

(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2005-507653

(P2005-507653A)

(43) 公表日 平成17年3月24日(2005.3.24)

(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
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 11/02	4 B O 2 4
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/04	4 B O 6 4
A 6 1 P 11/04	A 6 1 P 27/02	4 B O 6 5
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/16	4 C O 8 4
		4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-522569 (P2003-522569)	(71) 出願人	592107462
(86) (22) 出願日	平成14年8月27日 (2002.8.27)		シャイアー バイオケム インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月27日 (2004.2.27)		カナダ国 エイチ7ブイ 4エイ7, ケベック, ラヴァル, アーモンド-フラッピア
(86) 国際出願番号	PCT/CA2002/001315		ブルバード 275
(87) 国際公開番号	W02003/018052	(74) 代理人	100072051
(87) 国際公開日	平成15年3月6日 (2003.3.6)		弁理士 杉村 興作
(31) 優先権主張番号	60/314, 634	(72) 発明者	デニス マーティン
(32) 優先日	平成13年8月27日 (2001.8.27)		カナダ国 ケベック ジー3エイ 1イー9
(33) 優先権主張国	米国 (US)		セント-オウガスティン-ドゥーデスマウルス リュ ガボウリー 4728-ジー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリスポリペプチド及び対応するDNA断片

(57) 【要約】

本発明は、予防、診断、及び/又は治療に有用である、モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリスのポリペプチドに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記のポリヌクレオチド：

(a) 配列番号 2 又は 4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次 (secondary) ポリペプチドと、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 2 又は 4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 2 又は 4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、 10

(d) 配列番号 2 又は 4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号 2 又は 4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号 2 又は 4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号 1 又は 3 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び 20

(h) 上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 又は (g) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド；

から選択されたポリヌクレオチドからなる、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

下記のポリヌクレオチド：

(a) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、 30

(c) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号 1 又は 3 から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び

(h) 上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 又は (g) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド； 40

から選択されたポリヌクレオチドからなる、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドが DNA である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記ポリヌクレオチドが DNA である、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記ポリヌクレオチドが RNA である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記ポリヌクレオチドが RNA である、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。 50

【請求項 7】

厳しい条件下において、

- (a) ポリペプチドをコードする D N A 配列、又は
 - (b) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補鎖
- (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号第 2 又は 4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなる) ;
のいずれかにハイブリダイズする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 8】

厳しい条件下において、

- (a) ポリペプチドをコードする D N A 配列、又は
 - (b) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補鎖
- (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号第 2 又は 4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなる) ;
のいずれかにハイブリダイズする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 9】

厳しい条件下において、

- (a) ポリペプチドをコードする D N A 配列、又は
 - (b) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補鎖
- (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる) ;
のいずれかにハイブリダイズする、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 10】

厳しい条件下において、

- (a) ポリペプチドをコードする D N A 配列、又は
 - (b) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補鎖
- (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号 2 又は 4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに由来する、少なくとも 10 の連続するアミノ酸残基からなる) ;
のいずれかにハイブリダイズする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

厳しい条件下において、

- (a) ポリペプチドをコードする D N A 配列、又は
 - (b) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補鎖
- (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチドに由来する、少なくとも 10 の連続するアミノ酸残基からなる) ;
のいずれかにハイブリダイズする、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 12】

前記 D N A は発現制御部位と機能が発現するように連結されている、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 13】

前記 D N A は発現制御部位と機能が発現するように連結されている、請求項 2 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

40

【請求項 14】

請求項 12 に記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 13 に記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 16】

前記ポリペプチドの発現に適した条件下で、請求項 14 に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、ポリペプチドの生成方法。

【請求項 17】

前記ポリペプチドの発現に適した条件下で、請求項 15 に記載の宿主細胞を培養する工程

50

を含む、ポリペプチドの生成方法。

【請求項 18】

下記のポリペプチド：

(a) 配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチド

(b) 配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチド

(c) 配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド、

(d) 配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチド、 10

(e) 配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗原を生成することが可能なポリペプチド、

(f) 配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープ、

(g) N 末端のメチオニン残基が欠失した上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) に記載のポリペプチド、及び

(h) 分泌アミノ酸配列が欠失した上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) に記載のポリペプチド； 20

から選択されたポリペプチドからなる、単離されたポリペプチド。

【請求項 19】

下記のポリペプチド：

(a) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチド、

(c) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド、

(d) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチド、 30

(e) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗原を生成することが可能なポリペプチド、

(f) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープ、

(g) N 末端のメチオニン残基が欠失した上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) に記載のポリペプチド、及び

(h) 分泌アミノ酸配列が欠失した上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) に記載のポリペプチド；

から選択されたポリペプチドからなる、単離されたポリペプチド。

【請求項 20】 40

配列番号 2、4 に示す配列、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列を有するポリペプチドを 2 又はそれ以上含み、キメラポリペプチドを形成するように該ポリペプチドを連結して提供された、キメラポリペプチド。

【請求項 21】

配列番号 2 又は 4 に示す配列から選択された配列を有するポリペプチドを 2 又はそれ以上含み、キメラポリペプチドを形成するように該ポリペプチドを連結して提供された、キメラポリペプチド。

【請求項 22】

請求項 18 から 21 のいずれか 1 つの請求項に記載のポリペプチドと、薬学的に受容可能な担体、希釈液、又はアジュバントを含む薬剤組成物。

【請求項 23】

モラクセラ (*Moraxella*) 感染を受けやすい宿主に、請求項 22 に記載の組成物を予防又は治療に必要な量を投与する工程を含む、モラクセラ 感染の予防又は治療方法。

【請求項 24】

前記宿主が新生児、幼児、又は子供である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記宿主が免疫不全宿主である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記宿主が成人である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記宿主に請求項 22 に記載の組成物を予防又は治療に必要な量を投与する工程を含む、中耳炎、副鼻腔炎、慢性咳、急性喉頭炎、化膿性角膜炎、新生児 (*neonatorum*) の結膜炎、侵入性疾病の予防又は治療方法。

10

【請求項 28】

下記の工程；

(a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

(b) 請求項 18 から 21 のいずれか 1 つの請求項に記載のポリペプチドに反応性を示す抗体又はその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び

(c) モラクセラ の存在を示す混合物中で、特異的に結合した抗体又は結合した断片を検出する工程；

20

からなる、モラクセラ 感染を受けやすい宿主における、モラクセラ 感染の診断方法。

【請求項 29】

下記の工程；

(a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

(b) 請求項 18 から 21 のいずれか 1 つの請求項に記載のポリペプチド又はその断片を一つ又はそれ以上、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び

(c) モラクセラ に特異的な抗体の存在を示す混合物中で、特異的に結合した抗原又は結合した断片を検出する工程；

30

からなる、前記抗体を含むか又は含むと思われる生体サンプルにおける、モラクセラ 抗原に特異的な抗体の検出方法。

【請求項 30】

モラクセラ 感染の予防又は治療処理用の薬剤を製造において、請求項 22 に記載の薬剤組成物を使用する方法。

【請求項 31】

請求項 18 から 21 のいずれか 1 つの請求項に記載のポリペプチドを含む、モラクセラ 感染の検出又は診断用のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明はポリペプチドに、より特異的には、モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリス 感染の予防、診断及び/又は治療に使用可能な モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリス (*Moraxella (Branhamella) catarrhalis*) の SMC-1 及び SMC-2 ポリペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリス はヒトにおいて気道感染を引き起こすグラム陰性双球菌である。M. カタラーリス は、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 及び インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) に次ぐ、現在幼児や子供において中耳炎を引き起こす第 3 の最も代表的な起炎菌であるとして受け入れられている。M. カタラーリス は

50

また、副鼻腔炎、しつこい咳、急性喉頭炎、化膿性角膜炎および新生児（neonatorum）結膜炎を含む、他の何種類かの感染症にも関連している。

【0003】

モラクセラ・カタラハリス株のおよそ90%は抗生物質（ラクタマーゼ陽性）に耐性を有し、再発性中耳炎は高死亡率に結びついているから、宿主をM. カタラーリス感染から防御することができるワクチンの開発の必要性がある。M. カタラーリスによる感染は細菌細胞の表面において見出される抗原に対して免疫反応を引き起こす。しかし、これらの表面蛋白質の多くはいまだ特性解析されておらず、他の株による感染から防御する結果となる免疫反応もまた判っていない。

【0004】

M. カタラーリスの宿主への感染を予防するワクチンの開発するために、主に、偏在性表面タンパク質A（Us p A）という名の高分子・質量タンパクのような外膜タンパク質に主として努力がなされてきた。このタンパク質は、マウスの肺-クリアランスモデルにおいて、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の両方が殺菌及び防御作用を示したため、ワクチンとして有望視された。しかしながら、このタンパク質は、他のM. カタラーリスの株との間での変動性が非常に高かった。このタンパク質の他にも、別のM. カタラーリスタンパク質もワクチンの候補として関心を集めており、保存エピトープを有するトランスフェリン結合タンパクは、細菌表面に晒されているものであった。しかしながら、ある株から他の株への、同タンパク質による抗体交叉反応の程度には開きがあった。他の研究者もまた、45KDaのタンパク質CD（OMP CD）に焦点を当てていた。このタンパク質は、M. カタラーリスの株の中での保存性が非常に高いが、慢性閉塞性肺疾患の成人においては、このOMP CDに対する免疫反応には変動性が見られる。

【0005】

それ故に、モラクセラ（ブランハメラ）カタラーリス感染の予防、診断及び/又は治療に使用可能なM. カタラーリスポリペプチドの解明が、依然必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

一つの観点において、本発明は、配列番号2、4からなる配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次（second）ポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0007】

一つの観点において、本発明は、配列番号2、4なる配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに関する。

【0008】

他の観点においては、本発明のポリヌクレオチドにコードされたポリペプチド、薬剤組成物、発現制御部位を機能が発現するように連結した本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、及び前記ベクターを用いてトランスフェクトされた宿主細胞が提供され、また、前記宿主細胞を発現に適した条件下において培養する工程を含むポリペプチドの作成方法を提供する。

【0009】

本発明は、モラクセラ感染の予防、診断及び/又は治療に利用可能な、モラクセラのポリペプチドをコードする、精製および単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0010】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次（second）ポリペプチドと、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0011】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも80%の同一性を有

10

20

30

40

50

するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0012】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体からなる2次ポリペプチドと、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0013】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体からなる2次ポリペプチドと、少なくとも98%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0014】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4からなる2次ポリペプチドと、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0015】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0016】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0017】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも98%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0018】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドに関する。

【0019】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドに関する。

【0020】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体からなるアミノ酸配列により特徴づけられるポリペプチドに関する。

【0021】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4からなるアミノ酸配列により特徴づけられるポリペプチドに関する。

【0022】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0023】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0024】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープに関する。

【0025】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープに関する。

10

20

30

40

50

【0026】

一態様において、本発明は、下記のポリヌクレオチド：

(a) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

10

(d) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号1、3に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び

20

(h) 上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)又は(g)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、

から選択されたポリヌクレオチドからなる、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0027】

一態様において、本発明は、下記のポリヌクレオチド：

(a) 配列番号2又は4から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号2又は4から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2又は4から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

30

(d) 配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号1又は3から選択された配列からなるポリヌクレオチド、

(h) 上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)又は(g)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、

40

から選択されたポリヌクレオチドからなる、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0028】

一態様において、本発明は、下記のポリポリペプチド：

(a) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド、

(c) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド、

(d) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された

50

配列からなるポリペプチド、

(e) 配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチド、

(f) 配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープ、

(g) N末端のメチオニン残基が欠失した、上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)又は(f)のポリペプチド、

(h) 分泌アミノ酸配列が欠失した、上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)又は(f)に記載のポリペプチド、

から選択されたポリペプチドからなる、単離されたポリペプチドを提供する。

10

【0029】

一態様において、本発明は、下記のポリポリペプチド：

(a) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号 2 は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチド、

(c) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド、

(d) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチド、

20

(e) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチド、

(f) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープ、

(g) N末端のメチオニン残基が欠失した、上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)又は(f)に記載のポリペプチド、

(h) 分泌アミノ酸配列が欠失した、上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)又は(f)に記載のポリペプチド、

から選択されたポリペプチドからなる、単離されたポリペプチドを提供する。

30

【0030】

当業者であれば、本発明には、本特許出願において述べられた DNA 分子、すなわちポリヌクレオチド及びそれらの相補的な配列であって、突然変異体 (mutant) や、変異体 (variant) や、相同物や、それらポリペプチドの誘導体のような類似体をコードするものが含まれることが理解できよう。また、本発明には、本発明の DNA 分子に対応する RNA 分子も含まれる。DNA や RNA 分子以外にも、本発明には、対応するポリペプチドや、かかるポリペプチドに特異的に結合する単一特異性を有する抗体が含まれる。

【0031】

さらなる一態様において、本発明のポリペプチドは抗原性を示す。

【0032】

さらなる一態様において、本発明のポリペプチドは免疫原性を示す。

40

【0033】

さらなる一態様において、本発明のポリペプチドは、宿主内で免疫反応を引き起こすことができる。

【0034】

さらなる一態様において、本発明は、上記の本発明のポリペプチドに対して結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドにも関連する。

【0035】

“結合特異性を有する”抗体は、選択されたポリペプチドを認識して結合するけれども、サンプル、例えば生体サンプル内の他の分子を実質的に認識せず結合もしない抗体である。結合特異性は、固相酵素免疫検定法を用いて測定することができるが、それにおいては

50

、選択されたポリペプチドを抗原として使用する。

【0036】

本発明において、生物学の研究上の“予防”とは、生存曲線や、生存率や、生存期間の顕著な増加によって規定されるものである。生存曲線を比較するためのロジランクテスト(log rank test)や、生存率及び死亡までの日数を比較するためのフィッシャーの正確確率テスト(Fisher exact test)を用いた統計分析は、それぞれ、P値を算出して2グループ間に統計上の有意な相違があるかを判断するのに有用であろう。P値の0.05は、有意ではないとみなされる。

【0037】

本発明の他の観点においては、本発明のポリペプチドの抗原性/免疫原性を有する断片や、それらの類似体が提供される。 10

【0038】

本発明の断片は、かかる抗原決定部位(epitopic region)を1又はそれ以上含むか、あるいはそれらの抗原性/免疫原性特性を維持するのに十分な程、かかる部位に類似したものでなければならない。従って、本発明の断片は、本明細書に記載のポリペプチドや類似体の特定部位と100%の同一性を有するかもしれないので、本発明の断片に関しては、同一性の程度はおそらく無関係なものである。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列に由来する、少なくとも10の連続するアミノ酸残基を有する断片を提供する。一態様においては、少なくとも15の連続するアミノ酸残基である。一態様においては、少なくとも20の連続するアミノ酸残基である。 20

【0039】

当業者であれば、本発明において、本発明のポリペプチドの類似体が利用可能であること、すなわち抗原性/免疫原性を有する材料として利用可能であることが理解できよう。従って、本発明には、例えば付加、欠失、又は置換等を1又はそれ以上含むタンパク質やポリペプチドが含まれる。

【0040】

本明細書で用いる、本発明のポリペプチドの“断片”、“類似体”、又は“誘導體”には、アミノ酸残基の1又はそれ以上が、保存されるか又は保存されていないアミノ酸残基(好ましくは保存されたもの)で置換されたポリペプチドが含まれ、それらは天然のものかもしでないし又はそうでないかもしれない。一態様においては、本発明のポリペプチドの誘導體や類似体は、図面に表示の配列か又はそれらの断片と、約70%の同一性を有する。すなわち、残基の70%が同一である。他のさらなる態様では、ポリペプチドは80%以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様では、ポリペプチドは85%以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様では、ポリペプチドは90%以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様では、ポリペプチドは95%以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様においては、本発明のペプチド類似体の、約20個以下、より好ましくは10以下のアミノ酸残基が置換、修飾又は欠失されている。 30

【0041】

これら置換は、ペプチドの二次構造や疎水性度(hydrophobic nature)に最小限の影響しか与えないものである。好ましい置換は、保存されているとして従来から知られているもの、すなわち、疎水性、大きさ、電荷、又は官能基などの物理的又は化学的特性を共有する置換残基である。前記置換基には、デイホフ.Mが“Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978年)”中で記載した置換基、又はアルゴス.Pが“EMBO J.8. 第779-785頁、1989年)”中に記載した置換基などが含まれる。例えば、天然のものであろうが又はそうでなかろうが、下記グループ: 40

ala、pro、gly、gln、asn、ser、thr、val;

cys、ser、tyr、thr;

val、ile、leu、met、ala、phe;

lys、arg、orn、his; 及び、

phe、tyr、trp、his

の1つに属するアミノ酸は、保存的置換を代表するものである。好ましい置換基は、対応するL-アミノ酸のD-光学異性体の置換基も含む。

【0042】

異なるアプローチでは、類似体を、例えば効果的なタグを所望のポリペプチドに付けることによって、精製をより簡単にするための部分を組み込んだ融合ポリペプチドとすることができる。“タグ”は、取り除く必要があるかもしれないし、又は融合ポリペプチド自体が使用に十分な抗原性を維持する場合もあるかもしれない。

【0043】

相同性のパーセンテージは、同一性のパーセンテージと、類似性のパーセンテージ又はアミノ酸タイプの保存性の合計パーセンテージとして定める。 10

【0044】

一態様において、本発明のポリペプチドの類似体は、図面に記載の配列又はそれらの断片に対して、約70%の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは80%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは85%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは90%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは95%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは99%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、本発明のポリペプチドの類似体は、約20個以下、より好ましくは約10個以下のアミノ酸残基が置換、修飾又は欠失されている。 20

【0045】

アミノ酸配列を比較するためには、CLUTALプログラムのようなプログラムを用いることができる。このプログラムは、アミノ酸配列を比較して、必要に応じてどちらかの配列にスペースを挿入することにより、最適アラインメントを探し出すというものである。最適アラインメントについて、同一性や相同性を求めることもできる。BLASTxのようなプログラムは、類似配列を最も長くなるようにアラインし、適合値を定める。従って、それぞれ異なる値を有することが見付かったいくらかの類似する部位を比較することが可能となる。本発明では、両タイプの同一性分析の検討がなされている。

【0046】

異なるアプローチでは、類似体又は誘導体は、例えば所望のタンパク質又はポリペプチドに効果的にタグを付けることによって、精製をより簡単にするための部分を組み込んだ融合ポリペプチドとすることができる。“タグ”は、取り除く必要があるかもしれないし、又は融合ポリペプチドが使用に十分な抗原性を維持する場合があるかもしれない。 30

【0047】

抗原決定部位、すなわちポリペプチドの抗原性又は免疫原性を担う抗原決定部位を特定して抗原性ポリペプチドを選別できることは既知である。かかる選別を行なう方法は、従来から知られている。従って、本発明の断片は、かかる抗原決定部位を1又はそれ以上含むか、又はそれらの抗原性/免疫原性特性を維持できる程十分にかかる部位に類似していなければならない。

【0048】

更なる本発明の観点において、本発明の蛋白質又はポリペプチドの抗原性/免疫原性断片、又はその類似体若しくは誘導体を提供するものである。 40

【0049】

従って、類似体、誘導体、及び断片としては、それらが、少なくともそれらの誘導前のタンパク質又はポリペプチドの抗原性/免疫原性特性をある程度有することが重要である。

【0050】

また、ポリペプチドの生物学上又は薬学上の特性を変える他の化合物、すなわち半減期を長期化するポリエチレングリコール(PEG)、精製を簡略化するリーダー又は分泌アミノ酸配列、プレプロ及びプロ配列、及び(ポリ)サッカリドと融合されたポリペプチドも含まれる。 50

【0051】

さらに、アミノ酸部位が多型性であると分かっている場合には、特定のアミノ酸1又はそれ以上を変えて、異なるモラクセラ株の異なるエピトープに、より効果的に似せるようにすることが望ましい。

【0052】

さらに、本発明のポリペプチドは、末端のNH₂基のアシル化により（例えば、アンモニウム又はメチルアミンを用いた、アセチル化、又はチオグリコール酸アミド化、末端カルボキシル基のアミド化により）修飾して、安定性を与え、かつ、担体や他の分子への結合又は連結に関する疎水性を高めることができる。

【0053】

また、ポリペプチドの断片及び類似体の、ヘテロ及びホモポリペプチドマルチマーについても検討する。これらのポリマー型のものには、例えば、アビジン/ビオチン、グルタルアルデヒド、又はジメチルスーパージミテイットなどの架橋剤によって架橋された、1又はそれ以上のポリペプチドが含まれる。それらポリマー型のものには、組換えDNA技術によって生み出された、マルチシストロニック（multicistronic）mRNAから生成された2つ又はそれ以上の直列（tandem）又は反転した（inverted）隣接配列を含むポリペプチドも含まれる。

【0054】

さらなる一態様において、本発明は、本願の図面に記載のポリペプチド、又はそれらの断片が若しくは類似体を1又はそれ以上含むキメラポリペプチドにも関連する。

【0055】

さらなる一態様において、本発明は、配列番号2、4に示す配列、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列を有するポリペプチドを2又はそれ以上含み、キメラポリペプチドを形成するように該ポリペプチドを連結して提供された、キメラポリペプチドにも関連する。

【0056】

さらなる一態様において、本発明は、配列番号2又は4に示す配列から選択された配列からなるポリペプチドを2又はそれ以上含み、キメラポリペプチドを形成するように該ポリペプチドを連結して提供された、キメラポリペプチドにも関連する。

【0057】

好ましくは、本発明のポリペプチドの断片、類似体、又は誘導体は、抗原部位を少なくとも一つ、すなわち少なくとも1つのエピトープを含むであろう。

【0058】

抗原性ポリマー（すなわち合成マルチマー）の形成を完成させるために、ポリペプチドには、ビスハロアセチル基を有するものか、又はニトロアシルハロゲン化物等を用いることができるが、ここで試薬は、チオ基に対して特異性を有するものである。従って、異なるポリペプチドの2つのメルカプト基間の連結は1重結合であるかもしれないし、又は炭素数が少なくとも2、典型的には炭素数が少なくとも4、そして炭素数が多くても16の結合基から成るものであるかもしれないけれども、通常炭素数は14以下である。

【0059】

ある特定の態様においては、本発明のポリペプチド断片及び類似体は、メチオニン（Met）やバリン（Val）のような開始残基を含まない。好ましくは、ポリペプチドは、リーダー又は分泌配列（シグナル配列）を組み込まないものである。本発明のポリペプチドのシグナル部分は、確立された分子生物学技術に従い、判断することができる。通常は、興味のあるポリペプチドをモラクセラ培養物から単離して、続いて配列決定を行ない、成熟タンパク質の最初の残基を決定し、それによって成熟ポリペプチドの配列を決定する。

【0060】

ポリペプチドは、組換えポリペプチドの生成や精製を助ける開始コドン（メチオニン又はバリン）を用いずに及び/又はリーダーペプチドを用いずに、生成及び/又は使用できることが分かっている。リーダーペプチドをコードする配列を有さないクローニング遺伝子

10

20

30

40

50

は、ポリペプチドを大腸菌の細胞質に限定し、その回収を促すことが分かっている（グリック，G.R.及びパスタ・ナック，J.J.の“ Manipulation of gene expression in prokaryotes ”（1998年）、ワシントンDC、ASMプレスの“ Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinantDNA ”（第2版、第109 - 143頁））。

【0061】

本発明の他の観点によれば、(i)本発明のポリペプチドを担体、希釈剤、又はアジュバントと共に含む組成物、(ii)本発明のポリペプチドと、薬学的に受容可能な担体、希釈剤、又はアジュバントを含む薬剤組成物、(iii)本発明のポリペプチドと、薬学的に受容可能な担体、希釈剤、又はアジュバントを含むワクチン、(iv)宿主に本発明のポリペプチドを免疫反応の惹起に有効な量投与することにより、宿主においてモラクセラに対する免疫反応（例えばモラクセラに対する感染防御免疫）を誘発する方法、及び、特に(v) 予防又は治療量の本発明のポリペプチドを、必要とする宿主に投与することにより、モラクセラ感染を予防及び/又は治療する方法も提供する。

10

【0062】

本発明の他の観点によれば、(i)本発明のポリヌクレオチドを担体、希釈剤、又はアジュバントと共に含む組成物、(ii)本発明のポリヌクレオチドと、薬学的に受容可能な担体、希釈剤、又はアジュバントを含む薬剤組成物、(iii)宿主に本発明のポリヌクレオチドを免疫反応の惹起に有効な量投与することにより、宿主においてモラクセラに対する免疫反応（例えばモラクセラに対する感染防御免疫）を誘発する方法、及び、特に(iv) 予防又は治療量の本発明のポリヌクレオチドを、必要とする宿主に投与することにより、モラクセラ感染を予防及び/又は治療する方法も提供する。

20

【0063】

本発明のポリペプチドは、免疫化の前に、テタナス毒素、ジフテリア毒素、B型肝炎ウィルス表面抗原、ポリオウィルスVP1抗原や、他のウィルス性か細菌性の毒素、抗原、又は、任意の適当なタンパク質のような運搬体タンパク質に結合又は共役させて、より強い免疫反応を促すこともできる。この結合又は共役は、化学的に又は遺伝子学的に行なうことができる。ペプチド-担体の共役は、ヴァン・レゲンモートル，M．H．V．、ピリアンド J．P．、ミューラー S．、プラウエ S による生化学及び分子生物学の実験技術の“ Synthetic Polypeptides as antigens ”第19巻（1998年、ニューヨーク、エルゼビアのバードウ R．H．及びヴァン・ニッペンベルグ P．H．出版）でより詳細な説明を得ることができる。

30

【0064】

他の観点によれば、薬学的に受容可能なアジュバントの混合物中に、本発明のモラクセラポリペプチドを1又はそれ以上含む薬剤組成物が提供されている。適当なアジュバントは、(1)MF59（登録商標）、SAF（登録商標）、Rib i（登録商標）のような水中油エマルジョン形成物、(2)フロインドの完全な又は不完全なアジュバント、(3) $AlK(SO_4)_2$ 、 $AlNa(SO_4)_2$ 、 $AlNH_4(SO_4)_2$ 、 $Al(OH)_3$ 、 $AlPO_4$ 、シリカ、カオリン等の塩、(4)ステイミュロン（登録商標）のようなサポニン誘導體、又はそれらから生成されたISCOMsのような粒子（免疫刺激性複合体）、(5)インターロイキン、インターフェロン、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、腫瘍壊死因子（TNF）のようなサイトカイン、(6)カーボンポリヌクレオチドのような他の物質、すなわちポリICやポリAU、解毒コレラ毒素（CTB）と、大腸菌の粘膜免疫の誘発のための熱不安定性毒素を含むものである。アジュバントのより詳細な説明は、M.Z.Iカーン等による総説“ Pharmaceutical Research ”第11巻、第1号（1994年）の第2 - 11頁や、グプタ等による他の総説“ Vaccine ”第13巻、第14号の第1263 - 1276頁（1995年）や、W099/24578で得ることができる。好ましいアジュバントは、QuilA（登録商標）、QS21（登録商標）、Alhydrogel（登録商標）及びAdjuphos（登録商標）を含むものである。

40

【0065】

本発明の薬剤組成物は、注射、急速輸液、鼻咽吸込、皮膚吸込により非経口で投与されるか、又は舌下錠又は経口で投与される。

50

【0066】

「薬剤組成物」という用語は抗体を含む意味である。本発明によれば、モラクセラ感染により仲介されたモラクセラ感染及び/又は疾病と症状の治療又は予防のために、本発明のポリペプチドに対して結合特異性を有する一つ又はそれ以上の抗体を使用する方法もまた提供される。

【0067】

本発明の薬剤組成物は、P.R.ムライ(編集長)、E.J.パロン、M.A.ファレー、F.C.テノヴァー及びR.H.ヨルケンの“Manual of Clinical Microbiology”(ASMプレス、ワシントンD.C.)第7版(1999年)の第1773頁に記載のように、モラクセラ感染の予防及び/又はモラクセラ感染により生じた疾病及び症状に対して用いられる。一態様においては、本発明の薬剤組成物は、中耳炎、副鼻腔炎、慢性咳、急性喉頭炎、化膿性角膜炎、新生児の結膜炎及び侵襲的な疾患の治療又は予防に用いられ、宿主に本発明の組成物を予防又は治療量を投与することよりなる。一態様においては、本発明のワクチンの組成物は、モラクセラ感染の治療又は予防及び/又はモラクセラ感染により生じた疾病及び症状に対して用いられる。さらなる態様においては、モラクセラ感染はモラクセラカタラーリスである。

10

【0068】

更なる態様において、本発明はモラクセラ感染に対して感受性を有する宿主において、モラクセラ感染の予防又は治療処理をする方法を提供するものであり、その方法は宿主に本発明の組成物の予防又は治療量を投与することからなる。

【0069】

本出願において使用された様に、「宿主」という用語には哺乳動物が含まれる。更なる態様において、哺乳動物はヒトである。更なる態様において、ヒトは新生児、幼児又は子供である。更なる態様において、ヒトは大人である。

20

【0070】

ある特定の態様において、薬剤の組成物は、幼児、高齢者、及び免疫不全宿主のような、モラクセラ感染の危険性のある宿主に投与される。

【0071】

薬剤組成物は、好ましくは約0.001~100 µg/kg(抗原/体重)、より好ましくは、0.01~10 µg/kg、最も好ましくは0.1~1 µg/kgの投薬形態を単位として、免疫化の間に約1~6週間の間隔をおいて1~3回投与する。

30

【0072】

薬剤組成物は、好ましくは約0.1 µg~10 mg、より好ましくは1 µg~1 mg、最も好ましくは10~100 µgを投与形態の単位として、免疫化の間に約1~6週間の間隔をおいて1~3回投与する。

【0073】

別の観点においては、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるアミノ酸配列により特徴付けられたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。

【0074】

一態様において、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレーム(ORF)を含む、配列番号第1、3に記載のものである。

40

【0075】

図中に示されたポリヌクレオチド配列は、縮重コドンで変化を受けるかもしれないけれども、それでもなお、本発明のポリペプチドをコードする、ということが理解できるであろう。従って、本発明はさらに、上記のポリヌクレオチド配列(又は、それらの相補配列)とハイブリダイズするポリヌクレオチドにおいて、配列間の同一性が70%であるものを提供する。一態様では、配列間の同一性は少なくとも80%である。一態様では、配列間の同一性は少なくとも85%である。一態様では、配列間の同一性は少なくとも90%である。さらなる一態様では、ポリヌクレオチドは、厳しい条件下でハイブリダイズし、すなわち少なくとも95%の同一性を有する。さらなる一態様では、同一性は97%以上で

50

ある。

【0076】

ハイブリダイゼーションにとって最適の厳しい条件は、当業者であれば直ちに分かる（例えば、サンプローク等（Sambrook et al.）の“Molecular cloning：A Laboratory Manual”第2版（1989年）：ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー；、ニューヨーク、ジョン・ Wiley & Sons出版、ニューヨーク、オースベルF.M.等編（Ausubel F.M. et al., John Wiley & Sons, Inc. N.Y.）“Current protocols in Molecular Biology”（1999年）を参照）。

【0077】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、下記のポリヌクレオチド： 10
 (a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は
 (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖
 (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2、4に示す配列、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択されたものである)のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0078】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、下記のポリヌクレオチド：
 (a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は
 (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖
 (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2又は4から選択された配列からなるものである)のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。 20

【0079】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、下記のポリヌクレオチド：
 (a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は
 (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖
 (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2、4に記載の配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択されたポリペプチドに由来する、少なくとも10の連続するアミノ酸残基をからなるものである)のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0080】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、下記のポリヌクレオチド：
 (a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は
 (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖
 (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2又は4から選択されたポリペプチドに由来する、少なくとも10の連続するアミノ酸残基をからなるものである)のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。 30

【0081】

さらなる一態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号2、4に記載の本発明のポリペプチドをコードするものである。

【0082】

さらなる一態様において、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする、配列番号1、3に記載のものである。 40

【0083】

当業者であれば直ちに分かるように、ポリヌクレオチドにはDNAとRNAの両方が含まれる。

【0084】

本発明には、本願に記載のポリポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドも含まれる。

【0085】

他の観点においては、宿主内で該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現させて、その発現ポリペプチド生成物を回収することによる、組換え技術を用いた本発明のポ 50

リペプチドの生成方法が提供されている。別の方法としては、ポリペプチドは、確立された合成化学技術に基づいて、すなわち液相合成法又は固相合成法により、連結させて全ポリペプチドを生成する（ブロック・ライゲーション）ことにより、生成することができる。

【0086】

ポリヌクレオチド及びポリペプチドを入手及び鑑定するための通常の方法は、以下の参考文献：サンプローク等の“Molecular Cloning :A Laboratory Manual”第2版（1989年）、ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー；ニューヨーク、ジョン・ウィレイ&ソンス社、ニューヨーク、オースベルF.M.等編の“Current Protocol in Molecular Biology”；ニュージョージー、トトワ、ヒューマンプレス、ホワイト B . A . 出版の“PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering”（1997年）の490頁；ニューヨーク、シュプリンガー、スコープス R . K . (Scopes R.K.) 出版の“Protein Purification, Principles and Practices”第3版（1993年）の380頁；ニューヨーク、ジョン・ウィレイ&ソンス社出版、Coligan J.E等編の“Current Protocol in Immunology”に記載されたとおりである。

10

【0087】

本発明は本発明のポリヌクレオチドを含むベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

本発明は、前記ポリペプチドの発現に適した条件下において、本発明の宿主細胞を培養する工程を含む、ポリペプチドの生成方法を提供する。

20

【0088】

組換え体の生成においては、本発明のポリペプチドをコードするベクターを用いて宿主をトランスフェクトし、その後、プロモーターの活性化か、形質転換細胞の選択か、又は遺伝子の増殖に適するように改変した栄養培養液中で培養する。適したベクターは、選択された宿主内で生存と複製が可能なものであり、かつ染色体性、非染色体性、及び合成DNA配列を含み、例えば、細菌性プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、イースト菌プラスミド、プラスミドとファージDNAの組み合わせから生成したベクターなどがある。ポリペプチド配列を、制限酵素を用いてベクターの適切な部位に組込むことが可能であり、該ポリペプチドはプロモーター、リボソーム結合部位（共通部位又はシャイン・ダルガルノ配列）と、必要に応じてオペレーター（制御要素）からなる発現制御部位と機能が作動するように連結されている。所定の宿主とベクターに適した発現制御部位の個々の構成成分は、確立された分子生物学の原理（サンプローク等の“Molecular Cloning :A Laboratory Manual”第2版（1989年）、ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー；ニューヨーク、ジョン・ウィレイ&ソンス社、ニューヨーク、オースベルF.M.等編の“Current Protocol in Molecular Biology”）に従い、選択することができる。適したプロモーターは、LTR又はSV40プロモーターと、大腸菌ラクトースと、tac又はtrpプロモーターと、ファージラムダP_Lプロモーターとを含むものであるが、それらに制限されない。ベクターは、好ましくは選択マーカー、すなわちアンピシリン抵抗性遺伝子だけでなく、複製起点も組込んだものである。適した細菌性ベクターは、pET、pQE70、pQE60、pQE-9、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、pt rc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT5、と真核ベクターpBlueBacIII、pWLNE0、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVLを含むものである。宿主は細菌性のもの、すなわち大腸菌、枯草菌、ストレプトミセス；カビ、すなわちアスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニダランス；酵母菌、すなわちサッカロミセス；又は真核性のもの、すなわちCHO、COSとすることができる。

30

40

【0089】

培養液中にポリペプチドが発現すれば、細胞を通常遠心分離で回収し、その後（発現したポリペプチドが媒体中に分泌されていなければ）物理的又は化学的手法を用いて破碎し、その結果生じた粗抽出物を保持して興味の対象であるポリペプチドを単離する。培養液又は溶解液からのポリペプチドの精製は、ポリペプチドの特性に応じて確立された技術を用

50

い、すなわち硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロース・クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィー、及びレクチン・クロマトグラフィーを用いて行なうことができる。最終精製は、HPLCを用いて行なうことができる。

【0090】

ポリペプチドは、リーダー又は分泌配列の有無にかかわらず発現することができる。前者の場合においては、リーダーは翻訳後プロセッシングを用いて取り除く（米国第4,431,739号、同第4,425,437号、及び同第4,338,397号）か、又は発現したポリペプチドの精製後に化学的に取り除く。

【0091】

さらなる観点によれば、本発明のモラクセラポリペプチドは、モラクセラ感染、詳細にはモラクセラ感染の診断検査に使用することができる。

10

【0092】

いくつかの診断方法が可能であるが、例えば、生体サンプルにおけるモラクセラ菌の検査において、又はモラクセラに感受性を有する宿主におけるモラクセラ感染の診断において、下記工程：

a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

b) 本発明のモラクセラポリペプチドに反応性を示す抗体又はその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び

c) モラクセラの存在を示す混合物中で、特異的に結合した抗体又は結合した断片を検出する工程

20

に従った方法がある。

【0093】

その他には、モラクセラ抗原に特異的な抗体を含むか、又は含むと思われる生体サンプル内における、前記抗体の検出方法は、下記工程：

a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

b) 本発明のモラクセラポリペプチドの1又はそれ以上、あるいはその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び

c) モラクセラに特異的な抗体の存在を示す混合物中で、特異的に結合した抗原又は結合した断片を検出する工程、

30

に従い実施することができる。

【0094】

当業者であれば、この診断検査には、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、放射免疫測定法、又はラテックス凝集反応法のような免疫検査を含む、本質的にはそのタンパク質に特異的な抗体が生物中に存在するか否かを調べるための、様々な方法があると分かるであろう。

【0095】

本発明のポリペプチドをコードするDNA配列は、モラクセラを含むと思われる生体サンプル中の、同菌の存在有無の検出に用いるDNAプローブの設計にも用いることができる。本発明の検出法は、下記工程：

40

a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

b) 本発明のポリペプチドをコードするDNA配列を有するDNAプローブの1又はそれ以上、又はその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び

c) モラクセラ菌の存在を示す混合物中で、特異的に結合したDNAプローブを検出する工程、を含む。

【0096】

本発明のDNAプローブも、例えばポリメラーゼ連鎖反応を用いた、循環モラクセラ、すなわちサンプル中のモラクセラ核酸の検出に、モラクセラ感染の診断方法として用いることができる。そのプローブは、従来技術を用いて合成することができ、固相に固定するか、又は検出可能なラベルを付すことができる。本願の好ましいDNAプローブは、本発明のモ

50

ラクセラペプチドの少なくとも約6個の連続するヌクレオチドに相補的な配列からなるオリゴマーである。更なる態様において好適なDNAプローブは、本発明のモラクセラペプチドの少なくとも約15個の連続するヌクレオチドに相補的な配列からなるオリゴマーである。更なる態様において好適なDNAプローブは、本発明のモラクセラペプチドの少なくとも約30個の連続するヌクレオチドに相補的な配列からなるオリゴマーである。更なる態様において好適なDNAプローブは、本発明のモラクセラペプチドの少なくとも約50個の連続するヌクレオチドに相補的な配列からなるオリゴマーである。

【0097】

宿主中のモラクセラを検出する他の診断方法は、下記工程：

- a) 本発明のポリペプチド又はその断片に反応性を示す抗体に検出可能なラベルを付す工程、
 - b) ラベルを付した抗体又はラベルを付した断片を宿主に投与する工程、及び
 - c) モラクセラの存在を示す宿主中で、特異的に結合したラベルを付した抗体またはラベルを付した断片を検出する工程：
- を含む。

【0098】

本発明のさらなる観点は、モラクセラ感染の診断と、特にはその治療に特有の抗体の生成に用いる免疫原として、本発明のモラクセラポリペプチドを使用する方法である。適当な抗体は、適切なスクリーニング法を用いて、例えば試験モデル内においてモラクセラ感染を受動的に防御するある特定の抗体の能力を測ることにより、測定することができる。動物モデルの一例は、本明細書の実施例に記載のマウスモデルである。前記抗体は、完全な抗体であるか、又は抗原に結合性のある断片でもよく、かつ任意の免疫グロブリンのクラスに属するものとすることができる。前記抗体又は断片は、動物由来のものとすることができ、詳細には、哺乳動物のもの、より詳細には、マウス、ラット、又はヒトのものとすることができる。天然の抗体やその断片とすることもでき、あるいは必要に応じて、組換え抗体や抗体の断片とすることもできる。組換え抗体や抗体の断片という用語は、分子生物学の技術を用いて生成された抗体又は抗体の断片を意味する。前記抗体又は抗体の断片は、ポリクローナルか、又は好ましくはモノクローナルのものとすることができる。それは、モラクセラポリペプチドと結合した多数のエピト - プに特有のものでもよいが、好ましくは、1つのものに特有のものとすることができる。

【0099】

一観点において、本発明は、モラクセラ感染の予防及び/又は治療に用いる抗体の使用方法を提供している。

【0100】

更なる観点において、本発明は、モラクセラ感染に感受性を有する宿主におけるモラクセラ感染の予防又は治療の処理の方法を提供するものであり、その方法は予防量又治療量のモラクセラの本発明の薬剤組成物を宿主に投与することからなる。

【0101】

更なる観点において、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又はその断片、類似体あるいは誘導体を、DNA免疫化法に使用することができる。それは、注入することによってそれらを複製及び発現可能なベクターに導入し、それによってインピボで抗原性ポリペプチドを製造することができる。例えばポリヌクレオチドを、真核細胞中で機能するCMVプロモーターの制御下でプラスミドベクター中に導入することができる。好ましくはベクターを筋肉注射する。

【0102】

本発明のさらなる観点は、本発明のポリペプチドに対する抗体を、受動免疫のために用いる使用方法であり、そのために本発明のポリペプチドによって誘導された抗体は宿主に、受動免疫を与えるのに十分な量で投与される。人は本出願において述べられた抗体を使用することができるであろう。適切なスクリーニング方法を用いて適切な抗体を決定ことができ、その一例として、試験モデルにおいて特定の抗体がモラクセラ感染を受動的に

防御する能力を測定することができる。動物モデルの一例は、この中で述べられたマウスのモデルである。その抗体は全抗体あるいはその抗原結合断片であってもよく、如何なる免疫グロブリンクラスに属しても良い。その抗体又は断片は動物由来であってもよく、特異的には哺乳動物由来、更に特異的にはマウス、ラット又はヒト由来であってもよい。それは天然の抗体又はその断片であってもよく、望むならば、組み換え抗体又は抗体断片であってもよい。組み換え抗体又は抗体断片という用語は、分子生物学の技術を用いて製造された抗体又は抗体断片を意味するものである。その抗体又は抗体断片はポリクローナルであり、又は好ましくはモノクローナルである。それはモラクセラペプチドに関連した多くのエピトープに特異的であっても良いが、好ましくは一つに対して特異的である。

【0103】

遺伝的な免疫法における本発明のポリヌクレオチドの使用には、好ましくは適切な送達方法又はシステムが採用され、その例には、筋肉へのプラスミドDNAの直接注射 [フォルファ、H M G (1992) 1: 363; ターネスら、ワクチン (1999), 17: 2089; レーら、ワクチン (2000), 18: 1893; アルベスら、ワクチン (2001), 19: 788]、アジュバントあり又はなしでのプラスミドDNA注射 [ウルマーら、ワクチン (1999), 18: 18; マックローグリンら、ジャーナル・オブ・コントロールリリース, (1998) 56: 259; ハルティッカーら、ジェーンセラピー (2000) 7: 1171-82; ベンベニスティー及びレシェフ、PNAS USA (1986) 83: 9551; シングら、PNAS USA (2000) 97: 811]、特異的な担体と複合したDNAを送ることによる細胞の標的化 [ワら、ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー (1989) 24 6: 16985; チャピンら、Infect.Immun. (1999) 67: 6434]、種々の形のリポソームに複
20
合化された又はカプセルに包まれたプラスミドの注射 [イシイら、エイズリサーチ・アンド・ヒューマンレトロウイルス (1997) 13:142; ペリエら、ワクチン (2001), 19: 3301]、種々のポンパートメント法によるDNAの投与 [タンら、ネーチャー (1992) 356: 152; エイセンブラウンら., DAN Cell Biol (1993) 12: 791; チェンら、ワクチン (2001), 1 9: 2908]、生きている (lived) ベクターによるDNA投与 [チュブレカスら、ジェーン (1 997) 190: 191; プシヨコら、パイロロジー (1997) 23*: 389; スプレングら、FEMS (200 0) 27: 299; ディエトリッチら、ワクチン (2001), 19: 2506] がある。

【0104】

一つの観点によると、本発明は、モラクセラ感染の予防及び/又は治療のための抗体の使用
30
方法を提供する。

【0105】

さらなる態様において、本発明は、モラクセラ感染の予防又は治療用の薬剤の製造におけ
る、本発明の薬剤組成物の使用方法を提供する。

【0106】

さらなる態様において、本発明は、本発明のポリペプチドを含む、モラクセラ感染の検出
又は診断用のキットを提供している。

【0107】

別段の定義がない限り、本明細書で使用する技術又は科学用語の全ては、本発明が属する
分野における当業者に通常理解されているものと同様の意味を有する。ここに記載の出版
物、特許出願、特許、及びその他のここで言及された参考文献の全ては、参考文献として
40
そのまま盛りこまれる。紛争の際には、定義も含めて本明細書が支配をする。さらに、材
料や方法や実施例は解説を行なうのみであり、それに制限されるものではない。

【実施例1】

【0108】

S M C - 1 遺伝子とそれに対応するポリペプチドのクローニング及び分子特性を、以下実
施例で説明する。

【0109】

M. カタラーリス S M C - 1 (配列番号: 1) 遺伝子のコード領域を、P C R (カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社のDNA熱サイクル遺伝子増幅P C Rシステム2
4 0 0を使用)により、M. カタラーリス株のE T S U C - 2のゲノムDNAから増幅
50

し、そのPCRにあたって、制限部位 N c o I (CCATGG) 及び X h o I (CTCGAG) 付加のための伸張した塩基を含む下記オリゴ: R I O S 3 0 (5'- TATGTACCATGGCTGAACTCAATACCAGC CGTTCA -3') および R I O S 3 1 (5'- GGCATGCTCGAGGTAATCATGTCTCCAAGCATTG -3') を用いた。P C R 産物を、QIAgen社のQIAquickゲル抽出キットを用いて、その製品使用説明書(カリフォルニア、チャッツワース)に従って、アガロースゲルから精製し、NcoI及びXhoI(カナダ、ペー・ドゥルフェ、アマシャム ファルマシア バイオテク社)により消化した。pET21b(+)ベクター(ウィスコンシン州、マディソン、ノヴァゲン)をNcoI及びXhoIにより消化し、QIAquickゲル抽出キットを用いて、アガロースゲルから精製した。NdeI - XhoI PCR産物を、NcoI - XhoI pET21b(+)発現ベクターに連結させた。その連結した産物により、シマニス(Simianis)(Hanahan.Dによる“DNAクローニング”(1985年)、D.M. グローバー出版、第109 - 135頁)の方法に従い、大腸菌DH5 [80dlacZ M15 (lacZYA -argF)U169 endA1 racA1 hsdR17 (r_k-m_k+)deoR thi-1 supE44 `gyrA96 relA1](メリーランド州、ゲーサーズバーグ、ギブコBRL)を形質転換した。SMC-1遺伝子を含む組換えpET21d(+)プラスミド(rpET21d(+))からQIAgenキット(カリフォルニア、チャッツワース)を用いて精製し、DNA挿入物の配列決定を行なった(カリフォルニア、フォスター シティ、エー・ビー・アイ、タック・ダイ・デオキシターミネ - ター配列キット)。

10

【 0 1 1 0 】

【 表 1 】

M. カタラーリス遺伝子のPCR増幅法に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

遺伝子	プライマー I.D.	制限部位	ベクター	配列 (SEQ ID No)
SMC-1	RIOS30	<i>Nco</i> I	pET21d (-)	5'- TATGTACCATGGCTGAACT CAATACCAGCCGTTCA -3' (SEQ ID No :5)
SMC-1	RIOS31	<i>Xho</i> I	pET21d (+)	5'-GGCATGCTCGAGGTAA TCATGTCTCCAAGCATTTT G-3' (SEQ ID No :6)
SMC-1	RIOS187	<i>Bgl</i> II	pCMV-GH	5'-GGCAGATCTTGGAACT CAATACCAGCCGTTTC-3' (SEQ ID No :7)
SMC-1	RIOS188	<i>Sal</i> I	pCMV-GH	5'-ACCGGTCGACTTAGTA ATCATGTCTCCAAGCAT-3 ' (SEQ ID No :8)
SMC-2	RIOS20	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5'-CGTACCAGCACATATG AATAAACAAAACGCCAATC AA-3' (SEQ ID No :9)
SMC-2	RIOS21	<i>Xho</i> I	pET21b (+)	5'-GCCCATCTCGAGTTGC GATTCTGTCTCTGCC-3' (SEQ ID No : 10)
SMC-2	RIOS189	<i>Bam</i> HI	pCMV-GH	5'-CGAGGATCCTAATAAAA CAAAACGCCAATCAAAC-3 ' (SEQ ID No : 11)
SMC-2	RIOS190	<i>Hind</i> III	pCMV-GH	5'-CAGAAGCTTTTATTGC GATTCTGTCTCTGCC-3' (SEQ ID No : 12)

10

20

30

【0111】

SMC-1のポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレーム (ORF) は2781bpを
含み、6.31の予測pIと104054.84Daの予測分子量を有するアミノ酸残基926個のポリペプチ
ドをコードすることが分かった。スプキャン・ソフトウェア (ウィスコンシン配列分析パ
ッケージ; ジェネティクス・コンピューター・グループ) を用いた予測アミノ酸残基配
列 (配列番号: 2) の分析では、35個のアミノ酸残基のシグナルペプチド (MHTAHHRSKTYL
TTAIRYALFGIASLPFVIPTYA) の存在が示されたが、それは、アラニンとグルタミン残基との
間に位置する開裂部位を末端としていた。

40

【0112】

PCR増幅法によりSMC-1 (配列番号: 1) 遺伝子の存在を確認するために、次の3種の
別個のM. カタラーリス株: イースト・テネシー州立大学から提供されたM. カタラーリス
ETSU C-2と、ETSU T-25と、ETSU 658の臨床単離株; ラバル大学病院本部感染病研究セン

50

ターから提供されたM.カタラーリス株M-12を用いた。これらの実験には、負のコントロールとして、大腸菌XL1 - Blue MRF'を用いた。PCR(カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社のDNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステム2400)により、オリゴヌクレオチド・プライマーR I O S 3 0及びR I O S 3 1(表1)を用いて、SMC-1(配列番号:1)遺伝子を、前記3種のM.カタラーリス株のゲノムDNAと、コントロールの大腸菌株から増幅させた。PCRは、94で15秒間と、47で30秒間と、68で3分のサイクルを5回と、続いて94で15秒間と、63で30秒間と、68で3分のサイクルを30回と、最終伸長期間を68で5分間で行なった。PCR産物は、1%アガロースゲル中でサイズ分別し、エチジウムブロマイド染色で視覚化した。これらPCR増幅の結果は、表2に示すとおりである。増幅産物の分析から、テストした3種のM.カタラーリス株の全てのゲノム中に、SMC-1(配列番号:1)遺伝子が存在することが明らかになった。コントロールである大腸菌DNAに、前記オリゴヌクレオチド・プライマーを用いた同様のPCR増幅法を行なっても、そのような産物は検出されなかった。

10

【0113】

【表2】

PCR増幅法によるM.カタラーリス遺伝子の同定

株の同定	PCR増幅による同定	
	SMC-1	SMC-2
ETSU C-2	+	+
ETSU 658	+	+
ETSU T-25	+	+

20

【実施例2】

【0114】

SMC-2遺伝子とそれに対応するポリペプチドのクローニング及び分子特性を、以下実施例で説明する。

【0115】

M.カタラーリスのSMC-2(配列番号:3)遺伝子のコード領域を、PCR(カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社のDNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステム2400を使用)により、M.カタラーリス株ETSU C-2のゲノムDNAから増幅し、そのPCRにあたって、制限部位NdeI(CATATG)及びXhoI(CTCGAG)付加のために伸張した塩基を含む下記オリゴ:表1に記載のR I O S 2 0及びR I O S 2 1を用いた。発現ベクターへのSMC-2遺伝子のクローニングとその解読には、実施例1に記載のものと同様の方法を用いた。

30

【0116】

SMC-2のポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレーム(ORF)は957bpを含み、5.78の予想pIと35954.10Daの予想分子量を有するアミノ酸残基318個のポリペプチドをコードすることが分かった。スプキャン・ソフトウェア(ウイスコンシン配列分析パッケージ;ジェネティクス・コンピューター・グループ)を用いた予想アミノ酸残基配列(配列番号:4)の分析では、47個のアミノ酸残基のシグナルペプチド(VGKIMSKIPMMNEKYFRRQALYWLIAAAIMAGLWLIVWLTSSVPAMI)の存在が示されたが、それは、イソロイシンとアスパラギン残基との間にある開裂部位を末端としていた。

40

【0117】

試験した3種のM.カタラーリス株(表2)について、オリゴヌクレオチド・プライマーR I O S 2 0とR I O S 2 1を用いてPCR増幅を行なったところ、SMC-2遺伝子の存在が示された。SMC-2遺伝子のPCR増幅には、実施例1に記載の方法と同様の方法を用いた。これらオリゴヌクレオチド・プライマーを用いた同様のPCR増幅を、コントロール大腸菌DNAについて行なったが、上記のような産物は検出されなかった。

50

【実施例 3】

【0118】

CMVプラスミドpCMV-GHにおけるM.カタラーリス遺伝子のクローニングを、以下実施例で説明する。

【0119】

M.カタラーリスポリペプチドのDNAコード領域を、プラスミドベクターpCMV-GH中のサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター転写調節下にあるヒト成長ホルモン(hGH)遺伝子の下流相に挿入した(タング等の“Nature”(1992年)356:152)。CMVプロモーターは、大腸菌細胞内では機能しないプラスミドであるけれども、真核細胞へのプラスミド投与により活性化する。前記ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子も組込んだものとした。

10

【0120】

SMC-1(配列番号:1)とSMC-2(配列番号:3)の、リーダーペプチド部位を有さないコード領域を、PCR法(カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社、DNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステム2400)によりM.カタラーリス株のETSU C-2のゲノムDNAから増幅し、そのPCRにあたって、表1に記載の制限部位BamHI(GGATCC)及びBgIII(AGATCT)、Sall(GTCGAC)、又はHindIII(AAGCTT)付加のための伸張した塩基を含むオリゴヌクレオチド・プライマーを用いた。PCR産物は、QIAGEN社のQIAquickゲル抽出キットを用いてアガロースゲルから精製し、制限酵素(アマシャムファルマシアバイオテク社)により消化した。pCMV-GHベクター(テキサス州、ダラス、テキサス大学、生化学部、ステファン・A・ジョンストン博士研究室)をBamHI、BgIII、Sall、又はHindIIIにより消化し、QIAGEN社のQIAquickゲル抽出キットを用いてアガロースゲルから精製した。消化したDNA断片を、消化したpCMV-GHベクターに連結させ、CMVポリマーの制御下で、hGH-SMC-1とhGH-SMC-2の融合ポリペプチドを生成できるようにした。その連結産物を、シマニスの方法(ハナハン、D. DNAクローニング、1985年、D.M.グローバー出版、pp.109-135)に従って、大腸菌株DH5 [80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169 endA1racA1 hsdR17 (r_K-m_K+)deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1](ギブコBRL)を形質転換した。組換えpCMVプラスミドをQIAGENキットを用いて精製し、DNA配列決定により、挿入物のDNAのヌクレオチド配列を確認した。

20

【実施例 4】

【0121】

M.カタラーリスポリペプチド抗原に対して免疫反応を誘発するDNAの使用法を、以下実施例で説明する。

30

【0122】

雌のBALB/cマウス8匹(カナダ国ケベック州、セントコンスタント、チャールズリバー)のグループに、50µgの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)発現プラスミドpCMV-GH-GM-CSF(テキサス州、ダラス、テキサス大学、生化学部、ステファン・A・ジョンストン博士研究室)存在下に、SMC-1(配列番号:1)とSMC-2(配列番号:3)遺伝子をコードする組換えpCMV-GHを50µg、2~3週間の間隔をあけて100µlを3回筋肉注射することにより、免疫化した。コントロールとしては、マウスのグループに、50µgのpCMV-GH-GM-CSF存在下に、pCMV-GHを50µg注射した。各免疫注射の実施前と三度目の注射の7日後に、眼窩洞から血液サンプルを採取して、対応するHisタグラベルを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドを皮膜抗原として用いて、ELISA法により血清の抗体反応を調べた。これらHisタグでラベル化したM.カタラーリス組換えポリペプチドの生成及び精製法については、実施例5に示す。

40

【実施例 5】

【0123】

M.カタラーリス組換えポリペプチドの生成及び精製法を、以下実施例で説明する。

【0124】

SMC-1(配列番号:1)とSMC-2(配列番号:3)遺伝子を組込んだ組換えpET21プラスミドを用いて、電気穿孔法(カナダ国ミシサーガ、バイオラッド研究室、ジェーンパルサー

50

IIアパレイタス)により、大腸菌株AD494 (DE3) [ara-leu7697 lacX74 phoA PvuII phoR malF3 F' [lac⁺(lacI^q)pro] trxB::Kan(DE3)] (ノヴァゲン)を形質転換した。大腸菌のこの菌株において、組換えポリペプチドの発現を制御するT7プロモーターは、イソプロピル-β-D-チオ-ガラクトピラノシド (IPTG) によって誘導が可能であるlacプロモーターの制御下にある遺伝子であるT7 RNAポリメラーゼ (DE3プロファージ上に存在) によって特異的に認識される。形質転換細胞AD494 (DE3) / rpET21を、1mlにつき100 μgのカルベニシリン (カナダ国オークビル、シグマ-アルドリッチ・カナダ社) を含むLB培養液 (ペプトン10g/L、イースト菌抽出物5g/L、NaCl 10g/L) 中で250rpmで攪拌しながら、A₆₀₀値が0.5になるまで、37 °Cで培養した。Hisタグを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドの生成を促進するために、最終濃度1mMのIPTGと共に、細胞をさらに3時間インキュベートした。500ml培養液から誘導された細胞を遠心分離でペレット化して、-70 °Cで凍結させた。

10

【0125】

His結合金属キレート樹脂に固定された2価のカチオン (Ni²⁺) へのHisタグ配列 (連続する6個のヒスチジン残基) の結合特性に基づいたアフィニティー・クロマトグラフィーを用いて、IPTGに誘導されたAD494 (DE3) / rpET21の可溶性細胞質画分から、組換えポリペプチドの精製を行なった。大略すると、IPTGにより誘導された500mLの培養液から得られたペレット化した細胞を、PMSFを1mM含む溶解緩衝液 (20mLトリス、500mMNaCl、10mMイミダゾール、pH7.9) 中に再び懸濁させ、超音波処理して12000Xgで20分間遠心分離処理して、沈殿物を取り除いた。その上清をNi-NTAアガロースカラム (キアゲン) にかけた。Hisタグでラベルを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドを、250mMのイミダゾールと、500mMのNaClと、20mMのトリスpH7.9で溶出した。4 °CでPBSに対して透析して、サンプルから塩とイミダゾールを取り除いた。大腸菌の可溶部分から得られた組換えポリペプチド量は、MicroBCA (イリノイ州、ロックフォード、ピース) で測定した。

20

【実施例6】

【0126】

Hisタグを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドとヒト口蓋扁桃中に存在する抗体との反応性を、以下実施例で説明する。

【0127】

表3に示すように、ヒト口蓋扁桃内に存在する抗体を用いた免疫ブロット法において、SMC-1とSMC-2のHisタグを付した組換えポリペプチドの存在が認められた。このことは、ヒトは普通にM.カタラーリスと接触し、そのポリペプチドに特異的な抗体を作成することを示している。これらの特別なヒトの抗体は、M.カタラーリス感染の予防に関与するかもしれない。

30

【0128】

【表3】

ヒト口蓋扁桃中に存在する抗体と、M.カタラーリスのHisタグを付した融合組み換えポリペプチドとの免疫ブロットにおける反応性

精製した組み換えポリペプチド I. D. ¹	見かけの分子量 (kDa) ²	ヒト口蓋扁桃中に存在する抗体との免疫ブロットにおける反応性 ³
SMC-1	104	+
SMC-2	36	+

40

¹免疫ブロットは、実施例5に記載のように生成かつ精製されたHis標識組換えポリペプチドを用いて行なった。

² Hisタグを付した組換えポリペプチドの分子量は、SDS-PAGE後に測定した。

³免疫ブロットを行うためにヒト口蓋扁桃からの抽出物は希釈を行わなかった。

50

【実施例7】

【0129】

M. カタラーリス株表面上にSMC-1とSMC-2ポリペプチドの抗体が接近する可能性を、以下実施例で説明する。

【0130】

細菌を、37℃、8%二酸化炭素ガス中で1%デキストロースを含む脳心臓輸液（BHI）培養液中で培養して、OD_{490nm}が0.650（～10⁸ CFU/ml）となるようにした。その後、抗SMC-1又は抗SMC-2又はコントロール血清の希釈物を添加して細胞に結合させ、回転させながら4℃で2時間インキュベートした。サンプルをブロッキング緩衝液（2%ウシ血清アルブミン（BSA）含有リン酸緩衝生理食塩水（PBS））で4回洗浄し、その後、ブロッキング緩衝液で特異的に希釈したヤギ蛍光標識（FITC）-結合抗マウスIgG Fc（ガンマ）の断片1mlを加えた。さらに暗室中で回転させながら、室温で60分間インキュベートした後、サンプルをブロッキング緩衝液で4回洗浄し、0.25%ホルムアルデヒド含有PBS緩衝液で4℃で18時間固定化した。細胞を遠心し、PBS緩衝液0.5ml中に再懸濁させた。細胞は、フローサイトメトリー（ベックマン・クーラー社、Epics（登録商標）XL）で分析するまで、4℃の暗室に放置した。フローサイトメトリー分析から、SMC-1とSMC-2に特異的な抗体が、試験した均質な（ETSU C-2）M. カタラーリス株上にあるそれらに対応する表面エピトープを、効率的に認識することが明らかになった（表4）。分析されたモラクセラ細胞10000個のうちの89%以上が、SMC-1とSMC-2に特異的な血清中に存在する抗体によりラベル化されていることが示された。加えて、SMC-1とSMC-2に特異的な血清のプール中に存在する抗体は、M.カタラーリスのETSU 658株の表面に結合した（表4）。この株の10000個の細胞の90%以上が特異的な抗体により標識されていることも測定された。これらの観察は、SMC-1とSMC-2ポリペプチドが、抗体に認識され易い表面に接近可能であることを明確に示している。抗M.カタラーリス抗体は、M.カタラーリス感染の予防に重要な役割を果たすことが明らかになった。

【0131】

【表4】

M. カタラーリスの無傷の細胞表面における、SMC-1及びSMC-2に特異的な抗体の結合評価

血清の同定	菌株	蛍光指標 ²	ラベル化細胞の% ³
SMC-1 特異的抗体のプール ¹	ETSU C-2	19.8	96.1
	ETSU 658	15.2	93.1
SMC-2 特異的抗体のプール	ETSU C-2	11.0	89.8
	ETSU 658	11.9	90.5
負コントロール血清のプール ⁴	ETSU C-2	1.0	1.0
	ETSU 658	1.0	1.0
正のコントロール血清 ⁵	ETSU C-2	25.0	97.4
	ETSU 658	19.6	93.3

¹精製した組換えポリペプチド20µgとQuilAアジュバント（カナダ国、ホーンビー、シーダーレーン・ラボラトリーズ社）10µgの混合物を2週間毎に5回、マウスに皮下注射した。血清を1/50に希釈した。

10

20

30

40

50

²免疫血清で細胞にラベルを付けた後に得られた蛍光値の中央値を、コントロールのマウス血清について得られた蛍光値で割って算出したものを、蛍光指標とした。蛍光値の1は、無傷のモラクセラ細胞の表面に結合された抗体が存在しないことを示したものとす。

³分析した10,000細胞のうちの、ラベルを付した細胞%を示す。

⁴この検定には、免疫化されていないマウス又は見せかけ上免疫化されたマウスから採取した血清をプールして1/50に希釈したものを、負のコントロールとして用いた。

⁵検定には、精製されたM.カタラーリス株ETSU-C2由来の精製された外膜ポリペプチド20 μ gで免疫化されたマウスから得られた血清を1/1000に希釈して、正のコントロールとして用いた。

【実施例8】

10

【0132】

抗SMC-1及びSMC-2マウス血清の殺菌活性を、以下実施例で説明する。

【0133】

細菌をチョコレート寒天プレートに載せ、8%二酸化炭素ガス中、37 $^{\circ}$ Cで18時間、インキュベートした。その後、OD_{490nm}が0.25となるように溶菌緩衝液(10%ハンクス平衡塩類溶液(HBSS)及び1%カゼイン加水分解物、pH7.3)中に細菌細胞を再懸濁させ、8 \times 10⁴CFU/mlに希釈した。細菌懸濁液25 μ lと、熱で不活化した希釈試験用血清50 μ l及びHBSS15 μ lとを混合して、攪拌(200rpm)しながら8%二酸化炭素中、37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートすることにより、細菌検定を行なった。その後、ウサギの捕体成分含有血清を最終濃度が10%となるように添加して、その混合物を攪拌(200rpm)しながら8%二酸化炭素中37 $^{\circ}$ Cで、さらに60分間インキュベートした。インキュベート終了時に、チョコレート寒天プレートに検定混合物10 μ lをのせ、生存細菌数を測定した。そのプレートを8%二酸化炭素中、37 $^{\circ}$ Cで18~24時間インキュベートした。コントロールは、免疫化前のマウスから採取した熱不活化血清およびウサギ捕体とインキュベートした細菌を含むものとした。殺菌活性は、コントロールと比較して、50%かそれ以上の細菌を殺す結果となる最高血清希釈として測定した。M.カタラーリス株ETSU658を用いて血清の殺菌活性を評価した。M.カタラーリス株ETSU658に対する殺菌活性は、精製された組み換えSMC-1又はSMC-2ポリペプチド20 μ gで5回免疫したマウスから採取した血清において検出した。

20

【実施例9】

【0134】

30

免疫化により誘発されたM.カタラーリス感染に対するマウスの予防を、以下実施例で説明する。

【0135】

10匹の雌のBALB/cマウス(チャールズリバー)のグループに、10%のQuilAアジュバント(カナダ国、ホーンビー、シーダーレーン・ラボラトリーズ社)の存在下で、アフィニティ精製されたHisタグを付したM.カタラーリス組換えポリペプチド20 μ gを、2週間毎に5回、皮下に投与して免疫化するか、又は、コントロールとして、PBS中のQuilAアジュバントのみを投与した。血液サンプルは、それぞれ免疫化前の0、14、28、42及び56日目と、5度目の注射から14日後(70日目)に、眼窩洞から採取した。1週間後、M.カタラーリス株ETSU658約1 \times 10⁶CFUを用いて、マウスに肺内疾患を患させた。M.カタラーリス疾患の接種材料をチョコレート寒天にのせ、CFUを測定して、投与した量を確認した。マウスは、ペントバルビタール・ナトリウム(Euthanyl(登録商標))の腹腔内投与により感染の5時間後に屠殺した。無傷の肺を摘出して、組織ホモゲナイザーで均質化した。CFU測定のための連続希釈でプレーティングすることにより、肺ホモジェネートについて細菌クリアランスを測定した。

40

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】図1は、M.カタラーリス株ETSUC-2由来のSMC-1遺伝子のDNA配列(配列番号:1)を示したものである。前記配列の下線部は、リーダーペプチドのコード領域を示す。

50

【図2】図2は、M.カタラーリス株ETSUC-2由来のSMC-1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：2）を示したものである。下線部の配列は、35アミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【図3】図3は、M.カタラーリス株ETSUC-2由来のSMC-2遺伝子のDNA配列（配列番号：3）を示したものである。前記配列の下線部は、リーダーペプチドのコード領域を示す。

【図4】図4は、M.カタラーリス株ETSUC-2由来のSMC-2ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：4）を示したものである。下線部の配列は、47アミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【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
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/018052 A1

(51) International Patent Classification: A61K 39/02, C07K 14/21, C12N 15/31, 1/21, G01N 33/569 (74) Agent: MORROW, Joy, D. & Smart & Biggar, 900-55 Meicallie Street, P.O. Box 2999, Station D, Ottawa, Ontario K1P 5Y6 (CA).

(21) International Application Number: PCT/CA02/01315

(81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, GI, 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, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 27 August 2002 (27.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/314,634 27 August 2001 (27.08.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): SHIRE BIOCHEM INC. [CA/CA]; 275 Armand-Frappier Boulevard, Laval, Quebec H7V 4A7 (CA).

(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): MARTIN, Denis [CA/CA]; 4728-G, rue Gaboury, St-Augustin-de-Desmaures, Quebec G3A 1E9 (CA); HAMEL, Josée [CA/CA]; 2401 rue Maritain, Silery, Quebec G1T 1N6 (CA); BRODEUR, Bernard, R. [CA/CA]; 2401 rue Maritain, Silery, Quebec G1T 1N6 (CA); RIOUX, Stéphane [CA/CA]; 869 Avenue des Pinsons, Beauport, Quebec, G1E 1J3 (CA); COUTURE, Julie [CA/CA]; 896 C, Jean-Charles Cantin, St-Augustin-de-Desmaures, Quebec G3A 1A4 (CA).

Published: — with international search report — before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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

(54) Title: MORAXILLA (BRANHAMELA) CATARRHALIS POLYPEPTIDES AND CORRESPONDING DNA FRAGMENTS

1 MHTAHHRK TYLTAIRYA LFGIASLPFV IPTYBELNLS RSLTVVGADS SKNLEDTPTNT
61 KPNTVLALDA HLQSHDDTAN AFDGDFEVI TQQAARQTS QANQGNHMS QLDAPASKSD
121 NPSLNTRALT DKHDTPSASK SLAKLAENYH IKSDPDHRC QGMWMPHQ ATHTRPTTP
181 KLDENGFIT EDGIFAQADY GYYDAQTYAE LSGNVIMEQN GRRVTADKLT LDTQTGGATA
241 SGOVQFSDGG ASDHSAIIG MAENLVYHTD GQTATAQDVA FASTTINAHG YASQMDKISS
301 SEYRQHVFMF TTCPPTERKW YLDTDSIDIN TDTGRAIAKN TFLRIKKVPV FYLPYFNPFI
361 DARRSSGFLP PSMGFGASDS FEISTPPYLN LAPDYDATIT PTVFTNRNPM LTGFEFRLLTQ
421 DYSGGLTAS YLPKQQYHD KDRSIRQFDH TWQPKQFDKI TTYAQVQSV DANVLSDFNA
481 LGVESAKLNL PRRIGTSFLD ENVSADLRFI DFQRLDGFGI DGRPTDKR PYARLPQLSV
541 NYRLRPIWNG TPSGLEGGI HNSAFPKKSI KDRSIRQFDH GRIFNQFAS YPLLESWGL
601 TPRLSLTHLY TSYDESLAD QNIAKNGRH SVFAPTVSLD AGLFPEKAGA PPGMHQDTGG
661 YQVLPRLHY TYTPFKQDHN VENFETKIAQ LSYEQLNHN WFLGHDRIQ LHAVTPAVSY
721 RYDIDMGRTR FEGGIAEQIL LSHIRVGINI SESYSSRSRG LANQASLQPK DNLWFDASGS
781 FRNYDLSI VQIYRYPED RKLFLNGLIV RKNRAFQNS ALGAYTASAI FPINRWRNM
841 GQLQYDNLND YVMDSLMGLN YEDCCYGLSI YARRYDAFN PHLSPDTAVM ABRVRLNGIG
901 GGRLLRLLSE KVLGYDQVRN AWRHDI* (SEQ ID No : 2)

(57) Abstract: The present invention relates to polypeptides of Moraxella (Branhamella) catarrhalis which may be used for prophylaxis, diagnostic and/or therapy purposes.



WO 03/018052 A1

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

MORAXELLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS POLYPEPTIDES AND
CORRESPONDING DNA FRAGMENTS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention is related to polypeptides, more particularly SMC-1 and SMC-2 polypeptides of Moraxella (Branhamella) catarrhalis which may be used to prevent, diagnose and/or treat Moraxella (Branhamella) catarrhalis infection.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Moraxella (Branhamella) catarrhalis is a Gram-negative diplococcus that causes respiratory tract infections in humans. M. catarrhalis is now accepted as the third most common cause of otitis media in infants and children, after Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae. M. catarrhalis has also been associated with several other types of infection, including sinusitis, persistent cough, acute laryngitis, suppurative keratitis and conjunctivitis neonatorum.

Since approximately 90% of M. catarrhalis strains are resistant to antibiotics (β -lactamase positive) and that recurrent otitis media is associated with high morbidity, there is a need for the development of a vaccine that will protect hosts from M. catarrhalis infection. An infection by M. catarrhalis induces an immune response against antigens found at the surface of the bacterial cells. However, many of these surface proteins are still not characterized, nor has the immune response resulting in protection from infection by different strains been determined.

To develop a vaccine that will protect hosts from M. catarrhalis infection, efforts have mainly been concentrated

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

on outer membrane proteins such as the high-molecular-mass protein named ubiquitous surface protein A (UspA). This protein is considered a promising vaccine candidate because a monoclonal antibody and polyclonal antibodies were both shown to be bactericidal and protective in the murine pulmonary-clearance model. However, this protein was shown to be highly variable among the different strains of M. catarrhalis. In addition to this protein, other M. catarrhalis proteins have generated interest as potential vaccine candidates. The transferrin-binding protein, which possesses conserved epitopes, exposed on the bacterial surface. However, there was divergence in the degree of antibody cross-reactivity with the protein from one strain to another. Other investigators have also focused on the 45-kDa protein CD (OMP CD). This protein is highly conserved among strains of M. catarrhalis, however adults with chronic obstructive pulmonary disease show variability in the immune response against the OMP CD.

Therefore there remains an unmet need for M. catarrhalis polypeptides that may be used to prevent, diagnose and/or treat Moraxella (Branhamella) catarrhalis infection.

SUMMARY OF THE INVENTION

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID Nos: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

According to one aspect, the present invention relates to polypeptides comprising a sequence chosen from SEQ ID No : 2, 4 or fragments or analogs thereof.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

In other aspects, there are provided polypeptides encoded by polynucleotides of the invention, pharmaceutical compositions, vectors comprising polynucleotides of the invention operably linked to an expression control region, as well as host cells transfected with said vectors and processes for producing polypeptides comprising culturing said host cells under conditions suitable for expression.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 represents the DNA sequence of SMC-1 gene from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NOS: 1. The underlined portion of the sequence represents the region coding for the leader peptide.

Figure 2 represents the amino acid sequence of SMC-1 polypeptide from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NOS: 2. The underlined sequence represents the 35 amino acid residues leader peptide.

Figure 3 represents the DNA sequence of SMC-2 gene from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 3. The underlined portion of the sequence represents the region coding for the leader peptide.

Figure 4 represents the amino acid sequence of SMC-2 polypeptide from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 4. The underlined sequence represents the 47 amino acid residues leader peptide.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides purified and isolated polynucleotides, which encode Moraxella polypeptides which may be used to prevent, diagnose and/or treat Moraxella infection.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or
3 analogs thereof.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or
0 analogs thereof.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide 2, 4 or fragments or analogs thereof.

5 According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 98% identity to a second polypeptide 2, 4 or fragments or analogs thereof.

According to one aspect, the present invention provides an
20 isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NOS: 2 or 4.

According to one aspect, the present invention provides an
25 isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NOS: 2 or 4.

According to one aspect, the present invention provides an
30 isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NOS: 2 or 4.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 98% identity to a second polypeptide comprising SEQ ID NOS: 2 or 4.

- 5 According to one aspect, the present invention relates to polypeptides which comprise an amino acid sequence selected from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

According to one aspect, the present invention relates to polypeptides which comprise an amino acid sequence selected
0 from SEQ ID NOS: 2 and 4.

According to one aspect, the present invention relates to polypeptides characterized by the amino acid sequence comprising SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

- 15 According to one aspect, the present invention relates to polypeptides characterized by the amino acid sequence comprising SEQ ID NOS: 2 or 4.

According to one aspect, the present invention provides a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2,
20 4 or fragments or analogs thereof.

According to one aspect, the present invention provides a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2
or 4.

- 25 According to one aspect, the present invention relates to epitope bearing portions of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

According to one aspect, the present invention relates to epitope bearing portions of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4.

According to one aspect, the present invention provides an
5 isolated polynucleotide comprising a polynucleotide chosen from:

- (a) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or
0 analogs thereof;
- (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- .5 (c) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising
20 a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (e) a polynucleotide encoding a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS:
25 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (f) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

(g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 1, 3 or fragments or analogs thereof;

(h) a polynucleotide that is complementary to a polynucleotide in (a), (b), (c), (d), (e), (f) or (g).

5 According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide chosen from:

(a) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a
10 sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;

(b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;

(c) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a
15 sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;

(d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;

(e) a polynucleotide encoding a polypeptide capable of
20 raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;

(f) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from
25 SEQ ID NOS: 2 or 4;

(g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 1 or 3;

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

(h) a polynucleotide that is complementary to a polynucleotide in (a), (b), (c), (d), (e), (f) or (g).

According to one aspect, the present invention provides an isolated polypeptide comprising a polypeptide chosen from:

5 (a) a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;

(b) a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;

(c) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;

(d) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;

(e) a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;

20 (f) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;

(g) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f) wherein the N-terminal Met residue is deleted;

25 (h) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f) wherein the secretory amino acid sequence is deleted.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polypeptide comprising a polypeptide chosen from:

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

- (a) a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (b) a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (c) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (d) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (e) a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (f) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (g) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f) wherein the N-terminal Met residue is deleted;
- (h) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f) wherein the secretory amino acid sequence is deleted.

Those skilled in the art will appreciate that the invention includes DNA molecules, i.e. polynucleotides and their complementary sequences that encode analogs such as mutants, variants, homologues and derivatives of such polypeptides, as described herein in the present patent application. The invention also includes RNA molecules corresponding to the DNA molecules of the invention. In addition to the DNA and RNA molecules, the invention includes the corresponding

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

polypeptides and monospecific antibodies that specifically bind to such polypeptides.

In a further embodiment, the polypeptides in accordance with the present invention are antigenic.

- 5 In a further embodiment, the polypeptides in accordance with the present invention are immunogenic.

In a further embodiment, the polypeptides in accordance with the present invention can elicit an immune response in a host.

- 0 In a further embodiment, the present invention also relates to polypeptides which are able to raise antibodies having binding specificity to the polypeptides of the present invention as defined above.

- 5 An antibody that "has binding specificity" is an antibody that recognizes and binds the selected polypeptide but which does not substantially recognize and bind other molecules in a sample, e.g., a biological sample. Specific binding can be measured using an ELISA assay in which the selected polypeptide is used as an antigen.

- 20 In accordance with the present invention, "protection" in the biological studies is defined by a significant increase in the survival curve, rate or period. Statistical analysis using the Log rank test to compare survival curves, and Fisher exact test to compare survival rates and numbers of
25 days to death, respectively, might be useful to calculate P values and determine whether the difference between the two groups is statistically significant. P values of 0.05 are regarded as not significant.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

In an additional aspect of the invention there are provided antigenic/immunogenic fragments of the polypeptides of the invention, or of analogs thereof.

The fragments of the present invention should include one or more such epitopic regions or be sufficiently similar to such regions to retain their antigenic/immunogenic properties. Thus, for fragments according to the present invention the degree of identity is perhaps irrelevant, since they may be 100% identical to a particular part of a polypeptide or analog thereof as described herein. The present invention further provides fragments having at least 10 contiguous amino acid residues from the polypeptide sequences of the present invention. In one embodiment, at least 15 contiguous amino acid residues. In one embodiment, at least 20 contiguous amino acid residues.

The skilled person will appreciate that analogs of the polypeptides of the invention will also find use in the context of the present invention, i.e. as antigenic/immunogenic material. Thus, for instance proteins or polypeptides which include one or more additions, deletions, substitutions or the like are encompassed by the present invention.

As used herein, "fragments", "analogs" or "derivatives" of the polypeptides of the invention include those polypeptides in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably conserved) and which may be natural or unnatural. In one embodiment, derivatives and analogs of polypeptides of the invention will have about 70% identity with those sequences illustrated in the figures or fragments thereof. That is, 70% of the residues are the same. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 80%

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

identity. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 85% identity. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 90% identity. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 95% identity. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 99% identity. In a further embodiment, analogs of polypeptides of the invention will have fewer than about 20 amino acid residue substitutions, modifications or deletions and more preferably less than 10.

0 These substitutions are those having a minimal influence on the secondary structure and hydrophobic nature of the polypeptide. Preferred substitutions are those known in the art as conserved, i.e. the substituted residues share physical or chemical properties such as hydrophobicity, size, charge or functional groups. These include substitutions such as those described by Dayhoff, M. in Atlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978 and by Argos, P. in EMBO J. 8, 779-785, 1989. For example, amino acids, either natural or unnatural, belonging to one of the following groups represent conservative changes:

ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr, val;

cys, ser, tyr, thr;

val, ile, leu, met, ala, phe;

lys, arg, orn, his;

25 and phe, tyr, trp, his.

The preferred substitutions also include substitutions of D-enantiomers for the corresponding L-amino acids.

In an alternative approach, the analogs could be fusion polypeptides, incorporating moieties which render

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

purification easier, for example by effectively tagging the desired polypeptide. It may be necessary to remove the "tag" or it may be the case that the fusion polypeptide itself retains sufficient antigenicity to be useful.

- 5 The percentage of homology is defined as the sum of the percentage of identity plus the percentage of similarity or conservation of amino acid type.

- In one embodiment, analogs of polypeptides of the invention will have about 70% homology with those sequences
0 illustrated in the figures or fragments thereof. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 80% homology. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 85% homology. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 90% homology. In a
5 further embodiment, polypeptides will have greater than 95% homology. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 99% homology. In a further embodiment, analogs of polypeptides of the invention will have fewer than about 20 amino acid residue substitutions, modifications or
10 deletions and more preferably less than 10.

- One can use a program such as the CLUSTAL program to compare amino acid sequences. This program compares amino acid sequences and finds the optimal alignment by inserting
spaces in either sequence as appropriate. It is possible to
25 calculate amino acid identity or homology for an optimal alignment. A program like BLASTx will align the longest stretch of similar sequences and assign a value to the fit. It is thus possible to obtain a comparison where several
regions of similarity are found, each having a different
30 score. Both types of identity analysis are contemplated in the present invention.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

In an alternative approach, the analogs or derivatives could be fusion polypeptides, incorporating moieties which render purification easier, for example by effectively tagging the desired protein or polypeptide, it may be necessary to
5 remove the "tag" or it may be the case that the fusion polypeptide itself retains sufficient antigenicity to be useful.

It is well known that it is possible to screen an antigenic polypeptide to identify epitopic regions, i.e. those regions
0 which are responsible for the polypeptide's antigenicity or immunogenicity. Methods for carrying out such screening are well known in the art. Thus, the fragments of the present invention should include one or more such epitopic regions or be sufficiently similar to such regions to retain their
5 antigenic/immunogenic properties.

In an additional aspect of the invention there are provided antigenic/immunogenic fragments of the proteins or polypeptides of the invention, or of analogs or derivatives thereof.

20 Thus, what is important for analogs, derivatives and fragments is that they possess at least a degree of the antigenicity/immunogenic of the protein or polypeptide from which they are derived.

Also included are polypeptides which have fused thereto
25 other compounds which alter the polypeptides biological or pharmacological properties i.e. polyethylene glycol (PEG) to increase half-life; leader or secretory amino acid sequences for ease of purification; prepro- and pro- sequences; and (poly)saccharides.

30 Furthermore, in those situations where amino acid regions are found to be polymorphic, it may be desirable to vary one

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

or more particular amino acids to more effectively mimic the different epitopes of the different Moraxella strains.

Moreover, the polypeptides of the present invention can be modified by terminal -NH₂ acylation (eg. by acetylation, or
5 thioglycolic acid amidation, terminal carboxy amidation, e.g. with ammonia or methylamine) to provide stability, increased hydrophobicity for linking or binding to a support or other molecule.

Also contemplated are hetero and homo polypeptide multimers
0 of the polypeptide fragments and analogs. These polymeric forms include, for example, one or more polypeptides that have been cross-linked with cross-linkers such as avidin/biotin, gluteraldehyde or dimethylsuperimidate. Such polymeric forms also include polypeptides containing two or
5 more tandem or inverted contiguous sequences, produced from multicistronic mRNAs generated by recombinant DNA technology.

In a further embodiment, the present invention also relates to chimeric polypeptides which comprise one or more
10 polypeptides or fragments or analogs thereof as defined in the figures of the present application.

In a further embodiment, the present invention also relates to chimeric polypeptides comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments
25 or analogs thereof; provided that the polypeptides are linked as to form a chimeric polypeptide.

In a further embodiment, the present invention also relates to chimeric polypeptides comprising two or more polypeptides comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4
30 provided that the polypeptides are linked as to form a chimeric polypeptide.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

Preferably, a fragment, analog or derivative of a polypeptide of the invention will comprise at least one antigenic region i.e. at least one epitope.

In order to achieve the formation of antigenic polymers (i.e. synthetic multimers), polypeptides may be utilized having bishaloacetyl groups, nitroarylhalides, or the like, where the reagents being specific for thio groups. Therefore, the link between two mercapto groups of the different polypeptides may be a single bond or may be composed of a linking group of at least two, typically at least four, and not more than 16, but usually not more than about 14 carbon atoms.

In a particular embodiment, polypeptide fragments and analogs of the invention do not contain a starting residue, such as methionine (Met) or Valine (val). Preferably, polypeptides will not incorporate a leader or secretory sequence (signal sequence). The signal portion of a polypeptide of the invention may be determined according to established molecular biological techniques. In general, the polypeptide of interest may be isolated from a *Moraxella* culture and subsequently sequenced to determine the initial residue of the mature protein and therefore the sequence of the mature polypeptide.

It is understood that polypeptides can be produced and/or used without their start codon (methionine or valine) and/or without their leader peptide to favor production and purification of recombinant polypeptides. It is known that cloning genes without sequences encoding leader peptides will restrict the polypeptides to the cytoplasm of *E. coli* and will facilitate their recovery (Glick, B.R. and Pasternak, J.J. (1998) Manipulation of gene expression in prokaryotes. In "Molecular biotechnology: Principles and

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

applications of recombinant DNA", 2nd edition, ASM Press, Washington DC, p.109-143).

According to another aspect of the invention, there are also provided (i) a composition of matter containing a polypeptide of the invention, together with a carrier, diluent or adjuvant; (ii) a pharmaceutical composition comprising a polypeptide of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or adjuvant; (iii) a vaccine comprising a polypeptide of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or adjuvant; (iv) a method for inducing an immune response against Moraxella, in a host, by administering to the host, an immunogenically effective amount of a polypeptide of the invention to elicit an immune response, e.g., a protective immune response to Moraxella; and particularly, (v) a method for preventing and/or treating a Moraxella infection, by administering a prophylactic or therapeutic amount of a polypeptide of the invention to a host in need.

According to another aspect of the invention, there are also provided (i) a composition of matter containing a polynucleotide of the invention, together with a carrier, diluent or adjuvant; (ii) a pharmaceutical composition comprising a polynucleotide of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or adjuvant; (iii) a method for inducing an immune response against Moraxella, in a host, by administering to the host, an immunogenically effective amount of a polynucleotide of the invention to elicit an immune response, e.g., a protective immune response to Moraxella; and particularly, (iv) a method for preventing and/or treating a Moraxella infection, by administering a prophylactic or therapeutic amount of a polynucleotide of the invention to a host in need.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

Before immunization, the polypeptides of the invention can also be coupled or conjugated to carrier proteins such as tetanus toxin, diphtheria toxin, hepatitis B virus surface antigen, poliomyelitis virus VP1 antigen or any other viral or bacterial toxin or antigen or any suitable proteins to stimulate the development of a stronger immune response. This coupling or conjugation can be done chemically or genetically. A more detailed description of peptide-carrier conjugation is available in Van Regenmortel, M.H.V., Briand J.P., Muller S., Flaué S., «Synthetic Polypeptides as antigens» in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol.19 (ed.) Burdou, R.H. & Van Knippenberg P.H. (1988), Elsevier New York.

According to another aspect, there are provided pharmaceutical compositions comprising one or more Moraxella polypeptides of the invention in a mixture with a pharmaceutically acceptable adjuvant. Suitable adjuvants include (1) oil-in-water emulsion formulations such as MF59[™], SAF[™], Ribi[™]; (2) Freund's complete or incomplete adjuvant; (3) salts i.e. AlK(SO₄)₂, AlNa(SO₄)₂, AlNH₄(SO₄)₂, Al(OH)₃, AlPO₄, silica, kaolin; (4) saponin derivatives such as Stimulon[™] or particles generated therefrom such as ISCOMs (immunostimulating complexes); (5) cytokines such as interleukins, interferons, macrophage colony stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor (TNF); (6) other substances such as carbon polynucleotides i.e. poly IC and poly AU, detoxified cholera toxin (CTB) and E.coli heat labile toxin for induction of mucosal immunity. A more detailed description of adjuvant is available in a review by M.Z.I Khan et al. in Pharmaceutical Research, vol. 11, No. 1 (1994) pp2-11, and also in another review by Gupta et al., in Vaccine, Vol. 13, No. 14, pp1263-1276 (1995) and in WO

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

99/24578. Preferred adjuvants include QuilA™, QS21™, Alhydrogel™ and Adjuvphos™.

Pharmaceutical compositions of the invention may be administered parenterally by injection, rapid infusion, 5 nasopharyngeal absorption, dermoabsorption, or buccal or oral.

The term "pharmaceutical composition" is also meant to include antibodies. In accordance with the present invention, there is also provided the use of one or more 0 antibodies having binding specificity for the polypeptides of the present invention for the treatment or prophylaxis of Moraxella infection and/or diseases and symptoms mediated by Moraxella infection.

Pharmaceutical compositions of the invention are used for 5 the prophylaxis of Moraxella infection and/or diseases and symptoms mediated by Moraxella infection as described in Manual of Clinical Microbiology, P.R. Murray (Ed, in chief), E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. 10 Yolken. ASM Press, Washington, D.C. seventh edition, 1999, 1773p. In one embodiment, pharmaceutical compositions of the present invention are used for the prophylactic or therapeutic treatment of otitis media, sinusitis, persistent cough, acute laryngitis, suppurative keratitis, 20 conjunctivitis neonatorum and invasive diseases, comprising administering to the host a prophylactic or therapeutic 25 amount of a composition of the invention. In one embodiment, pharmaceutical compositions of the invention are used for the treatment or prophylaxis of Moraxella infection and/or diseases and symptoms mediated by Moraxella 30 infection. In a further embodiment, the Moraxella infection is Moraxella Catarrhalis.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

In a further embodiment, the invention provides a method for prophylactic or therapeutic treatment of Moraxella infection in a host susceptible to Moraxella infection comprising administering to the host a prophylactic or therapeutic amount of a composition of the invention.

As used in the present application, the term "host" includes mammals. In a further embodiment, the mammal is human. In a further embodiment, the human is a neonate, infant or child. In a further embodiment, the human is an adult.

In a particular embodiment, pharmaceutical compositions are administered to those hosts at risk of Moraxella infection such as infants, elderly and immunocompromised hosts.

Pharmaceutical compositions are preferably in unit dosage form of about 0.001 to 100 µg/kg (antigen/body weight) and more preferably 0.01 to 10 µg/kg and most preferably 0.1 to 1 µg/kg 1 to 3 times with an interval of about 1 to 6 week intervals between immunizations.

Pharmaceutical compositions are preferably in unit dosage form of about 0.1 µg to 10 mg and more preferably 1µg to 1 mg and most preferably 10 to 100 µg 1 to 3 times with an interval of about 1 to 6 week intervals between immunizations.

According to another aspect, there are provided polynucleotides encoding polypeptides characterized by the amino acid sequence comprising SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

In one embodiment, polynucleotides are those illustrated in SEQ ID Nos: 1, 3 which may include the open reading frames (ORF), encoding the polypeptides of the invention.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

It will be appreciated that the polynucleotide sequences illustrated in the figures may be altered with degenerate codons yet still encode the polypeptides of the invention. Accordingly the present invention further provides

5 polynucleotides which hybridize to the polynucleotide sequences herein above described (or the complement sequences thereof) having 70% identity between sequences. In one embodiment, at least 80% identity between sequences. In one embodiment, at least 85% identity between sequences. In

0 one embodiment, at least 90% identity between sequences. In a further embodiment, polynucleotides are hybridizable under stringent conditions i.e. having at least 95% identity. In a further embodiment, more than 97% identity.

Suitable stringent conditions for hybridation can be readily

5 determined by one of skilled in the art (see for example Sambrook et al., (1989) Molecular cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology, (1999) Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley & Sons, Inc., N.Y.).

10 In a further embodiment, the present invention provides polynucleotides that hybridize under stringent conditions to either

- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
 - (b) the complement of a DNA sequence encoding a
- 25 polypeptide;

wherein said polypeptide comprises a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

In a further embodiment, the present invention provides polynucleotides that hybridize under stringent conditions to

30 either

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
(b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;

wherein said polypeptide comprises a sequence chosen from
5 SEQ ID NOS: 2 or 4.

In a further embodiment, the present invention provides polynucleotides that hybridize under stringent conditions to either

- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
0 (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;

wherein said polypeptide comprises at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs
.5 thereof.

In a further embodiment, the present invention provides polynucleotides that hybridize under stringent conditions to either

- (a) DNA sequence encoding a polypeptide or
20 (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;

wherein said polypeptide comprises at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4.

25 In a further embodiment, polynucleotides are those encoding polypeptides of the invention illustrated in SEQ ID NOS: 2, 4.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

In a further embodiment, polynucleotides are those illustrated in SEQ ID NOS: 1, 3 encoding polypeptides of the invention.

As will be readily appreciated by one skilled in the art, polynucleotides include both DNA and RNA.

The present invention also includes polynucleotides complementary to the polynucleotides described in the present application.

According to another aspect, there is provided a process for producing polypeptides of the invention by recombinant techniques by expressing a polynucleotide encoding said polypeptide in a host cell and recovering the expressed polypeptide product. Alternatively, the polypeptides can be produced according to established synthetic chemical techniques i.e. solution phase or solid phase synthesis of oligopeptides which are ligated to produce the full polypeptide (block ligation).

General methods for obtention and evaluation of polynucleotides and polypeptides are described in the following references: Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley and Sons, Inc. New York; *PCR Cloning Protocols*, from *Molecular Cloning to Genetic Engineering*, Edited by White B.A., Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997, 490 pages; *Protein Purification, Principles and Practices*, Scopes R.K., Springer-Verlag, New York, 3rd Edition, 1993, 380 pages; *Current Protocols in Immunology*, Edited by Coligan J.E. et al., John Wiley & Sons Inc., New York.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

The present invention provides host cells transfected with vectors comprising the polynucleotides of the invention.

The present invention provides a process for producing a polypeptide comprising culturing a host cell of the invention under conditions suitable for expression of said polypeptide.

For recombinant production, host cells are transfected with vectors which encode the polypeptides of the invention, and then cultured in a nutrient media modified as appropriate for activating promoters, selecting transformants or amplifying the genes. Suitable vectors are those that are viable and replicable in the chosen host and include chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences e.g. bacterial plasmids, phage DNA, baculovirus, yeast plasmids, vectors derived from combinations of plasmids and phage DNA. The polypeptide sequence may be incorporated in the vector at the appropriate site using restriction enzymes such that it is operably linked to an expression control region comprising a promoter, ribosome binding site (consensus region or Shine-Dalgarno sequence), and optionally an operator (control element). One can select individual components of the expression control region that are appropriate for a given host and vector according to established molecular biology principles (Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley and Sons, Inc. New York). Suitable promoters include but are not limited to LTR or SV40 promoter, E.coli lac, tac or trp promoters and the phage lambda P_l promoter. Vectors will preferably incorporate an origin of replication as well as selection markers i.e. ampicillin resistance gene. Suitable bacterial

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

vectors include pET, pQE70, pQE60, pQE-9, pD10 phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 and eukaryotic vectors pBlueBacIII, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, 5 pXT1, pSG, pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL. Host cells may be bacterial i.e. E.coli, Bacillus subtilis, Streptomyces; fungal i.e. Aspergillus niger, Aspergillus nidulins; yeast i.e. Saccharomyces or eukaryotic i.e. CHO, COS.

Upon expression of the polypeptide in culture, cells are 0 typically harvested by centrifugation then disrupted by physical or chemical means (if the expressed polypeptide is not secreted into the media) and the resulting crude extract retained to isolate the polypeptide of interest. Purification of the polypeptide from culture media or lysate 5 may be achieved by established techniques depending on the properties of the polypeptide i.e. using ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, hydroxylapatite 20 chromatography and lectin chromatography. Final purification may be achieved using HPLC.

The polypeptides may be expressed with or without a leader or secretion sequence. In the former case the leader may be removed using post-translational processing (see US 25 4,431,739; US 4,425,437; and US 4,338,397) or be chemically removed subsequent to purifying the expressed polypeptide.

According to a further aspect, the Moraxella polypeptides of the invention may be used in a diagnostic test for Moraxella infection, in particular Moraxella infection.

30 Several diagnostic methods are possible, for example detecting Moraxella organism in a biological sample, or for

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

diagnostic of a Moraxella infection in an host susceptible to Moraxella infection, the following procedure may be followed:

- a) obtaining a biological sample from a host;
 - 5 b) incubating an antibody or fragment thereof reactive with a Moraxella polypeptide of the invention with the biological sample to form a mixture; and
 - c) detecting specifically bound antibody or bound fragment in the mixture which indicates the presence of
- 0 Moraxella.

Alternatively, a method for the detection of antibody specific to a Moraxella antigen in a biological sample containing or suspected of containing said antibody may be performed as follows:

- 15 a) obtaining a biological sample from a host;
 - b) incubating one or more Moraxella polypeptides of the invention or fragments thereof with the biological sample to form a mixture; and
 - c) detecting specifically bound antigen or bound
- 20 fragment in the mixture which indicates the presence of antibody specific to Moraxella.

One of skill in the art will recognize that this diagnostic test may take several forms, including an immunological test such as an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), a

25 radioimmunoassay or a latex agglutination assay, essentially to determine whether antibodies specific for the protein are present in an organism.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

The DNA sequences encoding polypeptides of the invention may also be used to design DNA probes for use in detecting the presence of Moraxella in a biological sample suspected of containing such bacteria. The detection method of this invention comprises:

- a) obtaining the biological sample from a host;
- b) incubating one or more DNA probes having a DNA sequence encoding a polypeptide of the invention or fragments thereof with the biological sample to form a mixture; and
- c) detecting specifically bound DNA probe in the mixture which indicates the presence of Moraxella bacteria.

The DNA probes of this invention may also be used for detecting circulating Moraxella i.e. Moraxella nucleic acids in a sample, for example using a polymerase chain reaction, as a method of diagnosing Moraxella infections. The probe may be synthesized using conventional techniques and may be immobilized on a solid phase, or may be labelled with a detectable label. A preferred DNA probe for this application is an oligomer having a sequence complementary to at least about 6 contiguous nucleotides of the Moraxella polypeptides of the invention. In a further embodiment, the preferred DNA probe will be an oligomer having a sequence complementary to at least about 15 contiguous nucleotides of the Moraxella polypeptides of the invention. In a further embodiment, the preferred DNA probe will be an oligomer having a sequence complementary to at least about 30 contiguous nucleotides of the Moraxella polypeptides of the invention. In a further embodiment, the preferred DNA probe will be an oligomer having a sequence complementary to at

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

least about 50 contiguous nucleotides of the Moraxella polypeptides of the invention.

Another diagnostic method for the detection of Moraxella in a host comprises:

- 5 a) labelling an antibody reactive with a polypeptide of the invention or fragment thereof with a detectable label;
- b) administering the labelled antibody or labelled fragment to the host; and
- 10 c) detecting specifically bound labelled antibody or labelled fragment in the host which indicates the presence of Moraxella.

A further aspect of the invention is the use of the Moraxella polypeptides of the invention as immunogens for
15 the production of specific antibodies for the diagnosis and in particular the treatment of Moraxella infection. Suitable antibodies may be determined using appropriate screening methods, for example by measuring the ability of a particular antibody to passively protect against Moraxella
20 infection in a test model. One example of an animal model is the mouse model described in the examples herein. The antibody may be a whole antibody or an antigen-binding fragment thereof and may belong to any immunoglobulin class. The antibody or fragment may be of animal origin,
25 specifically of mammalian origin and more specifically of murine, rat or human origin. It may be a natural antibody or a fragment thereof, or if desired, a recombinant antibody or antibody fragment. The term recombinant antibody or antibody fragment means antibody or antibody fragment which
30 was produced using molecular biology techniques. The

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

antibody or antibody fragments may be polyclonal, or preferably monoclonal. It may be specific for a number of epitopes associated with the Moraxella polypeptides but is preferably specific for one.

- 5 According to one aspect, the present invention provides the use of an antibody for prophylaxis and/or treatment of Moraxella infection.

In a further aspect, the invention provides a method for prophylactic or therapeutic treatment of Moraxella infection
.0 in a host susceptible to Moraxella infection comprising administering to the host a prophylactic or therapeutic amount of a pharmaceutical composition of the invention.

In a further aspect, polynucleotides encoding polypeptides of the invention, or fragments, analogs or derivatives
15 thereof, may be used in a DNA immunization method. That is, they can be incorporated into a vector which is replicable and expressible upon injection thereby producing the antigenic polypeptide in vivo. For example polynucleotides may be incorporated into a plasmid vector under the control
20 of the CMV promoter which is functional in eukaryotic cells. Preferably the vector is injected intramuscularly.

A further aspect of the invention is the use of the antibodies directed to the polypeptides of the invention for passive immunization, whereby an antibody raised by a
25 polypeptide of the invention is administered to a host in an amount sufficient to provide a passive immunization. One could use the antibodies described in the present application. Suitable antibodies may be determined using appropriate screening methods, for example by measuring the
30 ability of a particular antibody to passively protect against Moraxella infection in a test model. One example of

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

an animal model is the mouse model described in the examples herein. The antibody may be a whole antibody or an antigen-binding fragment thereof and may belong to any immunoglobulin class. The antibody or fragment may be of animal origin, specifically of mammalian origin and more specifically of murine, rat or human origin. It may be a natural antibody or a fragment thereof, or if desired, a recombinant antibody or antibody fragment. The term recombinant antibody or antibody fragment means antibody or antibody fragment which was produced using molecular biology techniques. The antibody or antibody fragments may be polyclonal, or preferably monoclonal. It may be specific for a number of epitopes associated with the Moraxella polypeptides but is preferably specific for one.

5 The use of a polynucleotide of the invention in genetic immunization will preferably employ a suitable delivery method or system such as direct injection of plasmid DNA into muscles [Wolf et al. H M G (1992) 1: 363; Turnes et al., Vaccine (1999), 17 : 2089; Le et al., Vaccine (2000) 18 : 1893; Alves et al., Vaccine (2001) 19 : 788], injection of plasmid DNA with or without adjuvants [Ulmer et al., Vaccine (1999) 18: 18; MacLaughlin et al., J. Control Release (1998) 56: 259; Hartikka et al., Gene Ther. (2000) 7: 1171-82; Benvenisty and Reshef, PNAS USA (1986) 83:9551; Singh et al., PNAS USA (2000) 97: 811], targeting cells by delivery of DNA complexed with specific carriers [Wa et al., J Biol Chem (1989) 264: 16985; Chaplin et al., Infect. Immun. (1999) 67: 6434], injection of plasmid complexed or encapsulated in various forms of liposomes [Ishii et al., AIDS Research and Human Retroviruses (1997) 13: 142; Perrie et al., Vaccine (2001) 19: 3301], administration of DNA with different methods of bombardment [Tang et al., Nature (1992) 356: 152; Eisenbraun et al., DNA Cell Biol (1993) 12: 791;

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

Chen et al., Vaccine (2001) 19: 2908], and administration of DNA with lived vectors [Tubulekas et al., Gene (1997) 190: 191; Pushko et al., Virology (1997) 239: 389; Spreng et al. FEMS (2000) 27: 299; Dietrich et al., Vaccine (2001) 19: 5 2506].

According to one aspect, the present invention provides the use of an antibody for prophylaxis and/or treatment of Moraxella infections.

In a further embodiment, the invention provides the use of a 0 pharmaceutical composition of the invention in the manufacture of a medicament for the prophylactic or therapeutic treatment of Moraxella infection.

In a further embodiment, the invention provides a kit 5 comprising a polypeptide of the invention for detection or diagnosis of Moraxella infection.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. All publications, patent applications, patents, and 10 other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

25 **EXAMPLE 1**

This example illustrates the cloning and molecular characteristics of SMC-1 gene and corresponding polypeptide.

The coding region of M. catarrhalis SMC-1 (SEQ ID NO: 1) gene was amplified by PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR 30 system 2400 Perkin Elmer, San Jose, CA) from genomic DNA of

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

M. catarrhalis strain ETSU C-2 using the following oligos that contained base extensions for the addition of restriction sites *Nco*I (CCATGG) and *Xho*I (CTCGAG): RIOS30 (5'- TARGTACCATGGCTGAACTCAATACCAGCCGTCA -3') and RIOS31 (5'- GGCATGCTCGAGGTAATCATGTCTCCAAGCATTTC -3'). PCR products were purified from agarose gel using a QIAquick gel extraction kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, Chatsworth, CA), and digested with *Nco*I and *Xho*I (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Baie d'Urfé, Canada). The pET21d(+) vector (Novagen, Madison, WI) was digested with *Nco*I and *Xho*I and purified from agarose gel using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen). The *Nco*I-*Xho*I PCR products were ligated to the *Nco*I-*Xho*I pET21d(+) expression vector. The ligated products were transformed into E. coli strain DH5 α [ϕ 80d*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *endA*1 *recA*1 *hsdR*17(*r_K*-*m_K*+) *deoR* *thi*-1 *supE*44 λ -*gyrA*96 *relA*1] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) according to the method of Simanis (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), pp. 109-135). Recombinant pET21d(+) plasmid (rpET21d(+)) containing SMC-1 gene was purified using a Qiagen kit and DNA insert was sequenced (Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit, ABI, Foster City, CA).

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR amplification of *M. catarrhalis* genes.

Genes	Primers I.D.	Restriction site	Vector	Sequence (SEQ ID No)
SMC-1	RIOS30	<i>Nco</i> I	pET21d (+)	5'- TATGTACCATGGCTGAACT CAATACCAGCGTTCA - 3' (SEQ ID No :5)
SMC-1	RIOS31	<i>Xho</i> I	pET21d (+)	5'- GGCATGCTCGAGGTAATCA TGICTCCAAGCATTTTG- 3' (SEQ ID No :6)
SMC-1	RIOS187	<i>Bgl</i> II	pCMV-GH	5'- GGCAGATCTTGGAATCAA TACCAGCCGTTTC-3' (SEQ ID No :7)
SMC-1	RIOS188	<i>Sal</i> I	pCMV-GH	5'- ACCGTTCGACTTAGTAATC ATGCTCCAAGCAT- 3' (SEQ ID No :8)
SMC-2	RIOS20	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5'- CGTACCAGCACATATGAAT AAACAAACGCCAATCAA- 3' (SEQ ID No :9)
SMC-2	RIOS21	<i>Xho</i> I	pET21b (+)	5'- GCCCATCTCGAGTTGCGAT TCTGTCTCTGCC-3' (SEQ ID No : 10)
SMC-2	RIOS189	<i>Bam</i> HI	pCMV-GH	5'- CGAGGATCCTAATAAACAA AACCCAATCAAAC- 3' (SEQ ID No : 11)
SMC-2	RIOS190	<i>Hind</i> III	pCMV-GH	5'- CAGAAGCTTTTATTGCGAT TCTGTCTCTGCC-3' (SEQ ID No : 12)

It was determined that the open reading frame (ORF) which
 5 codes for SMC-1 polypeptide contains 2781-bp and encodes a
 926 amino acid residues polypeptide with a predicted pI of
 6.31 and a predicted molecular mass of 104054.84 Da.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

Analysis of the predicted amino acid residues sequence (SEQ ID NO :2) using the Spscan software (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) suggested the existence of a 35 amino acid residues signal peptide
3 (MHTAHHRSKTYLTTAIRYALFGIASLPFVIPTYA), which ends with a cleavage site located between an alanine and a glutamic acid residues.

To confirm the presence by PCR amplification of SMC-1 (SEQ ID NO: 1) gene, the following 3 distinct M. catarrhalis
0 strains were used: M. catarrhalis ETSU C-2, ETSU T-25, and ETSU 658 clinical isolates were provided by the East Tennessee State University. The E. coli XL1-Blue MRF' was used in these experiments as negative control. SMC-1 (SEQ ID NO :1) gene was amplified by PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp
5 PCR system 2400 Perkin Elmer) from genomic DNA from the 3 M. catarrhalis strains, and the control E. coli strain using the oligonucleotides primers RIOS30 and RIOS31 (Table 1). PCR was performed with 5 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 47°C and 3 min at 68°C followed by 30 cycles of 15 sec at
10 94°C, 30 sec at 63°C and 3 min at 68°C and a final elongation period of 5 min at 68°C. The PCR products were size fractionated in 1% agarose gels and were visualized by ethidium bromide staining. The results of these PCR amplifications are presented in Table 2. The analysis of the
15 amplification products revealed that SMC-1 (SEQ ID NO :1) gene was present in the genome of all of the 3 M. catarrhalis strains tested. No such product was detected when the control E. coli DNA was submitted to identical PCR amplifications with these oligonucleotide primers.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

Table 2. Identification of *M. catarrhalis* genes by PCR amplification.

Strain Identification	Identification by PCR amplification of	
	SMC-1	SMC-2
ETSU C-2	+	+
ETSU 658	+	+
ETSU T-25	+	+
<i>E. coli</i>	-	-

EXAMPLE 2

5 This example illustrates the cloning and molecular characteristics of SMC-2 gene and corresponding polypeptide.

The coding region of *M. catarrhalis* SMC-2 (SEQ ID NO: 3) gene was amplified by PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer) from genomic DNA of *M. catarrhalis* strain ETSU C-2 using the following oligos that contained base extensions for the addition of restriction sites *Nde*I (CATATG) and *Xho*I (CTCGAG): RIOS20 and RIOS21, which are presented in Table 1. The methods used for cloning SMC-2 gene into an expression vector and sequencing are similar to the methods described in Example 1.

It was determined that the open reading frame (ORF) which codes for SMC-2 contains 957-bp and encodes a 318 amino acid residues polypeptide with a predicted pI of 5.78 and a predicted molecular mass of 35954.10 Da. Analysis of the predicted amino acid residues sequence (SEQ ID NO :4) using the Spscan software (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) suggested the existence of a 47 amino acid residues signal peptide (VCKIMSKIPMMNEKYFRROALYWLIAAAIMAGLWLIVWLTSSVPAMI), which

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

ends with a cleavage site located between an isoleucine and an asparagine residues.

The SMC-2 gene was shown to be present after PCR amplification using the oligonucleotide primers RIOS20 and RIOS21 in the 3 M. catarrhalis strains tested (Table 2). The methods used for PCR amplification of the SMC-2 gene were similar to the methods presented in Example 1. No such product was detected when the control E. coli DNA was submitted to identical PCR amplification with these oligonucleotide primers.

EXAMPLE 3

This example illustrates the cloning of M. catarrhalis genes in CMV plasmid pCMV-GH.

The DNA coding regions of M. catarrhalis polypeptides were inserted in phase downstream of a human growth hormone (hGH) gene which was under the transcriptional control of the cytomegalovirus (CMV) promoter in the plasmid vector pCMV-GH (Tang et al., Nature, 1992, 356 :152). The CMV promoter is non-functional plasmid in E. coli cells but active upon administration of the plasmid in eukaryotic cells. The vector also incorporated the ampicillin resistance gene.

The coding regions of SMC-1 (SEQ ID NO: 1) and SMC-2 (SEQ ID NO: 3) genes without their leader peptide regions were amplified by PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer) from genomic DNA of M. catarrhalis strain ETSU C-2 using oligonucleotide primers that contained base extensions for the addition of restriction sites *Bam*HI (GGATCC), *Bgl*III (AGATCT), *Sal*I (GTCGAC), or *Hind*III (AAGCTT) which are described in Table 1. The PCR products were purified from agarose gel using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen), and digested with restriction enzymes

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

(Amersham Pharmacia Biotech, Inc). The pCMV-GH vector (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas) was digested with *Bam*HI, *Eg*II, *Sa*II, or *Hind*III and purified from agarose gel using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen). The digested DNA fragments were ligated to the digested pCMV-GH vector to create the hGH-SMC-1 and hGH-SMC-2 fusion polypeptides under the control of the CMV promoter. The ligated products were transformed into *E. coli* strain DH5 α [ϕ 80dlac Δ M15 Δ (*lacZ*YA-argF) U169 *endA*I *recA*I *hsdR*17(*r_m*⁺) *deoR* *thi*-1 *supE*44 λ *gyrA*96 *relA*1] (Gibco BRL) according to the method of Simanis (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), pp. 109-135). The recombinant pCMV plasmids were purified using a Qiagen kit, and the nucleotide sequences of the DNA inserts were verified by DNA sequencing.

EXAMPLE 4

This example illustrates the use of DNA to elicit an immune response to *M. catarrhalis* polypeptide antigens.

A group of 8 female BALB/c mice (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) were immunized by intramuscular injection of 100 μ l three times at two- or three-week intervals with 50 μ g of recombinant pCMV-GH encoding SMC-1 (SEQ ID NO: 1) and SMC-2 (SEQ ID NO: 3) genes in presence of 50 μ g of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmid pCMV-GH-GM-CSF (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas). As control, a group of mice were injected with 50 μ g of pCMV-GH in presence of 50 μ g of pCMV-GH-GM-CSF. Blood samples were collected from the orbital sinus prior to each immunization and seven days following the third injection. Serum antibody responses were

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

determined by ELISA using the corresponding His-Tag labeled M. catarrhalis recombinant polypeptides as coating antigen. The production and purification of these His-tag labeled M. catarrhalis recombinant polypeptides are presented in

5 Example 5.

EXAMPLE 5

This example illustrates the production and purification of M. catarrhalis recombinant polypeptides.

The recombinant pET21 plasmid with SMC-1 (SEQ ID NO: 1) and
0 SMC-2 (SEQ ID NO: 3) genes were used to transform by
electroporation (Gene Pulser II apparatus, BIO-RAD Labs,
Mississauga, Canada) E. coli strain AD494 (DE3) [Δ ara-
1eu7697 Δ lacX74 AphoA PvuII phoR Δ malF3 F' [lac⁺(lacI^q) pro]
5 trxB::Kan (DE3)] (Novagen). In this strain of E. coli, the
T7 promoter controlling expression of the recombinant
polypeptide is specifically recognized by the T7 RNA
polymerase (present on the λ DE3 prophage) whose gene is
under the control of the lac promoter which is inducible by
isopropyl- β -d-thio-galactopyranoside (IPTG). The
10 transformant AD494(DE3)/ rpET21 was grown at 37°C with
agitation at 250 rpm in LB broth (peptone 10g/L, yeast
extract 5g/L, NaCl 10g/L) containing 100 μ g of carbenicillin
(Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Canada) per ml until
the A₆₀₀ reached a value of 0.5. In order to induce the
25 production of His-tagged M. catarrhalis recombinant
polypeptides, the cells were incubated for 3 additional
hours in the presence of IPTG at a final concentration of 1
mM. Induced cells from a 500 ml culture were pelleted by
centrifugation and frozen at -70°C.
30 The purification of the recombinant polypeptides from the
soluble cytoplasmic fraction of IPTG-induced

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

AD494 (DE3)/rpET21 was done by affinity chromatography based on the properties of the His•Tag sequence (6 consecutive histidine residues) to bind to divalent cations (Ni^{2+}) immobilized on the His•Bind metal chelation resin. Briefly, the pelleted cells obtained from a 500 mL culture induced with IPTG was resuspended in lysis buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.9) containing 1mM PMSF, sonicated and centrifuged at 12,000 X g for 20 min to remove debris. The supernatant was deposited on a Ni-NTA agarose column (Qiagen). The His-tag labeled M. catarrhalis recombinant polypeptides were eluted with 250 mM imidazole-500mM NaCl-20 mM Tris pH 7.9. The removal of the salt and imidazole from the sample was done by dialysis against PBS at 4°C. The quantities of recombinant polypeptides obtained from the soluble fraction of E. coli was estimated by MicroBCA (Pierce, Rockford, Illinois).

EXAMPLE 6

This example illustrates the reactivity of the His-tagged M. catarrhalis recombinant polypeptides with antibodies present in human palatine tonsils.

As shown in Table 3, SMC-1 and SMC-2 His-tagged recombinant polypeptide were recognized in immunoblots by the antibodies present in the human palatine tonsils. It indicates that humans, which are normally in contact with M. catarrhalis do develop antibodies that are specific to these polypeptides. These particular human antibodies might be implicated in the protection against M. catarrhalis infection.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

Table 3. Reactivity in immunoblots of antibodies present in human palatine tonsils with *M. catarrhalis* His-tagged fusion recombinant polypeptides.

Purified recombinant polypeptide I.D. ¹	Apparent molecular weight (kDa) ²	Reactivity in immunoblots with antibodies present in human palatine tonsils ³
SMC-1	104	+
SMC-2	36	+

5 ¹His-tagged recombinant polypeptides produced and purified as described in Example 5 were used to perform the immunoblots.

²Molecular weight of the His-tagged recombinant polypeptide was estimated after SDS-PAGE.

³Extracts from human palatine tonsils were not diluted in
10 order to perform the immunoblots.

EXAMPLE 7

This example illustrates the accessibility to antibodies of the SMC-1 and SMC-2 polypeptides at the surface of *M. catarrhalis* strain.

15 Bacteria were grown in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 1 % dextrose at 37°C in a 8% CO₂ atmosphere to give an OD_{490nm} of 0.650 (~10⁸ CFU/ml). Dilutions of anti-SMC-1 or anti-SMC-2 or control sera were then added and allowed to bind to the cells, which were incubated for 2 h at 4°C
20 with rotation. Samples were washed 4 times in blocking buffer [phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% bovine serum albumin (BSA)], and then 1 ml of goat fluorescein (FITC)-conjugated anti-mouse IgG Fc (gamma) fragment specific diluted in blocking buffer was added. After an

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

additional incubation of 60 min at room temperature with rotation in the dark, samples were washed 4 times in blocking buffer and fixed with 0.25 % formaldehyde in PBS buffer for 18 h at 4°C. Cells were centrifuged and
5 resuspended in 0.5 ml of PBS buffer. Cells were kept in the dark at 4°C until analyzed by flow cytometry (Epics® XL; Beckman Coulter, Inc.). Flow cytometric analysis revealed that SMC-1- and SMC-2-specific antibodies efficiently recognized their corresponding surface exposed epitopes on
.0 the homologous (ETSU C-2) M. catarrhalis strain tested (Table 4). It was determined that more than 89 % of the 10,000 Moraxella cells analyzed were labeled with the antibodies present in the SMC-1- and SMC-2-specific sera. In
15 addition, antibodies present in the pool of SMC-1- and SMC-2-specific sera attached at the surface of ETSU 658 strain of M. catarrhalis (Table 4). It was also determined that more than 90% of the 10,000 cells of this strain were labeled by the specific antibodies. These observations clearly demonstrate that the SMC-1 and SMC-2 polypeptides
20 are accessible at the surface, where they can be easily recognized by antibodies. Anti-M. catarrhalis antibodies were shown to play an important role in the protection against M. catarrhalis infection.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

Table 4. Evaluation of the attachment of SMC-1- and SMC-2-specific antibodies at the surface of intact cells of M. catarrhalis.

Serum Identification	Strains	Fluorescence Index ²	% of labeled cells ³
Pool of SMC-1-specific sera ¹	ETSU C-2	19.8	96.1
	ETSU 658	15.2	93.1
Pool of SMC-2-specific sera	ETSU C-2	11.0	89.8
	ETSU 658	11.9	90.5
Pool of negative control sera ⁴	ETSU C-2	1.0	1.0
	ETSU 658	1.0	1.0
Positive control serum ⁵	ETSU C-2	25.0	97.4
	ETSU 658	19.6	93.3

5

¹ The mice were injected subcutaneously five times at two-week intervals with 20 µg of purified recombinant polypeptides mixed with 10 µg of QuilA adjuvant (Cedarlane Laboratories, Hornby, Canada). The sera were diluted 1/50.

10 ² The fluorescence index was calculated as the median fluorescence value obtained after labeling the cells with an immune serum divided by the fluorescence value obtained for a control mouse serum. A fluorescence value of 1 indicated that there was no binding of antibodies at the surface of
15 intact Moraxella cells.

³% of labeled cells out of the 10,000 cells analyzed.

⁴ Sera collected from unimmunized or sham-immunized mice were pooled, diluted 1/50, and used as negative controls for this assay.

20 ⁵Serum obtained from a mouse immunized with 20 µg of purified outer membrane polypeptides from M. catarrhalis strain ETSU-

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

C2 was diluted 1/1000 and was used as a positive control for the assay.

EXAMPLE 8

This example illustrates the bactericidal activities of anti-SMC-1 and anti-SMC-2 mouse sera.

Bacteria were plated on chocolate agar plate and incubated at 37°C in a 8% CO₂ atmosphere for 16 h. Bacterial cells were then resuspended in bacteriolysis buffer [10% Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) and 1% hydrolyzed casein, pH 7.3] to an OD_{490nm} of 0.25 and diluted to 8 x 10⁴ CFU/ml. The bactericidal assay was performed by mixing 25 µl of the bacterial suspension with 50 µl of diluted heat-inactivated test serum and 15 µl of HBSS and incubating for 15 min at 37°C, 8% CO₂ with agitation (200rpm). The rabbit complement-containing serum was then added to a final concentration of 10%, and the mixture was incubated for an additional 60 min at 37°C, 8% CO₂ with agitation (200rpm). At the end of the incubation period, the number of viable bacteria was determined by plating 10µl of the assay mixture on chocolate agar plate. The plates were incubated at 37°C in an 8% CO₂ atmosphere for 18-24 h. The control consisted of bacteria incubated with heat-inactivated sera collected from mice before immunization and rabbit complement. The bactericidal titer was determined as the highest serum dilution resulting in killing of 50 % or more of the bacteria compared to the control. The M. catarrhalis strain ETSU 658 was used to evaluate the bactericidal activity of the sera. Bactericidal activity against M. catarrhalis strain ETSU 658 was detected in sera collected from mice immunized five times with 20µg of purified recombinant SMC-1 or SMC-2 polypeptides.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

EXAMPLE 9

This example illustrates the protection of mice against M. catarrhalis infection induced by immunization.

Groups of 10 female BALB/c mice (Charles River) were immunized subcutaneously five times at two-week intervals with 20 µg of affinity purified His-tagged M. catarrhalis recombinant polypeptides in presence of 10% of QuilA adjuvant (Cedarlane Laboratories Ltd) or, as control, with QuilA adjuvant alone in PBS. Blood samples were collected from the orbital sinus on day 0, 14, 28, 42, and 56 prior to each immunization and 14 days (day 70) following the fifth injection. One week later the mice were challenged intrapulmonary with approximately 1×10^6 CFU of the M. catarrhalis strain ETSU 658. Samples of the M. catarrhalis challenge inoculum were plated on chocolate agar plates to determine the CFU and to verify the challenge dose. Mice were killed by an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (EuthanylTM) 5h after infection. The intact lungs were excised and homogenised in a tissue homogeniser. The lung homogenate were assessed for bacterial clearance by plating of serial dilutions for CFU determination.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

CLAIMS:

1. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide chosen from:
- (a) a polynucleotide encoding a polypeptide having at
5 least 70% identity to a second polypeptide comprising a
sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or
analogs thereof;
- (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at
0 least 80% identity to a second polypeptide comprising a
sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or
analogs thereof;
- (c) a polynucleotide encoding a polypeptide having at
least 95% identity to a second polypeptide comprising a
sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or
.5 analogs thereof;
- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising
a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or
analogs thereof;
- (e) a polynucleotide encoding a polypeptide capable of
20 raising antibodies having binding specificity for a
polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS:
2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (f) a polynucleotide encoding an epitope bearing
portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from
25 SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from
SEQ ID NOS: 1, 3 or fragments or analogs thereof;

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

- (h) a polynucleotide that is complementary to a polynucleotide in (a), (b), (c), (d), (e), (f) or (g).
2. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide chosen from:
- 5 (a) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a
0 sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (c) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising
15 a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (e) a polynucleotide encoding a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;
- 20 (f) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 1 or 3;
- 25 (h) a polynucleotide that is complementary to a polynucleotide in (a), (b), (c), (d), (e), (f) or (g).
3. The polynucleotide of claim 1, wherein said polynucleotide is DNA.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

4. The polynucleotide of claim 2, wherein said polynucleotide is DNA.
5. The polynucleotide of claim 1, wherein said polynucleotide is RNA.
- 5 6. The polynucleotide of claim 2, wherein said polynucleotide is RNA.
7. An isolated polynucleotide that hybridizes under stringent conditions to either
- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
- .0 (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;
- wherein said polypeptide comprises a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4 or fragments or analogs thereof.
8. The polynucleotide of claim 1 that hybridizes
- 15 under stringent conditions to either
- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
- (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;
- wherein said polypeptide comprises a sequence chosen from
- 20 SEQ ID NOS: 2 or 4 or fragments or analogs thereof.
9. The polynucleotide of claim 2 that hybridizes under stringent conditions to either
- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
- (b) the complement of a DNA sequence encoding a
- 25 polypeptide;

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

wherein said polypeptide comprises a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4.

10. The polynucleotide of claim 1 that hybridizes under stringent conditions to either

- 5 (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
(b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;

wherein said polypeptide comprises at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising a sequence
.0 chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4 or fragments or analogs thereof.

11. The polynucleotide of claim 2 that hybridizes under stringent conditions to either

- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or
15 (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;

wherein said polypeptide comprises at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4.

20 12. A vector comprising the polynucleotide of claim 1, wherein said DNA is operably linked to an expression control region.

13. A vector comprising the polynucleotide of claim 2, wherein said DNA is operably linked to an expression control
25 region.

14. A host cell transfected with the vector of claim 12.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

15. A host cell transfected with the vector of claim 13.
16. A process for producing a polypeptide comprising culturing a host cell according to claim 14 under conditions suitable for expression of said polypeptide.
17. A process for producing a polypeptide comprising culturing a host cell according to claim 15 under condition suitable for expression of said polypeptide.
18. An isolated polypeptide comprising a polypeptide chosen from:
- (a) a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (b) a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (c) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (d) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (e) a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (f) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof;

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

- (g) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f) wherein the N-terminal Met residue is deleted;
- (h) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e), or (f) wherein the secretory amino acid sequence is deleted.
- 5 19. An isolated polypeptide comprising a polypeptide chosen from:
- (a) a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;
- .0 (b) a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (c) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID
15 NOS: 2 or 4;
- (d) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (e) a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence
20 chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (f) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4;
- (g) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e) or (f) wherein the N-terminal Met residue is deleted;
- 25 (h) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e), or (f) wherein the secretory amino acid sequence is deleted.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

20. A chimeric polypeptide comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2, 4 or fragments or analogs thereof; provided that the polypeptides are linked as to formed a chimeric polypeptide.
- 5 21. A chimeric polypeptide comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NOS: 2 or 4 provided that the polypeptides are linked as to formed a chimeric polypeptide.
22. A pharmaceutical composition comprising a
10 polypeptide according to any one of claims 18 to 21 and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or adjuvant.
23. A method for prophylactic or therapeutic treatment of Moraxella infection in a host susceptible to Moraxella infection comprising administering to said host a
15 prophylactic or therapeutic amount of a composition according to claim 22.
24. A method according to claim 23 wherein the host is a neonate, an infant or a child.
25. A method according to claim 23 wherein the host is
20 an immunocompromised host.
26. A method according to claim 23 wherein the host is an adult.
27. A method for therapeutic or prophylactic treatment of otitis media, sinusitis, persistent cough, acute
25 laryngitis, suppurative keratitis, conjunctivitis neonatorum, and invasive diseases comprising administering to said host a therapeutic or prophylactic amount of a composition according to claim 22.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

28. A method for diagnostic of Moraxella infection in an host susceptible to Moraxella infection comprising
- (a) obtaining a biological sample from a host;
 - (b) incubating an antibody or fragment thereof
- 5 reactive with a polypeptide according to any one of claims 18 to 21 with the biological sample to form a mixture; and
- (c) detecting specifically bound antibody or bound fragment in the mixture which indicates the presence of Moraxella.
- .0 29. A method for the detection of antibody specific to a Moraxella antigen in a biological sample containing or suspected of containing said antibody comprising
- (a) obtaining a biological sample from a host;
 - (b) incubating one or more polypeptides according to
- 15 any one of claims 18 to 21 or fragments thereof with the biological sample to form a mixture; and
- (c) detecting specifically bound antigen or bound fragment in the mixture which indicates the presence of antibody specific to Moraxella.
- 20 30. Use of the pharmaceutical composition according to claim 22 in the manufacture of a medicament for the prophylactic or therapeutic treatment of Moraxella infection.
31. Kit comprising a polypeptide according to any one
- 25 of claims 18 to 21 for detection or diagnosis of Moraxella infection.

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

Figure 1

```

1  ATGCACACCG CTCATCACCA TCGCTCAAAG ACATATTTGA CTACCGCTAT TCGTTACGGCA
61  CTATTTGGTA TCGCCAGTTT GCGATTTGTC ATACCAACTT ATGCAGAACT CAATACCAGC
121  GCTTCACTGA CAGTCGTTGG TGTGACAGC TCAAAAAATT TGCCATGATC ACCAAMTACC
181  AAACCCAAATA CIGTCTTAGC CTTAGACGCC CATCTACAAA GTCCATGATG TACTGCCAAT
241  GCCTTTGATG GCTTTGATTT TGAAGTTATC ACACGACAGG CAGCCGAGCA GACAGCAGAT
301  CAAGCAAATC AAGCCAAATC TCAGATGAGC CAGCTTGAAC CCTTTGCTAG TAAGTCAGAC
361  AATCCAAAGT TAACACATGC CAGGCTGAGC GATAGCATG ATACACCCTC TGCCAGTAAA
421  AGCTTAGCCA AATTAGCCGA AAACCTACAT ATTAGTCCG ATCCAGCCG TCATCGTTGT
481  CAGGCTATCT GGATGCGGCC AATCCACCAA GCAACACRCA CAAACCCGCC TACCACCCCA
541  AAATCGGATG AAATGCTAA TCCGATTACA GAAGATGSTA TTTTGTCTCA AGCTGATTAT
601  GGATATTTAG ACGCTCAAAC TTATGCGGAA CTGTCTGGCA ATGCTATTAT GGRACAAAAC
661  GGTCCGGCTG TAACCGCTGA TAAGCTTACT TTAGACACC AAACAGGGCA AGCCTGCGG
721  TCAGGCTAAG TACAATTTAG TGATGCGGCT GCAATGATC ACAGTGTGG CATTTTGGC
781  ATGGCTGAAA ACTTAGTATA CCATACAGAT GGTCCAGAC AAATGATAA AATPAGCAGT
841  TTTGCAAGCA CTACCAATCA TGCTCACGGT TATGCCAGT TATGCCAGT CACCCACAGA ACCCAATGG
901  AGCCAAATAT GGTTCACACA TGTCAATGTC ACCACCTGTC CACCCACAGA ACCCAATGG
961  TACTTAGATA CTGATAGCAT TGATATCAAT ACCGATACAG GTCTGTCTAT CCGCAAAAT
1021  ACCACCTTGC GTATCAAAAA AGTACCTGTC TTTTACCTGC CCTATTTTAA CTTTCCGATC
1081  GATGCTCGTC GCTCTCTGG ATTTTATTA CCATCAATG GATTTGGTGC ATCGGACAGT
1141  TTTGAAATTA GTACGCCTTA TTATCTGAAT TTGGCACCAG ATTAGTATGC AACCAATAG
1201  CCACTGTAT T'ACTAACCG CAATCCTATG CTGACTGCGG AATTTCGTTA TCTGACCCAA
1261  GATTATGGAT CAGGGGTGTT GACTGCTGCG TATCTTCCAA AAGATCAGCA ATATCATGAT
1321  AANGACCGTA GCCGAATACA ATTTGATCAT ACATGGCAAC CCAAGCAGTT TGATAAAAT
1381  ACCACTTACG CACAATATCA ATCTGTTCT' GATGCCAAT' ATTTATCAGA CTTTAAATGC
1441  T'GGGTGTTG AGAGTCTAA GCTAAATCTA CCAAGACGCA TCGGCACAGG CTTCTGGAT
1501  GAAATGPTCT CAGCTGATTT AAGATTGAA GATTTTCAGC GTTTAGACGG TTTTGGCTTA
1561  GATGTCGGC CAATFACAGA CAAAGATAGA CCATATGCAC GCCTACCACA GCTATCGTC
1621  AACTATCGTT TGCCTCGCAT ATGGATGGGT ACACCCAGCG GTCTTGAAC' GGTGTTGAT
1681  CATAAT'CTG CCTA'ITCAA AAAATCCATT AAAGATAACT CTGACCAGA AAAAAGCGGT
1741  GGTAGATAAT TTAGCCAAIT CACAGCCAGT TATCCACT'GC TCGCTCTTG GGT'ATTTG
1801  ACCCCAAAAC TTAGCCTGAC ACATCTATAT ACCAGCTATG ACCAAGACAG CTTAGCCGAC
1861  CAAATATATC CTAGNAAAA TGCTGCCAT TCGGTATTTG CACCCAGCGT CAGCTTGGAT
1921  GCTGCGGTAT TTTTQAAAA AGCGGGTCCA CCAFTTGGCA TGCATCAAGA TACAGTGGC
1981  TATCAAGTAC TGACACCAAG ATTACACTAT ACTTACACGC CTTTAAAGA TCAACACAAT
2041  GTACCAAAT TTAGACAAA AATTGCACAG CTTAGCTATG AGCAGCTTTT GAACAATAAC
2101  TGGTTTTTGG GTCATGATGC CATTCAAGAT TTAGACGCCG TCACGCCTGC AGTCAGTAC
2161  CGTATATAG ATAAAAITGG CAGGACAGC TTTGAAGCGG GATCCGAGA ACAGATTTTA
2221  TTGATCTATA TCCGTTTGG TATCATGAC AGCCAAAGCT ATAGCAGCAG AAGCTCTTGT
2281  TTGCGMGGC AAGCCAGCCT ACAGCCAAA GACAA'ITAT GGTTTGATGC ATCAGTTCGA
2341  TTFAGAACAA ATTAGATTT' GAGCAGTATT GTGGCACAAA TCGCTATGC TCCAGTGTAT
2401  CGTAAGT'AT TTAACCTAGG TATTGTCBAA AGAANAAGAAA ATCGTGC'IT' TAATCAATCA
2461  GCA'TFACAG CATPACTGCG CTCCGCCATT TTTCCAA'CA ATATCGCTG CCGTATGATG
2521  GGTCAACTAC AATAGSACTA CRACTTAGAT TATGTCATGG ATTC'IT'AT GGGCTAAT
2581  TATGAAGATT GCTGTTATGG TTTGTCAATC TATGCRAGAC GCTATCGTGA TGCTTCAAT
2641  CCACTATTTA CACTGATAC TGCAGLAATG GCAGAAITTC GCCTAAACGG TATCGGTGGC
2701  GCGGTGCTT TGAATCGACT TTTGAGCGAA AAGGTACTAG GCTATGATCA GGTTCGAAAT
2761  GCTTGGAGAC ATGATTACTA A (SEQ ID No : 1)

```

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

Figure 2

```

1 MHTAHHRK TYLTTAIRYA LFGIASLPEV IPTYAEIINTS RSLTVVQADS SKNLEDTFMT
61 KFNVLALDA HLQSHDDTAN AFDGDFEVI TQQAABQTSS QANQGNHOMS QLDAFASKSD
121 NPSLNTARLT DKHDTFSASK SLAKLAENYH IKSDFDAHRC QGMWQPIHQ ATHNRPITP
181 KLDENGNPIT EDGIFPAQADY GYDAQTYAE LSGNVLMQON GRRVTADKLT LDTQTGQATA
241 SQQVQFSDGG ASDHSAGIIG MAENLVYHTD GQTATAQDVA FASTTINAHG YASQMDKISS
301 SBYRLQVMP TTCPTTERKW YLDTDSIDIN TDTGRAIAKN TTRIKKIVFV FYLPYFNFFI
361 DARRSSGRLI PSMGFGASDS FEISTPYILN LAPDYDATIT PTVFNINFM LTGFRYLTQ
421 DYGGVLTAS YLPKQVYHD KDRSRIQFDH TWQPKQFDKI TTYAQVQSVS DANYLSDPNA
481 LGVESAKLNL PRRIGTSPFD ENVSADLRPE DFQRIDGFLG DGRPITDKR PYARLPQLSV
541 NYRFRINWNG TPGSLELGGI HNSAYFKKSI KDNSEPEKGG GRIFNFTAS YPLLRSGYL
601 TKLSLTHLY TSYDEDSLAD ONTAKKGRH SVFAPVSLD AGLFEBKAGA PFGVHQTGG
661 YQVLTFRLHY TYTFFKQHW VNFPTKIQD LSYEQLLMNN WFLGHRIDQ LHAVTPAVSY
721 FYDKWGRTR FEGGIARQIL LSHLVGINO SESYSSRSSG LAWQASLQPK DNLWFDASGS
781 FRTNYLSSI VAQRVYRPSD RKLNLGIVK RKENRAFQNS ALSAYTASAI FFINNRWRMM
841 GQLQYDYNLD YVMDSLMGLN YEDCCYGLSI YARRYRDAFN PHLSPDTAVM ABLVRLNGIGG
901 GGRNLRLLE KVLGYDQVRN AWRHDY* (SEQ ID No : 2)

```

Figure 3

```

1 GTGGGTAAAA TTATGTCAA AATTCOCATG ATGAATGAAA AGTATTTTCG TCGTCAGGCA
61 CTTTATGGGT TGATGCGGC GCCTATCATG GCAGGCTTGT GOTTGATTGT TTGGTIGACC
121 AGCTCCGTAC CAGCAATGAT TAATAACAA AACGCCAATC AACATCGTC CTATGTTGG
181 ACATTGCCGA CCACAATCAC AGCGTTAANT GAGCTTGATC ATGTGTGTTAA GCCCATGGAT
241 AATTCCGCAC TTGTGGGAGA CTTACGCAAC TATCCACCTG AATTTAAGGA CAAAGTTTAT
301 TTTAATGGTA TTATGGTTCG TTATACCATT GAGCTGATG ATGTTACCGA AAATGAAGTT
361 ATCTGGGATT ATCTAACAG CCGAGAGAT CGTAAACAIT TTGCTIATTT TCGCTATACT
421 GATGCCAATG ATAATAAGCG ATATGTACTG ACTTATGGTA AATTTACCAG TCCAGCTGAT
481 GCAGAACTCG CTTTGCAAAC CGTAAATTTI AGACTGCCAA AATCAGTGAT ACAAAAGACC
541 ACCAAATCT CTGAGTTGGT CGCAGATGAT GACAATTAAT AATGGGTCA AGATGTGGTG
601 GATTTGGCAG ACTTCCAGCC TCGCCGAGTT CGCCTGCAAG CGACCGGTAC CGAARTTCCA
661 GTCAAAGCGG CCACGCCAGC AGATGAAGAA TTGGCAGGCC TAAGCCGTGA GCGTGCATTA
721 CAAACACAAA TTTCCAGCA AACTGAGTCG GTCAGGCAGC CGACTGATTT GGATATCCAA
781 AACGATATCA ATCGTTTGTG TAATCAAGA TCTCAAGTCA GCTCTAGCGA TTTCCTATG
841 GCACCAACTG CACGCCACG GTCACCGCAG CAAACAGCCG ATATAGTACC CAAAAATGAA
901 ATATCTAAG GCATGACACC AACCCAAAGC CATTCCGCG AGACAGATC GCAATAA
(SEQ ID No : 3)

```

Figure 4

```

1 VQKIMSKLPM MNEKYFRRQA LYWLIAAAM AGLWLVWLT SSVFAMINKO NAMQISSYVA
61 TLPFTTALN ELDHVVKPMD NSALVRLRN YPPEFKIKVY FNGISGRYTI ELMVITENEV
121 IVDYLSRED RNFVYFRYT DANDNKRYVL TYGKFTSPAD AESALQTVNF RLPKSVIQKT
181 TKISLAVVM DNYELGQDVT DLADFPQRRV RLQATREIP VKAATPADEB LARLSRERAL
241 QTQISQVTS VRQPTDLDIQ MDINRLSNQR SQVSSDLPM APTARQSPQ QTADIVPKNE
301 ISKGTAPTQS HSABTESQ* (SEQ ID No : 4)

```

WO 03/018052

PCT/CA02/01315

SEQUENCE LISTING

<110> Shire Biochem Inc.

<120> MORAXELLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS POLYPEPTIDES AND CORRESPONDING DNA FRAGMENTS

<130> 74872-86

<150> US 60/314,634

<151> 2001-08-27

<160> 14

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 2781

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 1

atgcacaccg	ctcaltcaacca	tcgctcaaaag	acatatttga	ctaccgctat	tcggttacgca	60
ctatttggta	tcgccagttt	gccatttgtc	ataccaaatt	atgcagaact	caataccagc	120
cgttcaactga	cagtcgttgg	tgctgcacgc	tcaaaaaatt	tgcttgatgc	accacaatacc	180
aaaccocaata	ctgtcttagc	cttagacgoc	catctacaaa	gtcatgatga	tactgccaat	240
gcotttgatg	gctttgattt	tgaagtatc	acacagcagg	cagccgagca	gacaagcagt	300
caagcaaatc	aagccaatca	tcagatgagc	cagcttgacg	cctttgotag	taagtcagac	360
aatccaagt	taaacactgc	caggctgacg	gataagcatg	atacaccctc	tgccagttaa	420
agcttagcca	aattagccga	aaactaccat	attaagtccg	atccagaagc	tcactgttgt	480
caggtatgt	ggatgcagcc	aatccaccaa	gcacacacaca	caaacggccc	taccaccca	540
aaactggatg	aaaatggtaa	tcggattaca	gaagatggta	tttttgctca	agctgattat	600
ggatattatg	acgtcaaac	ttatgccgaa	ctgtctggca	atgtcattat	ggacaaaac	660
ggtcggcgtg	taacocgtga	taagcttaact	ttagacaccc	aaacagggca	agcactgag	720
tcaggtcaag	tacaatttag	tgatggcggg	gcaagtgatc	acagtgtcgg	catbattggc	780
atggctcaaa	acttagtata	ccatacagat	ggtcagacag	cgaccgcaca	agatgtgct	840
tttgcaagca	ctaccatcaa	tgctcaocgtg	tatgccagtc	caaccacaga	acgcaaatgg	900
agcgaatata	ggctcaaca	tgctatgttc	accacctgtc			960
tacttagata	ctgatagcat	tgatatcaat	accgatacag	gtcgtgtgat	cgcaaaaatt	1020
accaccttgc	gtatcaaaaa	agtacctgtc	ttttacctgc	ctatatttaa	ctttccgac	1080
gatgctcgtc	gctctctcgg	alttttatka	ccataaatgg	gattbgttgc	atcggacagt	1140
tttgaataa	gtacgcctta	ttatctctatg	ctgactggcg	aattctglla	totgaccca	1200
ccaacttgat	ttactaaccc	caatctctatg	ctgactggcg	aattctglla	totgaccca	1260
gattatggat	caggggtggt	gaactctctg	tatcttccaa	agatcagca	atatactgat	1320
aaagaccgta	gccgaataca	atttgatcat	acatggcaac	ccaagcagtt	tgataaaaatt	1380
accacttacg	cacaatata	attctgttct	gatgccaatt	atttatcaga	ctttaatgcc	1440
ttgggtgttg	agagtgctaa	gctaaatcta	ccaagacgca	tcggcacaa	ctttctggat	1500
gaaaaatgct	cagctgattt	aaagattgaa	gattttcagc	gttttagacg	ttttggctta	1560
gatggcggc	caactacaga	caaaagataga	ccatagcac	gectaccaca	getatcgctc	1620
aaactatgct	tgctctgcat	atggatgggt	acaccacgcg	gtcttgaact	gggtgtgatt	1680
cataattctg	actatttcaa	aaantccatt	aaagataact	ctgaaccaga	aaaaagcgg	1740
ggtagatatt	ttaaaccaat	cacagccagt	latccactgc	ttcgtctctg	gggttatttg	1800
acgcacaac	ttagcctgac	acatctatat	accagctatg	acgaagacag	cttagccgac	1860
caaaaattctg	ctaaagaaaa	tggtctgcat	tcggtatttg	caccagcgg	cagcttgat	1920
gctgggctat	tttttgaaaa	agcgggtgca	ccatttggca	tgcatcaaga	tacaggtggc	1980
latcaagtac	tgacaccacag	attcaactat	acttacacgc	cttttaaga	tcaacacaat	2040
gtaccaaat	ttgagaacaa	aattgcacag	cttagctatg	agcagctttt	gaacaataac	2100
tggtttttgg	gtacatgatg	cattcaagat	ttacagccgc	tcagcctgc	agtcagctac	2160
cgttatatag	ataaaatggg	caggaacacg	tttgaaggcg	ggatcgcaga	acagatttta	2220
ttgagtcata	tcctgttggg	tatcaatgac	agcgaagcct	atagcagcag	aaactctggt	2280
ttggcatggc	aagccagcct	acagccaaaa	gacaatttat	ggtttgatgc	atcaggttca	2340
tttagaaca	attatgattt	gagcagattt	gtggcacaaa	ttcgctatgc	tccaagtgat	2400

WO 03/018052 PCT/CA02/01315
 cgtaagttat ttaacctagg tattgtcaaa agnaagaaa atcgtgcttt taatcaatca 2460
 gcattatcag catatactgc cccgcgatt ttccaatca ataactcgtg gcgtatgatg 2520
 ggtcaactac aatccgacta caacttagat tatgtatgg attctttgat ggggctaaat 2580
 tatgaagatt gctgttatgg ttgtcaatc tatgcaagac gctatcgtga tgctttcaat 2640
 ccaatattat cacctgatac tgcagtaatg gcagaagttc gcctaaacgg tatcgggtgc 2700
 ggcggtcgtt tgaatcgact tttagcgaa aaggtactag gctatgatca ggttcgaaat 2760
 gcttgagac atgattacta a 2781

<210> 2
 <211> 926
 <212> PRT
 <213> Moraxella catarrhalis

<400> 2
 Met His Thr Ala His His His Arg Ser Lys Thr Tyr Leu Thr Thr Ala
 1 5 10 15
 Ile Arg Tyr Ala Leu Phe Gly Ile Ala Ser Leu Pro Phe Val Ile Pro
 20 25 30
 Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Thr Ser Arg Ser Leu Thr Val Val Gly Ala
 35 40 45
 Asp Ser Ser Lys Asn Leu Pro Asp Thr Pro Asn Thr Lys Pro Asn Thr
 50 55 60
 Val Leu Ala Leu Asp Ala His Leu Gln Ser His Asp Asp Thr Ala Asn
 65 70 75 80
 Ala Phe Asp Gly Phe Asp Phe Glu Val Ile Thr Gln Gln Ala Ala Glu
 85 90 95
 Gln Thr Ser Ser Gln Ala Asn Gln Gly Asn His Gln Met Ser Gln Leu
 100 105 110
 Asp Ala Phe Ala Ser Lys Ser Asp Asn Pro Ser Leu Asn Thr Ala Arg
 115 120 125
 Leu Thr Asp Lys His Asp Thr Pro Ser Ala Ser Lys Ser Leu Ala Lys
 130 135 140
 Leu Ala Glu Asn Tyr His Ile Lys Ser Asp Pro Asp Ala His Arg Cys
 145 150 155 160
 Gln Gly Met Trp Met Gln Pro Ile His Gln Ala Thr His Thr Asn Arg
 165 170 175
 Pro Thr Thr Pro Lys Leu Asp Glu Asn Gly Asn Pro Ile Thr Glu Asp
 180 185 190
 Gly Ile Phe Ala Gln Ala Asp Tyr Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ala Glu Leu Ser Gly Asn Val Ile Met Glu Gln Asn Gly Arg Arg Val
 210 215 220
 Thr Ala Asp Lys Leu Thr Leu Asp Thr Gln Thr Gly Gln Ala Thr Ala
 225 230 235 240
 Ser Gly Gln Val Gln Phe Ser Asp Gly Gly Ala Ser Asp His Ser Ala
 245 250 255

WO 03/018052 PCT/CA02/01315

Gly Ile Ile Gly Met Ala Glu Asn Leu Val Tyr His Thr Asp Gly Gln
 260 265 270

Thr Ala Thr Ala Gln Asp Val Ala Phe Ala Ser Thr Thr Ile Asn Ala
 275 280 285

His Gly Tyr Ala Ser Gln Met Asp Lys Ile Ser Ser Ser Glu Tyr Arg
 290 295 300

Leu Gln His Val Met Phe Thr Thr Cys Pro Pro Thr Glu Arg Lys Trp
 305 310 315 320

Tyr Leu Asp Thr Asp Ser Ile Asp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Arg Ala
 325 330 335

Ile Ala Lys Asn Thr Thr Leu Arg Ile Lys Lys Val Pro Val Phe Tyr
 340 345 350

Leu Pro Tyr Phe Asn Phe Pro Ile Asp Ala Arg Arg Ser Ser Gly Phe
 355 360 365

Leu Leu Pro Ser Met Gly Phe Gly Ala Ser Asp Ser Phe Glu Ile Ser
 370 375 380

Thr Pro Tyr Tyr Leu Asn Leu Ala Pro Asp Tyr Asp Ala Thr Ile Thr
 385 390 395 400

Pro Thr Val Phe Thr Asn Arg Asn Pro Met Leu Thr Gly Glu Phe Arg
 405 410 415

Tyr Leu Thr Gln Asp Tyr Gly Ser Gly Val Leu Thr Ala Ser Tyr Leu
 420 425 430

Pro Lys Asp Gln Gln Tyr His Asp Lys Asp Arg Ser Arg Ile Gln Phe
 435 440 445

Asp His Thr Trp Gln Pro Lys Gln Phe Asp Lys Ile Thr Thr Tyr Ala
 450 455 460

Gln Tyr Gln Ser Val Ser Asp Ala Asn Tyr Leu Ser Asp Phe Asn Ala
 465 470 475 480

Leu Gly Val Glu Ser Ala Lys Leu Asn Leu Pro Arg Arg Ile Gly Thr
 485 490 495

Ser Phe Leu Asp Glu Asn Val Ser Ala Asp Leu Arg Phe Glu Asp Phe
 500 505 510

Gln Arg Leu Asp Gly Phe Gly Leu Asp Gly Arg Pro Ile Thr Asp Lys
 515 520 525

Asp Arg Pro Tyr Ala Arg Leu Pro Gln Leu Ser Val Asn Tyr Arg Leu
 530 535 540

Pro Arg Ile Trp Met Gly Thr Pro Ser Gly Leu Glu Leu Gly Gly Ile
 545 550 555 560

His Asn Ser Ala Tyr Phe Lys Lys Ser Ile Lys Asp Asn Ser Glu Pro
 565 570 575

Glu Lys Ser Gly Gly Arg Ile Phe Asn Gln Phe Thr Ala Ser Tyr Pro
 580 585 590

WO 03/018052 PCT/CA02/01315
 Leu Leu Arg Ser Trp Gly Tyr Leu Thr Pro Lys Leu Ser Leu Thr His
 595 600
 Leu Tyr Thr Ser Tyr Asp Glu Asp Ser Leu Ala Asp Gln Asn Ile Ala
 610 615 620
 Lys Lys Asn Gly Arg His Ser Val Phe Ala Pro Thr Val Ser Leu Asp
 625 630 635 640
 Ala Gly Leu Phe Phe Glu Lys Ala Gly Ala Pro Phe Gly Met His Gln
 645 650 655
 Asp Thr Gly Gly Tyr Gln Val Leu Thr Pro Arg Leu His Tyr Thr Tyr
 660 665 670
 Thr Pro Phe Lys Asp Gln His Asn Val Pro Asn Phe Glu Thr Lys Ile
 675 680 685
 Ala Gln Leu Ser Tyr Glu Gln Leu Leu Asn Asn Asn Trp Phe Leu Gly
 690 695 700
 His Asp Arg Ile Gln Asp Leu His Ala Val Thr Pro Ala Val Ser Tyr
 705 710 715 720
 Arg Tyr Ile Asp Lys Met Gly Arg Thr Arg Phe Glu Gly Gly Ile Ala
 725 730 735
 Glu Gln Ile Leu Leu Ser His Ile Arg Val Gly Ile Asn Asp Ser Glu
 740 745 750
 Ser Tyr Ser Ser Arg Ser Ser Gly Leu Ala Trp Gln Ala Ser Leu Gln
 755 760 765
 Pro Lys Asp Asn Leu Trp Phe Asp Ala Ser Gly Ser Phe Arg Thr Asn
 770 775 780
 Tyr Asp Leu Ser Ser Ile Val Ala Gln Ile Arg Tyr Arg Pro Ser Asp
 785 790 795 800
 Arg Lys Leu Phe Asn Leu Gly Ile Val Lys Arg Lys Glu Asn Arg Ala
 805 810 815
 Phe Asn Gln Ser Ala Leu Ser Ala Tyr Thr Ala Ser Ala Ile Phe Pro
 820 825 830
 Ile Asn Asn Arg Trp Arg Met Met Gly Gln Leu Gln Tyr Asp Tyr Asn
 835 840 845
 Leu Asp Tyr Val Met Asp Ser Leu Met Gly Leu Asn Tyr Glu Asp Cys
 850 855 860
 Cys Tyr Gly Leu Ser Ile Tyr Ala Arg Arg Tyr Arg Asp Ala Phe Asn
 865 870 875 880
 Pro His Leu Ser Pro Asp Thr Ala Val Met Ala Glu Val Arg Leu Asn
 885 890 895
 Gly Ile Gly Gly Gly Arg Leu Asn Arg Leu Leu Ser Glu Lys Val
 900 905 910
 Leu Gly Tyr Asp Gln Val Arg Asn Ala Trp Arg His Asp Tyr
 915 920 925

WO/03/018052 PCT/CA02/01315

<210> 3
<211> 957
<212> DNA
<213> Moraxella catarrhalis

<400> 3
gtgggtaaaa ttatgtcaaa aattcccatg atgaatgaaa agtatatttcg tcgtcaggca 60
ctttattggg tgattgcggc ggotakcatg gcaggcttgg gtttgattgt ttggttgacc 120
agctccgtac cagcaatgat taataaaca aagcocaatc aaacatcgtc ctatgttgcg 180
acattgcgca ccaaatcac agcgltaaat gagcttgatc atgttggtta gccaatggat 240
aattcggcac ttgtgggaga cttacgcaac talccacctg aatttaagga caaagtttat 300
tttaaaggta ttagtggtcg ttataccatt gagctgatgg atgttaccga aaatgaagtt 360
atcgtgatt atctaaacag ccgagaagat cgtacaatt ttgottattt tcgtatact 420
gatgccaatg ataataagcg atatgtactg acttatggta aatttaccag tccagotgat 480
gcagaatctg ctttgcaaac cgtaaatctt agactgcaa aatcagtgat acaaagacc 540
acaaaatct ctgagttggg cgcagtaatg gacaattatg aattgggtca agatbggtg 600
gatttggcag acttccagcc tcgcccagtt cgcctgcaag cagcgcgtac cgaatccca 660
gtcaagcggg ccaagccagc agatgaagaa ttggcagcgc taagccgtga gcgtcatta 720
caaacacaaa ttcccagca aactgagtcg gtcaggcagc cgaactgatt ggatcccaa 780
aacgatacca atcgtttgtc taatcaaga tctcaagtca gctctagcga ttgctctatg 840
gcccaactg cagcccaca gtcaccgag caaacagccg atatatgacc caaaatgaa 900
atatctaaag gcactgcacc aaccacaagc cattcggcag agacagaatc gcaataa 957

<210> 4
<211> 318
<212> PRT
<213> Moraxella catarrhalis

<400> 4
Val Gly Lys Ile Met Ser Lys Ile Pro Met Met Asn Glu Lys Tyr Phe 15
1 5 10
Arg Arg Gln Ala Leu Tyr Trp Leu Ile Ala Ala Ala Ile Met Ala Gly 30
20 25 30
Leu Trp Leu Ile Val Trp Leu Thr Ser Ser Val Pro Ala Met Ile Asn 45
35 40 45
Lys Gln Asn Ala Asn Gln Thr Ser Ser Tyr Val Ala Thr Leu Pro Thr 60
50 55 60
Thr Ile Thr Ala Leu Asn Glu Leu Asp His Val Val Lys Pro Met Asp 80
65 70 75 80
Asn Ser Ala Leu Val Arg Asp Leu Arg Asn Tyr Pro Pro Glu Phe Lys 95
85 90 95
Asp Lys Val Tyr Phe Asn Gly Ile Ser Gly Arg Tyr Thr Ile Glu Leu 110
100 105 110
Met Asp Val Thr Glu Asn Glu Val Ile Val Asp Tyr Leu Asn Ser Arg 125
115 120 125
Glu Asp Arg Asn Asn Phe Ala Tyr Phe Arg Tyr Thr Asp Ala Asn Asp 140
130 135 140
Asn Lys Arg Tyr Val Leu Thr Tyr Gly Lys Phe Thr Ser Pro Ala Asp 160
145 150 155 160
Ala Glu Ser Ala Leu Gln Thr Val Asn Phe Arg Leu Pro Lys Ser Val 175
165 170 175

WO 03/018052 PCT/CA02/01315
 Ile Gln Lys Thr Thr Lys Ile Ser Glu Leu Val Ala Val Met Asp Asn
 180 185 190
 Tyr Glu Leu Gly Gln Asp Val Val Asp Leu Ala Asp Phe Gln Pro Arg
 195 200 205
 Arg Val Arg Leu Gln Ala Thr Arg Thr Glu Ile Pro Val Lys Ala Ala
 210 215 220
 Thr Pro Ala Asp Glu Glu Leu Ala Arg Leu Ser Arg Glu Arg Ala Leu
 225 230 235 240
 Gln Thr Gln Ile Ser Gln Gln Thr Glu Ser Val Arg Gln Pro Thr Asp
 245 250 255
 Leu Asp Ile Gln Asn Asp Ile Asn Arg Leu Ser Asn Gln Arg Ser Gln
 260 265 270
 Val Ser Ser Ser Asp Leu Pro Met Ala Pro Thr Ala Arg Pro Gln Ser
 275 280 285
 Pro Gln Gln Thr Ala Asp Ile Val Pro Lys Asn Glu Ile Ser Lys Gly
 290 295 300
 Thr Ala Pro Thr Gln Ser His Ser Ala Glu Thr Glu Ser Gln
 305 310 315

<210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 5
 tatgtaccat ggctgaactc aataccaagc gttca 35

<210> 6
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 6
 ggcattgctcg aggtaatcat gctccaagc attttg 36

<210> 7
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 7
 ggcagatett ggaactcaat accagccgtt c 31

WO 03/018052	PCT/CA02/01315
<210> 8	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 8	
acgcgtcgac ttagtaatca tgtctccaag cat	33
<210> 9	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 9	
cgtaccagca catatgaata acaaaaacgc caatcaa	37
<210> 10	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 10	
gcccatctcg agttgagatt ctgtctctgc c	31
<210> 11	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 11	
cgagatcct aataaacaaa acgccaatca aac	33
<210> 12	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Primer	
<400> 12	
cagaagcttt tattgagatt ctgtctctgc c	31
<210> 13	
<211> 35	

WO 03/018052
<212> DNA
<213> Artificial

PCT/CA02/01315

<220>
<223> Primer

<400> 13
tatgtaccat ggctgaactc aataccagcc gtlca

35

<210> 14
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 14
ggcatgctcg aggtaatcat gctccaage attttg

36

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/018052 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 39/02, C07K 14/21, C12N 15/31, I21, G01N 33/569
- (21) International Application Number: PCT/CA02/01315
- (22) International Filing Date: 27 August 2002 (27.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/314,634 27 August 2001 (27.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SHIRE BIOCHEM INC. [CA/CA]; 275 Armand-Frappier Boulevard, Laval, Quebec H7V 4A7 (CA).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): MARTIN, Denis [CA/CA]; 4728-G, rue Gaboury, St-Augustin-de-Desmaures, Quebec G3A 1E9 (CA). HAMEL, Josée [CA/CA]; 2401 rue Maritain, Sillery, Québec G1T 1N6 (CA). BRODEUR, Bernard, R. [CA/CA]; 2401 rue Maritain, Sillery, Québec G1T 1N6 (CA). RIOUX, Stéphane [CA/CA]; 869 Avenue des Pinsons, Beauport, Québec, G1B 1J3 (CA). COUTURE, Julie [CA/CA]; 896 C, Jean-Charles Cantin, St-Augustin-de-Desmaures, Québec G3A 1A4 (CA).
- (74) Agent: MORROW, Joy, D. & Smart & Biggar, 900-55 Metcalfé Street, P.O. Box 2999, Station D, Ottawa, Ontario K1P 5Y6 (CA).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, GI, 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, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, 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, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (48) Date of publication of this corrected version:
21 August 2003
- (15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 34/2003 of 21 August 2003, Section II
- 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.

WO 03/018052 A1

(54) Title: MORAXELLA (BRANIAMELLA) CATARRHALIS POLYPEPTIDES AND CORRESPONDING DNA FRAGMENTS

(57) Abstract: The present invention relates to polypeptides of Moraxella (Branhamella) catarrhalis which may be used for prophylaxis, diagnostic and/or therapy purposes.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 02/01315
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/02 C07K14/21 C12N15/31 C12N1/21 G01N33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 78968 A (INCYTE GENOMICS INC ; PATTERSON CHANDRA (US); BERG KIM L (US); LAGA) 28 December 2000 (2000-12-28) * Seq. ID. Nos. 11 and 27; claims; page 2 lines 28-30 *	1-31
A	MCMICHAEL J C: "Vaccines for Moraxella catarrhalis" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, 8 December 2000 (2000-12-08), pages S101-S107, XP004227957 ISSN: 0264-410X the whole document	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 January 2003		Date of mailing of the international search report 22/01/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sommerfeld, T

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 02/01315
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HELMINEN M E ET AL: "A MAJOR OUTER MEMBRANE PROTEIN OF MORAXELLA CATARRHALIS IS A TARGET FOR ANTIBODIES THAT ENHANCE PULMONARY CLEARANCE OF THE PATHOGEN IN AN ANIMAL MODEL" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 61, no. 5, 1 May 1993 (1993-05-01), pages 2003-2010, XP002048787 ISSN: 0019-9567	

International Application No. PCT/CA 02 01315

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-31, partially

SMC-1 (Seq.ID. Nos. 1 and 2) and related subject-matter

2. Claims: 1-31, partially

SMC-2 (Seq. ID. Nos. 3 and 4) and related subject-matter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/CA 02/01315
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"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 23-27 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box 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:	
see additional sheet	
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 checked="" 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.
PCT/CA 02/01315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0078968	A	28-12-2000	
		AU 1824101 A	09-01-2001
		EP 1218512 A2	03-07-2002
		WO 0078968 A2	28-12-2000

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 27/16	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	C 0 7 K 14/195	
C 0 7 K 14/195	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	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 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/569	F
G 0 1 N 33/569	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 5/00	A

(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, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ジョセ アメル

カナダ国 ケベック ジー1ティー 1エヌ6 シルリー リュ マリタン 2401

(72) 発明者 バーナード アール プロデュール

カナダ国 ケベック ジー1ティー 1エヌ6 シルリー リュ マリタン 2401

(72) 発明者 ステファン リウクス

カナダ国 ケベック ジー1イー 1ジェイ3 ビューポート アヴェニュー デ ピンサンズ
869

(72) 発明者 ジュリー クチュール

カナダ国 ケベック ジー3エイ 1エイ4 セント - オウガスティン - ドゥ - デスマウルス ジ
ーン - チャールズ カンティン 896 シー

Fターム(参考) 4B024 AA13 BA50 CA01 GA11 HA15

4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA15

4B065 AA01Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA46

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 NA14 ZA331 ZA341 ZB071

ZB311

4H045 AA10 BA10 CA11 EA52 FA74

专利名称(译)	莫拉氏菌 (Blanhamera) 卡他性多肽和相应的DNA片段		
公开(公告)号	JP2005507653A	公开(公告)日	2005-03-24
申请号	JP2003522569	申请日	2002-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	希雷生物化学有限公司		
申请(专利权)人(译)	希雷生物化学公司		
[标]发明人	デニスマーティン ジョセアメル バーナードアールプロデュール ステファンリウクス ジュリークチュール		
发明人	デニス マーティン ジョセ アメル バーナード アール プロデュール ステファン リウクス ジュリー クチュール		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/00 A61P37/02 C07K14/195 C07K14/21 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/14 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/00 C07K14/212 Y10S435/975		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P11/02 A61P11/04 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/00 A61P37/02 C07K14/195 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.F A61K37/02 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA13 4B024/BA50 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA01Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/NA14 4C084/ZA331 4C084/ZA341 4C084/ZB071 4C084/ZB311 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/EA52 4H045/FA74		
优先权	60/314634 2001-08-27 US		
其他公开文献	JP4397233B2 JP2005507653A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及粘膜莫拉氏菌 (Branhamella) 的多肽，其可用于预防，诊断和/或治疗目的。

M. カタラーリス遺伝子のPCR増幅法に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

遺伝子	プライマー I.D.	制限部位	ベクター	配列 (SEQ ID No)
SMC-1	R10S30	<i>NcoI</i>	pET21d (-)	5' TATGTACCAATGGCTGAAC CATATCCAGCCCTTCA -3' (SEQ ID No : 5)
SMC-1	R10S31	<i>XhoI</i>	pET21d (+)	5'-GGCATGCTCGAGGTAA TCATGTCFCCAAGCATTT G-3' (SEQ ID No : 6)
SMC-1	R10S187	<i>BglII</i>	pCMV-GH	5'-GGCAGATCTTGGAAC CAATACCAGCCGTTTC-3' (SEQ ID No : 7)
SMC-1	R10S188	<i>Sall</i>	pCMV-GH	5'-ACCGTCGACTTAGTA ATCATGTCTCCAAGCAT-3' ' (SEQ ID No : 8)
SMC-2	R10S20	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'-CGTACCAGCACATAAG AATTAACAAAACGCCAATC AA-3' (SEQ ID No : 9)
SMC-2	R10S21	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'-GCCCATCTCGAGTTGC GATCTGTCCTGACC-3' (SEQ ID No : 10)
SMC-2	R10S189	<i>BamHI</i>	pCMV-GH	5'-CGAGGATCCTAATAAA CAAAACGCCAATCAAAC-3' ' (SEQ ID No : 11)
SMC-2	R10S190	<i>HindIII</i>	pCMV-GH	5'-CAGAAGCTTTTATGCG GATCTGTCCTGACC-3' (SEQ ID No : 12)