ser Ile Ile Asp Glu Gln Gly Asn Asn Phe Met Val Gly Asn Leu Tyr
 915 920 925
 Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Asn Thr Ser Glu Thr Val Thr Phe Val Gly
 930 935 940
 Glu Asn Gly Ile Thr Thr Lys Val Asn Lys Gly Lys Val Lys Val Gly
 945 950 955 960
 Ile Asp Gln Thr Lys Gly Leu Thr Thr Pro Lys Leu Thr Val Gly Ser
 965 970 975
 Ser Asn Gly Lys Gly Ile Val Ile Asp Ser Lys Asp Gly Gln Asn Thr
 980 985 990
 Ile Thr Gly Leu Ser Asn Thr Leu Thr Asp Ala Thr Asn Ala Thr Thr
 995 1000 1005
 Gly His Val Ser Glu Ile Gln Gly Leu Ala Gln Gly Ala Asn Lys Thr
 1010 1015 1020
 Arg Ala Ala Ser Ile Gly Asp Val Leu Asn Ala Gly Phe Asn Leu Gln
 1025 1030 1035 1040
 Gly Asn Gly Glu Ala Lys Asp Phe Val Ser Thr Tyr Asp Thr Val Asn
 1045 1050 1055
 Phe Ile Asp Gly Asn Ala Thr Thr Ala Lys Val Thr Tyr Asp Asp Thr
 1060 1065 1070
 Lys Gln Thr Ser Thr Val Thr Tyr Asp Val Asn Val Asp Asn Lys Thr
 1075 1080 1085
 Leu Glu Val Thr Gly Asp Lys Lys Leu Gly Val Lys Thr Thr Thr Leu
 1090 1095 1100
 Thr Lys Thr Ser Ala Asn Gly Asn Ala Thr Lys Phe Ser Ala Ala Asp
 1105 1110 1115 1120
 Gly Asp Ala Leu Val Lys Ala Ser Asp Ile Ala Thr His Leu Asn Thr
 1125 1130 1135
 Leu Ala Gly Asp Ile Gln Thr Ala Lys Gly Ala Ser Gln Ala Ser Ser
 1140 1145 1150
 Ser Ala Ser Tyr Val Asp Ala Asp Gly Asn Lys Val Ile Tyr Asp Ser
 1155 1160 1165

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

5

Thr Asp Lys Lys Tyr Tyr Gln Ala Lys Asn Asp Gly Thr Val Asp Lys
 1170 1175 1180
 Thr Lys Glu Val Ala Lys Asp Lys Leu Val Ala Gln Ala Gln Thr Pro
 1185 1190 1195 1200
 Asp Gly Thr Leu Ala Arg Met Asn Val Lys Ser Val Ile Asn Lys Glu
 1205 1210 1215
 Gln Val Asn Asp Ala Asn Lys Lys Gln Gly Ile Asn Glu Asp Asn Ala
 1220 1225 1230
 Phe Val Lys Gly Leu Glu Lys Ala Ala Ser Asp Asn Lys Thr Lys Asn
 1235 1240 1245
 Ala Ala Val Thr Val Gly Asp Leu Asn Ala Val Ala Gln Thr Pro Leu
 1250 1255 1260
 Thr Phe Ala Gly Asp Thr Gly Thr Thr Ala Lys Lys Leu Gly Glu Thr
 1265 1270 1275 1280
 Leu Thr Ile Lys Gly Gly Gln Thr Asp Thr Asn Lys Leu Thr Asp Asn
 1285 1290 1295
 Asn Ile Gly Val Val Ala Gly Thr Asp Gly Phe Thr Val Lys Leu Ala
 1300 1305 1310
 Lys Asp Leu Thr Asn Leu Asn Ser Val Asn Ala Gly Gly Thr Lys Ile
 1315 1320 1325
 Asp Asp Lys Gly Val Ser Phe Val Asp Ala Asn Gly Gln Ala Lys Ala
 1330 1335 1340
 Asn Thr Pro Val Leu Ser Ala Asn Gly Leu Asp Leu Gly Gly Lys Arg
 1345 1350 1355 1360
 Ile Ser Asn Ile Gly Ala Ala Val Asp Asp Asn Asp Ala Val Asn Phe
 1365 1370 1375
 Lys Gln Phe Asn Glu Val Ala Lys Thr Val Asn Asn Leu Asn Asn Gln
 1380 1385 1390
 Ser Asn Ser Gly Ala Ser Leu Pro Phe Val Val Thr Asp Ala Asn Gly
 1395 1400 1405
 Lys Pro Ile Asn Gly Thr Asp Asp Lys Pro Gln Lys Ala Ile Lys Gly
 1410 1415 1420
 Ala Asp Gly Lys Tyr Tyr His Ala Asn Ala Asn Gly Val Pro Val Asp
 1425 1430 1435 1440
 Lys Asp Gly Asn Pro Ile Thr Asp Ala Asp Lys Leu Ala Asn Leu Ala
 1445 1450 1455
 Ala His Gly Lys Pro Leu Asp Ala Gly His Gln Val Val Ala Ser Leu
 1460 1465 1470
 Gly Gly Asn Ser Asp Ala Ile Thr Leu Thr Asn Ile Lys Ser Thr Leu
 1475 1480 1485

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

6

Pro Gln Ile Asp Thr Pro Asn Thr Gly Asn Ala Asn Ala Gly Gln Ala
 1490 1495 1500
 Gln Ser Leu Pro Ser Leu Ser Ala Ala Gln Gln Ser Asn Ala Ala Ser
 1505 1510 1515 1520
 Val Lys Asp Val Leu Asn Val Gly Phe Asn Leu Gln Thr Asn His Asn
 1525 1530 1535
 Gln Val Asp Phe Val Lys Ala Tyr Asp Thr Val Asn Phe Val Asn Gly
 1540 1545 1550
 Thr Gly Ala Asp Ile Thr Ser Val Arg Ser Ala Asp Gly Thr Met Ser
 1555 1560 1565
 Asn Ile Thr Val Asn Thr Ala Leu Ala Ala Thr Asp Asp Asp Gly Asn
 1570 1575 1580
 Val Leu Ile Lys Ala Lys Asp Gly Lys Phe Tyr Lys Ala Asp Asp Leu
 1585 1590 1595 1600
 Met Pro Asn Gly Ser Leu Lys Ala Gly Lys Ser Ala Ser Asp Ala Lys
 1605 1610 1615
 Thr Pro Thr Gly Leu Ser Leu Val Asn Pro Asn Ala Gly Lys Gly Ser
 1620 1625 1630
 Thr Gly Asp Ala Val Ala Leu Asn Asn Leu Ser Lys Ala Val Phe Lys
 1635 1640 1645
 Ser Lys Asp Gly Thr Thr Thr Thr Thr Val Ser Ser Asp Gly Ile Ser
 1650 1655 1660
 Ile Gln Gly Lys Asp Asn Ser Asn Ile Thr Leu Ser Lys Asp Gly Leu
 1665 1670 1675 1680
 Asn Val Gly Gly Lys Val Ile Ser Asn Val Gly Lys Gly Thr Lys Asp
 1685 1690 1695
 Thr Asp Ala Ala Asn Val Gln Gln Leu Asn Arg Ser Thr Gln Leu Val
 1700 1705 1710
 Gly Ser Trp Val Met Ala Gly Asn Asp Asn Ala Asp Gly Asn Gln Val
 1715 1720 1725
 Asn Ile Ala Asp Ile Lys Lys Asp Pro Asn Ser Gly Ser Ser Ser Asn
 1730 1735 1740
 Arg Thr Val Ile Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly Gly Lys Gly Asn Asn
 1745 1750 1755 1760
 Asp Thr Glu Lys Leu Ala Thr Gly Gly Val Gln Val Gly Val Asp Lys
 1765 1770 1775
 Asp Gly Asn Ala Asn Gly Asp Leu Ser Asn Val Trp Val Lys Thr Gln
 1780 1785 1790
 Lys Asp Gly Ser Lys Lys Ala Leu Leu Ala Thr Tyr Asn Ala Ala Gly
 1795 1800 1805

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

7

Gln Thr Asn Tyr Leu Thr Asn Asn Pro Ala Glu Ala Ile Asp Arg Ile
 1810 1815 1820
 Asn Glu Gln Gly Ile Arg Phe Phe His Val Asn Asp Gly Asn Gln Glu
 1825 1830 1835 1840
 Pro Val Val Gln Gly Arg Asn Gly Ile Asp Ser Ser Ala Ser Gly Lys
 1845 1850 1855
 His Ser Val Ala Val Gly Tyr Lys Ala Lys Ala Asp Gly Glu Ala Ala
 1860 1865 1870
 Val Ala Ile Gly Arg Gln Thr Gln Ala Gly Asn Gln Ser Ile Ala Ile
 1875 1880 1885
 Gly Asp Asn Ala Gln Ala Thr Gly Asp Gln Ser Ile Ala Ile Gly Thr
 1890 1895 1900
 Gly Asn Val Val Ala Gly Lys His Ser Gly Ala Ile Gly Asp Pro Ser
 1905 1910 1915 1920
 Thr Val Lys Ala Asp Asn Ser Tyr Ser Val Gly Asn Asn Asn Gln Phe
 1925 1930 1935
 Thr Asp Ala Thr Gln Thr Asp Val Phe Gly Val Gly Asn Asn Ile Thr
 1940 1945 1950
 Val Thr Glu Ser Asn Ser Val Ala Leu Gly Ser Asn Ser Ala Ile Ser
 1955 1960 1965
 Ala Gly Thr His Ala Gly Thr Gln Ala Lys Lys Ser Asp Gly Thr Ala
 1970 1975 1980
 Gly Thr Thr Thr Thr Ala Gly Ala Thr Gly Thr Val Lys Gly Phe Ala
 1985 1990 1995 2000
 Gly Gln Thr Ala Val Gly Ala Val Ser Val Gly Ala Ser Gly Ala Glu
 2005 2010 2015
 Arg Arg Ile Gln Asn Val Ala Ala Gly Glu Val Ser Ala Thr Ser Thr
 2020 2025 2030
 Asp Ala Val Asn Gly Ser Gln Leu Tyr Lys Ala Thr Gln Ser Ile Ala
 2035 2040 2045
 Asn Ala Thr Asn Glu Leu Asp His Arg Ile His Gln Asn Glu Asn Lys
 2050 2055 2060
 Ala Asn Ala Gly Ile Ser Ser Ala Met Ala Met Ala Ser Met Pro Gln
 2065 2070 2075 2080
 Ala Tyr Ile Pro Gly Arg Ser Met Val Thr Gly Gly Ile Ala Thr His
 2085 2090 2095
 Asn Gly Gln Gly Ala Val Ala Val Gly Leu Ser Lys Leu Ser Asp Asn
 2100 2105 2110
 Gly Gln Trp Val Phe Lys Ile Asn Gly Ser Ala Asp Thr Gln Gly His
 2115 2120 2125

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

8

Val Gly Ala Ala Val Gly Ala Gly Phe His Phe
2130 2135

<210> 2
<211> 6889
<212> DNA
<213> Moraxella catarrhalis

<400> 2
aatcattacc ccccccttta tgggggatca tatgaataga atattatgat tgtatctgat 60
tatttghatca gaatgtctgat gctctacgagt tgaatttgggt gaatcactct attattttgat 120
atgtlltggaa actaatetat tgaacttaaat ccccatatgg ttataattta gcataatgg 180
aggctlltttg taaaactcac atcgcaaat tgttttactg ttactaccat gcttgaatga 240
cgatcccaat catcagattc attcaagtga tgtgtttgta tacgcatcat ttaccctaat 300
tattttcaatc gaaatgcctca tgcacgcatg tatcattttt ttaaggtaaa ccaccatgaa 360
tcacatctat aaagtcacat ttaacaaaagc cacaggcaca tttatggccg tggoggaata 420
tgcacaatcc cacagcacgg ggggtagctg tcttacaggg caagtggcca gtgtatgcac 480
tctgagcttt gccogtgtt cccgctctgc tctcctctgt atcggtcgca cgtcaatgg 540
cagtgcttat gctcaaaaag atcccagaca tatcgcaatt gatggcaaca gctcgaacac 600
atcctcaggg actgcccctg cgacaggtga tccagccatt gctcttgggt aaaatgctaa 660
tgcagagggc ggtcaagcca tgcctctcgg tagtagcaat aaaacaggtg gtgaaaacgc 720
cgtaaatata ggtaccgatg ccaaaagtga ggagtccatc gccatcggtg gtgatgtagt 780
ggctgagggt actgctcoga ttgccatcgg tggtagatgc ttacatttgt gggatgaacc 840
aaataagcaa aagttcctcg acccaaaaag taaagaattg attttaaac atcaagaatt 900
aaacaacata tacaacctgc ctgatggtag tctcaaaag tattttgca catcagcaaa 960
gggacacgcc agtattgcac taggaacctg gacacagcca gaggtcatt ttgccaagc 1020
ctttggtaca cgggcaacag ctaaaagcaa ctattctctg gcagtggtc ttaccgcca 1080
agcaaacaca gaatottoa tgcctgttgg ttctaagca caagtaacg ggtttgcagc 1140
gacagccatt ggtggaggtg ctaaaagctga ttgggtcga agcatagccc taggttttgg 1200
ttctcagatc cttaactaag agaaagtag tcataacaat accaatgtct atgtaccaca 1260
aggtagaata ttagaagagc ggtataaagc caccgaaaac ggtcagtcgc ctaataaggt 1320
agtgatata ttttccattg gtagtagctc tatcaaacgt aaaatcatca atgtcgggtg 1380
gggttctcag gagaccgatg cggctcaatgt ggcacagctt aaattgggtg agcgggtggc 1440
taagcgtcaa attacttttc aggtgatga tagcaaatat agcgtaaaa aagtttggg 1500
tcagacttta actattaagc gtggtaaaac agagaccggt gaactaacgc aaaataacat 1560
cgggtgtgta caagatgata atggtaatgg tctgaaagt aaacttgcta aagatctgac 1620
tggtttgacc aaggttgca taaatggtaa tgggtgtaac aacgccagc tactaaacgg 1680
tggcttgacc ttttcgacat caggtgcca tgcaggcaaa acggtctatg gcactgatgg 1740
gggtgaagtt actataata caggaacagc aaacagaaac gcaataccgc acaactactg 1800
tattacaaaa aataaaattg gctttgctgg ggtgatgaa caagttgatg aaagcaaac 1860
ttatcttgac aacgaaaaag taaaagttgg cacagttgag attaaaaaaa ctggcatcaa 1920
tgcaggtaat caagaaatta ccaaggtcaa atcggccatt gttgatgca ttaatggca 1980
agcaaatcaa agctttgtga acctctaga aaacagcagg acaaacacca acaaacaaa 2040
ctctgcggc acggttaaac acttataga cctatcaca tcacogctga cctttacagg 2100
tgatagcggc aacgttaaac gaaaactggc tcagacttta accatcacag gggcaacaac 2160
aaagaccgat caattaaccg acaataacat cgggtgtgta gcaggtacta atggctaac 2220
cgttaaacct gctaaaactt taanacgtct tactgtagtt aatacggcta cattaaacgc 2280
caccataaaa gttaaagtag ataatagtag tggtaaacg gctgaattat laaacaaagg 2340
tttaaccttt acccaaaaa caggtgcaaa ttacagtaaa accgtctatg gaaatgatgg 2400
cttgaagttt actaatagtg ctaataaagc acttggcggc acaacttaca tcaaaaaaga 2460
tcaagttggt tttagcaatc aagatggctt acttgabgaa agcaaacctg atcttaaccg 2520
agcaatcaca ggaatggctt aaattggctt taaagacagt ggcattaatg caggtggtaa 2580
tactgcacta catggcagta caacctgct caacctacc tctactgac ctggcgtgca 2640
cgtatgtgta aacgcaggct ctaacttcaa cgaagcaaaa accogtgcgc ccagatcgc 2700
taacaaaacc agtaaaaggc ttgocgatgc caatgcccac accgttaagg actttgtctc 2760
agocactaat ggaagaaaa acccaattgg cgtaaaaaac acccaactga ccacaaaagc 2820
tgcbaaaggc aatcacgcaa ctaattttag tgttaacctc ggtgatgaca atgccttat 3000
laacgccaaa gacatgcgc acaactttaa caccctagct ggtgaaatc gcaacgcca 3060

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

```

aggcacagca agcaccgccc tacaaaacct ctctattatt gatgaacsaq gtaataaact 3120
tatggctcgtt aacctttact ctggttatga caoctoaaat aacctgaga ccgttaacct 3180
tgtaggltgaa aacggcattc ccocaaaggt aaataaaggt aaagtoaaag ttggtatgta 3240
ccaaaccgaa ggcctaaacta ccocaaaggt aaataaaggt aaagtoaaag ttggtatgta 3300
tgcatttgac agtaagatg gtaaaaatcc atcaaaagga ctaagcaaca cttaaacga 3360
tgcococaa gcaacaacag ggcattgtcc tgaatccag ggcctggcac aaggtgocaa 3420
caaaaaccgt gccocagca ttggtgatgt actaaacga ggccttaact tgcagggca 3480
tggtaagcc agsaactttg tctccactta tgcacacgtc anctttatcg atggcaatgc 3540
cacaccgct aggtgacct atgatgacac gaacagacc agccagtaa cttatgatgt 3600
caatctggat aataaaacc ttgaagtac aggcgataaa aaacttggcc toaaaaacc 3660
ccactgaccc aaascaagtg ctaatggtaa tgcacccaaa tttagtggcc ccgatggca 3720
tgcctctgtt aaagccagtg atatcgccac ccatctaaat accttggctc ggcacatcca 3780
aacccocaaa ggagcaagcc aagcaagccag ctacgcaagc tatgtggatg ctgatggcaa 3840
caaggtcact latgacagta ccgataaaga gtactatcaa gccaaaatg atggcaactg 3900
tgcataaaac aaagaagttg ccaaaagcaa actggtccgc caagccocaa ccccgatgg 3960
ccacttggct cgaatgaatg tcaaatcagt cattaacaaa gaaccaagta atgatgocaa 4020
taaaaagcaa ggcataaacg aagaacaacc ctttgttaa ggcactgaaa aagccgcttc 4080
tgcataacaa ccaaaaaagc ccgacgtaac tgggtgtgat ttaaatggcc ttgocccaac 4140
accgctgacc tttgcagggg atacagccac aacggctaaa aaactgggoc agactttgac 4200
catcaaaagt gggcaaacag acacaaataa gctaacccat aataacatcg gtgtggtagc 4260
aggtactgat ggcttcaact tcaaacctgc caaagaccta accaatctta acagcgttaa 4320
tgcaggtggc accaaaaatg atgacaagag cgtgtctttt gtgagccgaa acggctcaagc 4380
caaaagcaac acccctgtgc taagtgcgaa tgggtggac ctgggtggca aacgcatcag 4440
taacatcggc gcagctgttg atgataacga tgggtgaaac ttaagcagt ttaatgaagt 4500
tgcataaacg gtaacaacc taaacaacca aagtaactca ggtgctcat tgcctttgt 4560
agtcaaccgt gccaaatggc agccactcaa tggcaccgat gacaagccc aaaaagccat 4620
caagggcgcg gatgtaaat actatcacgc caacgcaaac ggcgtacctg tggcaaaaga 4680
tggcaacccc atcaacgat cggcaaaact tgcacatctg gcagctcatg goaaaacccc 4740
tgcagcaagt catcaagtg tggcaagcct agggcgcac tcagatgcca tcaacctaac 4800
caacatcaag tccactttgc caaaaattga cacaccaac acaggtaatg ccaatgcagc 4860
gcaagcccaa agtctgocca gcctatcagc agcaacgcaa agtaatgctg ccaatgtcaa 4920
agatgtgcta aatgtaggct ttaacttgca gaccaatcac aatcaagtg actttgtcaa 4980
agcctatgat accgtcaact ttgtcaatgg tacaggtgoc gacatcacia gogtgcgtag 5040
tgcctgatggc acgatgagta acatcacctg caacacccgc ttgacagcga ccgatgatga 5100
tggcaatgtg cttatcaaa gcaaaagatg taagtctac aaagcagacg acctoatgcc 5160
aaaaggctca ctaaaagcag goaaatcagc cagtgatgoc aaaactccaa ctggtctaag 5220
ccttgtcaac cccaatgctg gtaaaagcag tacagggcat ccagtggtc ttaataactt 5280
atcaaaagtg gtatttaaat ccaaaagatg taacaactc accacagtaa gctctgatgg 5340
catcagtatc caagggcaag ataacagcaa catcacccta agcaaaagat ggtgaaatgt 5400
agggcgttaag gtcatcagca atgtgggtaa aggcacaaaa gacacagcc ctgccaatgt 5460
acaacagta aaccgaagta cgcacttgt tgggtcttgg gtaatggctg gtaatgataa 5520
cgctgacggc aatcaggtaa acatgtccga catcaaaaa gacccaactt caggttoatc 5580
atctaaaccg actgtcatca aagcagccac ggtacttggc ggtaaagta ataacgatcc 5640
cgaaaaactb gccactgggt gtgtacaagt gggcgtggat aaagcagcga accgtaaagg 5700
ogatttaagc aatgtttggg tcaaaaacca aaaagatggc agcaaaaaag cctgtctcgc 5760
caactataac gccgcaggtc agaccaacta tttgaccaac aaccccgagc aagccattga 5820
cagaataaat gaacaaggtc tccgctctct ccalgtcaac gatggcaatc aagagcctgt 5880
ggtacaaggg cgtacaagca ttgactcaag tgcctcagc aagcaactcag tggcggctgg 5940
ttataagggc aagccagatg gtgaagccgc cgttgccata agccagacaaa cccaagcagg 6000
caaccaatcc atcgccatcg gtgataaccg acaagccaca ggcgatcaat ccatcgccat 6060
oggtacaggg aatgtggtag caggtaaagca ctctgggtcc atcgggacc caagcactgt 6120
taaggtgatg aacagttaca gtgtgggtaa taacaaccag ttaaccgatg ccaactcagc 6180
ogatgtcttt gylgtgggca ataacatcac cgtgaccgaa agtaactcgg ttgctttagg 6240
tcaaaactct gccatcagtg caggcacaca ccagggcaca caagccaaaa atctctcagg 6300
caacagcaggt acaaccacta cagcaggtgc aacaggtcac gttaaagctc ttgctgggca 6360
aacggcaggt ggtcgggtct ccgtgggtgc ctacaggtcgt gaacggcgtc tccaaatgt 6420
ggcaagcaggt aagttcagtg ccaacagccac cgtatgggtc aatgttagcc agttgtacaa 6480
agccaccocaa agcattgocca acgcaaaccaa tgagctggac catgtatcc accaaaaaga 6540
aataaagcc aatgcaagga ttctcatcagc gatgggatg gcgtccatgc cacaagccta 6600
cattcctggc agatccatgg ttaccggggg tbtgocacc caaacggctc aaggtcgggt 6660
ggcagtgga ctgtogaagc tgtcgggtaa tggctcaatg gtatttaaaa tcaatggctc 6720

```

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

10

```

agccgatacc caagggccatg taggggcagc agttgggtgca ggttttcact ttttaagccat 6780
aaatcgcaag attttactta aaaatcaatc tcaccatagt tgtataaac agcabcagca 6840
tcagtcatat tactgatgct tgatggtttt tattacttaa accatttta 6889

```

```

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Moraxella catarrhalis

```

```

<400> 3
ogggatccga tggcctgggc ggaatatgcc 30

```

```

<210> 4
<211> 38
<212> DNA
<213> Moraxella catarrhalis

```

```

<400> 4
cgggatccg aaaagtgaac acctgcacca actgctgc 38

```

```

<210> 5
<211> 38
<212> DNA
<213> Moraxella catarrhalis

```

```

<400> 5
tgtcagcatg tatcatTTTT ttaaggtaaa ccaccatg 38

```

```

<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> Moraxella catarrhalis

```

```

<400> 6
catcaattgc gatatgtctg ggatcttg 28

```

```

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Moraxella catarrhalis

```

```

<400> 7
cttcacccca tcagtccat agacc 25

```

```

<210> 8
<211> 150
<212> PRT
<213> Moraxella catarrhalis

```

```

<400> 8
Ala Leu His Gly Ser Thr Ile Ser Asn Asp Asp Lys Thr Arg Ala Ala
 1           5           10           15
Ser Ile Ala Asp Val Leu Asn Ala Gly Phe Asn Leu Glu Gly Asn Gly
 20           25           30

```

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

11

Glu Ala Val Asp Phe Val Ser Thr Tyr Asp Thr Val Asn Phe Ala Asp
 35 40 45

Gly Asn Ala Thr Thr Ala Lys Val Thr Tyr Asp Asn Lys Thr Ser Lys
 50 55 60

Val Ala Tyr Asp Val Asn Val Asp Gly Thr Thr Ile His Leu Thr Gly
 65 70 75 80

Thr Asn Gly Lys Lys Asn Gln Ile Gly Val Lys Thr Thr Thr Leu Thr
 85 90 95

Thr Lys Arg Ala Lys Gly Asn Thr Ala Thr Asn Phe Ser Val Asn Ser
 100 105 110

Gly Asp Asp Asn Ala Leu Ile Asn Ala Lys Asp Ile Ala Asp Asn Leu
 115 120 125

Asn Thr Leu Ala Gly Glu Ile Arg Thr Ala Lys Gly Thr Ala Ser Thr
 130 135 140

Ala Leu Gln Thr Phe Ser
 145 150

<210> 9
 <211> 450
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis

<400> 9
 gcactacatg gcagtacaat ttctaacgac gacaaaaccc gtgccgccag tatcgccgat 60
 gtgctaaccg caggctttaa cttggaaggt aatggtgaag cggttgactt tgtctccact 120
 tatgacaccg tcaactttgc cgatggcaat gccaccaccg ctaaggtaac ttatgataac 180
 aaaaccagta aagtggcgtg tgaatgcaat gtggatggta caaccattca tctaaccaggc 240
 actaatggca agaaaaacca aattggcgtg aaaaaccacca cactgaccac aaaacgtgct 300
 aaaggtaata cagcaactaa ttttagtggt aactctggtg atgacaatgc ccttattaac 360
 gccaaagaca tcgccgacaa tctaaaaccc ctatgctggg aaattcgcac cgccaaaggc 420
 acagcaagca ccgcctaca aaccttctct 450

<210> 10
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Moraxella catarrhalis

<400> 10
 Asp Gln Thr Lys Gly Leu Thr Thr Pro Lys Leu Thr Val Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Asn Gly Lys Gly Ile Val Ile Asp Ser Lys Asp Gly Gln Asn Thr Ile
 20 25 30

Thr Gly Leu Ser Asn Thr Leu Thr Asp Ala Thr Asn Ala Thr Thr Gly
 35 40 45

His Val Ser Glu Ile Gln Gly Leu Ala Gln Gly Ala Asn Lys Thr Arg
 50 55 60

WO 03/004651

PCT/SE02/01299

12

Ala Ala Ser Ile Gly Asp Val Leu Asn Ala Gly Phe Asn Leu Gln Gly
65 70 75 80
Asn Gly Glu Ala Lys Asp Phe Val Ser Thr Tyr Asp Thr Val Asn Phe
85 90 95
Ile Asp Gly Asn Ala Thr Thr Ala Lys Val Thr Tyr Asp Asp Thr Lys
100 105 110
Gln Thr Ser Thr Val Thr Tyr Asp Val Asn Val Asp Asn Lys Thr Leu
115 120 125
Glu Val Thr Gly Asp Lys Lys Leu Gly Val Lys Thr Thr Thr Leu Thr
130 135 140
Lys Thr Ser Ala Asn Gly Asn Ala Thr Lys Phe Ser Ala Ala Asp Gly
145 150 155 160
Asp Ala Leu Val Lys Ala Ser Asp Ile Ala Thr His Leu Asn Thr Leu
165 170 175
Ala Gly Asp Ile Gln Thr Ala Lys Gly Ala Ser Gln Ala Ser Ser Ser
180 185 190
Ala Ser Tyr Val Asp Ala Asp Gly Asn Lys Val Ile Tyr Asp Ser Thr
195 200 205
Asp Lys Lys Tyr Tyr Gln Ala Lys Asn Asp Gly Thr Val Asp Lys Thr
210 215 220
Lys Glu Val Ala Lys Asp Lys Leu Val Ala Gln Ala Gln Thr Pro
225 230 235

<210> 11
<211> 717
<212> DNA
<213> Moraxella catarrhalis

<400> 11
gaccaaacca aaggcttaac cagcctaag ctgaccgtgg gtagtsgtaa tggcaaaaggc 60
attgtcattg acagtaaaga tggtaaaaat accatcacag gactaagcaa cactctaacc 120
gatgccacca acgcaacaac agggcatgtc agtgaatcc agggcttggc acaaggtgca 180
aacaaaaccg gtgcccagcag cattggtgat gtactaaacg caggctttaa cttgcaaggc 240
aatggtgaag ccaagactt tgtctccact tatgacaccg tcaactttat cgtatggcaat 300
gccaccaccg ctaagggtgac ctatgatgac acgaaacaga ccagccacagt aacttatgat 360
gtcaatgtgg ataataaac ccttgaagtg acaggcgata aaaaacttgg cgtcaaaacc 420
accacactga ccaaaaacag tgctaattgt aatgcaacca aatttagtgc cgccgatggc 480
gatgcccttg ttaaagccag tgatatgcc acccatctaa ataccttggc tggcgacatc 540
caaaccccca aaggagcaag ccaagcaagc agctcaagaa gctatgtgga tgotgatggc 600
aaccaaggtca tctatgacag taccgataag aagtactatc aagccaaaaa tgatggcaca 660
gttgataaaa ccaagaagt tgccaaagac aaactggtcg cccaagccca aacccca 717

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 02/01299
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C12N 15/31, C07K 14/22 // C12N 15/62 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)		
IPC7: C12N, C07K		
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, BIOSIS, MEDLINE, GENESEQ, EMBL, SWALL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	The Journal of Immunology, Volume 167, 2001 Arne Forsgren et al., "Isolation and Characterization of Novel IgD-Binding Protein from Moraxella catarrhalis", page 2112 - page 2120 see the whole document --	1-55
A	CELLULAR IMMUNOLIGY, Volume 112, 1988, Arne Forsgren et al., "Branhamella catarrhalis Activates Human B Lymphocytes following Interactions with Surface IgD and Class 1 Major Histocompatibility Complex Antigens", page 78 - page 88, abstract --	1-55
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
22 October 2002	23 11 2002	
Name and mailing address of the ISA ¹ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Frida Plym Forsshell/mj Telephone No. +46 8 782 25 00	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 02/01299
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Bacterial Immunoglobulin-Binding Proteins, Volume 1, 1990, pages 235-242, Thomas F. Tedder, "Immunoglobulin D-binding bacteria", see especially chapter B --	1-55
A	WO 0105424 A2 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED), 25 January 2001 (25.01.01), abstract --	11-17
A	WO 01/07619 A1 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED) 1 February 2001 (01.02.01), abstract & DATABASE GENESEQ (online) Accession no: AAF59105, 1 Feb 2001 DATABASE GENESEQ (online) Accession no: AA69136, 1 Feb 2001 DATABASE GENESEQ (online) Accession no: AA59106 1 Feb 2001 DATABASE EMBL (online) Accession no: AX079917, 22 Feb 2001 --	1-55
A	WO 9634960 A1 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED), 7 November 1996 (07.11.96), abstract & DATABASE GENESEQ (online) Accession no: AA38740, 7 Nov 1996 DATABASE GENESEQ (online) Accession no: AAT38741, 7 Nov 1996 --	1-55
A	US 5808024A (KEN SASAKI ET AL), 15 September 1998 (15.09.98), abstract & DATABASE EMBL (online) Accession no: AR040716, 6 Oct 1999 DATABASE EMBL (online) Accession no: AR40717, 6 Oct 1999 --	1-55
A	US 6214981 B1 (KENNETH TUCKER ET AL) 10 April 2001 (10.04.2001), abstract & DATABASE GENESEQ (online) Accession no: AAD04029, 10 Apr 2001 -- -----	1-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE02/01299

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: 52 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claim 52 relates to a therapeutic method practised on the human or animal body. Thus, the International Search Authority is not required to carry out an international search for this claim (PCT Rule 39.1(iv)).</p>
2. <input type="checkbox"/>	<p>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:</p>
3. <input type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	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.:
4. <input type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International application No. 30/09/02 PCT/SE 02/01299		
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date		
WO 0105424 A2	25/01/01	AU	5958600 A	05/02/01		
		EP	1200122 A	02/05/02		
		US	6391313 B	21/05/02		

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/195	C 0 7 K 14/195	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/12	C 0 7 K 16/12	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 7/00	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	C

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 フオシユグレン, アルネ

スウェーデン国、エス - 2 3 9 4 1・ファルステルボ、ソテンスペーゲン・4・ペー

(72) 発明者 リエスベック, クリステイアン

スウェーデン国、エス - 2 1 6 2 1・マルメ、ファイシユパンスガータン・2

(72) 発明者 ヤンソン, ホーカン

スウェーデン国、エス - 2 2 3 5 3・ルンド、トレドゴーツガータン・6・ペー

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA13 BA31 BA61 CA04 CA05 CA06 CA07 DA06
 EA04 FA02 FA10 GA11 GA19 HA03 HA08 HA14
 4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13
 4B065 AA01Y AA26X AA98X AB01 AC14 BA02 BA24 CA24 CA45 CA46
 4C085 AA03 BB11 EE01
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB34 DA05 NA14 ZB08
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 DA50 DA75 DA86
 EA31 EA50 FA72 FA74 GA22 GA26 HA07

专利名称(译)	来自粘膜莫拉氏菌的新型表面暴露的免疫球蛋白D结合蛋白		
公开(公告)号	JP2005500837A	公开(公告)日	2005-01-13
申请号	JP2003510809	申请日	2002-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	霍师鱼格伦·阿恩		
申请(专利权)人(译)	Fuoshiyuguren , 阿恩		
[标]发明人	フオシユグレンアルネ リエスベツククリステイアン ヤンソンホーカン		
发明人	フオシユグレン,アルネ リエスベツク,クリステイアン ヤンソン,ホーカン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/14 A61K39/00 A61P37/06 C07K1/22 C07K14/195 C07K14/21 C07K16/12 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02		
CPC分类号	A61K39/00 A61P11/00 A61P37/04 A61P37/06 C07K14/212 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/14.Z A61K39/00.Z A61P37/06 C07K1/22 C07K14/195 C07K16/12 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12P21/02.C G01N33/53.N C12N5/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB34 4C087/DA05 4C087/NA14 4C087/ZB08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/GA26 4H045/HA07		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	0102410 2001-07-04 SE		
其他公开文献	JP4443922B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种表面暴露的蛋白质，其可以在卡他莫拉氏菌中检测到，具有如SEQ ID NO：1所述的氨基酸序列，表观分子量为200kDa，并且具有选择性结合膜结合或可溶性IgD的能力。所述表面暴露蛋白的免疫原性或IgD结合片段，以及所述表面暴露蛋白的免疫原性和粘附性片段。还描述了DNA片段，疫苗，质粒和噬菌体，非人宿主，重组DNA分子和植物，融合蛋白和多肽以及融合产物。还公开了一种检测IgD的方法，一种分离IgD的方法，一种分离卡他莫拉氏菌的表面暴露蛋白的方法以及一种用于治疗自身免疫疾病的方法。

