

(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2005-508146  
(P2005-508146A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	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 11/06	4 B O 6 5
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 27/02	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 88 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-506308 (P2003-506308)	(71) 出願人	592107462
(86) (22) 出願日	平成14年6月18日 (2002.6.18)		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15年12月18日 (2003.12.18)		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/CA2002/000911		ブルバード 275
(87) 国際公開番号	W02002/102836	(74) 代理人	100072051
(87) 国際公開日	平成14年12月27日 (2002.12.27)		弁理士 杉村 興作
(31) 優先権主張番号	60/298, 403	(72) 発明者	デニス マーティン
(32) 優先日	平成13年6月18日 (2001.6.18)		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
(31) 優先権主張番号	60/330, 095		リュ ガボウリー 4728-ジー
(32) 優先日	平成13年10月19日 (2001.10.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリス抗原

(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。

【選択図】 図2

```

1  MTAHKDRSTN LSKICKKPCF FTSSLIATLA MGLAMSACSD DRPKSPIIKP
51  ADDGILLNKD SIMTVKMSKY QPSFAPDGI IPANQTLNL DTAIVIEHIF
101 V DAGDEVSKG DALLGYFTHL ESLPSEVTL PAPPDGVVHR VFAHTDQHYD
151 ANTPLIEIHD ISQLKFISYL SSALMNDTKL GDAVTFGVGD IAHVGOISOV
201 NVSEQNPCLI EVHVIEPNP DEKPKDLGR RVVGHIDYQG IQVGVMPSS
251 AVYSDLNIL ALDGFDPKH KPDAPIDGVV WVKQDHRLS LSPVKVLEYH
301 EKTQQFLVQG ITEDSLVATV PLPKDAHDKP VKVY*
    
```

## 【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アミノ酸配列を有する 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、

10

(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、

(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アミノ酸配列を有する 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アミノ酸配列を有する 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アミノ酸配列を有する 2 次ポリペプチドにと、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド、

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、

(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。

40

【請求項 20】

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

50

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。

10

【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。

【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

20

(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；

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

30

(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；

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】

40

【技術分野】

【0001】

本発明はポリペプチド、より特異的には、モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリス (Moraxella (Branhamella) catarrhalis) 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 の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

50

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. カタラーリスはまた、副鼻腔炎、しつこい咳、大人の急性喉頭炎、化膿性角膜炎、新生児 (neonatorum) 結膜炎、および免疫不全宿主における侵入性疾患を含む、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。

10

【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 (UspA) 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質は、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。

20

【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 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。

30

【0007】

一つの観点において、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。

40

【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】

50

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 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、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、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 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、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

10

【0014】

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 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。

【0015】

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 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。

【0016】

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。

20

【0017】

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。

【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により特徴づけられ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により特徴づけられるポリペプチドに関する。

30

【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。

【0021】

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。

【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に関する。

40

【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に関する。

【0024】

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、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された

50

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、

(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

(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。

#### 【0025】

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、

(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、

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。

#### 【0026】

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、

(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、

10

20

30

40

50

(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。

【0027】

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、  
 (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。

【0028】

当業者であれば、本発明は、本特許出願において述べられたDNA分子、すなわち突然変異体(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ポリヌクレオチドや、それらの相補的配列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。

【0029】

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。

【0030】

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。

【0031】

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。

【0032】

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。

【0033】

“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り、その生体サンプルには当然にその選択されたペプチドが含まれる。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、選択されたポリペプチドを抗原として使用する。

【0034】

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

10

20

30

40

50

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。

【0035】

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。

【0036】

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ろう。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。

10

【0037】

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。

20

【0038】

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“誘導体”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体や類似体は、図面に表示の配列か又はそれらの断片と、約 80% の同一性を有する。すなわち、残基の 80% 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。他のさらなる態様では、ポリペプチドは 99% 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

【0039】

これら置換は、ペプチドの二次構造や疎水性度 (hydropathic 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 (1989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るうが、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。

【0040】

50

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。

【0041】

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。

【0042】

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。すなわち、残基の70%が同一である。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、より好ましくは訳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。

10

【0043】

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%の相同性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは80%以上の相同性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは85%以上の相同性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは90%以上の相同性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは95%以上の相同性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは99%以上の相同性を有する。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、より好ましくは訳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

【0044】

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。

30

【0045】

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。

【0046】

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するための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。

40

【0047】

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、同一性の程度はおそらく無関係なものであろう。

【0048】

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

50

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。

【0049】

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。

【0050】

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プトープに、より効果的に似せるようにすることが望ましい。

10

【0051】

さらに、本発明のポリペプチドは、末端のNH<sub>2</sub>基のアシル化により(例えば、アンモニア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。

【0052】

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デイ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。

20

【0053】

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。

【0054】

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。

30

【0055】

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。

【0056】

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つのエプトープを含むであろう。

【0057】

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。

40

【0058】

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

50

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。

【0059】

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）を用いず及び／又はリーダーペプチドを用いず、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 recombinant DNA”（第2版、第109 - 143頁））。

10

【0060】

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、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、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、特には(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。

【0061】

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、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、特には(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

【0062】

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型肝炎ウイルス表面抗原、ポリオウイルスVP1抗原や、他のウイ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．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

【0063】

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)スティミュロン（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

40

50

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)、Alhydroge I (登録商標) 及びAdjuphos (登録商標) を含むものである。

【0064】

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。

【0065】

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、新生児の結膜炎の治療又は予防に用いられる。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

【0066】

ある特定の態様において、薬剤の組成物は、新生児、幼児、子供、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。

【0067】

本願で用いる“宿主”には、哺乳動物が含まれる。さらなる一態様においては、該哺乳動物は人間である。さらなる一態様においては、該ヒトは新生児、幼児、子供である。さらなる一態様においては、該ヒトは大人である。

20

【0068】

ある特定の態様において、薬剤の組成物は、新生児、幼児、子供、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。

【0069】

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。

【0070】

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。

30

【0071】

別の観点においては、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が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。

【0072】

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

【0073】

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%以上である。

50

## 【0074】

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・ウィレイ&ソンス出版、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）。

## 【0075】

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に示す配列、又はそれらの断片が若しくは類似体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。

10

## 【0076】

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

## 【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：  
 (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、又はそれらの断片が若しくは類似体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を含むものである）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を含むものである）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

## 【0079】

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に記載の配列、又はそれらの断片が若しくは類似体である。

## 【0080】

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

## 【0081】

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。

## 【0082】

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。

## 【0083】

さらなる観点においては、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又はそれらの断片か、配列か、若しくは誘導体をDNAの免疫化法に用いることができる。つまり、注入すると複製可能かつ発現可能となるベクターにそれらを組み込んで、インピボで抗原性ポリペプチドを生成することができる。例えば、ポリヌクレオチドは、真核細胞内

50

で機能するCMVプロモーターの制御下にある、プラスミドベクターに組込むことができる。好ましくは、前記ベクターは、筋肉注射で注入する。

【0084】

他の態様においては、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。

【0085】

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。

【0086】

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。

【0087】

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<sub>L</sub>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。

【0088】

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分離し、その後(発現した

10

20

30

40

50

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。

【0089】

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。過去の方法においては、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。

10

【0090】

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カ感染の診断検査に使用することができる。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、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

20

する工程に従った方法がある。

【0091】

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。

【0092】

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菌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。

【0093】

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。

【0094】

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。

【0095】

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。

10

【0096】

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。適切な抗体は、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一群のエピト - 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。

20

【0097】

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

【0098】

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る。本願に記載された抗体を使用することができるであろう。

30

【0099】

本発明のさらなる観点は、本発明のポリペプチドから生成された抗体を受動免疫に十分な量を宿主に投与することによる免疫法である。

【0100】

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。

【0101】

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。

40

【0102】

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うのみであり、それに制限されるものではない。

【実施例1】

【0103】

B V H - M C 6 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。

50

## 【 0 1 0 4 】

M. カタラーリス BVH - MC 6 (配列番号: 1) 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 から増幅し、その PCR にあたって、制限部位 N d e I (CATATG) 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: D M A R 5 9 8 (5'-TAAGGATACATATGACGGCCATAAAGATCG-3') ; D M A R 5 9 9 (5'-TATGCTCGAGGTATACTTTGACTGGCTTATCATGTG-3') を用いた。PCR 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、NdeI 及び XhoI (カナダ、ベー・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(+)

10) ベクター (ウィスコンシン州、マディソン、ノヴァゲン) を NdeI 及び XhoI により消化し、QIAgen社 (カリフォルニア、チャッツワース) 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。NdeI - XhoI PCR産物を、NdeI - 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<sub>K</sub>-m<sub>K</sub>+)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。BVH-MC2遺伝子を含む組換え pET21b(+) プラスミド (rpET21b(+)) から QIAgen

20) 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)。

## 【 0 1 0 5 】

## 【 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
BVH-MC6	DMAR598	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'- TAAGGATACATATGACGGC CCATAAAGATCG -3' (SEQ ID NO:5)
BVH-MC6	DMAR599	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'- TATGCTCGAGGTATACTTT GACTGGCTTATCATGTG -3'(SEQ ID NO:6)
BVH-MC6	RIOS136	<i>BamHI</i>	pCMV-GH	5'- GAGTGCGGATCCTGATGAC CGCCCAAAT-3'(SEQ ID NO:7)
BVH-MC6	RIOS137	<i>HindIII</i>	pCMV-GH	5'- TGTATTAAGCTTTTAGTAT ACTTTGACTGGCTTATC- 3'(SEQ ID NO:8)
BVH-MC7	DMAR594	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'- CGGATATTCATATGTATCA GCGCTTTATCAATAC-3'(SE Q ID NO:9)
BVH-MC7	DMAR691	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'- ATAGATCTCGAGAAATTGC CAAACAGTCACA-3'(SEQ ID NO:10)
BVH-MC7	RIOS134	<i>BglIII</i>	pCMV-GH	5'- ACTATGAGATCTTGGGCAC CAAAGCCATCAAGC- 3'(SEQ ID NO:11)
BVH-MC7	RIOS135	<i>SalI</i>	pCMV-GH	5'- GATTATGTCGACTTAAAAT TGCCAAACAGTCACAAC- 3'(SEQ ID NO:12)

10

20

30

## 【0106】

BVH-MC6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1005bpを含み、5.46の予測pIと36662.14Daの予測分子量を有するアミノ酸残基334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、39個のアミノ酸残基のシグナルペプチド(MTAHKDRSTNL SKICLKHCFFFTSSLIATLAMGLAMSACS)の存在が示されたが、それは、セリンとアスパラギン残基との間に位置する開裂部位を末端としていた。

40

## 【0107】

PCR増幅法によりBVH-MC6(配列番号:1)遺伝子の存在を確認するために、次の4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、ETSU658の臨床単離株; ラバル大学病院本部感染症研究セン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)により、オリゴヌクレオチド・プライマーDMAR598及びDMAR599(表1)を用いて、BVH-MC6(配列

50

番号：1) 遺伝子を、前記4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30秒間と、50 で30秒間と、72 で1分のサイクルを30回と、最終伸長期間10分を72 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4種のM.カタラーリス株の全てのゲノム中に、BVH-MC6(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。

【0108】

【表2】

PCR増幅法によるM.カタラーリスの同定

株の同定	PCR増幅による同定	
	BVH-MC6	BVH-MC7
ETSU C-2	+	+
ETSU 658	+	+
ETSU T-25	+	+
M-12	+	+
<i>E. coli</i>	-	-

【実施例2】

【0109】

BVH-MC7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。

【0110】

M.カタラーリスのBVH-MC7(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DMAR594及びDMAR691を用いた。発現ベクターへのBVH-MC7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。

【0111】

BVH-MC7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1179bpを含み、8.65の予想pIと41456.50Daの予想分子量を有するアミノ酸残基392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；ジェネティックス・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、21個のアミノ酸残基のシグナルペプチド(MYQRFINTALVAA LAVTMAGC)の存在が示されたが、それは、システインとグリシン酸残基との間にある開裂部位を末端としていた。

【0112】

試験した4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DMAR594及びDMAR691を用いてPCR増幅を行なったところ、BVH-MC7遺伝子の存在が示された。BVH-MC7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。

【実施例3】

10

20

30

40

50

## 【0113】

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。

## 【0114】

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)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。

## 【0115】

BVH-MC6(配列番号:1)とBVH-MC7(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)によりM.カタラーリス株のETSUC-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BglII(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(カリフォルニア、チャットワース)を用いてアガロースゲルから精製し、制限酵素(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。pCMV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、BglII、Sall、又はHindIIIにより消化し、QIAgen社のQIAquickゲル抽出キット(カリフォルニア、チャットワース)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-BVH-MC6とhGH-BVH-MC7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<sub>K</sub>-m<sub>K</sub>+ )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。組換えpCMVプラスミドをQIAgenキット(カリフォルニア、チャットワース)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。

## 【実施例4】

## 【0116】

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。

## 【0117】

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、BVH-MC6(配列番号:1)とBVH-MC7(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。

## 【実施例5】

## 【0118】

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。

## 【0119】

BVH-MC6(配列番号:1)とBVH-MC73(配列番号:3)遺伝子を組込んだ

10

20

30

40

50

組換えpET21b(+)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、ジェーンバルサーIIアパレイタス)により、大腸菌株AD494( DE3) [ ara-leu7697 lac X74 phoA PvuII phoR malF3 F' [lac<sup>+</sup>(lacI<sup>q</sup>)pro] trxB::Kan(DE3)] ( ウィスコンシン州マディソン、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ラクトース・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) / rpET21b(+)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、NaCl10g/L)中で250rpmで攪拌しながら、A<sub>600</sub>値が0.5になるまで、37 °Cで培養した。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

## 【0120】

His結合金属キレート樹脂に固定された2価のカチオン(Ni<sup>2+</sup>)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) / rpET21b(+)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(カナダ国オンタリオ、ミシサーガ、チャゲン)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】

## 【0121】

Hisタグを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドと抗体ヒト口蓋扁桃中に存在する抗体と、M.カタラーリス抗原調製物による免疫化後のマウスから採集した血清の反応性を、以下実施例で説明する。

30

## 【0122】

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プロット法において、BVH-MC6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。さらに、免疫プロット法から、M.カタラーリス抗原調製物によって免疫化されたマウスから採取され、マウスモデルにおいて著しく肺のクリアランスを促す膜ポリペプチドに富んだ血清も、BVH-MC7のHisタグを付した組換えポリペプチドを認識する抗体を作成することが明らかになった。これらの結果は、このタンパク質が、マウスを感染から防御すべくM.カタラーリス抗原の調整物中に存在し、それにより、対応するBVH-MC7のHisタグを付した組換えポリペプチドと反応する抗体が誘発されたことを示している。

40

## 【0123】

## 【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調製物を有する M. カタラーリス抗原調製物による免疫化後のマウスから採集した血清との免疫プロットの反応性

精製した組み換え ポリペプチド I.D. <sup>1</sup>	見かけの分子量 (kDa) <sup>2</sup>	イムノプロットにおける反応性	
		ヒト口蓋扁桃 <sup>3</sup>	マウス血清 <sup>4</sup>
BVH-MC6	38	+	-
BVH-MC7	42	-	+

10

<sup>1</sup>免疫プロットは、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。

<sup>2</sup> 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。

<sup>3</sup>免疫プロットには、ヒト口蓋扁桃の原液を用いた。

<sup>4</sup>膜ポリペプチドに富むM. カタラーリス抗原調製物で免疫化した後にマウス血清を採取し、それをプールして1/500に希釈して免疫プロットを行なった。これらマウスは、M. カタラーリス感染から防御されたものである。

【実施例7】

【0124】

M. カタラーリス株表面上のBVH-MC6及びBVH-MC7ポリペプチドの抗体への接近の可能性を、以下実施例で説明する。

20

【0125】

細菌を、37、8%二酸化炭素ガス中で、0.25%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<sub>490nm</sub>が0.650(～10<sup>8</sup>CFU/ml)となるようにした。その後、BVH-MC6又は抗BVH-MC7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PBS緩衝液で2回洗浄し、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・コールター社、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、BVH-MC6とBVH-MC7に特異的な抗体が、試験した均質な(ETSU C-2)M. カタラーリス株上の、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60%以上が、BVH-MC6とBVH-MC7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、BVH-MC6とBVH-MC7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及びM-12株の表面に結合した(表4)。後者2つの株においてそれぞれ、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、BVH-MC6とBVH-MC7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が明確に示されている。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すことが明らかになった。

30

40

【0126】

【表4】

M. カタラーリス株 ETSU C-2 の無傷の細胞表面における、BVM-MC 2、BVM-MC 3、BVM-MC 4、及び BVM-MC 5 に特異的な抗体の結合評価

血清の同定	菌株	蛍光指標 <sup>2</sup>	ラベル化細胞の% <sup>3</sup>
BVH-MC6-特異的抗体のプール <sup>1</sup>	ETSU C-2	17.1	78.6
	ETSU 658	23.9	93.6
	M-12	28.8	95.3
BVH-MC7-特異的抗体のプール	ETSU C-2	14.1	63.8
	ETSU 658	16.9	91.3
	M-12	20.6	93.0
負コントロール血清のプール <sup>4</sup>	ETSU C-2	1	1
	ETSU 658	1	1
	M-12	1	11.3
正のコントロール血清 <sup>5</sup>	ETSU C-2	35.3	91.9
	ETSU 658	23.4	96.0
	M-12	16.5	84.0

10

20

<sup>1</sup> 精製した組換えポリペプチド 20 µg 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) 10 µg 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。

<sup>2</sup> 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。

<sup>3</sup> 分析した 10,000 細胞のうちの、ラベルを付した細胞 % を示す。

<sup>4</sup> 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。

30

<sup>5</sup> 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 µg 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】

【0127】

抗 BVH-MC6 マウス血清の殺菌活性を、以下実施例で説明する。

【0128】

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 °C で 18 時間、インキュベートした。その後、OD<sub>490nm</sub> 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 × 10<sup>4</sup> CFU/ml に希釈した。細菌懸濁液 25 µl と、熱で不活化した希釈試験用血清 50 µl 及び HBSS 15 µl とを混合して、攪拌 (200rpm) しながら 8% 二酸化炭素中、37 °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 °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 µl 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 °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。M. カタラーリス株 ETSU 658 を用いて血清の殺菌活性を評価した。下記の数式によって溶菌 % を測定した。

40

50

【 0 1 2 9 】

【 数 1 】

$$100 - \left[ \frac{\text{細菌を免疫血清とインキュベートした時に得られたCFV}}{\text{出血前の血清で得られたCFV}} \times 100 \right]$$

【 0 1 3 0 】

精製した組み換えBVH-MC6タンパク質により免疫化したマウス7匹から採取された血清において、殺菌性抗体が存在していることが見出された（表5）。コントロールマウスから得られた血清において殺菌活性は記録されなかった（データ示さず）。 10

【 0 1 3 1 】

【 表 5 】

抗BVM-MC6マウス血清の殺菌活性評価

血清の同定 <sup>1</sup>	溶菌%
S1 <sup>2</sup>	97.2
S2	9.7
S3	99.1
S4	98.8
S5	82.9
S6	94.6
S7	93.2
S8	70.9
正コントロール血清 <sup>3</sup>	76.0

20

30

<sup>1</sup> 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。

<sup>2</sup> BVH-MC6で免疫化したマウスより採集した各マウス血清を1/50に希釈した。

<sup>3</sup> 検定には、精製された外膜タンパク質20μgで免疫化されたマウスから得られた血清を1/50に希釈して、正のコントロールとして用いた。

【 実施例 9 】

【 0 1 3 2 】

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。 40

【 0 1 3 3 】

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20μgを、2週間毎に3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と28日目と3度目の注射から14日後（42日目）に、眼窩洞から採取した。1週間後、M.カタラーリス株ETSU 658約 $1 \times 10^6$ CFU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 50

後5時間で死亡した。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。

【実施例 10】

【0134】

精製した組換えBVH-MC6の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】

8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BVH-MC6ポリペプチド20 $\mu$ 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中に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、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 $9 \times 10^5$  CFU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、感染後5時間で死亡した。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。表6に示すように、平行して感染させたコントロールグループのマウスと比較して、免疫化したマウスから回収した細菌は60%少なかった。このように、組換えBVH-MC6ポリペプチドによる免疫化は、マウスの肺から、M.カタラーリスの異種菌のクリアランスを急速に促進した。

【0136】

【表6】

精製した組換え BVH-MC6 ポリペプチドにより免疫化されたマウスによる、モラクセラカタラーリスの肺クリアランス

コントロール群からの細菌の回収 (肺ホモジェネートのCFU/ml) <sup>a</sup>	BVH-MC6群からの細菌の回収 (肺ホモジェネートのCFU/ml) <sup>b</sup>	細菌クリアランス (%) <sup>c</sup>
$1.86 \times 10^5 \pm 1.01 \times 10^5$	$7.44 \times 10^4 \pm 2.17 \times 10^4$	60

<sup>a</sup> マウス7匹の平均 $\pm$ 標準偏差を示したものである。

<sup>b</sup> マウス8匹の平均 $\pm$ 標準偏差を示したものである。

<sup>c</sup> マウスは $9 \times 10^5$  CFUの細菌により肺内部に疾患を負わせたものとし、生存細菌は、疾患の5時間後に肺から回収した。免疫化したマウスから除去された細菌のパーセンテージ数をコントロールと比較した。

【図面の簡単な説明】

【0137】

【図1】図1は、M.カタラーリス株ETSUC-2由来のBVH-MC6遺伝子のDNA配列を示したものの(配列番号:1)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2】図2は、M.カタラーリス株ETSUC-2由来のBVH-MC6ポリペプチドのアミノ酸配列を示したものの(配列番号:2)である。下線部の配列は、39の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BVH-MC7遺伝子のDNA配列を示したものの(配列番号:3)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BVH-MC7ポリペプチドのアミノ

酸配列を示したもの（配列番号：4）である。下線部の配列は、21の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  
27 December 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/102836 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/00
- (21) International Application Number: PCT/CA02/00911
- (22) International Filing Date: 18 June 2002 (18.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
  - 60/298,403 18 June 2001 (18.06.2001) US
  - 60/330,095 19 October 2001 (19.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SHIRE BIOCHEM INC. [CA/CA]; 275 Armand-Frappier Blvd, Leval, Quebec H1V 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 Maritain, Sillery, Quebec G1T 1N6 (CA). BRODEUR, Bernard, R. [CA/CA]; 2401 Maritain, Sillery, Quebec G1T 1N6 (CA). RIOUX, Stéphane [CA/CA]; 869 avenue des Pinsans, Resport, Quebec G1E 1J3 (CA). LEBLANC, Geneviève [CA/CA]; 6850 Boul. L'Orniere, Apt. 12, Neufchatel, Quebec G2C 1C1 (CA). COUTURE, Julie [CA/CA]; 896 C, Jean-Charles Cantin, St-Augustin-de-Desmaures, Quebec G3A 1A4 (CA).
- (74) Agents: MORROW, Joy, D. et al.; Smart & Biggar, P.O. Box 2999, Station D, 900-55 Metcalfe Street, Ottawa, Ontario K1P 5Y6 (CA).
- (81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, 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, 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, UJ, UZ), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

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

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



(54) Title: MORAXELLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS ANTIGENS

(SEQ ID NO: 2)

```

1  MTAHKDRSTN LSKICLKHC FTFSSLIATLA MGLAMSACSD DRPKSPIIKP
51  ADDGIILNKD SIMTVKMSKY QPSFAFDGKI IPANQTLNLN DTAIVIVEHIF
101 VDAGDEVSKG DALLGVFTHL ESLFSEVTTL PAPFDGVVHR VFAHTDQHYD
151 ANPPLLEIHD ISQLKPISYL SSALMNDTKL GDAVTFGVGD IAHVGQISQV
201 NVSEQNEKLI EVHVIIIEPNP DERPKDLIGR RVVGHIDYQG IQVGVMMPSS
251 AVYDSDLNIL ALDGFDPKPPH KPDAPIDGYV WVVKQDHRLS LSPVRVLEYH
301 PKTQQFLVQG ITEDSLVATV PLPKDAHDKP VKVY*

```

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

WO 02/102836 A2

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

MORAXELLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS ANTIGENSFIELD OF THE INVENTION

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

10

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 15 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 in adults, suppurative keratitis, conjunctivitis neonatorum, and invasive 20 diseases in the immunocompromised host.

Since approximately 90% of M. catarrhalis strains are resistant to antibiotics ( $\beta$ -lactamase positive) and that recurrent otitis media is associated with high morbidity, there is a need for the 25 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 30 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 on outer 35 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, 40 this protein was shown to be highly variable among the different

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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.  
5 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  
10 disease show variability in the immune response against the OMP CD.

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

#### SUMMARY OF THE INVENTION

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 a sequence chosen from SEQ ID Nos : 2, 4 or fragments or analogs thereof.

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

In other aspects, there are provided polypeptides encoded by polynucleotides of the invention, pharmaceutical compositions,  
30 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.

35

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 represents the DNA sequence of BVH-MC6 gene from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 1. The underlined

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

portion of the sequence represents the region coding for the leader peptide.

Figure 2 represents the amino acid sequence of BVH-MC6 polypeptide from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 2. The underlined sequence represents the 39 amino acid residues leader peptide.

Figure 3 represents the DNA sequence of BVH-MC7 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 BVH-MC7 polypeptide from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 4. The underlined sequence represents the 21 amino acid residues leader peptide.

#### 20 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.

25 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 NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

30 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 NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

35 According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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 NO: 2 or 4.

5

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 NO: 2 or 4.

10

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4.

15

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.

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

According to one aspect, the present invention relates to 25 polypeptides characterized by the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

According to one aspect, the present invention relates to polypeptides characterized by the amino acid sequence selected 30 from SEQ ID NO: 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 NO: 2, 4 or 35 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 NO: 2 or 4.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

According to one aspect, the present invention relates to epitope bearing portions of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

5 According to one aspect, the present invention relates to epitope bearing portions of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4.

According to one aspect, the present invention provides an  
10 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 NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- 15 (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (c) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95%  
20 identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or  
25 analogs thereof;
- (e) a polynucleotide encoding a polypeptide capable of generating antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- 30 (f) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 1, 3 or fragments or analogs thereof;

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

(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 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 NO: 2 or 4;
- (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence  
10 chosen from: SEQ ID NO: 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 NO: 2 or 4;
- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a  
15 sequence chosen from: SEQ ID NO: 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 NO: 2 or 4;
- (f) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a  
20 polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4;
- (g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 1 or 3;
- (h) a polynucleotide that is complementary to a polynucleotide  
25 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:

- (a) a polypeptide having at least 70% identity to a second  
30 polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 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 NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

- (c) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (d) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 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 NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
- (f) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 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;
- (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:

- (a) a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4;
- (b) a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4;
- (c) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4;
- (d) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4;
- (e) a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4;
- (f) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4;

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

- (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

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 polypeptides and monospecific antibodies that specifically bind to such polypeptides.

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

20 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.

25

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

30

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, which naturally includes the selected peptide. Specific binding can be measured using an ELISA assay in which the selected polypeptide is used as an antigen.

In accordance with the present invention, "protection" in the biological studies is defined by a significant increase in the

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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 days to death, respectively, might be useful to calculate P values and  
5 determine whether the difference between the two groups is statistically significant. P values of 0.05 are regarded as not significant.

In an additional aspect of the invention there are provided  
10 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  
15 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  
20 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.

25 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  
30 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  
35 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 80% identity with those sequences

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

illustrated in the figures or fragments thereof. That is, 80% of the residues are the same. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 80% 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 10 fewer than about 20 amino acid residue substitutions, modifications or deletions and more preferably less than 10.

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 2, 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;  
25 val, ile, leu, met, ala, phe;  
lys, arg, orn, his;  
and phe, tyr, trp, his.

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

30 In an alternative approach, the analogs could be fusion polypeptides, incorporating moieties which render purification easier, for example by effectively tagging the desired polypeptide. It may be necessary to remove the "tag" or it may 35 be the case that the fusion polypeptide itself retains sufficient antigenicity to be useful.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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.

5 In one embodiment, 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% identity. In a further embodiment, polypeptides  
10 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  
15 the invention will have fewer than about 20 amino acid residue substitutions, modifications or deletions and more preferably less than 10.

In one embodiment, analogs of polypeptides of the invention will have about 70% homology with those sequences 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%  
25 homology. In a 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,  
30 modifications or 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  
35 either sequence as appropriate. It is possible to 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

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

found, each having a different score. Both types of identity analysis are contemplated in the present invention.

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 remove the "tag" or it may be the case that the fusion polypeptide itself retains sufficient antigenicity to be useful.

10

It is well known that it is possible to screen an antigenic polypeptide to identify epitopic regions, i.e. those regions 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 antigenic/immunogenic properties.

20 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, analog as described herein.

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

30 Also included are polypeptides which have fused thereto 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  
35 (poly)saccharides.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

Furthermore, in those situations where amino acid regions are found to be polymorphic, it may be desirable to vary one or more particular amino acids to more effectively mimic the different epitopes of the different Moraxella strains.

5

Moreover, the polypeptides of the present invention can be modified by terminal -NH<sub>2</sub> acylation (eg. by acetylation, or thioglycolic acid amidation, terminal carboxy amidation, e.g. with ammonia or methylamine) to provide stability, increased  
10 hydrophobicity for linking or binding to a support or other molecule.

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

In a further embodiment, the present invention also relates to chimeric polypeptides which comprise one or more polypeptides or fragments or analogs thereof as defined in the figures of the  
25 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 NO: 2, 4 or fragments or analogs  
30 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  
35 comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4 provided that the polypeptides are linked as to form a chimeric polypeptide.

Preferably, a fragment, analog or derivative of a polypeptide of

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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 methionine (Met) starting residue. 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 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 carrier, diluent or adjuvant; (iii) a

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

vaccine comprising a polypeptide of the invention and a 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.

10

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 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.

25 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., Plaué 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

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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.  $AlK(SO_4)_3$ ,  $AlNa(SO_4)_3$ ,  $5 AlNH_4(SO_4)_3$ ,  $Al(OH)_3$ ,  $AlPO_4$ , 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 99/24578. Preferred adjuvants include QuilA™, QS21™, Alhydrogel™ and Adjuphos™.

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

Pharmaceutical compositions of the invention are used for 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. Tenover and R.H. Tenover. ASM Press, Washington, D.C. seventh edition, 1999, 1773p. In one embodiment, pharmaceutical compositions of the present invention are used for the treatment or prophylaxis of otitis media, sinusitis, persistent cough, acute laryngitis, suppurative keratitis, conjunctivitis neonatorum. In one embodiment, vaccine compositions of the invention are used for the treatment or prophylaxis of moraxella infection and/or diseases and symptoms mediated by moraxella infection. In a further embodiment, the moraxella infection is Moraxella Catarrhalis.

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

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

hosts.

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 neonates, infants, children, 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 NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

In one embodiment, polynucleotides are those illustrated in SEQ ID No: 1, 3 which may include the open reading frames (ORF), encoding the polypeptides of the invention.

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 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

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

between sequences. In 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.

5

Suitable stringent conditions for hybridation can be readily determined by one of skilled in the art (see for example Sambrook et al., (1989) Molecular cloning : A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> 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.).

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

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

wherein said polypeptide comprises SEQ ID NO: 2, 4 or fragments  
20 or analogs thereof.

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

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

wherein said polypeptide comprises SEQ ID NO: 2 or 4.

30 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  
35 polypeptide;

wherein said polypeptide comprises at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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

- (a) a DNA sequence encoding a polypeptide or  
5 (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 SEQ ID NO: 2 or 4.

In a further embodiment, polynucleotides are those illustrated 10 in SEQ ID NO: 1, 3 or fragments or analogs thereof encoding polypeptides of the invention.

In a further embodiment, polynucleotides are those illustrated 15 in SEQ ID NO: 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 20 complementary to the polynucleotides described in the present application.

In a further aspect, polynucleotides encoding polypeptides of the invention, or fragments, analogs or derivatives thereof, may 25 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 of the CMV promoter which is 30 functional in eukaryotic cells. Preferably the vector is injected intramuscularly.

According to another aspect, there is provided a process for producing polypeptides of the invention by recombinant 35 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

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

which are ligated to produce the full polypeptide (block ligation).

General methods for obtention and evaluation of polynucleotides 5 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 10 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.

15 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.

20 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 25 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 30 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 35 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 40 include but are not limited to LTR or SV40 promoter, E.coli lac,

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

tac or trp promoters and the phage lambda P<sub>l</sub> promoter. Vectors will preferably incorporate an origin of replication as well as selection markers i.e. ampicillin resistance gene. Suitable bacterial vectors include pET, pQE70, pQE60, pQE-9, pD10 5 phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 and eukaryotic vectors pBlueBacIII, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG, pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL. Host cells may be bacterial i.e. E.coli, Bacillus subtilis, Streptomyces; fungal i.e. 10 Aspergillus niger, Aspergillus nidulins; yeast i.e. Saccharomyces or eukaryotic i.e. CHO, COS.

Upon expression of the polypeptide in culture, cells are typically harvested by centrifugation then disrupted by physical 15 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 may be achieved by established techniques depending on the properties of the 20 polypeptide i.e. using ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Final purification may be achieved using 25 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 4,431,739; 30 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 35 infection, in particular Moraxella infection. Several diagnostic methods are possible, for example detecting Moraxella organism in a biological sample, the following procedure may be followed:

- a) obtaining a biological sample from a host;

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

- b) incubating an antibody or fragment thereof reactive with a 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 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:

- a) obtaining a biological sample from a host;
- b) incubating one or more polypeptides of the invention or fragments thereof with the biological sample to form a mixture; and
- 15 c) detecting specifically bound antigen or bound 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 radioimmunoassay or a latex agglutination assay, essentially to determine whether antibodies specific for the protein are present in an organism.

25 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
- 35 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, 40 for example using a polymerase chain reaction, as a method of

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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.

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

- 10 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
- 15 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 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 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, 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.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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

5 A further aspect of the invention is the use of the antibodies directed to the polypeptides of the invention for passive immunization. One could use the antibodies described in the present application.

10 A further aspect of the invention is a method for immunization, whereby an antibody raised by a polypeptide of the invention is administered to a host in an amount sufficient to provide a passive immunization.

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

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

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms  
25 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 other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification,  
30 including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

35 EXAMPLE 1

This example illustrates the cloning and molecular characteristics of BVH-MC6 gene and corresponding polypeptide.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

The coding region of M. catarrhalis BVH-MC6 (SEQ ID NO: 1) gene was amplified by PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer, San Jose, CA) from genomic DNA of M. catarrhalis strain ETSU C-2 using the following oligos that contained base 5 extensions for the addition of restriction sites NdeI (CATATG) and XhoI (CTCGAG): DMAR598 (5'-TAAGGATACATATGACGGCCCAAAAGATCG-3'); DMAR599 (5'-TATGCTCGAGGTATACTTTGACTGGCTTATCATGTG-3'). PCR products were purified from agarose gel using a QIAquick gel extraction kit from QIAGEN following the manufacturer's instructions (Chatsworth, CA), and digested with NdeI and XhoI (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Baie d'Urfé, Canada). The pET21b(+) vector (Novagen, Madison, WI) was digested with NdeI and XhoI and purified from agarose gel using a QIAquick gel extraction kit from QIAGEN (Chatsworth, CA). The NdeI-XhoI PCR products were ligated to the NdeI-XhoI pET21b(+) expression vector. The ligated products were transformed into E. coli strain DH5 $\alpha$  [ $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 *endA1* *recA1* *hsdR17(r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>+) deoR thi-1 supE44  $\lambda$ gyrA96 relA1] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) according to the method of Simanis (Hanahan, 20 D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), pp. 109-135). Recombinant pET21b(+) plasmid (rpET21b(+)) containing BVH-MC6 gene was purified using a QIAGEN kit (Chatsworth, CA) and DNA insert was sequenced (Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit, ABI, Foster City, CA).*

25

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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

Genes	Primers I.D.	Restriction site	Vector	Sequence
BVH-MC6	DMAR598	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5'- TAAGGATACATATGACGGC CCATAAAGATCG -3' (SEQ ID NO:5)
BVH-MC6	DMAR599	<i>Xho</i> I	pET21b (+)	5'- TATGCTCGAGGTACTTT GACTGGCTTATCATGTG - 3' (SEQ ID NO:6)
BVH-MC6	RIOS136	<i>Bam</i> HI	pCMV-GH	5'- GAGTCCGGATCCTGATGAC CGCCAAAAT-3' (SEQ ID NO:7)
BVH-MC6	RIOS137	<i>Hind</i> III	pCMV-GH	5'- TGTATTAAAGCTTTTAGTAT ACTTGGACTGGCTTATC- 3' (SEQ ID NO:8)
BVH-MC7	DMAR594	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5'- CGGATATTCATATCTATCA CGCTTTATCAATAC- 3' (SEQ ID NO:9)
BVH-MC7	DMAR691	<i>Xho</i> I	pET21b (+)	5'- ATAGATCTCGAGAAATGC CAAACAGTCACA-3' (SEQ ID NO:10)
BVH-MC7	RIOS134	<i>Bgl</i> II	pCMV-GH	5'- ACTATGAGATCTGGGGCAC CAAAGCCATCAAGC- 3' (SEQ ID NO:11)
BVH-MC7	RIOS135	<i>Sa</i> I	pCMV-GH	5'- GATTATGTCGACTTAAAAT TGCCAAACAGTCACAAC- 3' (SEQ ID NO:12)

It was determined that the open reading frame (ORF) which codes for BVH-MC6 polypeptide contains 1005-bp and encodes a 334 amino acid residues polypeptide with a predicted pI of 5.46 and a predicted molecular mass of 36662.14 Da. Analysis of the predicted amino acid residues sequence (SEQ ID NO :2) using the SpScan software (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics 10 Computer Group) suggested the existence of a 39 amino acid residues signal peptide (MTAHKDRSTNLSKICLKHCFFTSLSLIATLAMGLAMSACS).

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

which ends with a cleavage site located between a serine and an aspartic acid residues.

To confirm the presence by PCR amplification of BVH-MC6 (SEQ ID NO:1) gene, the following 4 distinct M. catarrhalis strains were used: M. catarrhalis ETSU C-2, ETSU T-25, and ETSU 658 clinical isolates were provided by the East Tennessee State University; M. catarrhalis strain M-12 was provided by the Centre de Recherche en Infectiologie du Centre Hospitalier de l'Université Laval. The E. coli XL1-Blue MRF' was used in these experiments as negative control. BVH-MC6 (SEQ ID NO :1) gene was amplified by PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer, San Jose, CA) from genomic DNA from the 4 M. catarrhalis strains, and the control E. coli strain using the oligonucleotides primers DMAR598 and DMAR599 (Table 1). PCR was performed with 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 50°C and 1 min at 72°C and a final elongation period of 10 min at 72°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 amplification products revealed that BVH-MC6 (SEQ ID NO :1) gene was present in the genome of all of the 4 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.

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

Strain Identification	Identification by PCR amplification of	
	BVH-MC6	BVH-MC7
ETSU C-2	+	+
ETSU 658	+	+
ETSU T-25	+	+
M-12	+	+
<u>E. coli</u>	-	-

30

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

EXAMPLE 2

This example illustrates the cloning and molecular characteristics of BVH-MC7 gene and corresponding polypeptide.

5 The coding region of M. catarrhalis BVH-MC7 (SEQ ID NO: 3) gene was amplified by PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer, San Jose, CA) from genomic DNA of M. catarrhalis strain ETSU C-2 using the following oligos that contained base extensions for the addition of restriction sites NdeI (CATATG) 10 and XhoI (CTCGAG): DMAR594 and DMAR691, which are presented in Table 1. The methods used for cloning BVH-MC7 into an expression vector and sequencing are similar to the methods described in Example 1.

15 It was determined that the open reading frame (ORF) which codes for BVH-MC7 contains 1179-bp and encodes a 392 amino acid residues polypeptide with a predicted pI of 8.65 and a predicted molecular mass of 41456.50 Da. Analysis of the predicted amino acid residues sequence (SEQ ID NO :4) using the Spscan software 20 (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) suggested the existence of a 21 amino acid residues signal peptide (MYQRFINTALVAALAVTMAGC), which ends with a cleavage site located between a cysteine and a glycine residues.

25 The BVH-MC7 gene was shown to be present after PCR amplification using the oligonucleotide primers DMAR594 and DMAR691 in the 4 M. catarrhalis strains tested (Table 2). The methods used for PCR amplification of the BVH-MC7 gene were similar to the methods presented in Example 1. No such product was detected 30 when the control E. coli DNA was submitted to identical PCR amplification with these oligonucleotide primers.

EXAMPLE 3

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

The DNA coding regions of a M. catarrhalis polypeptides were inserted in phase downstream of a human growth hormone (hGH) 40 gene which was under the transcriptional control of the

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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 BVH-MC6 (SEQ ID NO: 1) and BVH-MC7 (SEQ ID NO: 3) genes without their leader peptide regions were amplified by PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer, San Jose, CA) 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), *Sa*II (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 from QIAGEN (Chatsworth, CA), digested with restriction enzymes (Amersham Pharmacia Biotech, Inc. Baie d'Urfe, Canada). The pCMV-GH vector (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas) was digested with *Bam*HI, *Bgl*III, *Sa*II, or *Hind*III and purified from agarose gel using the QIAquick gel extraction kit from QIAGEN (Chatsworth, CA). The digested DNA fragments were ligated to the digested pCMV-GH vector to create the hGH-BVH-MC6 and hGH-BVH-MC7 fusion polypeptides under the control of the CMV promoter. The ligated products were transformed into *E. coli* strain DH5 $\alpha$  [ $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZ*YA-*argF*)U169 *endA*1 *recA*1 *hscR*17(*r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>*) *deoR thi-1 supE*44  *$\lambda$ 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). The recombinant pCMV plasmids were purified using a QIAGEN kit (Chatsworth, CA) and the nucleotide sequences of the DNA inserts were verified by DNA sequencing.

#### 35 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, Qu $\acute{e}$ bec, Canada) were immunized by intramuscular injection of 100

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

10  $\mu$ l three times at two- or three-week intervals with 50  $\mu$ g of  
recombinant pCMV-GH encoding BVH-MC6 (SEQ ID NO: 1) and BVH-MC7  
(SEQ ID NO: 3) genes in presence of 50  $\mu$ g of granulocyte-  
macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)- expressing  
5 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  $\mu$ g of  
pCMV-GH in presence of 50  $\mu$ g of pCMV-GH-GM-CSF. Blood samples  
were collected from the orbital sinus prior to each immunization  
10 and seven days following the third injection and serum antibody  
responses were determined by ELISA using the corresponding His-  
Tag labeled M. catarrhalis recombinant polypeptides as coating  
antigen. The production and purification of these His-tagged  
labeled M. catarrhalis recombinant polypeptides are presented in  
15 Example 5.

#### EXAMPLE 5

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

The recombinant pET21b(+) plasmid with BVH-MC6 (SEQ ID NO: 1)  
and BVH-MC7 (SEQ ID NO: 3) genes were used to transform by  
electroporation (Gene Pulser II apparatus, BIO-RAD Labs,  
25 Mississauga, Canada) E. coli strain AD494 (DE3) [ $\Delta$ *ara-1eu7697*  
 $\Delta$ *lacX74*  $\Delta$ *phoA* *PvuII* *phoR*  $\Delta$ *malF3* F' [*lac'*(*lacI'*) *pro*] *trxB::Kan*  
(DE3)] (Novagen, Madison, WI). In this strain of E. coli, the  
T7 promoter controlling expression of the recombinant  
polypeptide is specifically recognized by the T7 RNA polymerase  
30 (present on the  $\lambda$ DE3 prophage) whose gene is under the control  
of the lac promoter which is inducible by isopropyl- $\beta$ -d-thio-  
galactopyranoside (IPTG). The transformant AD494(DE3)/  
rpET21b(+) was grown at 37°C with agitation at 250 rpm in LB  
broth (peptone 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 10g/L) containing  
35 100  $\mu$ g of carbenicillin (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville,  
Canada) per ml until the  $A_{600}$  reached a value of 0.5. In order to  
induce the 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

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

cells from a 500 ml culture were pelleted by centrifugation and frozen at -70°C.

The purification of the recombinant polypeptides from the soluble cytoplasmic fraction of IPTG-induced AD494(DE3)/rpET21b(+) was done by affinity chromatography based on the properties of the His•Tag sequence (6 consecutive histidine residues) to bind to divalent cations (Ni<sup>2+</sup>) 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, Mississauga, Ontario, Canada). The His-tagged 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 were estimated by MicroBCA (Pierce, Rockford, Illinois).

#### EXAMPLE 6

25 This example illustrates the reactivity of the His-tagged M. catarrhalis recombinant polypeptides with antibodies present in human palatine tonsils and sera collected from mice after immunization with M. catarrhalis antigenic preparations.

30 As shown in Table 3, BVH-MC6 His-tagged recombinant polypeptide was 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 this polypeptide. These particular human antibodies might be implicated in the protection against M. catarrhalis infection. In addition, immunoblots also revealed that sera collected from mice immunized with M. catarrhalis antigenic preparation enriched membrane proteins which induced significant lung clearance in a mouse model also developed

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

antibodies that recognized BVH-MC7 His-tagged recombinant polypeptides. These results indicate that this protein was present in *M. catarrhalis* antigenic preparation that protected mice against infection and that it induced antibodies that reacted with the corresponding BVH-MC7 His-tagged recombinant polypeptide.

Table 3. Reactivity in immunoblots of antibodies present in human palatine tonsils and sera collected from mice after immunization with *M. catarrhalis* antigenic preparations with *M. catarrhalis* His-tagged fusion recombinant polypeptides.

Purified recombinant polypeptide I.D. <sup>1</sup>	Apparent molecular weight (kDa) <sup>2</sup>	Reactivity in immunoblots with	
		Human palatine tonsils <sup>3</sup>	Mouse sera <sup>4</sup>
BVH-MC6	38	+	-
BVH-MC7	42	-	+

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

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

<sup>3</sup>Extracts from human palatine tonsils were not diluted in order to perform the immunoblots.

<sup>4</sup>Mouse sera collected after immunization with *M. catarrhalis* antigenic preparations enriched membrane polypeptides were pooled and diluted 1/500 to perform the immunoblots. These mice were protected against *M. catarrhalis* challenge.

#### EXAMPLE 7

This example illustrates the accessibility to antibodies of the BVH-MC6 and BVH-MC7 polypeptides at the surface of *M. catarrhalis* strain.

Bacteria were grown in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 0.25% dextrose at 37°C in a 8% CO<sub>2</sub> atmosphere to give an OD<sub>460nm</sub> of 0.650 (~10<sup>8</sup> CFU/ml). Dilutions of anti-BVH-MC6 or anti-BVH-MC7 or control sera were then added and allowed to bind to the cells, which were incubated for 2 h at 4°C with rotation.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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 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 washed 2 times in PBS buffer and 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 BVH-MC6- and BVH-MC7-specific antibodies efficiently recognized their corresponding surface exposed epitopes on the homologous (ETSU C-2) M. catarrhalis strain tested (Table 4). It was determined that more than 60 % of the 10,000 Moraxella cells analyzed were labeled with the antibodies present in the BVH-MC6- and BVH-MC7-specific sera. In addition, antibodies present in the pool of BVH-MC6- and BVH-MC7-specific sera attached at the surface of ETSU 658 and M-12 strains of M. catarrhalis (Table 4). It was also determined that more than 90% of the 10,000 cells of each of the two latter strains were labeled by the specific antibodies. These observations clearly demonstrate that the BVH-MC6 and BVH-MC7 polypeptides 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.

Table 4. Evaluation of the attachment of BVH-MC6- and BVH-MC7-specific antibodies at the surface of intact cells of M. catarrhalis.

Serum Identification	Strains	Fluorescence Index <sup>2</sup>	% of labeled cells <sup>3</sup>
Pool of BVH-MC6-specific sera <sup>1</sup>	ETSU C-2	17.1	78.6
	ETSU 658	23.9	93.6
	M-12	28.8	95.3
	ETSU C-2	14.1	63.8

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

Pool of BVH-MC7-specific sera	ETSU 658	16.9	91.3
	M-12	20.6	93.0
Pool of negative control sera <sup>4</sup>	ETSU C-2	1	1
	ETSU 658	1	1
	M-12	1	11.3
Positive control serum <sup>5</sup>	ETSU C-2	35.3	91.9
	ETSU 658	23.4	96.0
	M-12	16.5	84.0

<sup>1</sup> The mice were injected subcutaneously three 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.

<sup>5</sup> 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 intact *Moraxella* cells.

<sup>3</sup> % of labeled cells out of the 10,000 cells analyzed.

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

<sup>15</sup> Serum obtained from a mouse immunized with 20 µg of purified outer membrane polypeptides from *M. catarrhalis* strain ETSU-C2 was diluted 1/1000 and was used as a positive control for the assay.

20

**EXAMPLE 8**

This example illustrates the bactericidal activities of anti-BVH-MC6 mouse sera.

25 Bacteria were plated on chocolate agar plate and incubated at 37°C in a 8% CO<sub>2</sub> atmosphere for 18 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<sub>490nm</sub> of

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

0.25 and diluted to  $8 \times 10^7$  CFU/ml. The bactericidal assay was performed by mixing 25  $\mu$ l of the bacterial suspension with 50  $\mu$ l of diluted heat-inactivated test serum and 15  $\mu$ l of HBSS and incubating for 15 min at 37°C, 8% CO<sub>2</sub> with agitation (200rpm).  
 5 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% CO<sub>2</sub> with agitation (200rpm). At the end of the incubation period, the number of viable bacteria was determined by plating 10 $\mu$ l of the assay mixture on chocolate  
 10 agar plate. The plates were incubated at 37°C in an 8% CO<sub>2</sub> atmosphere for 18-24 h. The control consisted of bacteria incubated with heat-inactivated sera collected from mice before immunization and rabbit complement. The *M. catarrhalis* strain ETSU 658 was used to evaluate the bactericidal activity of the  
 15 sera. The % of lysis was determined by the following mathematical formula:

$$100 - \left[ \frac{\text{CFU obtained when the bacteria were incubated with immune sera}}{\text{CFU obtained with pre-bleed sera}} \times 100 \right]$$

20

Bactericidal antibodies were found to be present in the sera collected from 7 mice immunized with the purified recombinant BVH-MC6 protein (Table 5). No bactericidal activity were recorded in the sera collected from control mice (data not  
 25 shown).

Table 5. Evaluation of the bactericidal activity of anti-BVH-MC6 mouse sera.

Serum identification <sup>†</sup>	% of lysis
S1 <sup>†</sup>	97.2
S2	9.7
S3	99.1
S4	98.8
S5	82.9
S6	94.6
S7	93.2
S8	70.9
Positive control serum <sup>†</sup>	76.0

<sup>†</sup>The mice S1 to S8 were injected subcutaneously five times at  
 30 two-week intervals with 20  $\mu$ g of purified recombinant protein

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

mixed with 10 µg of QuilA adjuvant (Cedarlane Laboratories, Hornby, Canada).

<sup>2</sup>Each mouse serum collected from BVH-MC6 immunized mouse were diluted 1/50.

<sup>5</sup>Serum obtained from a mouse immunized with 20 µg of purified outer membrane proteins was diluted 1/50 and was used as a positive control for the assay.

#### 10 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 three 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, Hornby, Canada) or, as control, with QuilA adjuvant alone in PBS. Blood samples were collected from the orbital sinus on day 0, 14, and 28 prior to each immunization and 14 days (day 42) following the third injection. One week later the mice were challenged intrapulmonary with approximately  $1 \times 10^5$  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 (Euthanyl™) 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.

#### EXAMPLE 10

This example illustrates the protection of mice against M. catarrhalis infection induced by immunization with purified recombinant BVH-MC6.

Groups of 8 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 BVH-MC6

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

polypeptide in presence of 10% of QuilA adjuvant (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canada) 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  $9 \times 10^5$  CFU of the *M. catarrhalis* heterologous 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 (Euthanyl<sup>TM</sup>) 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. As shown in Table 6, 60% fewer bacteria were recovered from the immunized mice than from the control group challenged in parallel. Thus, immunization with recombinant BVH-MC6 polypeptide promoted rapid clearance of a heterologous strain of *M. catarrhalis* from lungs of mice.

20

Table 6. Pulmonary clearance of *Moraxella catarrhalis* by mice immunized with purified recombinant BVH-MC6 polypeptide

Bacterial recovery from control group (CFU/ml of lung homogenate) <sup>a</sup>	Bacterial recovery from BVH-MC6 group (CFU/ml of lung homogenate) <sup>b</sup>	Bacterial clearance (%) <sup>c</sup>
$1.86 \times 10^5 \pm 1.01 \times 10^5$	$7.44 \times 10^4 \pm 2.17 \times 10^4$	60

<sup>a</sup>Means  $\pm$  standard deviations for seven mice.

<sup>b</sup>Means  $\pm$  standard deviations for eight mice.

<sup>c</sup>Mice were challenged intrapulmonary with  $9 \times 10^5$  CFU of bacteria, and viable bacteria were recovered from lung 5 h after challenge. The number is the percentage of bacteria cleared from immunized mice compared with that of the control.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

What is claimed is:

1. 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 sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or 4 or fragments or analogs thereof;
  - (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or 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 NO: 2 or 4 or fragments or analogs thereof;
  - (d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or 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 NO: 2 or 4 or fragments or analogs thereof;
  - (f) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4 or fragments or analogs thereof;
  - (g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 1 or 3 or fragments or analogs thereof;
  - (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:
  - (a) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or 4;

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

- (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 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 NO: 2 or 4;
  - (d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 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 NO: 2 or 4;
  - (f) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4;
  - (g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 1 or 3;
  - (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.
  4. The polynucleotide of claim 2, wherein said polynucleotide is DNA.
  5. The polynucleotide of claim 1, wherein said polynucleotide is RNA.
  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
    - (b) the complement of a DNA sequence encoding a polypeptide;

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

- wherein said polypeptide comprises a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4 or fragments or analogs thereof.
8. The polynucleotide of claim 1 that hybridizes 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 SEQ ID NO: 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 polypeptide;
- wherein said polypeptide comprises a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4.
10. The polynucleotide of claim 1 that hybridizes 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 at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 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
  - (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 NO: 2 or 4.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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 region.
14. A host cell transfected with the vector of claim 12.
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 having an amino acid sequence comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
  - (b) a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide having an amino acid sequence comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
  - (c) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide having an amino acid sequence comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
  - (d) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

- (e) a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof;
  - (f) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 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;
  - (h) the polypeptide of (a), (b), (c), (d), (e), or (f) wherein the secretory amino acid sequence is deleted.
19. An isolated polypeptide comprising a polypeptide chosen from:
- (a) a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide having an amino acid sequence comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or 4;
  - (b) a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide having an amino acid sequence comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or 4;
  - (c) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide having an amino acid sequence comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2 or 4;
  - (d) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4;
  - (e) a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4;
  - (f) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 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.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

20. A chimeric polypeptide comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4 or fragments or analogs thereof; provided that the polypeptides are linked as to formed a chimeric polypeptide.
21. A chimeric polypeptide comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2 or 4 provided that the polypeptides are linked as to formed a chimeric polypeptide.
22. A pharmaceutical composition comprising a 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 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 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 laryngitis, suppurative keratitis, conjunctivitis neonatorum, and invasive disease comprising administering to said host a therapeutic or prophylactic amount of a composition according to claim 22.
28. A method for diagnostic of Moraxella infection in an host susceptible to Moraxella infection comprising
  - (a) obtaining a biological sample from a host;

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

- (b) incubating an antibody or fragment thereof 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.
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 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.
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 of claims 18 to 21 for detection or diagnosis of Moraxella infection.

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

Figure 1 (SEQ ID NO: 1)

```

1 ATGACGGCCC ATAAAGATCG GTCAACCAAC CTCCTAAAAA TATGCTPAAA
51 ACATGGTITTT TTCACATCAA GTCTCATCGC CACATTGGCA ATGGGGTTGG
101 CGATGAGTGC TTGTAGTGAT GACCGCCCAA AATCCCTAT ATCAAACCT
151 CCTGATGATG GCATCATACT TAATAAAGAC AGCATCATGA CCGTCAAGAT
201 GTCCAAATAT CAGCCAAAGT TTGCTTTTGA TGGTAAAAAT ATCCCAAGCA
251 ATCAGACCCT ATTAAATCCT GATACTGCTG TGATCGTTGA GCATATTTTT
301 GTTGATGCAG GTGATGAGGT TTCCAAAGGC GATGCACTAC TTGGTTATTT
351 CACCATTTA GAATCTTGGC CCACGGAAGT TACTACCCCT CCTGGGCCAT
401 TTGATGGGCT GGTTCACTCT GTCTTTGCC ACACAGATCA GCACTATGAT
451 OCCAATACGC CATTAATGCA GATTCATGAT ATTTCTCAAT TAAATTCAT
501 CAGCTATTTG TCTTCTGCAC TGATGAATGA TACCAAATG GCGATGCGG
551 TAACTTTTGG GGTTCATGGT ATTGCTCATG TTGGACAGAT TGCCCAAGT
601 NATGTCAGTG AACAAAACCC CAAACTCATT GAAGTACATG TCATCACTGA
651 ACCCAATCCT GATGAAAGC CCAAGATCT CCTTGGCGG CGTGTGTTG
701 GGCAATATGA TTATGGCAA ATCCAAGTTG CGCTCATGAT GCCCAGCAGC
751 GCTGTTTATG ACAGCGATTG GAATATCTTA CGCTTAGATC GATTGATTA
801 GCCACCACAT AAGCCAGATG CTCGGAITGA TGGCTATGTT TGGGTCGTAA
851 AACCAAGACCA CCGACTGCTC CTGTCCTCTG TAAAAGTTTT GGAATACCAT
901 CCCAAACTC AGCAATTTTT AGTGCAGGTT ATCACCAGAG ACAGTCTTCT
951 TGCCACAGTG CCCTTACCA AAGACGCACA TGATAAGCCA GTCAAAGTAT
1001 ACTAA

```

Figure 2 (SEQ ID NO: 2)

```

1 MTAHKDRSTN LSKICKLHCF FTSSLIATLA MGLAMSACSD DRPKSPIIKP
51 ADDGILLNKD SIMTVKMSKY QPSFADFCKI IPANQTLNLN DTAIVIVEHIF
101 VDAGDEVSKG DALLGYFTHL ESLPSEVTTL PAFPDGVVHR VFAHTDQHYD
151 ANFPLEIHD ISQLKFIYSL SSALMNDTKL GDAVTFGVHR IAHVQISQV
201 NVSEQPKLI EVHVITEPNP DERPRDLLGR RVVGHIDYQG IQVGVMPSS
251 AVYDSLNLIL ALDGFKPPH KPDAPIDGVV WVKQDHRLS LSPVKVLEYH
301 PKTQQPLVQG IPEDSLVATV ELPKDAHOKP VKVY*

```

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

Figure 3 (SEQ ID NO: 3)

```

1  ATGTATCAGC  GCTTTATCAA  TACCGCATTG  GTTCAGCCTT  TGGCGTAA
51  TATGGCAGGT  TGTGGCACCA  AAGCCATCAA  GCCAACCGAA  CGCAAGCCTG
101  CCAAATGGT  TAATATTAG  ACGCCAGTCG  CTGTATTAA  ACAGGTATCA
151  AGTATCCGCT  TGGATCAAGG  TCGATCTGGC  TTTAGTCTC  GTAATACCAA
201  CCTAAGAAAG  GATGTTATTG  ATTTACAAAT  TGCACCGTTG  GCAGATGGTA
251  TGATTCGAGC  AAGTCGCAGT  GGTATCGTCA  GTGGTTAGAT  GGGTGAATCG
301  ATTCCTTGGC  AATATAATGC  TGAAGATGTG  ATCACTGGCG  GTGTGGTAT
351  TGATGATCAA  GGTAGTGTGG  CGTCAATGG  TACCGGTCA  GGGAAATTA
401  TTGCATTAGA  TCCTCGCACA  GGTCAAGCAG  GCTGGGTAGT  AGAATTGGCT
451  TCTTCTACTT  TGGCACGAGC  ATTGATTAGT  GGTGATAAAG  TGATTGTGAT
501  CACTAACAGT  GCTACGATTT  TTGATTTGGA  TATTAAATAG  GGTGCGACAG
551  TTTGGCAGTA  TCCCACTCAG  CTACCAATA  CCAGTGTCC  TGTTATGGCA
601  AAGCCTTTGG  GCCTTAGTGC  TCGCACGCTA  TTGATTTGCT  GTGCTGATGG
651  GCGTATTTCAT  GCCTAGATA  CCATGACAGG  TGCACCACTG  TGGACTTGGC
701  GTTGGGACT  GCGATGGGT  TCTGGAGAAA  TTATCAGCT  GCGTGAATTT
751  GATGGGACAC  CGACCGTCT  AGATCATTAT  CTATACGCT  CCAGCTACAG
801  CCGACAATA  GCTGGGTTG  ATATGACAA  AGGGCTTAC  ATCTTTGCA
851  GCGAGCTATC  TAGCACCAA  AAGCTGACCA  CTTTGGCTGA  TGCTGTCAIC
901  GGTAGTAGCA  CTGATGGTGA  TGTGGTTGCC  TTTAACCGAA  TGACTGGCGA
951  GAAGCTTTGG  GAAATCATG  ATCTAAATA  TCGTGGATG  ACCAATCCG
1001  CAACCTTGG  CACTTATAT  GCTGTGGGG  ATGAGATGG  TGTGTACAT
1051  ATTTTAAATC  ATCAAGTCA  AATTATCAG  CGAGCCAATA  CCAAAGGTG
1101  TTGACCAAC  TTAAGTGA  TCAATAATC  CTTATATGCC  CAATCAGCAG
1151  ATGGCGTGT  GACTGTTGG  CAATTTAA

```

Figure 4 (SEQ ID NO: 4)

```

1  MYQRFINTAL  VAALAVTMAG  CCTKAIKPTE  RKPAKLVNIQ  TPVAVLTVQS
51  SIRLDQRRSG  FSRRNINLRK  DVIDLQIAPL  ADGMIAASRS  GIVSYMGES
101  IAWQYNAEDV  ITGGVIGDDQ  GSVAVIGTRS  GKLIALDART  GAARWVVELA
151  SSSLALALIS  GIKVIVITNS  GTIFGLDINS  GATVWQYATQ  VPNTSVRGM
201  KPLALDARTV  LIGGAGSRH  ALDTMTGAPV  WTRRWGLAMG  SGEIDQLRDI
251  DSTPTVVDHY  LTAASVSGQL  AGFDMTGRY  MFVSELSSTK  KLTTLADAVI
301  GSSTDDGVVA  FRMTGSEKLV  EHMHLKYRGL  TNPATIGTYI  AVGDADGVVH
351  ILNHQQIIS  RANTKGLTN  LTVINRLYA  QSADGVVTVW  QP*

```

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

SEQUENCE LISTING

<110> Shire Biochem Inc.  
 <120> MORAXELLA (BRANHAMIELLA) CATARRHALIS ANTIGENS  
 <130> 74872-84  
 <150> US 60/298,403  
 <151> 2001-06-18  
 <150> US 60/330,095  
 <151> 2001-10-19  
 <160> 12  
 <170> PatentIn version 3.0  
 <210> 1  
 <211> 1005  
 <212> DNA  
 <213> Moraxella catarrhalis  
 <400> 1  
 atgacggccc ataaagatcg gtcaaccaac ctctcaaaaa tatgcttaaa acattgtttt 60  
 ttccacatcaa gtctcatcgc cacattggca atgggggttg cgatgagtcg ttgtagtgat 120  
 gaacggccaa aatcccctat aatcaaacct gctgatgatg gcatacact taataaagac 180  
 agcatcatga ccgtcaagat gtccaaatct cagccaagtt ttgacctga tggtaaaatt 240  
 atcccagcca atcagacct atfaaatctt gatactgctg tgatcgttga gcattatttt 300  
 gttgatgcag gtgatgaggt ttccaaagcg gatgcactac ttggtatttt caccatttta 360  
 gaattcttgc ccagccaagt taactacctg cctgcgccat ttgatggggt ggttcactgt 420  
 gtctttgccc acacagatca gcactatgat gccaatagc cattaatga gattcagat 480  
 atttctcaat taaaattcat cagctatttg tottctgac tgatgaatga taccaaattg 540  
 ggcgatggcg taacttttgg ggttgatggt attgctcatg ttggacagat tagccaagt 600  
 aatgctcgtg acaaaaacc caaactcatt gaagtacatg tcatcatga acccaatctt 660  
 gatgaaaagc ccaaaagatct gcttggcgcg cgtgtggttg ggcattatga ttatggacaa 720  
 atccaaattg ggttcattgat gccccagcag cgtgtttatg acacggattt gaatatctta 780  
 cggctagatg gatttgataa gccaccacat aagccaagatg ctccgattga tggctatggt 840  
 tgggtcgtaa aacaagacca ccgactgtcc ctgtcccctg taaaagtttt ggaataccat 900  
 cccaaaactc agcaattttt agtcaaggt atcacccaag acagtcttgt tggcaccagt 960  
 cccttaccaa aagacgcaca tgataagcca gtcaaaagtat actaa 1005

<210> 2  
 <211> 334  
 <212> PRT  
 <213> Moraxella catarrhalis  
 <400> 2  
 Met Thr Ala His Lys Asp Arg Ser Thr Asn Leu Ser Lys Ile Cys Leu  
 1 5 10 15  
 Lys His Cys Phe Thr Ser Ser Leu Ile Ala Thr Leu Ala Met Gly  
 20 25 30  
 Leu Ala Met Ser Ala Cys Ser Asp Asp Arg Pro Lys Ser Pro Ile Ile  
 35 40 45  
 Lys Pro Ala Asp Asp Gly Ile Ile Leu Asn Lys Asp Ser Ile Met Thr  
 50 55 60

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

Val Lys Met Ser Lys Tyr Gln Pro Ser Phe Ala Phe Asp Gly Lys Ile  
65 70 75 80  
Ile Pro Ala Asn Gln Thr Leu Leu Asn Leu Asp Thr Ala Val Ile Val  
85 90 95  
Glu His Ile Phe Val Asp Ala Gly Asp Glu Val Ser Lys Gly Asp Ala  
100 105 110  
Leu Leu Gly Tyr Phe Thr His Leu Glu Ser Leu Pro Ser Glu Val Thr  
115 120 125  
Thr Leu Pro Ala Pro Phe Asp Gly Val Val His Arg Val Phe Ala His  
130 135 140  
Thr Asp Gln His Tyr Asp Ala Asn Thr Pro Leu Ile Glu Ile His Asp  
145 150 155 160  
Ile Ser Gln Leu Lys Phe Ile Ser Tyr Leu Ser Ser Ala Leu Met Asn  
165 170 175  
Asp Thr Lys Leu Gly Asp Ala Val Thr Phe Gly Val Asp Gly Ile Ala  
180 185 190  
His Val Gly Gln Ile Ser Gln Val Asn Val Ser Glu Gln Asn Pro Lys  
195 200 205  
Leu Ile Glu Val His Val Ile Ile Glu Pro Asn Pro Asp Glu Lys Pro  
210 215 220  
Lys Asp Leu Leu Gly Arg Arg Val Val Gly His Ile Asp Tyr Gly Gln  
225 230 235 240  
Ile Gln Val Gly Val Met Met Pro Ser Ser Ala Val Tyr Asp Ser Asp  
245 250 255  
Leu Asn Ile Leu Ala Leu Asp Gly Phe Asp Lys Pro Pro His Lys Pro  
260 265 270  
Asp Ala Pro Ile Asp Gly Tyr Val Trp Val Val Lys Gln Asp His Arg  
275 280 285  
Leu Ser Leu Ser Pro Val Lys Val Leu Glu Tyr His Pro Lys Thr Gln  
290 295 300  
Gln Phe Leu Val Gln Gly Ile Thr Glu Asp Ser Leu Val Ala Thr Val  
305 310 315 320  
Pro Leu Pro Lys Asp Ala His Asp Lys Pro Val Lys Val Tyr  
325 330

<210> 3  
<211> 1179  
<212> DNA  
<213> Moraxella catarrhalis

<400> 3  
atgtatcagc gctttatcaa taccgcattg gttgcagctt tggcggtaac tatggcaggt 60  
tgbggaccac aagccatcaa gccaacccgaa cgcaagcctg ccaaattggt taatattcag 120  
agccagctgg ctgtattaac acaggtatca agtatccgct tggatcaagg tcatctggc 180  
tttagctgct gbaataccaa octaagaaga gatgttattg attacaaat tgcaccgttg 240

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

```

gcagatggta tgattgcagc aagtcgcagt ggtatcgtca gtggttacat ggggtaatcg 300
attgctggc aatataatgc tgaagatgtg atcactggcg gtgctcggat tgatgatcaa 360
ggtagtgtgg cggtcattgg tacgcgttca gggaaataa ttgcattaga tctcgcaca 420
ggtcagacac gctgggtagt agaattggct tcttctagtt tggcaccagc attgattagt 480
ggtgataaag tgattgtcat cactaacagt ggtacgattt ttggattgga tattaatagt 540
ggtcgcagac ttggcagta tgcactcag gtaccaata ccagtgtcg tggtatggca 600
aagcctttg cgcttgatgc tcgcacgta tgattgggtg gtgctgatgg gcgtrattoat 660
gcactagata ccatgacagc tgcaccagt tggactcgc gtgtgggact ggcgatgggt 720
tctggagaaa ttgatcagct gcgtgatatt gatgggacac cgaccgtcgt agatcattat 780
ctatacgtcg ccagctacag cggacaatta gctggglttg atatgacaac agggcgtacc 840
atgtttgtca cggagctatc tagcaccaaa aagctgacca ctttggctga tgcgtctacc 900
ggtagtagca ctgatgggta tctggttgcc ttaaccgaa tgactggcga gaagctttgg 960
gaaaatcatg atctaaaata tctgtgattg accaatcctg caaccatcgg cacttatatt 1020
gctgtgggg atgcagatgg tctggtacat attttaaatc atcaaggtca aattatcagc 1080
cgagccaata ccaaaggtgc ttgaccaac ttaactgtga tcaataatcg cttatatgcc 1140
caatcagcag atggcgttgt gactgtttgg caattttaa 1179

```

```

<210> 4
<211> 392
<212> PRT
<213> Moraxella catarrhalis

```

```

<400> 4
Met Tyr Gln Arg Phe Ile Asn Thr Ala Leu Val Ala Ala Leu Ala Val
1 5 10 15
Thr Met Ala Gly Cys Gly Thr Lys Ala Ile Lys Pro Thr Glu Arg Lys
20 25 30
Pro Ala Lys Leu Val Asn Ile Gln Thr Pro Val Ala Val Leu Thr Gln
35 40 45
Val Ser Ser Ile Arg Leu Asp Gln Gly Arg Ser Gly Phe Ser Arg Arg
50 55 60
Asn Thr Asn Leu Arg Lys Asp Val Ile Asp Leu Gln Ile Ala Pro Leu
65 70 75 80
Ala Asp Gly Met Ile Ala Ala Ser Arg Ser Gly Ile Val Ser Gly Tyr
85 90 95
Met Gly Glu Ser Ile Ala Trp Gln Tyr Asn Ala Glu Asp Val Ile Thr
100 105 110
Gly Gly Val Gly Ile Asp Asp Gln Gly Ser Val Ala Val Ile Gly Thr
115 120 125
Arg Ser Gly Lys Leu Ile Ala Leu Asp Ala Arg Thr Gly Ala Ala Arg
130 135 140
Trp Val Val Glu Leu Ala Ser Ser Ser Leu Ala Pro Ala Leu Ile Ser
145 150 155 160
Gly Asp Lys Val Ile Val Ile Thr Asn Ser Gly Thr Ile Phe Gly Leu
165 170 175
Asp Ile Asn Ser Gly Ala Thr Val Trp Gln Tyr Ala Thr Gln Val Pro
180 185 190
Asn Thr Ser Val Arg Gly Met Ala Lys Pro Leu Ala Leu Asp Ala Arg
195 200 205

```

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

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

<210> 5  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 5  
 taaggataca tatgacggcc cataaagatc g 31

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

<220>  
 <223> primer

<400> 6  
 tatgctcgag gtatacttg actggettat catgtg 36

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

```

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 7
gagtgggat cctgatgacc gcccaaat          29

<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 8
tgtattaagc ttttagtata cttgactgg cttatc          36

<210> 9
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 9
cggatattca tatgtatcag cgctttatca atac          34

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 10
atagatctcg agaaattgcc aaacagtoac a          31

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 11
actatgagat cttgggcacc aaagccatca agc          33

<210> 12
<211> 36

```

WO 02/102836

PCT/CA02/00911

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<221> primer

<400> 12  
gattatgctg acttaaaatt gccaaacagt cacaac

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)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 December 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/102836 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/31, 15/63, C07K 14/21, 19/00, A61K 39/02, G01N 33/569
- (74) Agents: MORROW, Joy, D. et al.; Smart & Biggar, P.O. Box 2999, Station D, 900-55 Metcalfe Street, Ottawa, Ontario K1P 5Y6 (CA).
- (21) International Application Number: PCT/CA02/00911
- (81) Designated States (national): AR, 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, GH, GM, GR, GU, HT, 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, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 18 June 2002 (18.06.2002)
- (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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/298,403 18 June 2001 (18.06.2001) US  
60/330,095 19 October 2001 (19.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SHIRE BIOCHEM INC. [CA/CA]; 275 Armand-Frappier Blvd, 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 Maritain, Silery, Quebec G1T 1N6 (CA); BRODEUR, Bernard, R. [CA/CA]; 2401 Maritain, Silery, Quebec G1T 1N6 (CA); RIOUX, Stéphane [CA/CA]; 869 avenue des Pins, Beauport, Quebec G1E 1J3 (CA); LEBLANC, Geneviève [CA/CA]; 6850 Boul., L'Ormiere, Apt. 12, Neufchatel, Quebec G2C 1C1 (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
- (88) Date of publication of the international search report:  
22 May 2003
- 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 02/102836 A3

(54) Title: MORAXILLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS ANTIGENS

```

1  MTAHKDRSTN LSKICLKHCFTSSLIATLA MGLAMSACSD DRPKSPIIKP
51  ADDGILLNKD SIMTVKMSKY QPSFAPDGI IPANQTLNLN DTAIVIVEHIP
101 VDAGDEVSKG DALLGYPTHL ESLPSEVTTL PAPFDGVVHR VFAHTDQHYD
151 ANTPLEIEHD ISQLKFISYL SSALMNDTKL GDAVTFGVGD IAHVQISQV
201 NVSBQPKLI EVHVIIEPNP DEKPKDLGR RVVGHIDYGO IQVGVMPSS
251 AVYDSLNLAL ALDGFDRPPH KPDAPIDGYV WVVQDHRLS LSPVKVLEYH
301 PRTOQFLVQG ITEDSLVATV PLPKDAHDKP VKVY*

```

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

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/CA 02/00911
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/31 C12N15/63 C07K14/21 C07K19/00 A61K39/02 G01N33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K G01N		
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, WPI Data, BIOSIS, EMBL		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 78968 A (INCYTE GENOMICS, INC.) 28 December 2000 (2000-12-28) page 3, line 5 -page 4, line 13 page 6, line 15 -page 16, line 3; claims Sequence listing SEQ ID NO:23,29	1-31
A	WO 00 09694 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.) 24 February 2000 (2000-02-24) the whole document	1-31
<input 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 citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles 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		Date of mailing of the international search report
21 March 2003		31.03.2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2340, Tx. 31 651 epo nl, Fac. (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Montero Lopez, B

International Application No. PCT/CA 02 00911

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: Partially 1-31

Moraxella catarrhalis antigen of sequence SEQ ID NO:2 and homologs thereof, encoding polynucleotide of sequence SEQ ID NO:1 and homologs thereof and their applications

2. Claims: Partially 1-31

Moraxella catarrhalis antigen of sequence SEQ ID NO:4 and homologs thereof, encoding polynucleotide of sequence SEQ ID NO:3 and homologs thereof and their applications

International Application No. PCT/CA 02 00911

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 28 and 29 are directed to a diagnostic method practised on the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound. Although claims 23-26 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	Inte. ....-nat application No. PCT/CA 02/00911
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
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).	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT information on patent family members				Internat	Application No
				PCT/CA 02/00911	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0078968	A	28-12-2000	AU 1824101 A EP 1218512 A2 WO 0078968 A2		09-01-2001 03-07-2002 28-12-2000
WO 0009694	A	24-02-2000	AU 5422799 A CA 2340392 A1 WO 0009694 A1 EP 1105492 A1		06-03-2000 24-02-2000 24-02-2000 13-06-2001

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 27/16	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	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 33/569	F
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/569	A 6 1 K 37/02	

(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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ジョセ アメル

カナダ国 ケベック ジー1ティ 1エヌ6 シルリー 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 1エヌ6 シルリー 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 ピューポート アヴェニュー デ ピンサンス  
869

(72) 発明者 ジェネヴィエーヴ レブランク

カナダ国 ケベック ジー2シー 1シー1 ヌフチャテル ロミエーレ ブールヴァード 68  
50 アパートメント 12

(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 - チャールス カンティン 896 シー

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA13 BA31 CA04 CA05 CA06 CA07 CA11 DA06  
EA04 FA02 FA10 GA14 GA19 HA03 HA08 HA14  
4B064 AG01 CA02 CA19 CC24 CE02 CE12 DA01 DA13 DA15  
4B065 AA01Y AA26X AB01 AC14 BA02 BA24 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA04 MA17 MA35  
MA52 MA57 MA59 MA63 MA66 NA14 ZA332 ZA342 ZA592 ZB352  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 DA50 DA86 EA28  
EA50 EA52 FA72 FA74 GA01 GA26

专利名称(译)	莫拉氏菌 (Blanhamera) 卡他性杆菌抗原		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005508146A</a>	公开(公告)日	2005-03-31
申请号	JP2003506308	申请日	2002-06-18
[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 ジェネヴィエーヴレブランク 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 ジェネヴィエーヴ レブランク ジュリー クチュール		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/02 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/04 C07H21/04 C07K14/195 C07K14/21 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12N15/74 C12P21/02 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P27/02 A61P27/16 C07K14/212 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/04 C07K14/195 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/569.F C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/CA11 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA14 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA15 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA04 4C084/MA17 4C084/MA35 4C084/MA52 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA342 4C084/ZA592 4C084/ZB352 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA50 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA01 4H045/GA26		
优先权	60/298403 2001-06-18 US 60/330095 2001-10-19 US		
其他公开文献	JP2005508146A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

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

