

(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2005-500024
(P2005-500024A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/00	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/02	4 B O 6 4
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/02	4 C O 8 5
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 135 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-589508 (P2002-589508)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月15日 (2002.5.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年11月17日 (2003.11.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2002/000706
 (87) 国際公開番号 W02002/092625
 (87) 国際公開日 平成14年11月21日 (2002.11.21)
 (31) 優先権主張番号 60/290, 653
 (32) 優先日 平成13年5月15日 (2001.5.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592107462
 シャイアー バイオケム インコーポレイ
 テッド
 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
 ブールバード 275
 (74) 代理人 100072051
 弁理士 杉村 興作
 (72) 発明者 デニス マーティン
 カナダ国 ケベック ジー3エイ 1イー
 9 セント-オウガスティン-ドゥーデス
 マウルス リュ ガボウリー 4728-
 ジー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリス抗原

(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。

```

1 ATGGGACACTG ACGTGAACA TTATACAAA CATCGCTAT CAGCTGCCAT
51 CATTGGCGTT TTATTATCA TPAGCCCATC AGTGCACGA AATACGACAC
101 ACCATCACAC CCTAACCACT AGCGAGCTTA AACTTGTGA TGATAGTATT
151 ATTGATAGTA TCAATCAATT GGGTGAAGCTG ACCGTCAATA TTCCAAATAC
201 ACAATATTTT CAATACACA ACGGTGTGAG CGTTTCTTTT ACGCCATATC
251 ATGAGCTGCC TATTGTGAT ATCAGCTTGT ATTTATATGC AGGTCAGGG
301 TATGACCAATC AGGTGTGCAA ATCAGGCAAG GCTAAGTNG TTGCAACCAT
351 GCTCACCCAA GGAATGTACA GCCTTTCTGA AGATGATTT GTTGTGCCA
401 AAGAGCGTCT TGGCATTTGAT TTATCCAGTA CAGCAATAA GGATAACTTA
451 ACTTTATCAT TAAGAAAGCTT GTCTGATCAA TCAITTTTAA ATCAAGCCGC
501 CGATTTAATG GTCGATGCTG TCACTCAACC TGCCTTTTGT GATPAAGACTC
551 TACACGCCAA CAATAATCAG CTCATCACCA GTTTPAACA AAAAAGCAA
601 ACCCTTATC ATGTAGTATG TTTGTCTTAT CACTACGCCG TATATGAAA
651 TCACTCTTAT GCACAGCCAA CCACAGGCCGA TGAAGATAGT ATTGCCAAA
701 TTGATCGTGA TGAGCTGCTT AATTTTGGC ATACTTTTAT TAATGCAAT
751 AATGCGACAC TGGTGAATAC AGTGTATATG ACCGCCGACC AAGCCAAATC
801 ACTTGCACAC CATGTGAGCC CCAATTTACC GACAGCCAG TCCTATAAAA
851 ATACCTTGA TTTCACAAA CCAATTAAGS CTCGTGATAT CCATATTCCT
901 CACAGAGTA GTCAACCCA AATATATC GTTATTCCCA CAGTAAAGT
951 ACGCACGGAC AAAGCAGGCT GTCAAGAGTT CAGCGATTTT TCATTAGGTA
1001 ATGAAATTTT GGCAGGTGGT GATTTTAAIT CCAGATTTGT GAAPACCAT
1051 CGAGAGCAA AAGGCTTACAT TTATGGCATT TATGCGGTA TGAACCCCT
1101 CAGAGCAGGT GGTAAITATG TGGTTGAATT TTCACCCGAT GCGATTAAG
1151 CAGCCGATGC CATTTTATAG AGCTTACACA TCAITTTATGA GTCGTGAAT
1201 GAAGGCAATA CCAAGAGGA GCTTGAATTC GTGCTTTTGC CCAATPAAA
1251 TGGTTTTRGC AATATTTTTF CAAAGCAATGC CAGTATTCAT CGTGTCAATG
1301 GTGCTTTTAT TGTATCCGAT TATCCAAAG ATCATCTTAA CCATAGCCTC
1351 AATCGCTTGG ATATGCCCAC GATAAATAGT GTTAAATCCG CACTGAACCT
1401 CCGTATCAAG CCGTATGAAT TTATCATCAT CACCGTGGST AAAACTAAGC
1451 CAAATTTGGA CAATTA
    
```

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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ポリヌクレオチド、
- (b) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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ポリヌクレオチド、
- (c) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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ポリヌクレオチド、
- (d) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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、6、8、10、12、14 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、6、8、10、12、14 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、5、7、9、11、13 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) (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】

- (a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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 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、6、8、10、12、14 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ポリヌクレオチド、
- (c) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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ポリヌクレオチド、
- (d) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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、6、8、10、12、14 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、6、8、10、12、14 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、5、7、9、11、13 から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び
- (h) (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 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。

10

20

30

40

50

【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。

【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、配列番号第 2、4、6、8、10、12、14 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ものである)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。 10

【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、配列番号第 2、4、6、8、10、12、14 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ものである)のいずれかにハイブリダイズする、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【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、6、8、10、12、14 から選択された配列からなるものである)のいずれかにハイブリダイズする、請求項 2 に記載の単離されたポリヌクレオチド。 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、6、8、10、12、14 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からの、少なくとも 10 の連続するアミノ酸残基からなるものである)のいずれかにハイブリダイズする、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド。 30

【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、6、8、10、12、14 から選択された配列からなるポリペプチドからの、少なくとも 10 の連続するアミノ酸残基からなるものである)のいずれかにハイブリダイズする、請求項 2 に記載の単離されたポリヌクレオチド。 40

【請求項 12】

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

【請求項 14】

請求項 12 に記載のベクターを用いて核酸注入された宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 13 に記載のベクターを用いて核酸注入された宿主細胞。

【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を含む、ポリペプチドの生成方法。

【請求項 18】

(a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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 次ポリペプチドに対して、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチド 10

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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 次ポリペプチドに対して、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、6、8、10、12、14 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を有する 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、

(d) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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、6、8、10、12、14 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原を生成することが可能なポリペプチド、 20

(f) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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、

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

から選択されたポリペプチドからなる、単離されたポリペプチド。

【請求項 19】

(a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 から選択された配列からなるアミノ酸配列を有する 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチド、 30

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 から選択された配列からなるアミノ酸配列を有する 2 次ポリペプチドに対して、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、6、8、10、12、14 から選択された配列からなるアミノ酸配列を有する 2 次ポリペプチドに対して、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、6、8、10、12、14 から選択された配列からなるポリペプチド、 40

(e) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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、6、8、10、12、14 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 (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 (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。 50

【請求項 20】

配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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。

【請求項 21】

配列番号 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列から選択された配列を有するポリペプチドを 2 又はそれ以上含み、キメラポリペプチドを形成するように該ポリペプチドを連結して提供された、キメラポリペプチド。

【請求項 22】

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

10

【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量投薬する工程を含む、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。

20

【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量投薬する工程を含む、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】

(a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

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

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

30

を含む、モラクセラ 感染を受けやすい宿主における、モラクセラ 感染診断方法。

【請求項 29】

(a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

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

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

を含む、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。

40

【請求項 30】

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

【請求項 31】

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

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、ポリペプチドに関し、より詳細にはモラクセラ（ブランハメラ）カタラーリス（*Moraxella (Branhamella) catarrhalis*）感染の予防、診断及び/又は治療に利用可能であるモラクセラ（ブランハメラ）カタラーリス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、グラム陰性双球菌であり、ヒトの呼吸器感染症の起炎菌である。M. カタラーリスは現在、幼児や子供の中耳炎の起炎菌として、肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）及びインフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）に次ぐ第3の最も代表的な起炎菌と認められている。M. カタラーリスはまた、副鼻腔炎、慢性咳、成人の急性喉頭炎、化膿性角膜炎、新生児（neonatorum）の結膜炎、及び免疫不全宿主の侵入性疾病を含む、他の何種類かの感染症にも関連がある。

10

【0003】

M. カタラーリス株の約90%は抗生物質に耐性があり（ラクトース陽性）、また再発性中耳炎は高死亡率に結びつくため、宿主へのM. カタラーリス感染予防ワクチンの開発が必要とされている。M. カタラーリス感染は、細菌細胞表面の抗原に対する免疫反応を促す。しかしながら、これら表面蛋白の多くは未だ特徴づけられておらず、他の菌からの感染予防効果につながるような免疫反応も確認されていない。

【0004】

宿主へのM. カタラーリス感染予防ワクチンの開発には、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集中した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ものである。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は非常に変動性が高かった。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、細菌表面に表れたものであった。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。また他の研究者も、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も非常に保存性が高いが、慢性閉塞性肺疾患の成人の、このOMP CDに対する免疫反応には変動性が見られる。

20

30

【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/又は治療に利用可能である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】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14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次ポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0007】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14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。

40

【0008】

他の態様においては、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、発現制御部位と機能が発現するように連結され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核酸注入された宿主細胞が提供され、また、発現に適した条件下において、前記宿主細胞を培養する工程を含むポリペプチドの作成方法が提供されている。

【0009】

本発明は、精製かつ単離されたポリヌクレオチドにおいて、モラクセラ感染の予防、診断

50

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ポリヌクレオチドを提供する。

【0010】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14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。

【0011】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14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している。

10

【0012】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14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している。

【0013】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14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70%の同一性を有するポリペ

20

【0014】

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している。

【0015】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14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

【0016】

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している。

30

【0017】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14を含むアミノ酸配列により特徴付けられたポリペプチドに関する。

【0018】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14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を提供する。

【0019】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14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。

40

【0020】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14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に関する。

【0021】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14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。

50

【 0 0 2 2 】

一態様において、本発明は、配列番号 2、4、6、8、10、12、又は 14 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 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。

【 0 0 2 3 】

一態様において、本発明は、配列番号 2、4、6、8、10、12、又は 14 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。

【 0 0 2 4 】

一態様において、本発明は、配列番号 2、4、6、8、10、12、又は 14 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 90% 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

【 0 0 2 5 】

一態様において、本発明は、配列番号 2、4、6、8、10、12、又は 14 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。

【 0 0 2 6 】

一態様において、本発明は、配列番号 2、4、6、8、10、12、又は 14 から選択された配列からなるポリペプチドに関する。

【 0 0 2 7 】

一態様において、本発明は、 20

(a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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ポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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ポリヌクレオチド、 30

(d) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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、6、8、10、12、14 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、6、8、10、12、14 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、5、7、9、11、13 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 40

(h) (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。

【 0 0 2 8 】

一態様において、本発明は、

(a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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 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、6、8、10、12、14 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ポリヌ 50

クレオチド、

(c) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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ポリヌクレオチド、

(d) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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、6、8、10、12、14 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、6、8、10、12、14 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、 10

(g) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13 から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び

(h) (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。

【0029】

一態様において、本発明は、

(a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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 次ポリペプチドに対して、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチド、 20

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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 次ポリペプチドに対して、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、6、8、10、12、14 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 次ポリペプチドに対して、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、6、8、10、12、14 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、6、8、10、12、14 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、 30

(f) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 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、

(g) N 末端のメチオニン残基が欠失した (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 (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。

【0030】

一態様において、本発明は、

(a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、又は 14 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 70% の同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12、又は 14 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、

(c) 配列番号 2、4、6、8、10、12、又は 14 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、

(d) 配列番号 2、4、6、8、10、12、又は 14 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、6、8、10、12、又は 14 から選択された配列からなるポリ 50

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、6、8、10、12、又は 14 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 (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 (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。

【0031】

当業者であれば、本発明には、本願に記載の DNA 分子、すなわち突然変異体や、変異体
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抗体が含ま
れる。

10

【0032】

さらなる一実施例において、本発明のポリペプチドは抗原性を示す。

【0033】

さらなる一実施例において、本発明のポリペプチドは免疫原性を示す。

【0034】

さらなる一実施例において、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。

20

【0035】

さらなる一実施例において、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がある。

【0036】

“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明らか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
チドを抗原として使用する。

30

【0037】

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グランク検定や、
生存率及び死亡までの日数を比較するためのフィッシャーの正確確率検定を用いた統計分
析は、それぞれ、P 値を算出して 2 グループ間に統計上の顕著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、顕著ではないとみなされる。

【0038】

本発明の他の態様においては、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ている。

40

【0039】

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、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、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からの、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 1
5 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。

【0040】

50

当業者であれば、本発明を再検討する中で、本発明のポリペプチド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。

【0041】

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に対して、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より少ないアミノ酸残基が置換、修飾又は欠失されており、好ましくは10より少ないものがそうである。

10

【0042】

これら置換基は、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。好ましい置換基は、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、天然のものであるが又はそうでなからうが、下記グループ：

20

ala、pro、gly、gln、asn、ser、thr、val；

cys、ser、tyr、thr；

val、ile、leu、met、ala、phe；

lys、arg、orn、his；及び、

30

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。

【0043】

従来とは異なるアプローチでは、類似体を、例えば効果的に所望のポリペプチド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。

【0044】

相同性のパーセンテージは、同一性のパーセンテージと、アミノ酸のタイプの類似性や、又は保存のパーセンテージの、合計パーセンテージとして定める。

40

【0045】

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より少ないアミノ酸残基、好ましくは10より少ないものが置換、修飾又は欠失されている。

50

【0046】

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より少ないアミノ酸残基、好ましくは10より少ないものが置換、修飾又は欠失されている。

【0047】

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、最適配列を探し出すというものである。最適配列について、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一直線に配列し、適合値を定める。従って、それぞれ異なる値を有するとして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。

【0048】

従来とは異なるアプローチでは、類似体又は誘導体は、例えば効果的に所望のタンパク質又はポリペプチド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。

【0049】

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。

【0050】

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。

【0051】

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

【0052】

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。

【0053】

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

【0054】

さらに、本発明のポリペプチドは、末端のNH₂基のアシル化により(例えば、アンモニアや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。

10

20

30

40

50

【0055】

また、ポリペプチドの断片及び類似体の、ヘテロ及びホモポリペプチドマルチマーについても検討する。これらのポリマー型のものには、例えば、アビジン/ビオチン、グルタルアルデヒド、又はジメチルスーパージミテイ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又は反転した隣接配列を含むポリペプチドも含まれる。

【0056】

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。

10

【0057】

さらなる一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14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。

【0058】

さらなる一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14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。

20

【0059】

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1つ、すなわち抗原決定部位を少なくとも1つ含むものである。

【0060】

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。

30

【0061】

ある特定の態様においては、本発明のポリペプチド断片及び類似体は、メチオニン(Met)やバリン(Val)のような開始残基を含まない。好ましくは、ポリペプチドは、リーダー又は分泌配列(シグナル配列)を組み込まないものである。本発明のポリペプチドのシグナル部分は、確立された分子生物学技術に従い、判断することができる。通常は、興味のあるポリペプチドをモラクセラ菌株から単離して、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定めて、それに従い成熟ポリペプチドの配列を定める。

【0062】

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)やリーダーペプチドの両方又はその一方を用いずに、生成及び/又は使用できることが分かっている。リーダーペプチドをコードする配列を有さないクローン遺伝子は、ポリペプチドを大腸菌の細胞質に限定して、その回復を促すことが分かっている(グリック, G.R.及びパスタ-ナック, J.J.の“Manipulation of gene expression in prokaryotes”(1998年)、ワシントンDC、ASMプレスの“Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinantDNA”(第2版、第109-143頁))。

40

【0063】

本発明の他の態様においては、(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)免疫反応の誘引に効果的な免疫量の本発明のポリペプチド、

50

例えばモラクセラに対する免疫反応予防剤を宿主に投与することにより、その宿主内で、モラクセラに対する免疫反応を誘発させる方法、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されている。

【0064】

本発明の他の態様によれば、(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)免疫反応の誘引に効果的な免疫量の本発明のポリヌクレオチド、例えばモラクセラに対する免疫反応予防剤を宿主に投与することにより、その宿主内で、モラクセラに対する免疫反応を誘発させる方法、及び、特には(iv)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されている。

10

【0065】

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・レゲンモーター、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。

20

【0066】

他の態様では、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(SO₄)₂、AlNa(SO₄)₂、AlNH₄(SO₄)₂、Al(OH)₃、AlPO₄、シリカ、カオリン等の塩、(4)ステイミュロン(登録商標)のようなサポニン誘導體、又はそれらから生成されたISCOMsのような粒子(免疫刺激性複合体)、(5)インターロイキン、インターフェロン、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)のようなサイトカイン、(6)カーボンポリヌクレオチドのような他の物質、すなわちポリICやポリAU、解毒コレラ毒素(CTB)と、大腸菌の粘膜免疫の誘発のための熱不安定性毒素を含むものである。アジュバントのより詳細な説明は、M.Z.Iカーン等による総説“Pharmaceutical Research”第11巻、第1号(1994年)の第2-11頁や、グプタ等による他の総説“Vaccine”第13巻、第14号の第1263-1276頁(1995年)や、W099/24578で得ることができる。好ましいアジュバントは、QuilA(登録商標)、QS21(登録商標)、Alhydrogel(登録商標)及びAdjuphos(登録商標)を含むものである。

30

【0067】

本発明の薬剤組成物は、注射、急速注入、鼻咽吸込、皮膚吸込により非経口で投与されるか、又は口腔内か経口で投与される。

40

【0068】

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。

50

【0069】

さらなる一態様において、本発明は、モラクセラ感染を受けやすい宿主に、本発明の予防又は治療量の組成物を投薬する工程を含む、前記宿主のモラクセラ感染の予防又は治療方法を提供する。

【0070】

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、哺乳動物は人間である。

【0071】

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。

10

【0072】

ある特定の態様において、薬剤の組成物は、成人のような、モラクセラ感染の危険性のある宿主に投与される。

【0073】

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。

【0074】

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。

20

【0075】

別の態様においては、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14号に示す配列か、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ている。

【0076】

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)を含むことができる、配列番号第1、3、5、7、9、11、13に記載のものである。

【0077】

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、すなわち少なくとも95%の同一性で、ハイブリダイズする。さらなる一態様では、同一性は97%以上である。

30

【0078】

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”(1989年): ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバーの“Laboratory Manual”第2版、ニューヨーク、ジョン・ウィレイ&ソンス、オースベルF.M.等(Ausubel F.M. et al., John Wiley & Sons, Inc. N.Y.)出版の“Molecular Biology”(1999年)を参照)。

40

【0079】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、

(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、6、8、10、12、14に示す配列

50

、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ものである)のいずれかをハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0080】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、

(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、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなるものである)のいずれかをハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0081】

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、

(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、6、8、10、12、14に記載の配列か、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からの、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)のいずれかをハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0082】

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、

(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、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなるポリペプチドからの、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)のいずれかをハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0083】

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、5、7、9、11、13に記載の配列、又はそれらの断片が若しくは類似体に記載のものである。

【0084】

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、5、7、9、11、又は13に記載のものである。

【0085】

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。

【0086】

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。

【0087】

さらなる態様においては、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又はそれらの断片が、配列か、若しくは誘導体は、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、真核細胞内で活性化する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。

【0088】

他の態様においては、宿主内で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。

【0089】

10

20

30

40

50

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”：ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバーの“A Laboratory Manual”第2版（1989年）；ニューヨーク、ジョン・ウィレイ&ソンス社、オースベルF.M.等出版の“Current Protocol in Molecular Biology”；ニュージョージ、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&ソンス社出版の“Current Protocol in Immunology”に記載されたとおりである。

10

【0090】

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

【0091】

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に核酸注入し、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加減した培養液中でそれ培養する。適したベクターは、選択されたベクター内で生存かつ複製可能であり、かつ染色体性、非染色体性、及び合成DNA配列からなるものであり、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。ポリペプチド配列は、発現制限部位に機能が作動するように連結された制限酵素を用いて、プロモーターと、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、任意にオペレーター（制御要素）から成るベクターの適切な部位に組込むことができる。所定の宿主とベクターに適する発現制御部位の個々の構成部位は、確立された分子生物学の原理（サンプローク等の“分子クローニング”：ニューヨークのコールド・スプリング・ハーバー“実験マニュアル”第2版（1989年）；ニューヨーク、ジョン・ウィレイ&ソンス、オースベルF.M.等出版の“分子生物学”）に従い、選択することができる。適したプロモーターは、LTR又はSV40プロモーターと、大腸菌ラクトースと、tac又はtrpプロモーターと、ファージラムダP_Lプロモーターとを含むものであるが、それらに制限されない。ベクターは、好ましくは選択マーカー、すなわちアンピシリン抵抗性遺伝子だけでなく、複製起点も組込んだものである。適した細菌性ベクターは、pET、pQE70、pQE60、pQE-9、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT5、と真核ベクターpBlueBac111、pWLN E0、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ズ；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。

20

30

【0092】

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析出、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。

40

【0093】

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、リーダーは翻訳後処理を用いて取り除く（米国第4431739号、同第4425437号、及び同第4338397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

50

く。

【0094】

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タラーリス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する工程

10

に従った方法がある。

【0095】

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

20

に従い実施することができる。

【0096】

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んだ、原則として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。

【0097】

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プローブの構築にも用いることができる。本発明の検出法は、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

30

を含む。

【0098】

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、本発明のモラクセラペプチドの少なくとも約6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。さらなる態様では、好ましいDNAプローブは、本発明のモラクセラペプチドの少なくとも約15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。さらなる態様では、好ましいDNAプローブは、本発明のモラクセラペプチドの少なくとも約30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。さらなる態様では、好ましいDNAプローブは、本発明のモラクセラペプチドの少なくとも約50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。

40

【0099】

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に反応性を示す抗体又はその断片に、検出可能なラベルを付す

50

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。

【0100】

他に、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で、前記抗体を検出する方法は、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に従って実施することができる。

【0101】

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んだ、原則として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。

【0102】

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プローブの構築にも用いることができる。本発明の検出法は、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。

【0103】

一態様において、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。

【0104】

本発明のさらなる態様は、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イムノゲンとして、本発明のモラクセラポリペプチドを使用する方法である。適当な抗体は、適切なスクリーニング法を用いて、例えば試験モデル内においてモラクセラ感染を受動的に防御するある特有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、かつ免疫グロブリンの任意の部類に属するものとすることができる。前記抗体又は断片は、動物のものとすることができる。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エピト - プの数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することができる。

【0105】

一態様において、本発明は、モラクセラ感染の予防及び/又は治療に用いる抗体の使用方法を提供している。

10

20

30

40

50

【0106】

本発明のさらなる態様は、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イムノゲンとして、本発明のモラクセラポリペプチドを使用する方法である。適当な抗体は、適切なスクリーニング法を用いて、例えば試験モデル内においてモラクセラ感染を受動的に防御するある特有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、かつ免疫グロブリンの任意の部類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エピト - プの数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することができる。

10

【0107】

本発明のさらなる態様は、受動免疫に用いる、本発明のポリペプチドを対象とした抗体の使用方法である。本願に記載の抗体を使用することができる。

【0108】

本発明のさらなる態様は、本発明のポリペプチドから生成された抗体の、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。

20

【0109】

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している。

【0110】

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。

【0111】

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、本発明の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。ここに記載の公報、特許出願、特許、及びその他のここ而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。論争時には、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実例であるが、それらに制限されることはない。

30

【実施例1】

【0112】

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

【0113】

M. カタラーリス BVH - MC 2 (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ETSUC - 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) の付加によって伸張した塩基を含む下記オリゴ: DMAR544 (5' - CATCAGTGCATATGAATACGACACACCATCACACG - 3'); DMAR545 (5' - GAGTTATTCTCGAGTTTGTCCAAATTTGGCTTAGTTTTAC - 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、ペー・ドゥルフェ、アマシャム ファルマシア バイオテク社) により消化した。pET21b(+)ベクター (ウィスコンシン州、マディソン、ノヴァゲン) を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

40

50

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) (Hanahaによる“D.DNAクローニング”(1985年)、D.M.グローバー出版、第109 - 135頁)の方法に従い、大腸菌DH5 [80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169 endA1 racA1 hsdR17 (r_K-m_K+)deoR thi-1 supE44 ⁻gyrA96 relA1] (メリーランド州、ゲーサーズバーグ、ギブコBRL)を形質転換させた。BVH-MC2遺伝子を含む組換えpET21b(+)プラスミド (rpET21b(+))からQIAgenキット (カリフォルニア、チャッツワース)を用いて精製し、DNA挿入物の配列決定を行なった (カリフォルニア、フォスター シティ、エー・ビー・アイ、タック・ダイ・デオキシターミネ - ター配列キット)。

【 0 1 1 4 】

【 表 1 】

表 1 - 1

遺伝子	プライマー 番号	制限部位	ベクター	配列
<u>BVH-MC2</u>	DMAR544	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'- CATCAGTGCATATGAATACGACACACCATC- ACACG-3' (配列番号 : 15)
<u>BVH-MC2</u>	DMAR545	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'- GAGTTATTCTCGAGTTTGTCCAATTTGGC- TTAGTTTTAC-3' (配列番号 : 16)
<u>BVH-MC2</u>	DMAR544 a	<i>BglII</i>	pCMV-GH	5'- TCAGTGAGATCTTGAATACGACACACCATC- 3' (配列番号 : 17)
<u>BVH-MC2</u>	DMAR545 a	<i>SalI</i>	pCMV-GH	5'- GATTTGAGTTGTCGACTTATTTGTCCAAT- TTG-3' (配列番号 : 18)
<u>BVH-MC3</u>	DMAR592	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'- CGGAGTGCCATATGAGCTTAATTAATAAAT- TAAATG-3' (配列番号 : 19)
<u>BVH-MC3</u>	BMAR593	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'- TATAACTCGAGGTTTTGTGCAACAGGIGTTG -3' (配列番号 : 20)
<u>BVH-MC3</u>	DMAR592 a	<i>BglII</i>	pCMV-GH	5'- CGCTTGAGATCTTGAAGATGTGTATCAGC- GTGC-3' (配列番号 : 21)
<u>BVH-MC3</u>	DMAR593 a	<i>HindIII</i>	pCMV-GH	5'- CAATAACAAAGCTTTCAGTTTTGTGCAACA- GGTGTG-3' (配列番号 : 22)
<u>BVH-MC4</u>	RIOS71	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'- AACCGCACATATGTATCGCTTGGTGTCCAC- ACC-3' (配列番号 : 23)
<u>BVH-MC4</u>	RIOS72	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'- GGTGACTCGAGGTACTCATCACCACCTAAT- CGCAC-3' (配列番号 : 24)
<u>BVH-MC4</u>	RIOS71a	<i>BamHI</i>	pCMV-GH	5'- GCAGGATCCTTATCGCTTGGTGTCCACC-3' (配列番号 : 25)

10

20

30

40

表 1 - 2

<u>BVH-MC4</u>	RIOS72a	<i>SalI</i>	pcMV-GH	5'- ATCAATCGGGTCGACTTAGTACTCATCACCA -3' (配列番号 : 26)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS59	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'- AAAGCTTCATATGGCCCAAAGTCAAGAATC- TGCC-3' (配列番号 : 27)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS60	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'- CGATAACTCGAGTTGAACATCAGGCACCTGC -3' (配列番号 : 28)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS59a	<i>BglIII</i>	pcMV-GH	5'- ACCATTCAAAAGAGATCTTGGCCCAAAGTC- AAGAATCTG-3' (配列番号 : 29)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS60a	<i>SalI</i>	pcMV-GH	5'- GTTAGACCGAGTCGACTCATTGAACATCAG- GCA-3' (配列番号 : 30)

10

20

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

【0115】

BVH-MC2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1467 bpを含み、予測pI6.08と予測分子量53754.35Daを有するアミノ酸残基488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)を用いた予測アミノ酸残基配列(配列番号: 2)の分析では、30個のアミノ酸残基のシグナルペプチド(MDTDMKHLTKHRL SAAIIGVLLFISPSVQA)の存在が示されたが、それは、アラニンとアスパラギン残基との間にある開裂部位を末端としていた。

30

【0116】

PCR増幅法によりBVH-MC2(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・テネシー州立大学提供の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提供のM. カタラーリス株M-12を用いた。これら実験には、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DMAR544及びDMAR545(表1)を用いて、BVH-MC2(配列番号: 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、51 で30秒間と、72 で1分20秒のサイクルを30回と、最終伸長期間7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-MC2(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。

40

【0117】

さらに他の菌からのBVH-MC2遺伝子を配列決定することにより、M.カタラーリス株中においてこの遺伝子が高度に分子保護されていることが明らかになった。菌ETSU659(配列番号: 3)と、ETSU T-25(配列番号: 5)と、M-12(配列番号: 7)の菌からのM.カタラ

50

ーリスBVH-MC2遺伝子のコード部位をそれぞれ、上記オリゴヌクレオチド・プライマーDMA R544及びDMAR545を用いて、PCRにより増幅させた。PCR産物は、QIAGEN社のQIAquickゲル抽出キットを用いて、製品使用説明書（カリフォルニア、チャットワース）に従い、アガロースゲルから精製し、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・デオキシターミネーター配列キット）。実験1と同様の方法で、全配列を得ることができた。ETSUC-2（配列番号：2）と、ETSU658（配列番号：4）と、ETSUT-25（配列番号：6）と、ETSUT-25（配列番号：6）と、M 12（配列番号：8）の菌の予想アミノ酸配列は、それぞれ、下記表2、4、6及び8に示す通りである。図15及び16は、M.カタラーリスBVH-MC2について確立された共通ヌクレオチド配列と予想アミノ酸配列をそれぞれ表したものである。BVH-MC2の予想ポリペプチド配列を二つ一組で比較したところ、同一性が100%であることが分かった。この後者の結果は、M.カタラーリスの分離株中でBVH-MC2ポリペプチドが高度に分子保存されていることを明確に示すものである。

10

【0118】

【表2】

株	PCR増幅法による固定			
	<u>BVH-MC2</u>	<u>BVH-MC3</u>	<u>BVH-MC4</u>	<u>BVH-MC5</u>
ETSU C-2	+	+	+	+
ETSU 658	+	+	+	+
ETSU T-25	+	+	+	+
M-12	+	+	+	+
<u>E. coli</u>	-	-	-	-

20

PCR増幅法によるM.カタラーリスの同定

【実施例2】

【0119】

BVH-MC3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。

30

【0120】

M.カタラーリスのBVH-MC3（配列番号：9）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ETSUC-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）の付加によって伸張した塩基を含む下記オリゴ：表1に記載のDMAR592及びDMAR593を用いた。BVH-MC3の発現ベクターへのクローニングとその解読には、実験1に記載のものと同様の方法を用いた。

40

【0121】

BVH-MC3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1656 bpを含み、予想pI4.68と予想分子量58910.13Daを有するアミノ酸残基551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）を用いた予想アミノ酸残基配列（配列番号：10）の分析では、46個のアミノ酸残基のシグナルペプチド（MSLINKLNER ITP HVLTSIKNQDGDNADKSNLLTAFYTI FAGRLSN）の存在が示されたが、それは、アスパラギンとグルタミン酸残基との間にある開裂部位を末端としていた。

【0122】

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DMA R592及びDMAR593を用いてPCR増幅を行なったところ、BVH-MC3遺伝子の存在が示された。B

50

BVH-MC3遺伝子のPCR増幅には、実験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】

【0123】

BVH-MC4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。

【0124】

M.カタラーリスのBVH-MC4（配列番号：11）遺伝子のコード領域を、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、制限部位NdeI（CATATG）及びXhoI（CTCGAG）の付加によって伸張した塩基を含む下記オリゴ：表1に記載のR10S71及びR10S72を用いた。BVH-MC4の発現ベクターへのクローニングとその解読には、実験1に記載の方法と同様の方法を用いた。

10

【0125】

BVH-MC4をコードするオープン・リーディング・フレーム（ORF）は1251 bpを含み、予想pI4.84と予想分子量46125.11Daを有するアミノ酸残基416個のポリペプチドをコードすることが分かった。サブキャン・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：12）の分析では、42個のアミノ酸残基のシグナルペプチド（MDTKHIQQNWLLPDGVADVLFTDAQKQESLRDALLFVLTAHG）の存在が示されたが、それは、グリシンとチロシン残基との間にある開裂部位を末端としていた。

20

【0126】

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R10S71及びR10S72を用いてPCR増幅を行なったところ、BVH-MC4遺伝子の存在が示された。BVH-MC4遺伝子のPCR増幅には、実験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。

30

【実施例4】

【0127】

BVH-MC5遺伝子とそれに対応するポリペプチドのクローニングと分子特性を、以下実施例で説明する。

【0128】

M.カタラーリスのBVH-MC5（配列番号：13）遺伝子のコード領域を、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、制限部位NdeI（CATATG）及びXhoI（CTCGAG）の付加によって伸張した塩基を含む下記オリゴ：表1に記載のR10S59及びR10S60を用いた。BVH-MC5の発現ベクターへのクローニングとその解読には、実験1に記載の方法と同様の方法を用いた。

40

【0129】

BVH-MC5をコードするオープン・リーディング・フレーム（ORF）は639 bpを含み、予想pI7.45と予想分子量24020.08Daを有するアミノ酸残基212個のポリペプチドをコードすることが分かった。サブキャン・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：14）の分析では、60個のアミノ酸残基のシグナルペプチド（MNNFVYQLQSFYELNQVNRHTIAQSPKYIQLTVLGLIVMIIGIFGWLLAILPTIQKLNA）の存在が示されたが、それは、アラニン残基2つとの間にある開裂部位を末端としていた。

【0130】

50

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R10S59及びR10S60を用いてPCR増幅を行なったところ、BVH-MC5遺伝子の存在が示された。BVH-MC5遺伝子のPCR増幅には、実験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5】

【0131】

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。

【0132】

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。

【0133】

BVH-MC2(配列番号:1)、BVH-MC3(配列番号:9)、BVH-MC4(配列番号:11)及びBVH-MC5(配列番号:13)遺伝子の、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BglIII(AGATCT)、SalI(GTCGAC)、又はHindIII(AAGCTT)の付加によって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、ベー・ドゥルフェ、アマシヤ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、BglIII、SalI、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、CMVポリモーターの制御下で、hGH-BVH-MC2、hGH-BVH-MC3、hGH-BVH-MC4、及びhGH-BVH-MC5の融合ポリペプチドを生成できるように、消化したpCMV-GHベクターに連結させた。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[80dlacZ M15(lacZYA-argF)U169 endA1racA1 hsdR17(R_k-m_k+)deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1](メリーランド州、ゲーサーズバーグ、ギブコBRL)を形質転換させた。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6】

【0134】

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。

【0135】

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、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)50µgの存在下に、BVH-MC2(配列番号:1)、BVH-MC3(配列番号:9)、BVH-MC4(配列番号:11)、及びBVH-MC5(配列番号:13)遺伝子をコードする組換えpCMV-GH50µgを、2~3週間の間隔をあけて100µl3回筋肉注射することにより、免疫性を与えた。コントロールとしては、マウスのグループに、pCMV-GH-GM-CSF50µgの存在下に、pCMV-GH50µgを注射した。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標識ラベルを付

10

20

30

40

50

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標識ラベルを付した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、実験7に示す。

【実施例7】

【0136】

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。

【0137】

BVH-MC2 (配列番号: 1)、BVH-MC3 (配列番号: 9)、BVH-MC4 (配列番号: 11)、及びBVH-MC5 (配列番号: 13) 遺伝子を組込んだ組換え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、ジェーンパルサーIIアパレイタス)により、大腸菌株AD494 (DE3) [ara-leu7697 lacX74 phoA PvuII phoR malF3 F' [lac⁺(lacI^q)pro] trxB::Kan(DE3)] (ウイスコンシン州マディソン、ノヴァゲン)を形質転換させた。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--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T7RNA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100µgのカルベニシリン(カナダ国オークビル、シグマ-オールドリッチ・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、A₆₀₀値が0.5になるまで、37度で培養した。His標識を付したM.カタラーリス組換えポリペプチドの生成を促進するために、最終濃度1mMのIPTGと共に、細胞をさらに3時間インキュベートした。500ml培養液から誘導された細胞を遠心分離でペレット化して、-70度で凍結させた。

10

20

30

【0138】

His結合金属キレート樹脂に固定された2価のカチオン(Ni²⁺)へのHis標識配列(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、PMSF1mLを含む溶解緩衝液(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標識ラベルを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドを、イミダゾール250mMと、NaCl500mMと、pH7.9のトリス20mLで溶出した。4度で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。

【実施例8】

【0139】

His標識M.カタラーリス組換えポリペプチドを、ヒト口蓋扁桃と、M.カタラーリス抗原調整物による免疫化後のマウスから採取した血清と反応させた場合のその反応性を、以下実施例で説明する。

40

【0140】

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-MC2、BVH-MC3、及びBVH-MC4のHis標識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整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-MC2のHis標識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、このポリペプチドが、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-

50

MC2のHis標識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。

【0141】

【表3】

精製した 組換えポリペプチド I.D. ¹	見かけ上の分子量 (kDa) ²	免疫プロットの反応性	
		ヒト口蓋扁桃 ³	マウス血清 ⁴
<u>BVH-MC2</u>	50	+	-
<u>BVH-MC3</u>	70	+	+
<u>BVH-MC4</u>	40	+	-
<u>BVH-MC5</u>	20	-	-

10

ヒト口蓋扁桃と、M.カタラーリス抗原調整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

¹免疫プロットは、実験例7に記載のように生成かつ精製されたHis標識組換えポリペプチドを用いて行なった。

² His標識組換えポリペプチドの分子量は、SDS-PAGE後に測定した。

³免疫プロットには、ヒト口蓋扁桃の原液を用いた。

⁴膜ポリペプチドに富むM.カタラーリス抗原調整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9】

【0142】

M.カタラーリス株表面上のBVH-MC2、BVH-MC3、BVH-MC4、及びBVH-MC5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。

【0143】

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_{490nm}が0.650(～10⁸CFU/ml)となるようにした。その後、抗BVM-MC2、抗BVM-MC3、抗BVM-MC4、抗BVM-MC5、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、4℃で18時間、0.25%ホルムアルデヒド含有PBS緩衝液で固定化した。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、BVM-MC2、BVM-MC3、BVM-MC4、及びBVM-MC5に特異的な抗体が、試験した同質の(ETSU C-2)(表4)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。分析されたモラクセラ細胞10000のうちの70%以上が、特定の血清中において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。これら観察では、これらのポリペプチドが、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

【0144】

【表4】

50

血清	蛍光指標 ²	ラベルを付した細胞% ³
BVH-MC2に特異的な血清プール ¹	3.6	72.8
BVH-MC3に特異的な血清プール	7.5	82.8
BVH-MC4に特異的な血清プール	10.9	92.4
BVH-MC5に特異的な血清プール	6.7	77.4
負のコントロール血清のプール ⁴	1	7.4
正のコントロール血清 ⁵	43.8	98.7

10

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

¹ 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。

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

³ 分析した 10,000 細胞のうちの、ラベルを付した細胞 % を示す。

20

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

⁵ 検定には、精製された外膜ポリペプチド 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 10】

【0145】

抗 BVH-MC2 マウス血清の細菌活性を、以下実施例で説明する。

【0146】

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_{490nm} が 0.25 となるように溶菌緩衝液 (10% ハンクス平衡塩類溶液 (HBSS) 及び 1% カゼイン加水分解物、pH7.3) 中に細菌細胞を再懸濁させ、8 × 10⁴ 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、免疫化前のマウスとウサギ捕体から採取した熱不活化血清と共にインキュベートした細菌を含むものとした。

30

【0147】

40

細菌の % は、下記数式を用いて算出した。

【0148】

【数 1】

$$100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

A: 細菌を免疫血清と共にインキュベートした場合の CFU

50

B:出血前の血清と共にインキュベートした場合のCFU

【0149】

M. カタラーリス株 E T S U 658を用いて、血清の細菌活性を検定した。精製した組換え BVH-MC2ポリペプチド(配列番号:2)による免疫化の後に採取したマウス血清の溶菌のパーセンテージは、71.3であった(表5)。

【0150】

【表5】

血清	細菌濃度	溶菌%
<u>BVH-MC2</u> に特異的な血清プール ¹	1/35	71.3
正のコントロール血清 ²	1/35	92.7

10

抗 BVM-MC2 マウス血清の細菌活性評価

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

² 検定には、精製された外膜ポリペプチド20μgで免疫化されたマウスから得られた血清を1/35に希釈して、正のコントロールとして用いた。

20

【実施例11】

【0151】

抗 BVH-MC3 マウス血清の細菌活性を、以下実施例で説明する。

【0152】

細菌をチョコレート寒天プレートに載せ、8%二酸化炭素ガス中で、37℃で18時間、インキュベートした。その後、 OD_{490nm} が0.25となるように溶菌緩衝液(10%ハックス平衡塩類溶液(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、 8×10^4 CFU/mlに希釈した。細菌懸濁液25μlと、熱で不活化した希釈試験用血清50μl及びHBSS15μlとを混合して、攪拌(200rpm)しながら8%二酸化炭素中、37℃で15分間インキュベートして、細菌検定法を行なった。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℃でさらに60分間インキュベートした。インキュベートの終了時に、チョコレート寒天プレートに検定混合物10μl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℃で18~24時間インキュベートした。コントロールは、免疫化前のマウスとウサギ捕体から採取した熱不活化血清と共に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 E T S U 658を用いて、血清の細菌活性を検定した。溶菌の%は、下記数式を用いて算出した。

30

【0153】

【数2】

$$100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

40

A:細菌を免疫血清と共にインキュベートした場合のCFU

B:出血前の血清と共にインキュベートした場合のCFU

【0154】

精製した組換え BVH-MC3ポリペプチドで免疫化したマウス7匹から採取した血清中には、細菌性抗体が存在することが分かった(表6)。コントロールのマウスから採取し

50

た血清中では、細菌活性は示されなかった（該当データなし）。

【0155】

【表6】

血清 ¹	溶菌%
S1 ²	33.3
S2	67.9
S3	89.6
S4	66.2
S5	78.0
S6	90.1
S7	37.1
正のコントロール血清	77.3

10

抗BVM-MC3マウス血清の細菌活性評価

¹ 精製した組換えポリペプチド20 μ g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 μ gの混合物を、2週間毎に5回、マウスS1～S7に皮下注射した。

20

² BVM-MC3で免疫化されたマウスから採取した各マウス血清は、1/50に希釈した。

³ 検定には、精製された外膜ポリペプチド20 μ gで免疫化されたマウスから得た血清を1/50に希釈して、正のコントロールとして用いた。

【実施例12】

【0156】

精製した組換えBVH-MC3ポリペプチド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。

【0157】

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標識M.カタラーリス組換えBVH-MC3ポリペプチド20 μ gを、2週間毎に5回、皮下に投与して免疫化するか、又は、コントロールとして、PBS中に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 1×10^6 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、疾患の投与量を確認した。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測定用の連続希釈法により、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。クリアランス%は、下記数式を用いて算出した。

30

40

【0158】

【数3】

$$100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

A: BVH-MC3ポリペプチドにより免疫化されたマウスについて得られたCFU

50

B:コントロールマウスについて得られたCFU

【0159】

表7に示すように、コントロールグループのマウスと比較して、BVH-MC3ポリペプチドで免疫化したマウスに関して、生存細菌数に54%の減少が見られた。このように、組換えBVH-MC3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ていた。

【0160】

【表7】

コントロール群からの 回収細菌数 (肺ホモジネートCFU/ml) ^a	<u>BVH-MC3</u> 群からの 回収細菌数 (肺ホモジネートCFU/ml) ^b	細菌クリアランス (%) ^c
$2.4 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^4$	54

10

精製した組換えBVH-MC3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

^aマウス6匹の平均±標準偏差を示したものである。

^bマウス7匹の平均±標準偏差を示したものである。

^cマウスは細菌 1×10^6 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。クリアランス%は、上記数式を用いて算出した。

20

【図面の簡単な説明】

【0161】

【図1】M.カタラーリス株ETSUC-2のBVH-MC2遺伝子のDNA配列を示したものの(配列番号:1)であり、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】M.カタラーリス株ETSUC-2のBVH-MC2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)であり、下線部の配列は、30のアミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【図3】M.カタラーリス株ETSU658のBVH-MC2遺伝子の部分DNA配列を示したものである(配列番号:3)。

30

【図4】M.カタラーリス株ETSU658のBVH-MC2ポリペプチドの部分アミノ酸配列を示したものである(配列番号:4)。

【図5】M.カタラーリス株ETSUT25のBVH-MC2遺伝子の部分DNA配列を示したものである(配列番号:5)。

【図6】M.カタラーリス株ETSUT25のBVH-MC2ポリペプチドの部分アミノ酸配列を示したものである(配列番号:6)。

【図7】M.カタラーリス株ETSUM-12のBVH-MC2遺伝子の部分DNA配列を示したものである(配列番号:7)。

【図8】M.カタラーリス株ETSUM-12のBVH-MC2ポリペプチドの部分アミノ酸配列を示したものである(配列番号:8)。

40

【図9】M.カタラーリス株ETSUC-2のBVH-MC3遺伝子のDNA配列を示したものの(配列番号:9)であり、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10】M.カタラーリス株ETSUC-2のBVH-MC3ポリペプチドのアミノ酸配列を示したものの(配列番号:10)であり、下線部の配列は、46のアミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【図11】M.カタラーリス株ETSUC-2のBVH-MC4遺伝子のDNA配列を示したものの(配列番号:11)であり、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12】M.カタラーリス株ETSUC-2のBVH-MC4ポリペプチドのアミノ酸配列を示したものの(配列番号:12)であり、下線部の配列は、42のアミノ酸残基のリーダーペ

50

チドを示す。

【図13】M.カタラーリス株ETSUC-2のBVH-MC5遺伝子のDNA配列を示したもの（配列番号:13）であり、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14】M.カタラーリス株ETSUC-2のBVH-MC5ポリペプチドのアミノ酸配列を示したもの（配列番号:14）であり、下線部の配列は、60のアミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【図15】MacVector配列決定分析ソフトウェア（バージョン6.5）のプログラムClustal Wによる、M.カタラーリス株ETSUC-2、ETSU658、ETSUT-25、及びM12由来のBVH-MC2遺伝子の部分ヌクレオチド配列を比較したものであり、配列の下部に示す共通ラインにおいて、*と空欄のスペースはそれぞれ、配列間のヌクレオチドが同一な箇所と異なる箇所を示している。

10

【図16】MacVector配列決定分析ソフトウェア（バージョン6.5）のプログラムClustal Wによる、M.カタラーリス株ETSUC-2、ETSU658、ETSUT-25、及びM12由来のBVH-MC2遺伝子のオープン・リーディング・フレームの一部の予想アミノ酸配列を比較したものであり、配列の下部に示す共通ラインにおいて、*の印はそれぞれ、アミノ酸が同一であることを示している。

【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
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/092625 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C07K 14/195
- (21) International Application Number: PCT/CA02/00706
- (22) International Filing Date: 15 May 2002 (15.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/290,653 15 May 2001 (15.05.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SHIRE BIOCHEM INC. [CA/CA]; 275 Armand-Trappier Boulevard, Laval, Quebec H7V 4A7 (CA).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): MARTIN, Denis [CA/CA]; 4728-G rue Galbraith, St-Augustin-de-Desmaures, Quebec G3A 1E9 (CA). HAMEL, Josée [CA/CA]; 2401 Maritain, Sillery, Quebec G1T 1 N6 (CA). BRODEUR, Bernard, R. [CA/CA]; 2401 Maritain,
- (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): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, VZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, 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

[Continued on next page]

(54) Title: MORAXELLA(BRANHAMELLA) CATARRHALIS ANTIGENS



WO 02/092625 A2

```

1  ATGGACACTG AGATGAAGCA TTTCACAAA CATCCCTAT GAGCTGGAT
51  CATTCGGCTT TATTTATCA TTAGCCATC AGTCTAAGA AATCGACAC
101  ACCATCCACG GTPAAGTAGT ACGGAGCTTA AACTTGGTGA TGAATAGTAT
151  ATTSATAGTA TCAATCAATT GCGTGGCTG ACCGCAATA TTCCAAATAC
201  ACAATATTTT CAAACCAACA ACGGTGTGAG CGTTGCTTTT ACGCCATPAC
251  ATGAGCTGCC TATTTGCGAT ATCAGCTGT ATTTTATGC AGGGTCAGCG
301  TTGACCCATC AGTTGGCAA ATCAGGCGCG CCTACATGG TTGCAACCT
351  GCACCCCAA GGAACAGACA GCCTTTCGA AGATGAGTT GTTCCFQCCA
401  AAGAGGCTCT TGGCATGAT TTACACGTA CAGCAATATA GGTAACPTA
451  ACTTTATCAT TAAGAAGCTT GTCTGATCAA TCATTATPAA ATCAAGCCGC
501  CGATTTAATG GTCGATGCTG TCACTCAACC TCGTTTTSAT GATPAGACTC
551  TACCAACGCA CAATATCAG CTCATCCCA GTTTAARA CAARAAGCA
601  AACCCITATC ATGAGCTTC TGTGCTTAT CATCAAGCCG TATATCAAAA
651  TCATCCTTAT GCACACGCA CACAGGCGA TGAAGATAGT ATTGCCAAAA
701  TTGATCCGTA TGAGCTGCTT AATTTTIGCC ATACTTPTAT TAAFGCAAT
751  AATGGCACAC TGGTATATC AGGTGATAG ACCGCCGAGC AAGCCAAATC
801  ACTTCCACAC CTTCTGACG CCAATTTGCC CACAGGAG TGCTTTAARA
851  ATACCGTGA TTTGACAAA CCACTTAAGG CTCCTCATAT CCAATTCCT
901  CACAACAGTA GTCAAACCA AATCATCAT GGTCAATCCA CCACTTAAGT
951  ACGCACGGAC AAGCAGGCT GTCAAGGTT CACCGATTIT TCATTAGGTA
1001  ATGAAATTTT GGCAGTGGT GATTTAATG CCAGATTGAT GAJAAACAT
1051  CGAGGCAAE AAGCTTACG TTATGGCAT TTTGCCGTA TGGAGGCTT
1101  CAGAGCAGGT GGTAMTTATG TCGTTGAATT TTCAACCGAT GCGGATAAAG
1151  CAGCGATGC CATTTTAGAG ACGCTACACA TCATTAAATGA GTCGCTGAAT
1201  GAAGGCATPA CCCAAGAACA GCTTGAATG GTGCGTTTGG GCAATAAAAA
1251  TGGTTTGGC AATATTTT CAGCAATAGC CAGTATATAT CCGTCAATG
1301  GTGCTTATCT TGTGCGGAT TATCCAAAG ATCACTPAA CCAATACCTC
1351  AATCGCTGG ATAAAGCAC GATAAATAGT GTTAATAACG CACTGAACTT
1401  CCGTATCAAG CCTGATGAA TATCATCAT CACCGTGGT AAAACTAAGC
1451  CAAATTTGGA CAAATAA

```

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

WO 02/092625 A2 

(BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG). *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

Published:

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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

MORAXELLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS ANTIGENS

FIELD OF THE INVENTION

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.

BACKGROUND OF THE INVENTION

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

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

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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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

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

SUMMARY OF THE INVENTION

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID Nos : 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof.

According to one aspect, the present invention relates to polypeptides comprising a sequence chosen from

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

SEQ ID No : 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof.

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

10 **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

Figure 1 represents the DNA sequence of BVH-MC2 gene from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 1. The underlined portion of the sequence represents the region coding for the leader peptide.

15 Figure 2 represents the amino acid sequence of BVH-MC2 polypeptide from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 2. The underline sequence represents the 30 amino acid residues leader peptide.

20 Figure 3 represents the partial DNA sequence of BVH-MC2 gene from M. catarrhalis strain ETSU 658; SEQ ID NO: 3.

Figure 4 represents the partial amino acid sequence of BVH-MC2 polypeptide from M. catarrhalis strain ETSU 658; SEQ ID NO: 4.

25 Figure 5 represents the partial DNA sequence of BVH-MC2 gene from M. catarrhalis strain ETSU T-25; SEQ ID NO: 5.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

Figure 6 represents the partial amino acid sequence of BVH-MC2 polypeptide from M. catarrhalis strain ETSU T-25; SEQ ID NO: 6.

5 Figure 7 represents the partial DNA sequence of BVH-MC2 gene from M. catarrhalis strain M-12; SEQ ID NO: 7.

Figure 8 represents the partial amino acid sequence of BVH-MC2 polypeptide from M. catarrhalis strain M-12; SEQ ID NO: 8.

10 Figure 9 represents the DNA sequence of BVH-MC3 gene from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 9. The underlined portion of the sequence represents the region coding for the leader peptide.

15 Figure 10 represents the amino acid sequence of BVH-MC3 polypeptide from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 10. The underlined sequence represents the 46 amino acid residues leader peptide.

20 Figure 11 represents the DNA sequence of BVH-MC4 gene from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 11. The underlined portion of the sequence represents the region coding for the leader peptide.

Figure 12 represents the amino acid sequence of BVH-MC4 polypeptide M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 12. The underlined sequence represents the 42 amino acid residues leader peptide.

25 Figure 13 represents the DNA sequence of BVH-MC5 gene from M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 13. The underlined portion of the sequence represents the region coding for the leader peptide.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

Figure 14 represents the amino acid sequence of BVH-MC5 polypeptide M. catarrhalis strain ETSU C-2; SEQ ID NO: 14. The underline sequence represents the 60 amino acid residues leader peptide.

5 Figure 15 depicts the comparison of the partial nucleotide sequences of the BVH-MC2 genes from ETSU C-2, ETSU 658, ETSU T-25, and M-12 M. catarrhalis strains by using the program Clustal W from MacVector sequence analysis software (version 6.5). Underneath the alignment, there is
10 a consensus line where * and blank spaces respectively represent identical nucleotides and differences between sequences.

Figure 16 depicts the comparison of the predicted amino acid sequences of the BVH-MC2 partial open reading
15 frames from ETSU C-2, ETSU 658, ETSU T-25, and M-12 M. catarrhalis strains by using the program Clustal W from MacVector sequence analysis software (version 6.5). Underneath the alignment, there is a consensus line where * characters represent identical amino acid residues.

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, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof.

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof.

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, 6, 8, 10, 12 or 14.

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, 6, 8, 10, 12 or 14.

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, 6, 8, 10, 12 or 14.

According to one aspect, the present invention relates to polypeptides comprising a sequence chosen from SEQ ID Nos : 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

According to one aspect, the present invention relates to polypeptides characterized by the amino acid sequence comprising SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14 .

5 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, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof.

10 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, 6, 8, 10, 12 or 14.

15 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, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof.

20 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, 6, 8, 10, 12 or 14.

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, 6, 8, 10, 12 or 14.

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, 6, 8, 10, 12 or 14.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

According to one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide having at least 90% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14.

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, 6, 8, 10, 12 or 14.

According to one aspect, the present invention relates to polypeptides comprising a sequence chosen from SEQ ID No : 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14.

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

(a) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 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, 4, 6, 8, 10, 12, 14 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, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

(d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;

5 (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, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;

10 (f) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;

(g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 or fragments or analogs thereof;

15 (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:

20 (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, 6, 8, 10, 12 or 14;

25 (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, 6, 8, 10, 12 or 14;

(c) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14;

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

(d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14;

(e) a polynucleotide encoding a polypeptide
5 capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14;

(f) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from
10 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14;

(g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13;

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

15 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
20 ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 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, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs
25 thereof;

(c) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;

(d) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 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, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;

(f) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 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, 4, 6, 8, 10, 12 or 14;

(b) a polypeptide having at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14;

(c) a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14;

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

(d) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14;

(e) a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14;

(f) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14;

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

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

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

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

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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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

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

10 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.

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

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

The fragments of the present invention should include one or more such epitopic regions or be sufficiently
30 similar to such regions to retain their

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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
5 described herein. The present invention further provides fragments having at least 10 contiguous amino acid residues from the polypeptide sequences of the present invention. In one embodiment, at least 15 contiguous amino acid residues. In one embodiment, at least 20 contiguous amino acid
10 residues.

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

As used herein, "fragments", "analogs" or "derivatives" of the polypeptides of the invention include
20 those polypeptides in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably conserved) and which may be natural or unnatural. In one embodiment, derivatives and analogs of polypeptides of the invention will have about 80%
25 identity with those sequences 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
30 further embodiment, polypeptides will have greater than 90% identity. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 95% identity. In a further embodiment,

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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

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

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

cys, ser, tyr, thr;

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

lys, arg, orn, his; and

phe, tyr, trp, his.

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

In an alternative approach, the analogs could be fusion polypeptides, incorporating moieties which render purification easier, for example by effectively tagging the desired polypeptide. It may be necessary to remove the

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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

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

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

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
20 greater than 85% homology. In a further embodiment, polypeptides will have greater than 90% 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
25 of polypeptides of the invention will have fewer than about
30

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

20 amino acid residue substitutions, 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 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 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.

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.

Thus, for fragments according to the present invention the degree of identity is perhaps irrelevant,

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

since they may be 100% identical to a particular part of a polypeptide, analog as described herein.

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.

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 (poly)saccharides.

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.

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

Also contemplated are hetero and homo polypeptide multimers of the polypeptide fragments and analogues. These polymeric forms include, for example, one or more polypeptides that have been cross-linked with cross-linkers such as avidin/biotin, gluteraldehyde or dimethyl-superimidate. Such polymeric forms also include polypeptides containing two or more tandem or inverted

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

contiguous sequences, produced from multicistronic mRNAs generated by recombinant DNA technology.

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

In a further embodiment, the present invention also relates to chimeric polypeptides comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4,
10 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof; provided that the polypeptides are linked as to formed a chimeric polypeptide.

In a further embodiment, the present invention also relates to chimeric polypeptides comprising two or more
15 polypeptides comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14 provided that the polypeptides are linked as to formed a chimeric polypeptide.

Preferably, a fragment, analog or derivative of a polypeptide of the invention will comprise at least one
20 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.
25 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.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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

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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

invention to elicit an immune response, e.g., a protective immune response to Moraxella; and particularly, (v) a method for preventing and/or treating a Moraxella infection, by administering a prophylactic or therapeutic amount of a polypeptide of the invention to a host in need.

According to another aspect of the invention, there are also provided (i) a composition of matter containing a polynucleotide of the invention, together with a carrier, diluent or adjuvant; (ii) a pharmaceutical composition comprising a polynucleotide of the invention and a 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.

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.

21

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

According to another aspect, there are provided pharmaceutical compositions comprising one or more Moraxella polypeptides of the invention in a mixture with a pharmaceutically acceptable adjuvant. Suitable adjuvants include (1) oil-in-water emulsion formulations such as MF59[™], SAF[™], Ribi[™]; (2) Freund's complete or incomplete adjuvant; (3) salts i.e. AlK(SO₄)₂, AlNa(SO₄)₂, AlNH₄(SO₄)₂, Al(OH)₃, AlPO₄, silica, kaolin; (4) saponin derivatives such as Stimulon[™] or particles generated therefrom such as ISCOMS (immunostimulating complexes); (5) cytokines such as interleukins, interferons, macrophage colony stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor (TNF); (6) other substances such as carbon polynucleotides i.e. poly IC and poly AU, detoxified cholera toxin (CTB) and E. coli heat labile toxin for induction of mucosal immunity. A more detailed description of adjuvant is available in a review by M.Z.I Khan et al. in Pharmaceutical Research, vol. 11, No. 1 (1994) pp2-11, and also in another review by Gupta et al., in Vaccine, Vol. 13, No. 14, pp1263-1276 (1995) and in WO 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. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Tenover. ASM Press, Washington, D.C. seventh edition, 1999, 1773p. In one embodiment, pharmaceutical compositions

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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

As used in the present application, the term "host" includes mammals. In a further embodiment, the mammal is human.

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

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

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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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 a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof.

In one embodiment, polynucleotides are those illustrated in SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 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 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.

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, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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
5 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
10 chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14 or fragments
or analogs thereof.

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

15 (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, 4, 6, 8, 10, 12 or 14.

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

(a) a DNA sequence encoding a polypeptide or

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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

wherein said polypeptide comprises at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14 or fragments or analogs thereof.

5 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 polypeptide;

10 wherein said polypeptide comprises at least 10 contiguous amino acid residues from a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14.

15 In a further embodiment, polynucleotides are those illustrated in SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 or fragments or analogs thereof encoding polypeptides of the invention.

In a further embodiment, polynucleotides are those illustrated in SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 or 13 encoding polypeptides of the invention.

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

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

25 In a further aspect, polynucleotides encoding polypeptides of the invention, or fragments, analogs or derivatives thereof, may be used in a DNA immunization method. That is, they can be incorporated into a vector

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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

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

The present invention provides a process for producing a polypeptide comprising culturing a host cell of

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

the invention under conditions suitable for expression of said polypeptide.

For recombinant production, host cells are transfected with vectors which encode the polypeptides of the invention, and then cultured in a nutrient media modified as appropriate for activating promoters, selecting transformants or amplifying the genes. Suitable vectors are those that are viable and replicable in the chosen host and include chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences e.g. bacterial plasmids, phage DNA, baculovirus, yeast plasmids, vectors derived from combinations of plasmids and phage DNA. The polypeptide sequence may be incorporated in the vector at the appropriate site using restriction enzymes such that it is operably linked to an expression control region comprising a promoter, ribosome binding site (consensus region or Shine-Dalgarno sequence), and optionally an operator (control element). One can select individual components of the expression control region that are appropriate for a given host and vector according to established molecular biology principles (Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley and Sons, Inc. New York). Suitable promoters include but are not limited to LTR or SV40 promoter, *E. coli* lac, tac or trp promoters and the phage lambda P_l promoter. Vectors will preferably incorporate an origin of replication as well as selection markers i.e. ampicillin resistance gene. Suitable bacterial vectors include pET, pQE70, pQE60, pQE-9, pD10 phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 and eukaryotic vectors pBlueBacIII, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG, pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL. Host cells may be

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

bacterial i.e. E. coli, Bacillus subtilis, Streptomyces;
fungal i.e. Aspergillus niger, Aspergillus nidulins; yeast
i.e. Saccharomyces or eukaryotic i.e. CHO, COS.

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

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

According to a further aspect, the Moraxella
polypeptides of the invention may be used in a diagnostic
25 test for Moraxella infection, in particular Moraxella
catarrhalis 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 02/092625

PCT/CA02/00706

b) incubating an antibody or fragment thereof reactive with a Moraxella polypeptide of the invention with the biological sample to form a mixture; and

5 c) detecting specifically bound antibody or bound fragment in the mixture which indicates the presence of Moraxella.

10 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 Moraxella 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.

20 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:

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

- 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
- 5 c) detecting specifically bound DNA probe in the mixture which indicates the presence of Moraxella bacteria.

The DNA probes of this invention may also be used for detecting circulating Moraxella i.e. Moraxella nucleic acids in a sample, for example using a polymerase chain reaction, as a method of diagnosing Moraxella infections. The probe may be synthesized using conventional techniques and may be immobilized on a solid phase, or may be labelled with a detectable label. A preferred DNA probe for this application is an oligomer having a sequence complementary to at least about 6 contiguous nucleotides of the Moraxella polypeptides of the invention. In a further embodiment, the preferred DNA probe will be an oligomer having a sequence complementary to at least about 15 contiguous nucleotides of the Moraxella polypeptides of the invention. In a further embodiment, the preferred DNA probe will be an oligomer having a sequence complementary to at least about 30 contiguous nucleotides of the Moraxella polypeptides of the invention. In a further embodiment, the preferred DNA probe will be an oligomer having a sequence complementary to at least about 50 contiguous nucleotides of the Moraxella polypeptides of the invention.

10
15
20
25

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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

a) labelling an antibody reactive with a polypeptide of the invention or fragment thereof with a detectable label;

5 b) administering the labelled antibody or labelled fragment to the host; and

c) detecting specifically bound labelled antibody or labelled fragment in the host which indicates the presence of Moraxella.

10 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;

15 b) incubating one or more Moraxella polypeptides of the invention or fragments thereof with the biological sample to form a mixture; and

c) detecting specifically bound antigen or bound fragment in the mixture which indicates the presence of antibody specific to Moraxella.

20 One of skill in the art will recognize that the 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
25 for the protein are present in an organism.

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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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
5 sequence encoding a polypeptide of the invention or
fragments thereof with the biological sample to form a
mixture; and
- c) detecting specifically bound DNA probe in the
mixture which indicates the presence of Moraxella bacteria.

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

A further aspect of the invention is the use of the Moraxella polypeptides of the invention as immunogens
15 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
20 infection in a test model. One example of an animal model is the mouse model described in the examples herein. The antibody may be a whole antibody or an antigen-binding fragment thereof and may belong to any immunoglobulin class. The antibody or fragment may be of animal origin,
25 specifically of mammalian origin and more specifically of murine, rat or human origin. It may be a natural antibody or a fragment thereof, or if desired, a recombinant antibody or antibody fragment. The term recombinant antibody or antibody fragment means antibody or antibody fragment which
30 was produced using molecular biology techniques. The

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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

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

 A further aspect of the invention is the use of the Moraxella polypeptides of the invention as immunogens
10 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
15 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,
20 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
25 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.

30 A further aspect of the invention is the use of the antibodies directed to the polypeptides of the invention

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

for passive immunization. One could use the antibodies described in the present application.

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
5 sufficient to provide a passive immunization.

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
10 therapeutic treatment of Moraxella infection.

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

EXAMPLE 1

25 This example illustrates the cloning and molecular characteristics of BVH-MC2 gene and corresponding polypeptide.

The coding region of M. catarrhalis BVH-MC2 (SEQ ID NO: 1) gene was amplified by PCR (DNA Thermal Cycler

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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) and *XhoI* (CTCGAG): DMAR544 (5'-CATCAGTGCATATGAATACGACACACCATCACACG-3'); DMAR545 (5'-GAGTTATTCTCGAGTTTGTCCAAATTTGGCTTAGTTTTAC-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 α [ϕ 80dlacZAM15 Δ (*lacZ*YA-*argF*)U169 *endA1 recA1 hsdR17*(*r_K-m_K*+) *deoR thi-1 supE44 λ gyrA96 relA1*] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) according to the method of Simanis (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), pp. 109-135). Recombinant pET21b(+) plasmid (rpET21b(+)) containing *BVH-MC2* 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).

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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

Genes	Primers I.D.	Restriction site	Vector	Sequence
BVH-MC2	DMAR544	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'-CATCAGTGCATATGAATACGACACACCATC-ACACG-3' (SEQ ID No: 15)
BVH-MC2	DMAR545	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'-GAGTTATTCICGAGTTTGTCCAAATTGGC-TTAGITTTTAC-3' (SEQ ID No: 16)
BVH-MC2	DMAR544 a	<i>BglII</i>	pCMV-GH	5'-TCAGTGAGATCTTGAATACGACACACCATC-3' (SEQ ID No: 17)
BVH-MC2	DMAR545 a	<i>SalI</i>	pCMV-GH	5'-GATTGAGTTGTGCGACTTATTGTCCAAAT-TTG-3' (SEQ ID No: 18)
BVH-MC3	DMAR592	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'-CGGAGTGCCATATGAGCTTAATTAATAAAT-TAAATG-3' (SEQ ID No: 19)
BVH-MC3	DMAR593	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'-TATAACTCGAGGTTTTGTGCAACAGGTGTTG-3' (SEQ ID No: 20)
BVH-MC3	DMAR592 a	<i>BglII</i>	pCMV-GH	5'-CGCTTGAGATCTTGGAGATGTGTATCAGC-GTGC-3' (SEQ ID No: 21)
BVH-MC3	DMAR593 a	<i>HindIII</i>	pCMV-GH	5'-CAATAACAAAGCTTTCAGTTTGTGCAACA-GGTGTTG-3' (SEQ ID No: 22)
BVH-MC4	RIOS71	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'-AACCGCACATATGIATCGCTTGTGTCCACC-ACC-3' (SEQ ID No: 23)
BVH-MC4	RIOS72	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'-GGTGACTCGAGGTACTCATCACCACCTAAT-CGCAC-3' (SEQ ID No: 24)
BVH-MC4	RIOS71a	<i>BamHI</i>	pCMV-GH	5'-GCAGGATCCTTATCGCTTGGTGTACACC-3' (SEQ ID No: 25)

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

<u>BVH-MC4</u>	RIOS72a	<i>SalI</i>	pCMV-GH	5'- ATCAATCGGGTCGACTTAGTACTCATTACCA -3' (SEQ ID No: 26)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS59	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'- AAAGCTTCATATGCCCCAAAGTCAAGAATC- TGCC-3' (SEQ ID No: 27)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS60	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'- CGATAACTCGAGTTGAACATCAGGCACCTGC -3' (SEQ ID No: 28)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS59a	<i>EgII</i>	pCMV-GH	5'- ACCATTCAAAAGAGATCTTGGCCCCAAAGTC- AAGAATCTG-3' (SEQ ID No: 29)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS60a	<i>SalI</i>	pCMV-GH	5'- GTTAGACCGAGTCGACTCATTGAACATCAG- GCA-3' (SEQ ID No: 30)

It was determined that the open reading frame (ORF) which codes for BVH-MC2 polypeptide contains 1467-bp and encodes a 488 amino acid residues polypeptide with a predicted pI of 6.08 and a predicted molecular mass of 53754.35 Da. Analysis of the predicted amino acid residues sequence (SEQ ID NO: 2) using the Spscan software (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) suggested the existence of a 30 amino acid residues signal peptide (MDTDMKHLTKHRLSAAIIGVLLFISPSVQA), which ends with a cleavage site located between an alanine and an asparagine residues.

To confirm the presence by PCR amplification of BVH-MC2 (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-

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

Blue MRF' was used in these experiments as negative control. BVH-MC2 (SEQ ID NO: 1) gene was amplified by PCR (DNA Thermal Cyclor 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 DMAR544 and DMAR545 (Table 1). PCR was performed with 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 51°C and 1 min 20 sec at 72°C and a final elongation period of 7 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-MC2 (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.

Sequencing of additional BVH-MC2 genes from other strains confirmed the high level of molecular conservation of this gene among M. catarrhalis strains. The respective coding region of M. catarrhalis BVH-MC2 gene from strains ETSU 658 (SEQ ID NO: 3), ETSU T-25 (SEQ ID NO: 5), and M-12 (SEQ ID NO: 7) were amplified by PCR using the oligonucleotide primers DMAR544 and DMAR545 as described above. PCR products were purified from agarose gel using a QIAquick gel extraction kit from QIAGEN following the manufacturer's instructions (Chatsworth, CA) and the DNA insert were sequenced (Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit, ABI, Foster City, CA). The total sequence could be obtained in the same manner as in Example 1. The predicted amino acid sequences from strains ETSU C-2 (SEQ ID NO: 2), ETSU 658 (SEQ ID NO: 4), ETSU T-25 (SEQ ID NO: 6), and M-12 (SEQ ID NO: 8) were respectively presented in the

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

following figures 2, 4, 6, and 8. The figures 15 and 16 respectively depict the consensus nucleotide and predicted amino acid sequences established for *M. catarrhalis* BVH-MC2. Pairwise comparison of the BVH-MC2 predicted polypeptide sequences revealed 100% identity. This latter result clearly demonstrates the high level of molecular conservation of BVH-MC2 polypeptides among *M. catarrhalis* isolates.

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

Strain Identification	Identification by PCR amplification of			
	<u>BVH-MC2</u>	<u>BVH-MC3</u>	<u>BVH-MC4</u>	<u>BVH-MC5</u>
ETSU C-2	+	+	+	+
ETSU 658	+	+	+	+
ETSU T-25	+	+	+	+
M-12	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-

EXAMPLE 2

This example illustrates the cloning and molecular characteristics of BVH-MC3 gene and corresponding polypeptide.

The coding region of *M. catarrhalis* BVH-MC3 (SEQ ID NO: 9) gene was amplified by PCR (DNA Thermal Cyclor 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) and *XhoI* (CTCGAG): DMAR592 and DMAR593, which are presented in Table 1. The methods used for cloning BVH-MC3 into an expression

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

vector and sequencing are similar to the methods described in Example 1.

It was determined that the open reading frame (ORF) which codes for BVH-MC3 contains 1656-bp and encodes a 551 amino acid residues polypeptide with a predicted pI of 4.68 and a predicted molecular mass of 58910.13 Da. Analysis of the predicted amino acid residues sequence (SEQ ID NO: 10) using the Spscan software (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) suggested the existence of a 46 amino acid residues signal peptide (MSLINKLNER ITPHVLTSIKNQDGDNADKSNLLTAFYITIFAGRLSN), which ends with a cleavage site located between an asparagine and a glutamic acid residues.

The BVH-MC3 gene was shown to be present after PCR amplification using the oligonucleotide primers DMAR592 and DMAR593 in the 4 M. catarrhalis strains tested (Table 2). The methods used for PCR amplification of the BVH-MC3 gene were similar to the methods presented in Example 1. No such product was detected when the control E. coli DNA was submitted to identical PCR amplification with these oligonucleotide primers.

EXAMPLE 3

This example illustrates the cloning and molecular characteristics of BVH-MC4 gene and corresponding polypeptide.

The coding region of M. catarrhalis BVH-MC4 (SEQ ID NO: 11) 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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

addition of restriction sites *Nde*I (CATATG) and *Xho*I (CTCGAG): RIOS71 and RIOS72, which are presented in Table 1. The methods used for cloning BVH-MC4 into an expression vector and sequencing are similar to the methods described in Example 1.

It was determined that the open reading frame (ORF) which codes for BVH-MC4 contains 1251-bp and encodes a 416 amino acid residues polypeptide with a predicted pI of 4.84 and a predicted molecular mass of 46125.11 Da.

10 Analysis of the predicted amino acid residues sequence (SEQ ID NO: 12) using the Spscan software (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) suggested the existence of a 42 amino acid residues signal peptide (MDTKHIQQNWLLPDGVADVLFTDAQKQESLRDALLFVLTARG), which ends

15 with a cleavage site located between an glycine and a tyrosine residues.

The BVH-MC4 gene was shown to be present after PCR amplification using the oligonucleotide primers RIOS71 and RIOS72 in the 4 M. catarrhalis strains tested (Table 2).

20 The methods used for PCR amplification of the BVH-MC4 gene were similar to the methods presented in Example 1. No such product was detected when the control E. coli DNA was submitted to identical PCR amplification with these oligonucleotide primers.

25 **EXAMPLE 4**

This example illustrates the cloning and molecular characteristics of BVH-MC5 gene and corresponding polypeptide.

The coding region of M. catarrhalis BVH-MC5 (SEQ ID NO: 13) gene was amplified by PCR (DNA Thermal Cycler

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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 *Nde*I (CATATG) and *Xho*I (CTCGAG): RIOS59 and RIOS60, which are presented in Table 1. The methods used for cloning BVH-MC5 into an expression vector and sequencing are similar to the methods described in Example 1.

It was determined that the open reading frame (ORF) which codes for BVH-MC5 contains 639-bp and encodes a 212 amino acid residues polypeptide with a predicted pI of 7.45 and a predicted molecular mass of 24020.08 Da. Analysis of the predicted amino acid residues sequence (SEQ ID NO: 14) using the Spscan software (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) suggested the existence of a 60 amino acid residues signal peptide (MNNFVYQLQSPFWYELNQNRRHTIAQSPKYIQLTVLGLIVMIGIPGWLLAILPTIQKLNA), which ends with a cleavage site located between two alanine residues.

The BVH-MC5 gene was shown to be present after PCR amplification using the oligonucleotide primers RIOS59 and RIOS60 in the 4 *M. catarrhalis* strains tested (Table 2). The methods used for PCR amplification of the BVH-MC5 gene were similar to the methods presented in Example 1. No such product was detected when the control *E. coli* DNA was submitted to identical PCR amplification with these oligonucleotide primers.

EXAMPLE 5

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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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

The coding regions of BVH-MC2 (SEQ ID NO: 1), BVH-MC3 (SEQ ID NO: 9), BVH-MC4 (SEQ ID NO: 11), and BVH-MC5 (SEQ ID NO: 13) 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 BamHI (GGATCC), BglII (AGATCT), SalI (GTCGAC), or HindIII (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 BamHI, BglII, SalI, or HindIII 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-MC2, hGH-BVH-MC3, hGH-BVH-MC4, and hGH-BVH-MC5 fusion polypeptides under the control of the CMV promoter. The ligated products were transformed into E. coli strain DH5 α [ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZ Δ YA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17 (r $_K$ -m $_K$ +)]

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

deor thi-1 supE44 λ'gyrA96 relA1] (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 nucleotides sequence of the DNA inserts were verified by DNA sequencing.

EXAMPLE 6

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

10 A group of 8 female BALB/c mice (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) were immunized by intramuscular injection of 100 µl three times at two- or three-week intervals with 50 µg of recombinant pCMV-GH encoding BVH-MC2 (SEQ ID NO: 1), BVH-MC3 (SEQ ID NO: 9), BVH-MC4 (SEQ ID NO: 11), and BVH-MC5 (SEQ ID NO: 13) genes in presence of 50 µg of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmid pCMV-GH-GM-CSF (Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas). As control, a group of mice were injected with 50 µg of pCMV-GH in presence of 50 µg of pCMV-GH-GM-CSF. Blood samples were collected from the orbital sinus prior to each immunization 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 Example 7.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

EXAMPLE 7

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

The recombinant pET21b(+) plasmid with BVH-MC2 (SEQ ID NO: 1), BVH-MC3 (SEQ ID NO: 9), BVH-MC4 (SEQ ID NO: 11), and BVH-MC5 (SEQ ID NO: 13) genes were used to transform by electroporation (Gene Pulser II apparatus, BIO-RAD Labs, Mississauga, Canada) *E. coli* strain AD494 (DE3) [Aara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR ΔmalF3 F' [lac⁺(lacI^q) 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 (present on the λDE3 prophage) whose gene is under the control of the lac promoter which is inducible by isopropyl-β-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 100 μg of carbenicillin (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Canada) per ml until the A₆₀₀ 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 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 (Ni²⁺) immobilized on the His•Bind metal chelation resin.

46

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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
5 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
10 was done by dialysis against PBS at 4°C. The quantities of recombinant polypeptides obtained from the soluble fraction of E. coli was estimated by MicroBCA (Pierce, Rockford, Illinois).

EXAMPLE 8

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

As shown in Table 3, BVH-MC2, BVH-MC3, and BVH-MC4
20 His-tagged recombinant polypeptides were recognized in immunoblots by the antibodies present in the human palatine tonsils. It indicates that humans, which are normally in contact with M. catarrhalis do develop antibodies that are specific to these polypeptides. These particular human
25 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 polypeptides which induced significant lung clearance in a
30 mouse model also developed antibodies that recognized BVH-MC2 His-tagged recombinant polypeptides. These results

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

indicate that this polypeptide was present in M. catarrhalis antigenic preparation that protected mice against infection and that it induced antibodies that reacted with the corresponding BVH-MC2 His-tagged recombinant polypeptide.

- 5 Table 3. Reactivity in immunoblots of 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. ¹	Apparent molecular weight (kDa) ²	Reactivity in immunoblots with	
		Human palatine tonsils ³	Mouse sera ⁴
<u>BVH-MC2</u>	50	+	-
<u>BVH-MC3</u>	70	+	+
<u>BVH-MC4</u>	40	+	-
<u>BVH-MC5</u>	20	-	-

- 10 ¹His-tagged recombinant polypeptides produced and purified as described in Example 7 were used to perform the immunoblots.

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

- 15 ³Human palatine tonsils were undiluted to perform the immunoblots.

⁴Mouse 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 a M. catarrhalis challenge.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

EXAMPLE 9

This example illustrates the accessibility to antibodies of the BVH-MC2, BVH-MC3, BVH-MC4, and BVH-MC5 polypeptides at the surface of M. catarrhalis strain.

5 Bacteria were grown in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 0.25% dextrose at 37°C in a 8% CO₂ atmosphere to give an OD_{490nm} of 0.650 (~10⁸ CFU/ml). Dilutions of anti-BVH-MC2, anti-BVH-MC3, anti-BVH-MC4, anti-BVH-MC5, or control sera were then added and allowed to bind
10 to the cells, which were incubated for 2 h at 4°C with rotation. Samples were washed 4 times in blocking buffer [phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% bovine serum albumin (BSA)], and then 1 ml of goat fluorescein (FITC)-conjugated anti-mouse IgG Fc (gamma) fragment specific
15 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
20 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-MC2-, BVH-MC3-, BVH-MC4-, and BVH-MC5-specific antibodies efficiently recognized their corresponding surface exposed
25 epitopes on the homologous (ETSU C-2) M. catarrhalis strain tested (Table 4). It was determined that more than 70 % of the 10,000 Moraxella cells analyzed were labeled with the antibodies present in the specific sera. These observations clearly demonstrate that these polypeptides are accessible
30 at the surface where they can be easily recognized by antibodies. Anti-M. catarrhalis antibodies were shown to

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

play an important role in the protection against M. catarrhalis infection.

5 Table 4. Evaluation of the attachment of BVH-MC2-, BVH-MC3-, BVH-MC4-, and BVH-MC5- specific antibodies at the surface of intact cells of M. catarrhalis strain ETSU-C2.

Serum Identification	Fluorescence Index ²	% of labeled cells ³
Pool of <u>BVH-MC2-</u> specific sera ¹	3.6	72.8
Pool of <u>BVH-MC3-</u> specific sera	7.5	82.8
Pool of <u>BVH-MC4-</u> specific sera	10.9	92.4
Pool of <u>BVH-MC5-</u> specific sera	6.7	77.4
Pool of negative control sera ⁴	1	7.4
Positive control serum ⁵	43.8	98.7

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

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

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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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

⁵ Serum obtained from a mouse immunized with 20 µg of purified outer membrane polypeptides was diluted 1/1000 and was used as a positive control for the assay.

EXAMPLE 10

This example illustrates the bactericidal activities of anti-BVH-MC2 mouse sera.

10 Bacteria were plated on chocolate agar plate and incubated at 37°C in a 8% CO₂ 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_{490nm} of 0.25 and diluted to 8 x 10⁴
15 CFU/ml. The bactericidal assay was performed by mixing 25 µl of the bacterial suspension with 50 µl of diluted heat-inactivated test serum and 15 µl of HBSS and incubating for 15 min at 37°C, 8% CO₂ with agitation (200rpm). The rabbit complement-containing serum was then added to a final
20 concentration of 10%, and the mixture was incubated for an additional 60 min at 37°C, 8% CO₂ with agitation (200rpm). At the end of the incubation period, the number of viable bacteria was determined by plating 10µl of the assay mixture
25 on chocolate agar plate. The plates were incubated at 37°C in an 8% CO₂ atmosphere for 18-24 h. The control consisted of bacteria incubated with heat-inactivated sera collected from mice before immunization and rabbit complement.

The % of lysis was determined by the following mathematical formula:

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

$$100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

A = CFU obtained when the bacteria were incubated with immune sera

B = CFU obtained with pre-bleed sera

- 5 The M. catarrhalis strain ETSU 658 was used to evaluate the bactericidal activity of the sera. Percentage of lysis of 71.3 was determined for mouse sera collected after immunization with purified recombinant BVH-MC2 polypeptide (SEQ ID NO: 2) (Table 5).

- 10 **Table 5. Evaluation of the bactericidal activities of anti-BVH-MC2 mouse sera.**

Identification	Bactericidal titer	% of lysis
Pool of <u>BVH-MC2</u> -specific sera ¹	1/35	71.3
Positive control serum ²	1/35	92.7

- ¹ The mice were injected subcutaneously five times at two-week intervals with 20 µg of purified recombinant polypeptides mixed with 10 µg of QuilA adjuvant (Cedarlane Laboratories, Hornby, Canada).
- 15

² Serum obtained from a mouse immunized with 20 µg of purified outer membrane polypeptides was diluted 1/35 and was used as a positive control for the assay.

EXAMPLE 11

- 20 This example illustrates the bactericidal activities of anti-BVH-MC3 mouse sera.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

Bacteria were plated on chocolate agar plates and incubated at 37°C in a 8% CO₂ 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_{490nm} of 0.25 and diluted to 8 x 10⁴ CFU/ml. The bactericidal assay was performed by mixing 25 μl of the bacterial suspension with 50 μl of diluted heat-inactivated test serum and 15 μl of HBSS and incubating for 15 min at 37°C, 8% CO₂ with agitation (200rpm). The rabbit complement-containing serum was then added to a final concentration of 10%, and the mixture was incubated for an additional 60 min at 37°C, 8% CO₂ with agitation (200rpm). At the end of the incubation period, the number of viable bacteria was determined by plating 10 μl of the assay mixture on chocolate agar plate. The plates were incubated at 37°C in an 8% CO₂ atmosphere for 18-24 h. The control consisted of bacteria incubated with heat-inactivated sera collected from mice before immunization and rabbit complement. The M. catarrhalis strain ETSU 658 was used to evaluate the bactericidal activity of the sera. The % of lysis was determined by the following mathematical formula:

$$100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

A = CFU obtained when the bacteria were incubated with immune sera

25 B = CFU obtained with pre-bleed sera

Bactericidal antibodies were found to be present in the sera collected from the 7 mice that were immunized with the purified recombinant BVH-MC3 polypeptide (Table 6). No bactericidal activity were recorded in the sera collected from control mice (data not shown).

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

Table 6. Evaluation of the bactericidal activity of anti-
BVH-MC3 mouse sera.

Serum identification ¹	% of lysis
S1 ²	33.3
S2	67.9
S3	89.6
S4	66.2
S5	78.0
S6	90.1
S7	37.1
Positive control serum ³	77.3

¹The mice S1 to S7 were injected subcutaneously five times at two-week intervals with 20 µg of purified recombinant polypeptide mixed with 10 µg of QuilA adjuvant (Cedarlane Laboratories, Hornby, Canada).

²Each mouse serum collected from BVH-MC3 immunized mouse were diluted 1/50.

³Serum obtained from a mouse immunized with 20 µg of purified outer membrane polypeptides was diluted 1/50 and was used as a positive control for the assay.

EXAMPLE 12

This example illustrates the protection of mice against M. catarrhalis infection induced by immunization with purified recombinant BVH-MC3 polypeptide.

Groups of 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-MC3 polypeptide in presence of 10% of QuilA adjuvant (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canada) or, as

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

control, with QuilA adjuvant alone in PBS. Blood samples were collected from the orbital sinus on day 0, 14, 28, 42, and 56 prior to each immunization and 14 days (day 70) following the fifth injection. One week later the mice were challenged intrapulmonary with approximately 1×10^6 CFU of the M. catarrhalis strain ETSU 658. Samples of the M. catarrhalis challenge inoculum were plated on chocolate agar plates to determine the CFU and to verify the challenge dose. Mice were killed by an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (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 the serial dilutions for CFU determination. The % of clearance was determined by the following mathematical formula:

$$100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

A = CFU obtained with the mice immunized with the BVH-MC3 polypeptide

B = CFU obtained in the control mice

As shown in Table 7, a reduction of 54% in the number of living bacteria were determined for mice immunized with BVH-MC3 polypeptide comparatively to mice in the control group. Thus, immunization with recombinant BVH-MC3 polypeptide promoted rapid clearance of an heterologous strain of M. catarrhalis from the lungs of the mice.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

Table 7. Pulmonary clearance of Moraxella catarrhalis by mice immunized with purified recombinant BVH-MC3 polypeptide

Bacterial recovery from control group (CFU/ml of lung homogenate) ^a	Bacterial recovery from <u>BVH-MC3</u> group (CFU/ml of lung homogenate) ^b	Bacterial clearance (%) ^c
$2.4 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5 \pm 7.9 \times 10^4$	54

^aMeans \pm standard deviations for six mice.

5 ^bMeans \pm standard deviations for seven mice.

^cMice were challenged intrapulmonary with 1×10^6 CFU of bacteria, and viable bacteria were recovered from lung 5 h after challenge. The % of clearance was calculated with the mathematical formula described above.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

CLAIMS:

1. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide chosen from:
- (a) a polynucleotide encoding a polypeptide having
5 at least 70% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;
- (b) a polynucleotide encoding a polypeptide having
10 at least 80% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;
- (c) a polynucleotide encoding a polypeptide having
15 at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;
- (d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;
- (e) a polynucleotide encoding a polypeptide
20 capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;
- (f) a polynucleotide encoding an epitope bearing
25 portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

(g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 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, 4, 6, 8, 10, 12, 14;

(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, 6, 8, 10, 12, 14;

(c) a polynucleotide encoding a polypeptide having at least 95% identity to a second polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14;

(d) a polynucleotide encoding a polypeptide comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14;

(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, 4, 6, 8, 10, 12, 14;

(f) a polynucleotide encoding an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14;

(g) a polynucleotide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13;

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

(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.

5 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
10 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
15 polypeptide;

wherein said polypeptide comprises a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof.

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

(a) a DNA sequence encoding a polypeptide or

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

25 wherein said polypeptide comprises a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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, 4, 6, 8, 10, 12, 14.

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, 4, 6, 8, 10, 12, 14 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, 4, 6, 8, 10, 12, 14.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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,
5 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
10 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
15 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
20 a second polypeptide having an amino acid sequence
comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8,
10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;
- (b) a polypeptide having at least 80% identity to
a second polypeptide having an amino acid sequence
25 comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8,
10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;
- (c) a polypeptide having at least 95% identity to
a second polypeptide having an amino acid sequence

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8,
10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;

(d) a polypeptide comprising a sequence chosen
from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or
5 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, 6, 8, 10, 12, 14 or
fragments or analogs thereof;

10 (f) an epitope bearing portion of a polypeptide
comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8,
10, 12, 14 or fragments or analogs thereof;

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

15 (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
20 a second polypeptide having an amino acid sequence
comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8,
10, 12, 14;

(b) a polypeptide having at least 80% identity to
a second polypeptide having an amino acid sequence
25 comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8,
10, 12, 14;

(c) a polypeptide having at least 95% identity to
a second polypeptide having an amino acid sequence

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

comprising a sequence chosen from: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14;

(d) a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14;

5 (e) a polypeptide capable of raising antibodies having binding specificity for a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14;

(f) an epitope bearing portion of a polypeptide comprising a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 10, 12, 14;

(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.

15 20. A chimeric polypeptide comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 or fragments or analogs thereof; provided that the polypeptides are linked as to formed a chimeric polypeptide.

20 21. A chimeric polypeptide comprising two or more polypeptides having a sequence chosen from SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 14 provided that the polypeptides are linked as to formed a chimeric polypeptide.

22. A pharmaceutical composition comprising a 25 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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

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 a host susceptible to Moraxella infection comprising

(a) obtaining a biological sample from a host;

(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

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

- (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
- 5 (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
- 10 infection.
31. Kit comprising a polypeptide according to any one of claims 18 to 21 for detection or diagnosis of Moraxella infection.

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

1/8

Figure 1 (SEQ ID NO: 1)

```

1 ATGGACACTG ACATGAACA TTTAACAATA CATCGCCTAT CAGCTGCAT
51 CATVGGCGTT TTATTATTCA TTAGCCGATC AGTGAAGCA AATACGACAC
101 ACCATCACAC GTRAACCAAT AGCGAGCTTA AACTTGCTGA TGATAGTATT
151 ATTGATAGTA TCAATCAATT GGTGAGCTG ACCGCAATA TTCAAATAC
201 ACAATATTTT CAACCAACA ACAGTGTGAC CGTTGCTTTT ACCGCATTAC
251 ATGAGCTGCC TATTGTGGAT ATCAGCTTCT ATTTAATGCG AGGTCACGG
301 TATGACCAATC AGGTTGGCAA ATCAGGCAAG GCTAACATGG TTGCAACCAT
351 GCTCACCAAA GGAAGTACCA GCCTTCTGTA AGATGAGTTT GTTGTGCCA
401 AAGAGCGTCT TGGCAATGAT TTTACCACTA CAGCAATAA GGATAACTTA
451 ACTTTATCAT TAAGAAGCTT GTCGTATCAA TCATTATTTA ATCAAGCCGC
501 CGATTTAATG TCGATGCTG TCACTCAACC TCGTTTGGT GATAAGACTC
551 TACAACGCAA CAATAATCAC CTCATCACCA GTTTAARACA AAAAARCGAA
601 ACCCTTATTC ATGAGCTTTC TGTGCTTAT CACCAAGCCG TATATGAAAA
651 TCATCCTTAT GCACACGCAA CCACAGGCGA TGAAGATAGT ATTGCCAAAA
701 TTGATCGTGA TGAGCTGCTT AATTTTGGC ATACTTTTAT TAATGCAAAAT
751 AATGGGACAC TGGTATTAC AGGTGATATG ACCGCCGAGC AAGCCAAATC
801 ACTTGCCAAC CATCTGACCG CCAAAATPACC GACAGGCAAG TCGTATATAA
851 ATACGCTGGA TTGACAAAA CCAATTAAGC CTCGTCATAT CCAATTTCTC
901 CACACAGTA GTCAATATTC ATCATATATC GGTATATCCA CAGTAAATC
951 ACCGACGAC AAGCAGGCTC GTCAGAGTTT CAGGATTTT TCATTAGGTA
1001 ATGAATTTT GCCACGCTG GATTTAATG CCAGATTGAT GAAACCAAT
1051 CGAGAGCAA AAGCTACAC TTAATGGCATT TATGCGGTA TGGAACGCC
1101 CAGAGCAGGT GGTAATTATG TGGTTGAATT TTCAACCGAT GCCGATAAAG
1151 CAGCCGATGC CATTTTAGAG ACCCTACACA TCATTAAATG ATCGCTGAAT
1201 GAAGGCAATA CCCAACAAGA GCTTGAATG GTCGCTTGG GCAATAAAAA
1251 TGGTTTGGC AATATTTTTC CAAGCAATGC CAGTATATAT CGTGTCAATG
1301 GTGCTTATAT TTTTCCGATC TATCCAAAG ATCTCTTAA CCAATACGCC
1351 AATCGCTGG ATAAATGCCAC GATAAATAGT GTTAATACCG CACTGAACAT
1401 CGGTATCAAG CCTGATGAAT TTATCATCAT CACCGTGGT AAAACTAAGC
1451 CAAATTTGGA CAAATAA

```

Figure 2 (SEQ ID NO: 2)

```

1 MDDMKHLK HRLSBAALCV LLEISPSVQA NTHHHTLTS SELKLADDSI
51 LDSINQLGEL TVNIPITQYF QTRNGVSVAF TPLHELPIVD ISLYFNAGSA
101 YDHQVGSKST ANMVATMLTQ GTDSLSEDF VAAKERLGD FTSTANKDNL
151 TLSRLSLSDQ SLLNQAADLM VDAVTQPAFD DKTLDQRNKQ LITSLKQKQK
201 NPYHVASVAV HQAVYENHPY AHATGDEDS TAKIDRELL NFWHTFINAN
251 NATLVITGDM TAEQAKSLAN HLTAKLPTGK SYKNLDELTK PVKARHLIHP
301 HNSSQPQIII GHPTSKVTRD KAGRQEFSDP SLGNEILAG DFNARLMKTI
351 RQRGYTYGI YGMRERLRAG GNYVVEFSD GDKAADALLE TLHI INESLN
401 EGITQBELEL VRLGNKGFPA NIFSSNASH RVLGALFVAD YPKDHLNHTL
451 NRLDNATINS VNTALNLRK PDEPIITVG KTRPMKDK*

```

Figure 3 (SEQ ID NO: 3)

```

1 GAGCTTAAAC TTGCTGATGA TAGTATTATT GATAGTATCA ATCAATTGGG
51 TGAGCTGACC GTCAATATTC CAAATACACA ATATTTTCAA ACCAACAAGC
101 GTGTGAGCCT TGCTTTTACG CCAATACATG AGCTGCCTAT TGTCGATATC
151 ACCTTGTATT TTAATCGAGG GTCAAGCTAT GACCATCAGG TTGSCAAATC
201 AGCCACGCTC AACTGTGTTG CAACCATGCT CACCCAAAGG ACTGACAGCC
251 TTTCTGAAGA TGAGTTTGTG CTTGCCAAG AGCCCTTGG CATGTATTT
301 ACCAGTACAG CAAATAAGGA TAACCTAACT TTATCATTTA GAAGCTTGTG
351 TGATCAATCA TTATTAATC AAGCCGCCCA TTTAATGGTC GATGCTGTCA
401 CTCACCTGCG TTTTGTATGAT AAGACTCTAC AACGCARCAA AAATCAGCTC
451 ATCACCAGTT TAAACAAAAA AAGCAAAAC CCTTATCATG TAGCTTCTGT
501 TGCTTATCAT CAGCCGATG ATGAAATCA TCCTTATGCA CAGCAACCA
551 CAGCCGATCA AGATAGTATT GCCAAATTTG ATCGTATGTA GCTGCTTAAT
601 TTTTGGCATA CTTTATTTAA TCCAAATAT CCGCACTGG TGATACAGG
651 TGATATGACC GCGGAGCAAG CCAAAATCACT TGCCAAACCAT CTGACCCGCA
701 AATTACCGAC AGGCAAGTCC TATAAAAATA CGCTGGATTT GACAAAACCA
751 GTTAAGGCTC GCCATATCCA TATTCCTCAC AACAGTAGTC AAACCCAAAT
801 CATCATCGGT CACCCACCA GTAAAGTACG CACGGACAAA GCAGTCTGTC

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

2/8

Figure 3 (SEQ ID NO: 3) (continued)

```

851 AAGAGTTCAG CGATTTTCCA TTAGGTAATG AAATTTTGGC AGGTGGTGAT
901 TTAATGCCA GATTGATGAA AACCATTCGA GAGCAAAAG GCACACCTA
951 TGGCATTAT GCGGATATGG AACGCCTCAG AGCAGGTGGT AATTATGTGG
1001 TTCAATTTTC AACCGATGCC GATAAAGCAG CCGATGCCAT TTTAGAGACG
1051 CTACACATCA TTAATGAGTC GCTGAATGAA GGCATAACCC AAGAAGAGCT
1101 TGAATTTGGT CGTTTGGGTA ATAAAAATGG TTTTGCCAAT ATTTTTCGAA
1151 GCAATGCCAG TATTTCATCGT GCATTGSGT CTTTATTGTG TGCCGATTAT
1201 CCAAAAGATC ATCTTAACCA TACGCTCAAT CGCTTGATA ATGCCAGGAT
1251 AAATAGTGTT AATACCGCAC TGAACCTGCG TATCAAGCCT GATGAATTT

```

Figure 4 (SEQ ID NO: 4)

```

1 ELKLADDSII DSIINQLGELT VNIPNTQYFQ TNNGVSVAFV FLHELPIVDI
51 SLYFNAGSAY DHQVKSQSTA NMVATMLTQG TDSLSEDEFV AAKERLGIDF
101 TSTANKDNL LSLRSLSDQS LLNQAADLMV DAVTQPAFDD KTLQRNKNQL
151 ITSLKQKQKQ NYHVASVAYH QAVYENHPYA HATTGDEDSI AKIDRDELLN
201 FWHTFINANN ATLVITGDMT AEQAKSLANH LTAKLPTGKS YKNLDDLTKF
251 VKARHIHIFH NSSQTQIIIG HPTSKVRIDK AGRQEFSDPS LGNEILAGGD
301 FNARLMKTRR EQKGYTYGIY GGMERLRAGG NYVVEFSTDG DKAADALET
351 LHIINESLNE GITQBELELV RLGNKNGFAN IFSSNASIHR VIGALFVADY
401 PKDHLNHLN RLDNATINSV NPTALNLRKFP DEF

```

Figure 5 (SEQ ID NO: 5)

```

1 GAGCTTAAAC TTGCTGAGGA TACTATTATT GATAGTATCA ATCAATGGG
51 TGAGCTGACC GTCAATATTC CAAATACACA ABATTTTCAA ACCACAAAG
101 GTCTGAGCGT TCGTTTACG CCAATACATG AGCTGCCATG TGTGATATC
151 AGCTTGTATT TTAATGCAGG GTCAGCGTAT GACCATCAGG TTGGCAAATC
201 AGGCACGGCT AACATGTTG CAACCATGCT CACCCAAGGA ACTGACAGCC
251 TTTCTGAAGA TGAGTTTGTG CGTGCCAAAG AGCGTCTTGG CATTGATTTT
301 ACCAGTACAG CAAATAAGGA TAACCTTACT TTATCATTAA GAAGCTTGTG
351 TGATCAATCA TTATTAATC AAGCCGCCGA TTTAATGGTC GATGCTGTCA
401 CTCARCTGAC TTTTATGATG AAGACTCTAC AACCCAAAG AAATCCGCTC
451 ATCACCAGTT TAAACAAA AAAGCAAAC CTTTATCAIG TAGCTCTGTG
501 TGCTTATCAT CAAGCCGTAT ATGAAAATCA TCCTPATGCA CAGGCAACCA
551 CAGGCGATGA AGATAGTATT GCCAAAATG ATCGTATGTA GCTGCTTAAT
601 TTTTGGCATA CTTTATTAA TGCAAAATAT GCGACACTGG TGATZACAGG
651 TGATATGACC GCGGAGCAAG CCAAACTACT TGCCAAACAT CTGACCGCCA
701 AATTACCGAC AGGCAAGTCT TATAAANAAT CGCTGGATTT GACAAAACCA
751 GTTAAAGCTC GCCATATCCA TATTCTCAC AACCAATG ACACCAAT
801 CATCATCGT CACCCACCA GTAAAGTACG CACGACAAA GCAGGTGCTC
851 AAGAGTTCAG CGATTTTCCA TTAGGTAATG AAATTTTGGC AGGTGGTGAT
901 TTAATGCCA GATTGATGAA AACCATTCGA GAGCAAAAG GCTACACTTA
951 TGGCATTAT GCGGATATGG AACGCCTCAG AGCAGGTGGT AATTATGTGG
1001 TTGAATTTTC AACCGATGCC GATAAAGCAG CCGATGCCAT TTTAGAGACG
1051 CTACACATCA TTAATGAGTC GCTGAATGAA GGCATAACCC AAGAAGAGCT
1101 TGAATTTGGT CGTTTGGGTA ATAAAAATGG TTTTGCCAAT ATTTTTCGAA
1151 GCAATGCCAG TATTTCATCGT GCATTGSGT CTTTATTGTG TGCCGATTAT
1201 CCAAAAGATC ATCTTAACCA TACGCTCAAT CGCTTGATA ATGCCAGGAT
1251 AAATAGTGTT AATACCGCAC TGAACCTGCG TATCAAGCCT GATGAATTT

```

Figure 6 (SEQ ID NO: 6)

```

1 ELKLADDSII DSIINQLGELT VNIPNTQYFQ TNNGVSVAFV FLHELPIVDI
51 SLYFNAGSAY DHQVKSQSTA NMVATMLTQG TDSLSEDEFV AAKERLGIDF
101 TSTANKDNL LSLRSLSDQS LLNQAADLMV DAVTQPAFDD KTLQRNKNQL
151 ITSLKQKQKQ NYHVASVAYH QAVYENHPYA HATTGDEDSI AKIDRDELLN
201 FWHTFINANN ATLVITGDMT AEQAKSLANH LTAKLPTGKS YKNLDDLTKF
251 VKARHIHIFH NSSQTQIIIG HPTSKVRIDK AGRQEFSDPS LGNEILAGGD
301 FNARLMKTRR EQKGYTYGIY GGMERLRAGG NYVVEFSTDG DKAADALET
351 LHIINESLNE GITQBELELV RLGNKNGFAN IFSSNASIHR VIGALFVADY

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

3/8

Figure 6 (SEQ ID NO: 6) (continued)

401 PKDHLNHLN RLDNATINSV NTALNLRKIP DEF

Figure 7 (SEQ ID NO: 7)

1 GAGCTTAAC TTGCTGATGA TAGTATTATT GATACTATCA ATCAATTGGG
51 TGAGCTGACC GTCAATATTC CAAATACACA ATATTTTCAA ACCAACAAAG
101 GTGTGAGCGT TGCTTTTACG CCATTACATG AGCTGCCTAT TGTGATATC
151 AGCTTGTATT TPAATGCAGG GTCAGCGTAT GACCATCAGG TTGGCAAATC
201 AGGCACGGCT AACATGGTTG CAACCATGCT CACCCAAGGA ACTGACAGCC
251 TTTCTGAAGA TGAGTTTGT GCTGCCAAG AGCGTCTTGG CATTGATTTT
301 ACCAGTACAG CAATAAGGA TAACTTAAC TTATCATTAA GAAGCTTGTG
351 TGATCAATCA TTATTAAATC AAGCCGCCGA TTATATGGTC GATGCTGTCA
401 CTCACCTGC TTTTGTATGT AAGACTCTAC AACGCACGA AATACAGCTC
451 ATCACCAGIT TAAACAAAA AAGCAAAAC CCTTATCATG TAGCTTCTGT
501 TGCTTATCAT CAAGCCGAT ATGAAAAACA TCCTTATGCA CACGCAACCA
551 CAGGCGATGA AGATAGTATT GCCAAAATG ATCGTGATGA GCTGCTTAAT
601 TTTTGGCATA CTTTATTAA TGCAAAATAT GCGCACTGG TGATTACAGG
651 TGATATGACC GCCGAGCAAG CCAATCACT TGCCAAACCA CTGACCCGCA
701 AATTACCGAC AGGCAAGTCG TATAAAATA CGCTGGATTT GACAAACCA
751 GTTAAAGCTC TTTTGTATGT AATCTCTAC AACCTGATC AAACCAAAAT
801 CATCATCGST CACCCACCA GTAAGTACG CACGACAAA CGAGGTGTG
851 AAGAGTTCAG CGATTTTCA TTAGTTRAT AATTTTGGC AGGTGGTGT
901 TTTAATGCCA GATGATGAA AACCATTCGA GAGCAAAAG GCTACACTTA
951 TGGCATTAT GGCAGTATGG AACCCCTCAG AGCAGGTGGT AATTATGTGG
1001 TTGAATTTTC AACCGATGGC GATAAAGCAG CCGATGCCAT TTTAGAGAG
1051 CTACACATCA TPAATGAGTC GCTGAATGAA GGCATAACCC AAGAAGAGCT
1101 TGATATGGTG CGTTGGGTA ATAAAATGG TTTTCCCAT ATTTTCAA
1151 GCATTCAGG TATTCATCGT GTGATTTGG CTTTATTTGT TGCAGATTAT
1201 CCAAAAGACC ATCTTAACCA TACGCTCAAT CGCTTGGATA ATGCCAGAT
1251 AAATAGTGT AATACCGCAC TGAACCTGGG TATCAAGCCT GATGAATTT

Figure 8 (SEQ ID NO: 8)

1 ELKLADDSII DSINOLGELT VNIPNTQYFQ TNNGVSVAPT PLHELPTVDI
51 SLYFNAGSAY DHQVGSQETA NMVATMLTQC TDSLSEDEFV AAKRELGI DF
101 TSTANKDMIT LSLRSLSDQS LLNQAADLWV DAVTQPAFDD KTLQRKNQL
151 ITSLKQKQKQ PVHVASVYH QAVYENHPYA HATTGDEDSI AKIDRELLN
201 FWHFTINANN ATLVITGDMT ABOAKSLANH LTAKLPTGKS YKNLDDLKFP
251 VKARLHIHPIH NSSQTIIIG HPTSKVRITDK AGRQEFSDFS LGNELLAGGD
301 FNARLMKTIH EQKGYTYGIY GGMERLRAGG NYVVEFSTDG DKAADAILET
351 LHIINESLNE GITQBELELV RLGNKNGFAN IFSSNASIHR VIGALFVADY
401 PKDHLNHLN RLDNATINSV NTALNLRKIP DEF

Figure 9 (SEQ ID NO: 9)

1 ATGAGCTTAA TTAATBAATT AAATGAACGC ATTACGCCGC ATGCTTAAAC
51 TTCCATTAAA AATCAAGATG GCGATAATGC TGATPAAATC AATTTGTTAA
101 CCGCATTTTA TACCAATTTT GCAGGACGCT TGAGTAAATGA AGATGTGTAT
151 CAGCGTGCCA ATGCTTTGGC TGATAATGAG CTGAGCATG GGCATCATCT
201 GCTCAATGTT GCTTTTAGTG ATGTTTCAAC TGGTGAAGAT CAGATTGCTT
251 CTTTGATPAA TCAATTAAGC GATCAATATC ATGTTTGGCC AGRTRAGSCA
301 CGCACCCCAA TCCCAACGGC AGCACCTTTG GCTTTGGCAC GCATTAANGA
351 GCAAGCAGGT GCATTAATCTG TACCCTCTTT TATCTGTACT CAATTGGCTA
401 AAGAAGAAAA CCGTTTGCCA ACTTGGGGCC ATACTTTATT GCCAGCAGGG
451 CTATTTGCAA CCGCTGCCAC AACCAACGCC GAGCCTGTAA GCACAGCCTC
501 TGCTGTTGTG AAAGAGCCTG TCAAACCAAG TGTGTGACA GAACCAAGTTC
551 ATCCAGCTGC GGCTACCCAC CCAGTCAAAA CACCAACTGC CCAGCATTAC
601 GAACAAGAG AAAAAGCTC TTTTCTAAA ACGATCTAC CGATATTGG
651 ATTCATTTAT TTTGCGAGCT TGGCATGGCT TTTGTTAAGA GCATGTCAAG
701 ACAAACCAAC ACCTGTGCGC GCACCTGTTG CGACAGATAC AGCACCTGTG
751 GTAGCGGATA ATGCTGTACA GGCAGACCCA ACACAAAACAG GTGTTGCCCA
801 AGCACCTGCA ACGCTTAGCT TGTCTGTIGA TGAACCGGTT CAAGCCTTGT
851 ACTCGCACCG TGCTCAGGTT GGTAGTGAAG AGCTTGCAGG TCATATCCGT

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

4/8

Figure 9 (SEQ ID NO: 9) (continued)

```

991 GCAGCTATTG CTCAAGTCTT TGGGCTACAA GATTTAACCA TTCAAAATAC
991 CAACTGACTT ACCGCTACGA TGCCAGCGGC AGAATACTTA CCGCAATTTT
1001 TGGGTTTGAT GAAAGGTGTA CCAAATCAA GCGTTGTGAT TCATGATCAT
1051 ACGGTACGCT TTAATGCAAC CACGCCAGAA GATGTAGCAA AACTGTGAGA
1101 GGGTGTAAA AATATTCTAC CCGCTGATTT TACTGTAGAA GCAGAACCCTG
1151 AACTTGATAT TAATACTGCG GTTGCCGATA GTATTGAAC AGCCCGTGT
1201 GCTATTGTTG CTTTGGGTGA TACGTTGAA GAAAATGAGA TGGATATTTT
1251 AATCAATGCA TTAATATGCC AAATCATTA CTTTGGCTTA GACTCAACCG
1301 AATATCCCA AGAAATAAA GAATCTGGG ATTTGGCTGC CGAAATAA
1351 AGGCAGTCC CTGAAACAC TTTCGGTATC ATTTGGTATA CAGACACTCA
1401 AGGCACACAT GAGTATAATC AAGATTTATC AGAATCTOGT GCTGCTGCTG
1451 TTAAGAGTA TTTGGTATCA AAAGGTGTG CTGCTGAACG CTTGAACACT
1501 CAAGTGCAA GTTTTGATTA TCCAGTTGCA TCAATGCTA CCGAACAAGG
1551 TCGCTTCAA AACCTCGTA TTGAGTTGT ACTTTTCAA GAAGGTGAAG
1601 CAATTACTCA AGTCGGTCA TGTGAAGATG CACCAACACC TGTTCACAA
1651 AACTGA

```

Figure 10 (SEQ ID NO: 10)

```

1 MSLINKLNER ITPHVLTSIK NODGDNADKS NLLTAEYTFI AGRLSNEDVY
51 QRANALPDNE LEHGHLLNV AFSVDVSTGED QIASLSNOLA DEHYVSPVTA
101 RTAATAAPL ALARKEQAG ALSVHSIRT OLAKENRRLP TWAHTLLPAG
151 LFATAATTTA EPVTTASAVV KEPVKPSVVT EPVHPAAATP PVKPTPAQHY
201 ENKEKSPFLK TILPLIIGLII FAGLAWLLLR ACQDKPTVA APVATDTPV
251 VADNAVQADF TQTVQAQAPA TLSSLVDETG QALYSHRAOV GSEELAGHIR
301 AAIAQVFGVQ DLTIQNTNVH TATMPAAEYL PAILGLMRGV PNSSVVLHDD
351 TVRPNATPE DVAKLVEGAK NILPADPTVE APELDINTA VADSIETARV
401 ATVALGDTVE ENEMDILINA LNTQIMFAL DSEIIPQENK ELLDLAAEKL
451 KAVPETLRLI IGHDTDQGH EYNQDLSER AAHVKEYLVN KGVAERLNT
501 QGASFDYVVA SNATEQGRFQ NRRIEFVLFQ EGEAITQVGH AEDAPTPVAQ
551 N*

```

Figure 11 (SEQ ID NO: 11)

```

1 ATGGATACAA AACGATTC ACAAATTGG CTCTACCTG ATGGTGTGGC
51 TGATCTACTA TTTCCCATG CTCAAAAACA AGAAACCTG CCGCAACCTT
101 TGCTATTTGT GCTAACGCA CACGGTATC GCTTGGTGT ACCACAPTA
151 ATAGAGTATA CCGAAGTCT GCTAAATAAT GCTGACGAAG ATCTAAACAG
201 CCAAACITTC AAATTTATCG ATCAGCTCAA TGGTCGTTG ATGGGTTTGC
251 GTGCCGATAT TACGCCACAA ATTCACGCA TGTATAGCAA ATATGGTCAA
301 GGCATCAGCC GTTACTGTTA TGTGGGGCAA GTTGTCAAAA CCTTACCAGC
351 TGGTCTGTTT GGGCTGGTA CACCGCTCA ATTTGGTGT GAGATTTTGG
401 GGRAGATGA TATCCGTCG GACTTGACG TGATGATCT ATTTGGCCCA
451 TTGGCAGATG AGATCCGACT AGCCGAGAG ATGCTACATG TGGATATTGG
501 TCATGTCGCT ATTTTGTGAT CTTGTGTGCA GTTGCATGGC GTTTCAAATA
551 AAGATGCTGA TGAGCTGATT GGCAITTACC ATAAAAAGC CATGCCAGAA
601 CTTGCCAAAT GTTGCCAAAA TATTGGCAAT AGCCTAAACA GCCCAAGCGA
651 TGCAACCGAT TTTTGGTAT TGGCTAAGCA TACATTAAGC AGTGATCGGA
701 CACCAATGC CGAGGCTTTA TTAAGTAAAC TGTCCGATAA AGCTGCCCAA
751 GATAATAAAA TCATCCAAAG GCCAATGAG CTTCTACTT TGGCGCACA
801 TATCGAGGCG GTGGTATGA GTGTGATAT TGATGACT GAAATGTGAG
851 GATATCAITA TCATACGGT GTGGTATTA ATGCTATTT GGTAAATAGA
901 ACCACACAGA CTCAAGCTTT GGTACGAGG GGTGCTTTG ATGCTATCTC
951 AACTCACAGC GTAGCAAGG GCGCAACTGG TTTAGCATG GATATTAATC
1001 GTTGTCTGA ATTTGTAGAG CTTGAAAGAG ATACTGTGAT TTTGTGGAT
1051 TATCAGGATT TGCAAAATGC TGATGCAGAC ACAAAGCTG ATTTGGCCAC
1101 ACAATTAATA ACCTGCAAT CTGAAGCTG TATTTGCAAT AAGCCTTGA
1151 CTGTGATGA TAAGCTTAC CAGATTTGTG GGTTTTCCA TTTGGCACCC
1201 CATCAAGATA AGCCGATTTG GCGGTCGCA TTAGTTGGTG ATGACTACTA
1251 A

```

Figure 12 (SEQ ID NO: 12)

```

1 MDTKHICQNW LLEPCVAVLV FTDAAKOESL RDALLEVLTA HGVRVLSPPV
51 IEYTESLNN ADEDLKRQTF KPIDQLNGRL MGLRADITPQ ILRIDSXYGQ
101 GISRYCYVVG VVKTLPTGLF GLRTPQLLGA EIPGIDDIRA ELELIDLLAA
151 LADEIGLGRH MLRVDIGHVA IPDRLCQLHG VSNKDADEL GYHKKAMPE
201 LAKWCQNIQW SLNFSDATD FVLAKHTLS SDRTPWAEL LSKLSBKARQ
251 DNKTIQANE LATLAHTRA VGMVSVIDT ELSGVHYHTG VVENVYLGNR
301 TTQOALVRG GRFDGISTHS VARGATGFSM DINRLEFVE LEEDVILVD
351 YHDLQADAD TKADLATQIK TLQSEGCIVI KPLTVDDKPN QIDGVLHWDT
401 DQDKPIWAVR LVGDEV*

```

Figure 13 (SEQ ID NO: 13)

```

1 ATGAATAATT TCGTATCA CTAACAAGT TTTGGTATG ACCTAATCA
51 GTCCAATCCT CATACCTTG CTCATCACC CAAATATATA CAGCTGACGG
101 TACTTGGTTT GATCGTATG ATCATTGCA TTTTGGCTG CTAATCTGC
151 ATTTTACCAA CCATTCAAAA GCTTAATGCA GCCCAAAGTC AAGAATCTGC
201 CTTAATTGAT GAATTGCCA CTAATATCA TAAAGCCAG CAGTTGACC
251 ATCTAAGCCA TCAGTCATA CAAAAAATA CACAACCTGA AARTCAGTC
301 AATGCTCTGC CACGCACAGC ACCGATGAGC GAGATTATCG GAATGATAAA
351 TACCALAGCA CAGCGGTTA ATGTCAGGT GGTGAGTGA TCAGTCAAG
401 CAGTCTGGA ACAGGTAT TATACCGAM CCCTTTCGC AGTGAGTGG
451 ACAGGGGATT ATCATCTTT GGTTCGATGG TTACTTGAGT TGTCAGAGCC
501 TAACCAATTG CTGACAGTGC ATGATTTGA TCTGAGGCT GGTTTGAACC
551 ATCAGCTGAT GATGATGCT CAGATGAAA CTTATCAAG AACAAACCG
601 CCAAACCCAG TTGCTAGCA GGTGCTGAT GTTCAATGA

```

Figure 14 (SEQ ID NO: 14)

```

1 MNNVYVLOS FHYELNVMR HTIAQSPKYI QLTVLCIVM IIGIFWLLA
51 ILETTQKINA AQSQESALID EFATKYHKAQ QFDHLSHOVI QKNTOLENOL
101 NALPRTAPMS ELIGMINTKA QAVNVQVVA SVQAGREGDY YTERPIAVSA
151 TGDYHALGRW LLELSEANHL LTVHDFDLKA GLNHQLMMIA QMKTYQANKR
201 PKFVAQQVPD VQ*

```

Figure 15

```

ETSU C-2 1 GAGCTTAAACTTCTGATGATAGTATTATGATAGTATCAATCAATTGGG 50
ETSU 658 1 GAGCTTAAACTTCTGATGATAGTATTATGATAGTATCAATCAATTGGG 50
ETSU T-25 1 GAGCTTAAACTTCTGATGATAGTATTATGATAGTATCAATCAATTGGG 50
M-12 1 GAGCTTAAACTTCTGATGATAGTATTATGATAGTATCAATCAATTGGG 50
*****

ETSU C-2 51 TGAGCTGACCGTCAATATTCAAATACACAATATTTTCAAACCAACAACG 100
ETSU 658 51 TGAGCTGACCGTCAATATTCAAATACACAATATTTTCAAACCAACAACG 100
ETSU T-25 51 TGAGCTGACCGTCAATATTCAAATACACAATATTTTCAAACCAACAACG 100
M-12 51 TGAGCTGACCGTCAATATTCAAATACACAATATTTTCAAACCAACAACG 100
*****

ETSU C-2 101 GTGTGAGCGTTGCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCTATTGTCGATATC 150
ETSU 658 101 GTGTGAGCGTTGCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCTATTGTCGATATC 150
ETSU T-25 101 GTGTGAGCGTTGCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCTATTGTCGATATC 150
M-12 101 GTGTGAGCGTTGCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCTATTGTCGATATC 150
*****

ETSU C-2 151 AGCTTGTATTTTAAATGCAGGGTCAGCGTATGACCATCAGGTTGGCAAAATC 200
ETSU 658 151 AGCTTGTATTTTAAATGCAGGGTCAGCGTATGACCATCAGGTTGGCAAAATC 200
ETSU T-25 151 AGCTTGTATTTTAAATGCAGGGTCAGCGTATGACCATCAGGTTGGCAAAATC 200
M-12 151 AGCTTGTATTTTAAATGCAGGGTCAGCGTATGACCATCAGGTTGGCAAAATC 200
*****

```

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

6/8

Figure 15 (continued)

ETSU C-2	201	AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTCACCCAAAGAACTGACAGCC	250
ETSU 658	201	AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTCACCCAAAGAACTGACAGCC	250
ETSU T-25	201	AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTCACCCAAAGAACTGACAGCC	250
M-12	201	AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTCACCCAAAGAACTGACAGCC	250

ETSU C-2	251	TTTC TGAAGATGAGTTTGGTTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTT	300
ETSU 658	251	TTTC TGAAGATGAGTTTGGTTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTT	300
ETSU T-25	251	TTTC TGAAGATGAGTTTGGTTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTT	300
M-12	251	TTTC TGAAGATGAGTTTGGTTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTT	300

ETSU C-2	301	ACCA GTACAGCAAATAAGGATAACTTAAC TTTATCATTAAAGAAGCTTGTC	350
ETSU 658	301	ACCA GTACAGCAAATAAGGATAACTTAAC TTTATCATTAAAGAAGCTTGTC	350
ETSU T-25	301	ACCA GTACAGCAAATAAGGATAACTTAAC TTTATCATTAAAGAAGCTTGTC	350
M-12	301	ACCA GTACAGCAAATAAGGATAACTTAAC TTTATCATTAAAGAAGCTTGTC	350

ETSU C-2	351	TGATCAATCATTATTAANTCAAGCCGCGATTTAATGGTCGATGCTGTCA	400
ETSU 658	351	TGATCAATCATTATTAANTCAAGCCGCGATTTAATGGTCGATGCTGTCA	400
ETSU T-25	351	TGATCAATCATTATTAANTCAAGCCGCGATTTAATGGTCGATGCTGTCA	400
M-12	351	TGATCAATCATTATTAANTCAAGCCGCGATTTAATGGTCGATGCTGTCA	400

ETSU C-2	401	CTCAACCTGCTTTTGATGATAAGACTCTACAACGCCAACAAAATCAGCTC	450
ETSU 658	401	CTCAACCTGCTTTTGATGATAAGACTCTACAACGCCAACAAAATCAGCTC	450
ETSU T-25	401	CTCAACCTGCTTTTGATGATAAGACTCTACAACGCCAACAAAATCAGCTC	450
M-12	401	CTCAACCTGCTTTTGATGATAAGACTCTACAACGCCAACAAAATCAGCTC	450

ETSU C-2	451	ATCACCAGTTTAAACAAAAAAGCAAAACCCCTTATCATGTAGCTTCTGT	500
ETSU 658	451	ATCACCAGTTTAAACAAAAAAGCAAAACCCCTTATCATGTAGCTTCTGT	500
ETSU T-25	451	ATCACCAGTTTAAACAAAAAAGCAAAACCCCTTATCATGTAGCTTCTGT	500
M-12	451	ATCACCAGTTTAAACAAAAAAGCAAAACCCCTTATCATGTAGCTTCTGT	500

ETSU C-2	501	TGCTTATCATCAAGCCGTATATGAAAATCATCCTTATGCACAGCAACCA	550
ETSU 658	501	TGCTTATCATCAAGCCGTATATGAAAATCATCCTTATGCACAGCAACCA	550
ETSU T-25	501	TGCTTATCATCAAGCCGTATATGAAAATCATCCTTATGCACAGCAACCA	550
M-12	501	TGCTTATCATCAAGCCGTATATGAAAATCATCCTTATGCACAGCAACCA	550

ETSU C-2	551	CAGCCGATGAAGATAGTATTGCCAAAATTGATCGTGATGAGCTGCTTAAT	600
ETSU 658	551	CAGCCGATGAAGATAGTATTGCCAAAATTGATCGTGATGAGCTGCTTAAT	600
ETSU T-25	551	CAGCCGATGAAGATAGTATTGCCAAAATTGATCGTGATGAGCTGCTTAAT	600
M-12	551	CAGCCGATGAAGATAGTATTGCCAAAATTGATCGTGATGAGCTGCTTAAT	600

ETSU C-2	601	TTT TGGCATACTTTTATTAATGCAAATAATGCGACACTGGTATTACAGG	650
ETSU 658	601	TTT TGGCATACTTTTATTAATGCAAATAATGCGACACTGGTATTACAGG	650
ETSU T-25	601	TTT TGGCATACTTTTATTAATGCAAATAATGCGACACTGGTATTACAGG	650
M-12	601	TTT TGGCATACTTTTATTAATGCAAATAATGCGACACTGGTATTACAGG	650

ETSU C-2	651	TGATATGACCCGCGAGCAAGCCAAATCACTTGCCAACCATCTGACCCGCA	700
ETSU 658	651	TGATATGACCCGCGAGCAAGCCAAATCACTTGCCAACCATCTGACCCGCA	700
ETSU T-25	651	TGATATGACCCGCGAGCAAGCCAAATCACTTGCCAACCATCTGACCCGCA	700
M-12	651	TGATATGACCCGCGAGCAAGCCAAATCACTTGCCAACCATCTGACCCGCA	700

ETSU C-2	701	AATTACCGACAGGCAAGTCGTATAAAAAATACCGTGGATTGACAAAACCA	750
ETSU 658	701	AATTACCGACAGGCAAGTCGTATAAAAAATACCGTGGATTGACAAAACCA	750
ETSU T-25	701	AATTACCGACAGGCAAGTCGTATAAAAAATACCGTGGATTGACAAAACCA	750
M-12	701	AATTACCGACAGGCAAGTCGTATAAAAAATACCGTGGATTGACAAAACCA	750

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

7/8

Figure 15 (continued)

ETSU C-2 751 GTPAAGGCTCGTCATATCCATATTCCTCACAACAGTAGTCAAACCCAAAT 800
 ETSU 658 751 GTPAAGGCTCGTCATATCCATATTCCTCACAACAGTAGTCAAACCCAAAT 800
 ETSU T-25 751 GTPAAGGCTCGTCATATCCATATTCCTCACAACAGTAGTCAAACCCAAAT 800
 M-12 751 GTPAAGGCTCGTCATATCCATATTCCTCACAACAGTAGTCAAACCCAAAT 800

 ETSU C-2 801 CATCATCGGTCACTCCACCAGTAAAGTACGCACGGACAAAAGCAGGTGCTC 850
 ETSU 658 801 CATCATCGGTCACTCCACCAGTAAAGTACGCACGGACAAAAGCAGGTGCTC 850
 ETSU T-25 801 CATCATCGGTCACTCCACCAGTAAAGTACGCACGGACAAAAGCAGGTGCTC 850
 M-12 801 CATCATCGGTCACTCCACCAGTAAAGTACGCACGGACAAAAGCAGGTGCTC 850

 ETSU C-2 851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATTAGGTAATGAAATTTTGGCAGGTGGTGAT 900
 ETSU 658 851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATTAGGTAATGAAATTTTGGCAGGTGGTGAT 900
 ETSU T-25 851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATTAGGTAATGAAATTTTGGCAGGTGGTGAT 900
 M-12 851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATTAGGTAATGAAATTTTGGCAGGTGGTGAT 900

 ETSU C-2 901 TTTAATGCCAGATTGATGAAAACCATTCGAGAGCAAAAAGGCTACACTTA 950
 ETSU 658 901 TTTAATGCCAGATTGATGAAAACCATTCGAGAGCAAAAAGGCTACACTTA 950
 ETSU T-25 901 TTTAATGCCAGATTGATGAAAACCATTCGAGAGCAAAAAGGCTACACTTA 950
 M-12 901 TTTAATGCCAGATTGATGAAAACCATTCGAGAGCAAAAAGGCTACACTTA 950

 ETSU C-2 951 TGGCATTATGCGCGTATGGAACGCCTCAGAGCAGGTGGTAATTTATGTGG 1000
 ETSU 658 951 TGGCATTATGCGCGTATGGAACGCCTCAGAGCAGGTGGTAATTTATGTGG 1000
 ETSU T-25 951 TGGCATTATGCGCGTATGGAACGCCTCAGAGCAGGTGGTAATTTATGTGG 1000
 M-12 951 TGGCATTATGCGCGTATGGAACGCCTCAGAGCAGGTGGTAATTTATGTGG 1000

 ETSU C-2 1001 TTGAATTTCAACCGATGGCGATTAAGCAGCCGATGCCATTTTATGAGAGC 1050
 ETSU 658 1001 TTGAATTTCAACCGATGGCGATTAAGCAGCCGATGCCATTTTATGAGAGC 1050
 ETSU T-25 1001 TTGAATTTCAACCGATGGCGATTAAGCAGCCGATGCCATTTTATGAGAGC 1050
 M-12 1001 TTGAATTTCAACCGATGGCGATTAAGCAGCCGATGCCATTTTATGAGAGC 1050

 ETSU C-2 1051 CTACACATCATTAATGAGTCGCTGAATGAAGGCATAACCCAGAAGAGCT 1100
 ETSU 658 1051 CTACACATCATTAATGAGTCGCTGAATGAAGGCATAACCCAGAAGAGCT 1100
 ETSU T-25 1051 CTACACATCATTAATGAGTCGCTGAATGAAGGCATAACCCAGAAGAGCT 1100
 M-12 1051 CTACACATCATTAATGAGTCGCTGAATGAAGGCATAACCCAGAAGAGCT 1100

 ETSU C-2 1101 TGAATGGTGGCTTTGGCAATAAAAATGGTTTTGCCAATATTTTTCAA 1150
 ETSU 658 1101 TGAATGGTGGCTTTGGCAATAAAAATGGTTTTGCCAATATTTTTCAA 1150
 ETSU T-25 1101 TGAATGGTGGCTTTGGCAATAAAAATGGTTTTGCCAATATTTTTCAA 1150
 M-12 1101 TGAATGGTGGCTTTGGCAATAAAAATGGTTTTGCCAATATTTTTCAA 1150

 ETSU C-2 1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGCATTGGTGCTTTATTGTTGCCGATTAT 1200
 ETSU 658 1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGCATTGGTGCTTTATTGTTGCCGATTAT 1200
 ETSU T-25 1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGCATTGGTGCTTTATTGTTGCCGATTAT 1200
 M-12 1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGCATTGGTGCTTTATTGTTGCCGATTAT 1200

 ETSU C-2 1201 CCAAAAAGATCATCTTAACCATACGCTCAATCGCTTGGATAATGCCAGAT 1250
 ETSU 658 1201 CCAAAAAGATCATCTTAACCATACGCTCAATCGCTTGGATAATGCCAGAT 1250
 ETSU T-25 1201 CCAAAAAGATCATCTTAACCATACGCTCAATCGCTTGGATAATGCCAGAT 1250
 M-12 1201 CCAAAAAGATCATCTTAACCATACGCTCAATCGCTTGGATAATGCCAGAT 1250

 ETSU C-2 1251 AAATAGTGTAAATACCGCACTGAACTTGGGTATCAAGCCTGATGAATTT 1299
 ETSU 658 1251 AAATAGTGTAAATACCGCACTGAACTTGGGTATCAAGCCTGATGAATTT 1299
 ETSU T-25 1251 AAATAGTGTAAATACCGCACTGAACTTGGGTATCAAGCCTGATGAATTT 1299
 M-12 1251 AAATAGTGTAAATACCGCACTGAACTTGGGTATCAAGCCTGATGAATTT 1299

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

8/8

Figure 16

```

ETSU C-2 1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFQTNNNGVSVAPTPHHELPIVDI 50
ETSU 658 1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFQTNNNGVSVAPTPHHELPIVDI 50
ETSU T-25 1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFQTNNNGVSVAPTPHHELPIVDI 50
M-12 1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFQTNNNGVSVAPTPHHELPIVDI 50
*****

ETSU C-2 51 SLVFNAGSAYDHQVKGSGTANMVAATMLTQGTDSLSEDFVAAKERLGIDF 100
ETSU 658 51 SLVFNAGSAYDHQVKGSGTANMVAATMLTQGTDSLSEDFVAAKERLGIDF 100
ETSU T-25 51 SLVFNAGSAYDHQVKGSGTANMVAATMLTQGTDSLSEDFVAAKERLGIDF 100
M-12 51 SLVFNAGSAYDHQVKGSGTANMVAATMLTQGTDSLSEDFVAAKERLGIDF 100
*****

ETSU C-2 101 TSTANKDNLTLSRLSDQSLNQAADLMVDAVTPQAFDDKTLQRNKNQL 150
ETSU 658 101 TSTANKDNLTLSRLSDQSLNQAADLMVDAVTPQAFDDKTLQRNKNQL 150
ETSU T-25 101 TSTANKDNLTLSRLSDQSLNQAADLMVDAVTPQAFDDKTLQRNKNQL 150
M-12 101 TSTANKDNLTLSRLSDQSLNQAADLMVDAVTPQAFDDKTLQRNKNQL 150
*****

ETSU C-2 151 ITSLKQKQKQNPYHVASVAYHQAVYENHPYAHATTGDEDSIAKIDRDELLN 200
ETSU 658 151 ITSLKQKQKQNPYHVASVAYHQAVYENHPYAHATTGDEDSIAKIDRDELLN 200
ETSU T-25 151 ITSLKQKQKQNPYHVASVAYHQAVYENHPYAHATTGDEDSIAKIDRDELLN 200
M-12 151 ITSLKQKQKQNPYHVASVAYHQAVYENHPYAHATTGDEDSIAKIDRDELLN 200
*****

ETSU C-2 201 FWHITFINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLTAKLPTGKSYKNLDTLTKP 250
ETSU 658 201 FWHITFINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLTAKLPTGKSYKNLDTLTKP 250
ETSU T-25 201 FWHITFINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLTAKLPTGKSYKNLDTLTKP 250
M-12 201 FWHITFINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLTAKLPTGKSYKNLDTLTKP 250
*****

ETSU C-2 251 VKARHIIHPHNSSTQIILIGHPTSKVRTDKAGRQEFSDFLGNEILAGGD 300
ETSU 658 251 VKARHIIHPHNSSTQIILIGHPTSKVRTDKAGRQEFSDFLGNEILAGGD 300
ETSU T-25 251 VKARHIIHPHNSSTQIILIGHPTSKVRTDKAGRQEFSDFLGNEILAGGD 300
M-12 251 VKARHIIHPHNSSTQIILIGHPTSKVRTDKAGRQEFSDFLGNEILAGGD 300
*****

ETSU C-2 301 FNARLMKTIREQKGYTYGIYGGMERLRAGGNYVVEFSTDGDKAADAILET 350
ETSU 658 301 FNARLMKTIREQKGYTYGIYGGMERLRAGGNYVVEFSTDGDKAADAILET 350
ETSU T-25 301 FNARLMKTIREQKGYTYGIYGGMERLRAGGNYVVEFSTDGDKAADAILET 350
M-12 301 FNARLMKTIREQKGYTYGIYGGMERLRAGGNYVVEFSTDGDKAADAILET 350
*****

ETSU C-2 351 LHIINESLNEGITQEELELVRLGNKNGFANIFSSNASIHRVIGALFVADY 400
ETSU 658 351 LHIINESLNEGITQEELELVRLGNKNGFANIFSSNASIHRVIGALFVADY 400
ETSU T-25 351 LHIINESLNEGITQEELELVRLGNKNGFANIFSSNASIHRVIGALFVADY 400
M-12 351 LHIINESLNEGITQEELELVRLGNKNGFANIFSSNASIHRVIGALFVADY 400
*****

ETSU C-2 401 PRDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRKPDDEF 433
ETSU 658 401 PRDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRKPDDEF 433
ETSU T-25 401 PRDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRKPDDEF 433
M-12 401 PRDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRKPDDEF 433
*****

```

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

SEQUENCE LISTING

<110> Shire Biochem Inc.
 <120> Moraxella (Branhamella) Catarrhalis Antigens
 <130> 74872-83
 <150> US 60/290,653
 <151> 2001-05-15
 <160> 30
 <170> PatentIn version 3.0

 <210> 1
 <211> 1467
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis

 <400> 1
 atggacactg acatgaaaca ttttaacaaa catcgccat cagctgccat cattggcggt 60
 ttattattca ttagcccatc agtgcaagca aatcgcacac accatcacac gctaaccagt 120
 agcaggetta aacttgctga tgatagtatt attgatagta tcaatcaatt gggtgagctg 180
 accgtcaata ttccaaatac acaatatttt caaaccaaca acggtgtgag cgttgctttt 240
 acgccattac atgagctgcc tattgtcgat atcagcttgt attttaatgc agggtcagcg 300
 tatgaccatc aggttgcaaa atcaggcaag gctaacatgg ttgoaacat gctcacccaa 360
 ggaactgaca gcctttctga agatgagttt gttgctgcca aagagcgtct tggcattgat 420
 tttaccagta cagcaaataa ggataactta actttatcat taagaagctt gtctgatcaa 480
 tcattattaa atcaagccgc cgatttaatg gtcgatgctg tcaactcaacc tgcttttgat 540
 gataagactc tacaacgcaa caaaaatcag ctcatcacca gtttaaaaca aaaaaagcaa 600
 aacccttacc atgtagcttc tgttgcttat catcaagccg tatatgaaaa tcatccttat 660
 gcacacgcaa ccacaggcga tgaagatagt attgccaaaa ttgatcgtga tgagctgctt 720
 aatttttggc atacttttat taatgcaaat aatgcgacac tgggtgattac aggtgatatg 780
 accgcgagc aagccaatc acttgccaac catctgaccg ccaaatcacc gacaggcaag 840
 tctgataaaa atacgctgga tttgacaaaa ccagttaagg ctcgctatat ccatattcct 900
 cacaacagta gtcaaaccca aatcatcacc ggtcatccca ccagtaaagt acgcaaggac 960
 aaagcaggtc gtcaagagtt cagcgatttt tcattaggta atgaaatttt ggcaggtggt 1020
 gattttaatg ccagattgat gaaaaccatt cgagagcaaa aaggetacac ttatggcatt 1080
 tatggcggtta tggaaagcct cagagcaggt ggtaattatg tggttgaatt ttcaaccgat 1140
 ggcgataaag cagccgatgc ctttttagag acgctacaca tcattaatga gtcgctgaat 1200
 gaaggcataa cccaagaaga gcttgagttg gtgcggtttg gcaataaaaa tggttttgct 1260

WO 02/092625 PCT/CA02/00706
 aatattttt caagcaatgc cagtattcat cgtgtcattg gtgctttatt tgitgccgat 1320
 tatccaaaag atcatcttaa ceatacgttc aatcgcttgg ataatgccac gataaatagt 1380
 gttaataccg cactgaactt gcgtatcaag cctgatgaat ttatcatcat caccgtgggt 1440
 aaaactaagc caaatttga caaataa 1467

<210> 2
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Moraxella catarrhalis

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

WO 02/092625 PCT/CA02/00706

Thr Gly Asp Met Thr Ala Glu Gln Ala Lys Ser Leu Ala Asn His Leu
260 265 270

Thr Ala Lys Leu Pro Thr Gly Lys Ser Tyr Lys Asn Thr Leu Asp Leu
275 280 285

Thr Lys Pro Val Lys Ala Arg His Ile His Ile Pro His Asn Ser Ser
290 295 300

Gln Thr Gln Ile Ile Ile Gly His Pro Thr Ser Lys Val Arg Thr Asp
305 310 315 320

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

Leu Ala Gly Gly Asp Phe Asn Ala Arg Leu Met Lys Thr Ile Arg Glu
340 345 350

Gln Lys Gly Tyr Thr Tyr Gly Ile Tyr Gly Gly Met Glu Arg Leu Arg
355 360 365

Ala Gly Gly Asn Tyr Val Val Glu Phe Ser Thr Asp Gly Asp Lys Ala
370 375 380

Ala Asp Ala Ile Leu Glu Thr Leu His Ile Ile Asn Glu Ser Leu Asn
385 390 395 400

Glu Gly Ile Thr Gln Glu Glu Leu Glu Leu Val Arg Leu Gly Asn Lys
405 410 415

Asn Gly Phe Ala Asn Ile Phe Ser Ser Asn Ala Ser Ile His Arg Val
420 425 430

Ile Gly Ala Leu Phe Val Ala Asp Tyr Pro Lys Asp His Leu Asn His
435 440 445

Thr Leu Asn Arg Leu Asp Asn Ala Thr Ile Asn Ser Val Asn Thr Ala
450 455 460

Leu Asn Leu Arg Ile Lys Pro Asp Glu Phe Ile Ile Ile Thr Val Gly
465 470 475 480

Lys Thr Lys Pro Asn Leu Asp Lys
485

<210> 3
<211> 1299
<212> DNA
<213> Moraxella catarrhalis

<400> 3
gagcttaaac ttgctgatga tagtattatt gatagtatca atcaattggg tgagctgacc 60
gtcaatattc caaatacaca atattttcaa accaacaacg gtgtgagcgt tgcttttaag 120
ccattacatg agctgacctat tgcgataac agcttgatt ttaatgcagg gtcagcgtat 180
gaccatcagg ttggcaaatc aggcacggct aacatgggtg caaccatgct cacccaagga 240
actgacagcc ttctgaaga tgagtttggg gctgccaag agcgtcttgg cattgatttt 300
accagtacag caaataagga taacttaact ttatcattaa gaagcttgtc tgatcaatca 360

WO 02/092625 PCT/CA02/00706
 ttattaaatc aagccgcca tttaatggc gatgctgca ctcaacctgc ttttgatgat 420
 aagactctac aagcaacaa aatcagctc atcaccagt taaaacaaa aaagcaaac 480
 ccttatcatg tagcttctgt tgcttatcat caagccgtat atgaaaatca tccttatgca 540
 cacgcaacca caggcgatga agatagtatt gccaaaattg atcgtgatga gctgcttaat 600
 ttttggcata cttttattaa tgcaaaatgt ggcacactgg tgattacagg tgatatgacc 660
 gccgagcaag ccaaatcaat tgccaacat ctgaccgcca aattaccgac aggcaagtgc 720
 tataaaaata cgctggattt gacaaaacca gtaaggctc gccatatcca tattctccac 780
 aacagtagtc aaacccaaat catcatcggc caccaccca gtaaagtacg cacggacaaa 840
 gcaggtcgtc aagagttcag cgatttttca ttaggtaatg aaattttggc agtggtgat 900
 ttaatgcca gattgatgaa aaccattcga gagcaaaaag gctacactta tggcatttat 960
 ggcggtatgg aacgcctcag agcaggtggc aattatgtgg ttgaattttc aaccgatggc 1020
 gataaagcag ccgatgccat ttagagacg ctacacatca ttaatgagtc gctgaatgaa 1080
 ggcataaccg aagaagagct tgaattggcg cgtttgggta ataaaaatgg ttttgccaat 1140
 attttttcaa gcaatgccag tattcatcgt gtcattggcg ctttatttgt tgccgattat 1200
 ccaaaagatc atctaacca tacgctcaat cgcttgata atgccacag aaatagtgtt 1260
 aataccgcac tgaacttgcg tatcaagcct gatgaattt 1299

<210> 4
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Moraxella catarrhalis

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

WO 02/092625 PCT/CA02/00706

Met Val Asp Ala Val Thr Gln Pro Ala Phe Asp Asp Lys Thr Leu Gln
130 135 140

Arg Asn Lys Asn Gln Leu Ile Thr Ser Leu Lys Gln Lys Lys Gln Asn
145 150 155 160

Pro Tyr His Val Ala Ser Val Ala Tyr His Gln Ala Val Tyr Glu Asn
165 170 175

His Pro Tyr Ala His Ala Thr Thr Gly Asp Glu Asp Ser Ile Ala Lys
180 185 190

Ile Asp Arg Asp Glu Leu Leu Asn Phe Trp His Thr Phe Ile Asn Ala
195 200 205

Asn Asn Ala Thr Leu Val Ile Thr Gly Asp Met Thr Ala Glu Gln Ala
210 215 220

Lys Ser Leu Ala Asn His Leu Thr Ala Lys Leu Pro Thr Gly Lys Ser
225 230 235 240

Tyr Lys Asn Thr Leu Asp Leu Thr Lys Pro Val Lys Ala Arg His Ile
245 250 255

His Ile Pro His Asn Ser Ser Gln Thr Gln Ile Ile Ile Gly His Pro
260 265 270

Thr Ser Lys Val Arg Thr Asp Lys Ala Gly Arg Gln Glu Phe Ser Asp
275 280 285

Phe Ser Leu Gly Asn Glu Ile Leu Ala Gly Gly Asp Phe Asn Ala Arg
290 295 300

Leu Met Lys Thr Ile Arg Glu Gln Lys Gly Tyr Thr Tyr Gly Ile Tyr
305 310 315 320

Gly Gly Met Glu Arg Leu Arg Ala Gly Gly Asn Tyr Val Val Glu Phe
325 330 335

Ser Thr Asp Gly Asp Lys Ala Ala Asp Ala Ile Leu Glu Thr Leu His
340 345 350

Ile Ile Asn Glu Ser Leu Asn Glu Gly Ile Thr Gln Glu Glu Leu Glu
355 360 365

Leu Val Arg Leu Gly Asn Lys Asn Gly Phe Ala Asn Ile Phe Ser Ser
370 375 380

Asn Ala Ser Ile His Arg Val Ile Gly Ala Leu Phe Val Ala Asp Tyr
385 390 395 400

Pro Lys Asp His Leu Asn His Thr Leu Asn Arg Leu Asp Asn Ala Thr
405 410 415

Ile Asn Ser Val Asn Thr Ala Leu Asn Leu Arg Ile Lys Pro Asp Glu
420 425 430

Phe

<210> 5
<211> 1299

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

```

<400> 5
gagcctaaac ttgctgatga tagtattatt gatagatca atcaattggg tgagctgacc 60
gtcaatatto caaatacaca atattttcaa accaacaacg gtgtgagcgt tgcttttaacg 120
ccattacatg agctgcctat tgcgatatc agcttgattt ttaatgcagg gtcagcgtat 180
gaccatcagg ttggcaaatc aggcacggct aacatggttg caaccatgct cacccaagga 240
actgacagcc ttctgaaaga tgagtttgtt gctgccaag agcgtcttgg cattgatttt 300
accagtacag caaataagga taacttaact ttatcattaa gaagcttgtc tgcacatca 360
ttattaaatc aagccgccga ttaatggtc gatgctgca ctcaacctgc ttttgatgat 420
aagactctac aagccaacaa aatcagctc atcaccagtt taaaacaaaa aaagcaaac 480
ccttatcatg tagcttctgt tgcttatcat caagccgtat atgaaaaaca tccttatgca 540
cacgcaacca caggcgatga agatagtatt gccaaaattg atcgtgatga gctgettaat 600
ttttggcata cttttattaa tgcaataat gcgacactgg tgattacagg tgatagacc 660
gccgagcaag ccaaatcact tgccaacctc ctgaccgccca aattaccgac aggcaagtct 720
tataaaaaa cgtggattt gacaaaacca gttaaggctc gccatatcca tattcctcac 780
aacagtagtc aaacccaat catcatcggc caccaccaca gtaaagtacg cacggacaaa 840
gcaggtcctg aagagttcag cgatttttca ttaggtaatg aaattttggc aggtggtgat 900
tttaatgcca gattgatgaa aaccattcga gagcaaaaag gctacactta tggcatttat 960
ggcggtatgg aacgcctcag agcaggtggt aattatgtgg ttgaatttcc aaccgatggc 1020
gataaagcag ccgatgccat tttagagacg ctacacatca ttaatgagtc gctgaatgaa 1080
ggcataaacc aagaagagct tgagttggtg cgtttgggca ataaaaatgg ttttgccaat 1140
atttttcaa gcaatgccag tattcatcgt gtcattgggt cttttattgt tgccgattat 1200
ccaaaagatc atcttaacca tacgctcaat cgtttggata atgccacgat aaatagtgtt 1260
aataccgcac tgaacttgcg tatcaagcct gatgaattt 1299

```

<210> 6

<211> 433

<212> PRT

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 6

```

Glu Leu Lys Leu Ala Asp Asp Ser Ile Ile Asp Ser Ile Asn Gln Leu
1 5 10 15
Gly Glu Leu Thr Val Asn Ile Pro Asn Thr Gln Tyr Phe Gln Thr Asn
20 25 30
Asn Gly Val Ser Val Ala Phe Thr Pro Leu His Glu Leu Pro Ile Val
35 40 45

```

WO 02/092625 PCT/CA02/00706
 Asp Ile Ser Leu Tyr Phe Asn Ala Gly Ser Ala Tyr Asp His Gln Val
 50 55 60
 Gly Lys Ser Gly Thr Ala Asn Met Val Ala Thr Met Leu Thr Gln Gly
 65 70 75
 Thr Asp Ser Leu Ser Glu Asp Glu Phe Val Ala Ala Lys Glu Arg Leu
 85 90 95
 Gly Ile Asp Phe Thr Ser Thr Ala Asn Lys Asp Asn Leu Thr Leu Ser
 100 105 110
 Leu Arg Ser Leu Ser Asp Gln Ser Leu Leu Asn Gln Ala Ala Asp Leu
 115 120 125
 Met Val Asp Ala Val Thr Gln Pro Ala Phe Asp Asp Lys Thr Leu Gln
 130 135 140
 Arg Asn Lys Asn Gln Leu Ile Thr Ser Leu Lys Gln Lys Lys Gln Asn
 145 150 155
 Pro Tyr His Val Ala Ser Val Ala Tyr His Gln Ala Val Tyr Glu Asn
 165 170 175
 His Pro Tyr Ala His Ala Thr Thr Gly Asp Glu Asp Ser Ile Ala Lys
 180 185 190
 Ile Asp Arg Asp Glu Leu Leu Asn Phe Trp His Thr Phe Ile Asn Ala
 195 200 205
 Asn Asn Ala Thr Leu Val Ile Thr Gly Asp Met Thr Ala Glu Gln Ala
 210 215 220
 Lys Ser Leu Ala Asn His Leu Thr Ala Lys Leu Pro Thr Gly Lys Ser
 225 230 235 240
 Tyr Lys Asn Thr Leu Asp Leu Thr Lys Pro Val Lys Ala Arg His Ile
 245 250 255
 His Ile Pro His Asn Ser Ser Gln Thr Gln Ile Ile Ile Gly His Pro
 260 265 270
 Thr Ser Lys Val Arg Thr Asp Lys Ala Gly Arg Gln Glu Phe Ser Asp
 275 280 285
 Phe Ser Leu Gly Asn Glu Ile Leu Ala Gly Gly Asp Phe Asn Ala Arg
 290 295 300
 Leu Met Lys Thr Ile Arg Glu Gln Lys Gly Tyr Thr Tyr Gly Ile Tyr
 305 310 315 320
 Gly Gly Met Glu Arg Leu Arg Ala Gly Gly Asn Tyr Val Val Glu Phe
 325 330 335
 Ser Thr Asp Gly Asp Lys Ala Ala Asp Ala Ile Leu Glu Thr Leu His
 340 345 350
 Ile Ile Asn Glu Ser Leu Asn Glu Gly Ile Thr Gln Glu Glu Leu Glu
 355 360 365
 Leu Val Arg Leu Gly Asn Lys Asn Gly Phe Ala Asn Ile Phe Ser Ser
 370 375 380

WO 02/092625 PCT/CA02/00706
 Asn Ala Ser Ile His Arg Val Ile Gly Ala Leu Phe Val Ala Asp Tyr
 385 390 395 400
 Pro Lys Asp His Leu Asn His Thr Leu Asn Arg Leu Asp Asn Ala Thr
 405 410 415
 Ile Asn Ser Val Asn Thr Ala Leu Asn Leu Arg Ile Lys Pro Asp Glu
 420 425 430

Phe

<210> 7
 <211> 1299
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis
 <400> 7
 gagcttaaac ttgctgatga tagtattatt gatagtatca atcaattggg tgagetgacc 60
 gtcaatattc caatacaca atattttcaa accaacaacg gtgtgagcgt tgcttttacg 120
 ccattacatg agctgcctat tgcgatatac agcttgattt ttaatgcagg gtcagcgtat 180
 gaccateagg ttggcaaatc aggcacggct aacatggttg caaccatgct cacccaagga 240
 actgacagcc ttctgaaga tgagtttgtt gctgccaagg agcgtcttgg cattgatttt 300
 accagtacag caaataagga taacttaact ttatcattaa gaagcttgtc tgatcaatca 360
 ttattaaatc aagcgcgcca tttaatggtc gatgctgtca ctcaacctgc ttttgatgat 420
 aagactctac aacgcaacaa aaatcagctc atcaccagtt taaaacaaaa aaagcaaac 480
 ctttatcatg tagcttctgt tgcctatcat caagccgtat atgaaaatca tccttatgca 540
 cagcaacca caggcgatga agatagtatt gccaaaattg atcgtgatga gctgcttaat 600
 ttttggcata cttttattaa tgcaataat gcgacactgg tgattacagg tgatagacc 660
 gccagcaag ccaateact tgccaacat ctgacggcca aattacggac aggcaagtgc 720
 tataaaata cgctggattt gacaaaacca gttaaggctc gccatatcca tattcctcac 780
 aacagtagtc aaacccaaat catcatcggt caceccaacca gtaaagtacy cacggacaaa 840
 gcaggctgct aagagttcag cgatttttca ttaggtaatg aaattttggc aggtggtgat 900
 tttaatgcca gattgatgaa aaccattcga gagcaaaaag gctacactta tggcatttat 960
 ggcggtatgg aacgcctcag agcaggtagt aattatgtgg ttgaatttc aaccgatggc 1020
 gataaagcag ccgatgccat tttagagaag ctacacatca ttaatgagtc gctgaatgaa 1080
 ggcataacc aagaagagct tgaattggtg cgtttgggta ataaaaatgg ttttgcaat 1140
 atttttcaa gcaatgccag tattcatcgt gtcattggtg ctttatttgt tgccgattat 1200
 ccaaaagacc atcttaacca tacgctcaat cgcttgata atgccacgat aaatagtggt 1260
 aataccgcac tgaacttgcg tatcaagcct gatgaattt 1299

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

```

<210> 8
<211> 433
<212> PRT
<213> Moraxella catarrhalis

<400> 8
Glu Leu Lys Leu Ala Asp Asp Ser Ile Ile Asp Ser Ile Asn Gln Leu
1 5 10
Gly Glu Leu Thr Val Asn Ile Pro Asn Thr Gln Tyr Phe Gln Thr Asn
20 25
Asn Gly Val Ser Val Ala Phe Thr Pro Leu His Glu Leu Pro Ile Val
35 40 45
Asp Ile Ser Leu Tyr Phe Asn Ala Gly Ser Ala Tyr Asp His Gln Val
50 55 60
Gly Lys Ser Gly Thr Ala Asn Met Val Ala Thr Met Leu Thr Gln Gly
65 70 75 80
Thr Asp Ser Leu Ser Glu Asp Glu Phe Val Ala Ala Lys Glu Arg Leu
85 90 95
Gly Ile Asp Phe Thr Ser Thr Ala Asn Lys Asp Asn Leu Thr Leu Ser
100 105 110
Leu Arg Ser Leu Ser Asp Gln Ser Leu Leu Asn Gln Ala Ala Asp Leu
115 120 125
Met Val Asp Ala Val Thr Gln Pro Ala Phe Asp Asp Lys Thr Leu Gln
130 135 140
Arg Asn Lys Asn Gln Leu Ile Thr Ser Leu Lys Gln Lys Lys Gln Asn
145 150 155 160
Pro Tyr His Val Ala Ser Val Ala Tyr His Gln Ala Val Tyr Glu Asn
165 170 175
His Pro Tyr Ala His Ala Thr Thr Gly Asp Glu Asp Ser Ile Ala Lys
180 185 190
Ile Asp Arg Asp Glu Leu Leu Asn Phe Trp His Thr Phe Ile Asn Ala
195 200 205
Asn Asn Ala Thr Leu Val Ile Thr Gly Asp Met Thr Ala Glu Gln Ala
210 215 220
Lys Ser Leu Ala Asn His Leu Thr Ala Lys Leu Pro Thr Gly Lys Ser
225 230 235 240
Tyr Lys Asn Thr Leu Asp Leu Thr Lys Pro Val Lys Ala Arg His Ile
245 250 255
His Ile Pro His Asn Ser Ser Gln Thr Gln Ile Ile Ile Gly His Pro
260 265 270
Thr Ser Lys Val Arg Thr Asp Lys Ala Gly Arg Gln Glu Phe Ser Asp
275 280 285
Phe Ser Leu Gly Asn Glu Ile Leu Ala Gly Gly Asp Phe Asn Ala Arg
290 295 300

```

WO 02/092625 PCT/CA02/00706
 Leu Met Lys Thr Ile Arg Glu Gln Lys Gly Tyr Thr Tyr Gly Ile Tyr
 305 310 315 320
 Gly Gly Met Glu Arg Leu Arg Ala Gly Gly Asn Tyr Val Val Glu Phe
 325 330 335
 Ser Thr Asp Gly Asp Lys Ala Ala Asp Ala Ile Leu Glu Thr Leu His
 340 345 350
 Ile Ile Asn Glu Ser Leu Asn Glu Gly Ile Thr Gln Glu Glu Leu Glu
 355 360 365
 Leu Val Arg Leu Gly Asn Lys Asn Gly Phe Ala Asn Ile Phe Ser Ser
 370 375 380
 Asn Ala Ser Ile His Arg Val Ile Gly Ala Leu Phe Val Ala Asp Tyr
 385 390 395 400
 Pro Lys Asp His Leu Asn His Thr Leu Asn Arg Leu Asp Asn Ala Thr
 405 410 415
 Ile Asn Ser Val Asn Thr Ala Leu Asn Leu Arg Ile Lys Pro Asp Glu
 420 425 430
 Phe

<210> 9
 <211> 1656
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis

<400> 9
 atgagcttaa ttaataaatt aaatgaacgc attacgccgc atgtcttaac ttcgattaaa 60
 aatcaagatg gcgataatgc tgataaatct aatttgtaa ccgcatttta taccattttt 120
 gcaggacgct tgagtaatga agatgtgtat cagcgtgcca atgctttgcc tgataatgag 180
 cttgagcatg gccatcatct gctcaatggt gcttttagtg atgtttcaac tggatgaagat 240
 cagattgctt ctttgagtaa tcaattagcc gatgaatgc atgtttcgcc agtaaccgca 300
 cgcaccgcaa tcgcaacggc agcacctttg gctttggcac gcattaaaga gcaagcaggt 360
 gcattatctg taccgtcttt tattcgtact caattggcta aagaagaaaa ccgtttgcca 420
 acttggcgcc atactttatt gccagcaggc ctatttgcaa ccgctgccac aaccaccgcc 480
 gagcctgtaa cgacagcctc tgctgtgtg aaagagcctg tcaaaccaag tgttgtgaca 540
 gaaccagttc atccagctgc ggctaccacc ccagtcaaaa caccaactgc ccagcattac 600
 gaaaacaaag aaaaaagtcc ttttctaaaa acgattctac cgattattgg attgattatt 660
 tttgcaggct tggcatggct tttgtaaga gcatgtcaag acaaaccaac acctgttgcg 720
 gcacctgttg cgacagatac agcacctgtg gtacgggata atgctgtaca ggcagaccca 780
 acacaaacag gtgttgccca agcaoctgca acgcttagct tgcctgttga tgaacgggt 840
 caagcgttgt actcgcaccg tgctcagggt gtagtgaag agcttgcaag toatatccgt 900
 gcagctattg ctcaagtctt tggcgtacaa gatttaacca tcaaaatac caatgtacat 960

WO 02/092625 PCT/CA02/00706
accgctacga tgcagcggc agaatactta ccagcaattt tgggtttgat gaaaggtgta 1020
ccaaattcaa gcgttgatgat tcatgatcat acggtacgct ttaatgcaac cagccagaa 1080
gatgtagcaa aactggtaga ggggtctaaa aatattctac ccgctgattt tactgtagaa 1140
gcagaacctg aacttgatat taatactgcg gttgccgata gtattgaaac agcgcgtggt 1200
gctattgttg ctttgggtga tacggttgaa gaaatgaga tggatatttt aatcaatgca 1260
ttaaataccc aatcattaa ctttcttta gactcaaccg aaattcccca agaaaataaa 1320
gaaatcttgg atttggctgc cgaataatta aagcagtgcc ctgaacaac tttgcgtatc 1380
attggtcata cagacactca aggcacacat gactataatc aagatttacc agaattctgt 1440
gctgctgctg ttaaagagta tttggtatca aaaggtgttg ctgctgaacg cttgaacact 1500
caaggtgcaa gttttgatta tccagttgca tcaaatgcta ccgaacaagg tctgttccaa 1560
aacctgctga ttgagtttgt acctttccaa gaaggtgaag caattactca agtcggtcat 1620
gctgaagatg caccacacc tgttgacaaa aactga 1656

<210> 10
<211> 551
<212> PRT
<213> Moraxella catarrhalis

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

WO 02/092625 PCT/CA02/00706

Ser Val Val Thr Glu Pro Val His Pro Ala Ala Ala Thr Thr Pro Val
180 185 190

Lys Thr Pro Thr Ala Gln His Tyr Glu Asn Lys Glu Lys Ser Pro Phe
195 200 205

Leu Lys Thr Ile Leu Pro Ile Ile Gly Leu Ile Ile Phe Ala Gly Leu
210 215 220

Ala Trp Leu Leu Leu Arg Ala Cys Gln Asp Lys Pro Thr Pro Val Ala
225 230 235 240

Ala Pro Val Ala Thr Asp Thr Ala Pro Val Val Ala Asp Asn Ala Val
245 250 255

Gln Ala Asp Pro Thr Gln Thr Gly Val Ala Gln Ala Pro Ala Thr Leu
260 265 270

Ser Leu Ser Val Asp Glu Thr Gly Gln Ala Leu Tyr Ser His Arg Ala
275 280 285

Gln Val Gly Ser Glu Glu Leu Ala Gly His Ile Arg Ala Ala Ile Ala
290 295 300

Gln Val Phe Gly Val Gln Asp Leu Thr Ile Gln Asn Thr Asn Val His
305 310 315 320

Thr Ala Thr Met Pro Ala Ala Glu Tyr Leu Pro Ala Ile Leu Gly Leu
325 330 335

Met Lys Gly Val Pro Asn Ser Ser Val Val Ile His Asp His Thr Val
340 345 350

Arg Phe Asn Ala Thr Thr Pro Glu Asp Val Ala Lys Leu Val Glu Gly
355 360 365

Ala Lys Asn Ile Leu Pro Ala Asp Phe Thr Val Glu Ala Glu Pro Glu
370 375 380

Leu Asp Ile Asn Thr Ala Val Ala Asp Ser Ile Glu Thr Ala Arg Val
385 390 395 400

Ala Ile Val Ala Leu Gly Asp Thr Val Glu Glu Asn Glu Met Asp Ile
405 410 415

Leu Ile Asn Ala Leu Asn Thr Gln Ile Ile Asn Phe Ala Leu Asp Ser
420 425 430

Thr Glu Ile Pro Gln Glu Asn Lys Glu Ile Leu Asp Leu Ala Ala Glu
435 440 445

Lys Leu Lys Ala Val Pro Glu Thr Thr Leu Arg Ile Ile Gly His Thr
450 455 460

Asp Thr Gln Gly Thr His Glu Tyr Asn Gln Asp Leu Ser Glu Ser Arg
465 470 475 480

Ala Ala Ala Val Lys Glu Tyr Leu Val Ser Lys Gly Val Ala Ala Glu
485 490 495

Arg Leu Asn Thr Gln Gly Ala Ser Phe Asp Tyr Pro Val Ala Ser Asn
500 505 510

WO 02/092625 PCT/CA02/00706
 Ala Thr Glu Gln Gly Arg Phe Gln Asn Arg Arg Ile Glu Phe Val Leu
 515 520 525
 Phe Gln Glu Gly Glu Ala Ile Thr Gln Val Gly His Ala Glu Asp Ala
 530 535 540
 Pro Thr Pro Val Ala Gln Asn
 545 550

<210> 11
 <211> 1251
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis

<400> 11
 atggatacaa aacacattca gcaaaattgg cttctacctg atggtgtggc tgatgtacta 60
 tttaccgatg ctcaaaaaa agaaagcctg cgtgatgctt tgctatttgt gctaaaccga 120
 caaggttacc gcttgggtgc accaccatta atagagtata cggaaagtct gctaaataat 180
 gctgacgaag atctaaaaag ccaactttc aaatttatcg atcagctcaa tggctgtttg 240
 atgggtttgc gtgccgatat tacgccacaa attctacgca ttgatagcaa atatggtcaa 300
 ggcacacagc gttactgtta tgttgggcaa gttgtcaaaa cctaccgac tggctctgtt 360
 gggctgcgta caccgcttca attgggtgct gagatttttg ggatagatga tatccgtgce 420
 gagcttgagc tgattgatct attggcgca ttggcagatg agatcggact aggcgagag 480
 atgtacatg tggatattgg tcatgtcgct atttttgatc gcttgtgtca gttgcatggc 540
 gtttcaata aagatgctga tgagctgatt ggcatttacc ataaaaagc catgccagaa 600
 cttgccaaat ggtgccaaaa tattggcaat agcctaaaca gcccaagcga tgcaaccgat 660
 tttttggtat tggctaagca tacattaagc agtgatcgga caccaaatgc cgaggcttta 720
 ttaagtaaac tgtccgataa agctcgccaa gataataaaa tcatccaagc ggcaaatgag 780
 cttgctactt tggcggcaca taccagagcg gtgggtatga gtgtgagat tgatgtgact 840
 gaattgtcag gatatcatta tcatctggt gtggtattta atgtctattt gggtaataga 900
 accacacaga ctcaagcttt ggtacgagcg ggtcgctttg atggtatctc aactcacagc 960
 gtgcaagggt gcgcaactgg ttttagcatg gatattaatc gtttgcttga attgttagag 1020
 cttgaagaag atactgtgat tttggtggat taccagatt tgcaaaatgc tgatgcagac 1080
 acaaaagctg atttggccac acaattaaa accttgcaat ctgaaagctg tattgtcatt 1140
 aagcctttga ctgtagatga taagcctaac cagattgatg gtgttttgca ttgggacacc 1200
 gatcaagata agccgatttg ggcggtgcga ttagtgtgtg atgagtacta a 1251

<210> 12
 <211> 416
 <212> PRT
 <213> Moraxella catarrhalis

WO 02/092625

PCT/CA02/00706

```

<400> 12
Met Asp Thr Lys His Ile Gln Gln Asn Trp Leu Leu Pro Asp Gly Val
1 5 10 15
Ala Asp Val Leu Phe Thr Asp Ala Gln Lys Gln Glu Ser Leu Arg Asp
20 25 30
Ala Leu Leu Phe Val Leu Thr Ala His Gly Tyr Arg Leu Val Ser Pro
35 40 45
Pro Leu Ile Glu Tyr Thr Glu Ser Leu Leu Asn Asn Ala Asp Glu Asp
50 55 60
Leu Lys Arg Gln Thr Phe Lys Phe Ile Asp Gln Leu Asn Gly Arg Leu
65 70 75 80
Met Gly Leu Arg Ala Asp Ile Thr Pro Gln Ile Leu Arg Ile Asp Ser
85 90 95
Lys Tyr Gly Gln Gly Ile Ser Arg Tyr Cys Tyr Val Gly Gln Val Val
100 105 110
Lys Thr Leu Pro Thr Gly Leu Phe Gly Leu Arg Thr Pro Leu Gln Leu
115 120 125
Gly Ala Glu Ile Phe Gly Ile Asp Asp Ile Arg Ala Glu Leu Glu Leu
130 135 140
Ile Asp Leu Leu Ala Ala Leu Ala Asp Glu Ile Gly Leu Gly Arg Glu
145 150 155 160
Met Leu His Val Asp Ile Gly His Val Ala Ile Phe Asp Arg Leu Cys
165 170 175
Gln Leu His Gly Val Ser Asn Lys Asp Ala Asp Glu Leu Ile Gly Ile
180 185 190
Tyr His Lys Lys Ala Met Pro Glu Leu Ala Lys Trp Cys Gln Asn Ile
195 200 205
Gly Asn Ser Leu Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Asp Phe Leu Val Leu
210 215 220
Ala Lys His Thr Leu Ser Ser Asp Arg Thr Pro Asn Ala Glu Ala Leu
225 230 235 240
Leu Ser Lys Leu Ser Asp Lys Ala Arg Gln Asp Asn Lys Ile Ile Gln
245 250 255
Ala Ala Asn Glu Leu Ala Thr Leu Ala Ala His Ile Arg Ala Val Gly
260 265 270
Met Ser Val Ser Ile Asp Val Thr Glu Leu Ser Gly Tyr His Tyr His
275 280 285
Thr Gly Val Val Phe Asn Val Tyr Leu Gly Asn Arg Thr Thr Gln Thr
290 295 300
Gln Ala Leu Val Arg Gly Gly Arg Phe Asp Gly Ile Ser Thr His Ser
305 310 315 320
Val Ala Arg Gly Ala Thr Gly Phe Ser Met Asp Ile Asn Arg Leu Leu
325 330 335

```

WO 02/092625 PCT/CA02/00706
 Glu Phe Val Glu Leu Glu Glu Asp Thr Val Ile Leu Val Asp Tyr His
 340 345 350
 Asp Leu Gln Asn Ala Asp Ala Asp Thr Lys Ala Asp Leu Ala Thr Gln
 355 360 365
 Ile Lys Thr Leu Gln Ser Glu Gly Cys Ile Val Ile Lys Pro Leu Thr
 370 375 380
 Val Asp Asp Lys Pro Asn Gln Ile Asp Gly Val Leu His Trp Asp Thr
 385 390 395 400
 Asp Gln Asp Lys Pro Ile Trp Ala Val Arg Leu Val Gly Asp Glu Tyr
 405 410 415

<210> 13
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis
 <400> 13
 atgaataatt ttgtgatca gctacaaagt ttttggatg agcttaatca ggccaatcgt 60
 cataccattg ctcaatcacc caaatatata cagctgacgg tacttggttt gatcgtgatg 120
 atcattggca ttttggctg gctacttgcg attttaccaa coattcaaaa gcttaatgca 180
 gcccaagtc aagaatctgc cttaatgat gaatttgcca ctaaataatca taaagcccag 240
 cagtttgacc atctaagcca tcaggtcata caaaaaata cacaaattga aatcagctc 300
 aatgctctgc cacycacagc accgatgagc gagattatcg gaatgataaa taccaaagca 360
 caagcggtta atgtgcaggt ggtgagtga tcagttcaag caggtcgtga acaggattat 420
 tataccgaac gccctatcgc agtgagtgcg acaggggatt atcatgcttt ggtcgtatgg 480
 ttacttgagt tgtcagagcc taaccatttg ctgacagtgc atgatttga tctgaaggct 540
 ggtttgaacc atcagctgat gatgattgct cagatgaaaa cttatcaage aaacaaacgc 600
 ccaaaaccag ttgctcagca ggtgcctgat gttcaatga 639

<210> 14
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Moraxella catarrhalis
 <400> 14
 Met Asn Asn Phe Val Tyr Gln Leu Gln Ser Phe Trp Tyr Glu Leu Asn
 1 5 10 15
 Gln Val Asn Arg His Thr Ile Ala Gln Ser Pro Lys Tyr Ile Gln Leu
 20 25 30
 Thr Val Leu Gly Leu Ile Val Met Ile Ile Gly Ile Phe Gly Trp Leu
 35 40 45
 Leu Ala Ile Leu Pro Thr Ile Gln Lys Leu Asn Ala Ala Gln Ser Gln
 50 55 60

WO 02/092625 PCT/CA02/00706

Glu Ser Ala Leu Ile Asp Glu Phe Ala Thr Lys Tyr His Lys Ala Gln
65 70 75 80

Gln Phe Asp His Leu Ser His Gln Val Ile Gln Lys Asn Thr Gln Leu
85 90 95

Glu Asn Gln Leu Asn Ala Leu Pro Arg Thr Ala Pro Met Ser Glu Ile
100 105 110

Ile Gly Met Ile Asn Thr Lys Ala Gln Ala Val Asn Val Gln Val Val
115 120 125

Ser Ala Ser Val Gln Ala Gly Arg Glu Gln Asp Tyr Tyr Thr Glu Arg
130 135 140

Pro Ile Ala Val Ser Ala Thr Gly Asp Tyr His Ala Leu Gly Arg Trp
145 150 155 160

Leu Leu Glu Leu Ser Glu Ala Asn His Leu Leu Thr Val His Asp Phe
165 170 175

Asp Leu Lys Ala Gly Leu Asn His Gln Leu Met Met Ile Ala Gln Met
180 185 190

Lys Thr Tyr Gln Ala Asn Lys Arg Pro Lys Pro Val Ala Gln Gln Val
195 200 205

Pro Asp Val Gln
210

<210> 15
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 15 catcagtgca tatgaatacg acacaccatc acacg 35

<210> 16
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 16 gagttattct cgagtttgc caaatttggc ttagttttac 40

<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

WO 02/092625	PCT/CA02/00706
<400> 17 tcagtggat cttgaatacg acacaccac	30
<210> 18 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> primer	
<400> 18 gatttgagtt gtcgaattat ttgtccaaat ttg	33
<210> 19 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> primer	
<400> 19 cggagtcca tatgagetta attaataaat taaatg	36
<210> 20 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> primer	
<400> 20 tataactcga ggtttgtgc aacaggtgtt g	31
<210> 21 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> primer	
<400> 21 cgcttgagat cttggaagat gtgtatcagc gtgc	34
<210> 22 <211> 37 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> primer	
<400> 22 caatacaaaa gctttcagtt ttgtgcaaca ggtgttg	37

<p>WO 02/092625</p> <p><210> 23 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial</p> <p><220> <223> primer</p> <p><400> 23 aacgcacat atgtatcgt tgggtcacc acc</p> <p><210> 24 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial</p> <p><220> <223> primer</p> <p><400> 24 ggtgactcga ggtactcgc accaactaat cgcac</p> <p><210> 25 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial</p> <p><220> <223> primer</p> <p><400> 25 gcaggatcct taccgcttg tgccacc</p> <p><210> 26 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial</p> <p><220> <223> primer</p> <p><400> 26 atcaatcggg tcgacttagt actcacc a</p> <p><210> 27 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial</p> <p><220> <223> primer</p> <p><400> 27 aaagcttcac atggccaaa gccaagaac tgcc</p> <p><210> 28 <211> 31</p>	<p>PCT/CA02/00706</p> <p>33</p> <p>35</p> <p>27</p> <p>31</p> <p>34</p>
---	---

WO 02/092625 PCT/CA02/00706

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 28
cgataactcg agttgaacat caggcacctg c 31

<210> 29
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 29
accattcaaa agagatcttg gcccaaagtc aagaatctg 39

<210> 30
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 30
gttagaccga gtgaactcat tgaacatcag gca 33

【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
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/092625 A3

(51) International Patent Classification: C12N 15/31,
15/63, C07K 14/21, 19/00, A61K 39/02, G01N 33/569

(CA), BRODEUR, Bernard, R. [CA/CA]; 2401 Marilain,
Sillery, Quebec G1T 1N6 (CA). RIOUX, Stéphane
[CA/CA]; 869 avenue Des Pinsons, Banapro, Quebec
G1E 1J3 (CA). COUTURE, Julie [CA/CA]; 896 C,
Jean-Charles Cantin, St-Augustin-de-Desmaures, Quebec
G3A 1A4 (CA).

(21) International Application Number: PCT/CA02/00706

(22) International Filing Date: 15 May 2002 (15.05.2002)

(25) Filing Language: English

(74) Agents: MORROW, Joy, D. et al.; Smart & Biggar, P.O.
Box 2999, Station D, 900-55 Metcalfe Street, Ottawa, Onta-
rio K1P 5Y6 (CA).

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/290,653 15 May 2001 (15.05.2001) US

(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, 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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Applicant (for all designated States except US): SHIRE
BIOCHEM INC. [CA/CA]; 275 Armand-Frappier Boule-
vard, 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-Des-
maures, Quebec G3A 1E9 (CA). HAMEL, Josée
[CA/CA]; 2401 Marilain, Sillery, Quebec G1T 1 N6

(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, UM),

[Continued on next page]

(54) Title: MORAXELLA(BRANHAMELJA) CATARRHALIS ANTIGENS



WO 02/092625 A3

1 ATGGGCACTG ACATGAAACA TTAAACAAA CATCGCTAT CAGCTCCAT
51 CATTCGCTTT TATATATCA TTAGCAGATC AATGCAACA AATACGACAC
101 ACCATCGACG GGTAGCAAGT ACGGAGCTTA AACTTGTCTA TGATAGTATT
151 ATTGATAGTA TCAATCAATT GGGTAGCTG ACCGCAATA TTCCAAATAC
201 ACAATATTTT CAAACCAACA ACGGTGTGAG CGTTCCTTTI ACGCAATTAC
251 ATGAGCTGCC TATGTGCTAT ATCAGCTTGT ATTTTATGC AGGGTCAGCG
301 TTGTACCAAT AGTTGGCAA ATCAGGCAAG CTAAGATGG TTGCACCAT
351 GCTCACCCAA GGAACAGACA GCCTTCTGA AGATGCTTT GTTCGCGCA
401 AAGAGCTCTT TGGCATGTAT TTACCACTA CAGCAATAA GGATAACTTA
451 ACTTTATCAT TAAGAAGCTT GTCGATCAA TCATTATTTA ATCAAGCCGC
501 CGATTTAATG GTCGATGCTG TCACTCAACC TGCTTTTGTAT GATPAGACTC
551 TCAACCCAA CAATAATCG CTCATCACA GTTTAAACA AAATAAGCA
601 AACCCCTATC ATGATGCTTC TGTTGCTTAT CATCAAGCCG TATATGAAA
651 TCATCCTTAT GCACACGCAA CCACAGCCGA TGAAGATAGT APTGCCAAA
701 TTGATCGTGA TGAGCTGCTT AATTTTGGC ATACTTTTAT TAAAGCAAT
751 AATGCGACAC TGTCATTTAC AGGTGATATG AAGCCGAGC AAGCCAAATC
801 ACTTCCACAC CATGTAGCG CCAATTTACC GACGCGCAG TGTATPAAA
851 ATACCCTGGA TTTCACAAA CCAATTAAGG CTCCTCATAT CCATATTCCT
901 CACACAGTA GTCAACCCA AATCATATC GGTCAATCCA CCAATTAAGT
951 ACGCACGGAC AAAGCAGGTC GTCAGAGTT CAGCGATTTT TCATTAGTA
1001 ATGAAATTTT GGCAGGTGGT GATTTTAAAG CCAGATTTAT GAAAACCAT
1051 CGAGAGCAA AAGCTTACAC TTAGTGCTT TTGCGCTTA TGGAGCGCT
1101 CAGAGCAGGT GGTAAATATG TGTGTGAAT TTCAACCGAT GCGGATPAA
1151 CAGCCGATGC CATTTAGAG ACGCTACACA TCATTAATGA GTGCTGAAT
1201 GAAGGCATAA CCCAAGAAGA GCTTGAATTC GTGCGTTGG CCAATAAAA
1251 TGTCTTGGC AATATTTTT CAAGCAATGC CAGATTTAT CGTGCTATTG
1301 GTCTTTTMT TGTGCGGAT TATCCAAAAG ATCATCTTAA CCAATGCTC
1351 AATCGCTGG ATAAATGAC GATAAATAGT GTTATACCG CACTGAACCT
1401 CCGTATCAAG CCTGATGAT TATCATCAT CACCGGGT AAAACTAAG
1451 CAAATTTGGA CAAATAA

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

WO 02/092625 A3 

European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
10 July 2003

Published:
with international search 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.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 02/00706
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER 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. FIELDS SEARCHED 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) EMBL, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 78968 A (INCYTE GENOMICS, INC.) 28 December 2000 (2000-12-28) page 3, line 5 -page 4, line 13 page 6, line 16 -page 16, line 25 Sequence listing SEQ ID NO:40, nucleotides 87220-88690 SEQ ID NO:35, nucleotides 67170-68830 SEQ ID NO:19, nucleotides 32950-33770 SEQ ID NO:11, nucleotides 7880-8515	1-31
A	WO 01 19996 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.) 22 March 2001 (2001-03-22) 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 principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 February 2003		Date of mailing of the international search report 25. 02. 2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 PfaffenstraÙe 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	national application No. PCT/CA 02/00706
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos. : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 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).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input 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.:	
Remark on Protest	<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 Application No. PCT/CA 02/00706

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-31 partially

Moraxella catarrhalis polynucleotide BVH-MC2 of sequence SEQ ID NO:1, 3, 5 or 7 and analogs thereof; BVH-MC2 polypeptide of sequence SEQ ID NO:2, 4, 6 or 8 and analogs thereof; vector and host cell; chimeric polypeptide and therapeutic and diagnostic applications

2. Claims: 1-31 partially

Moraxella catarrhalis polynucleotide BVH-MC3 of sequence SEQ ID NO:9 and analogs thereof; BVH-MC3 polypeptide of sequence SEQ ID NO:10 and analogs thereof; vector and host cell; chimeric polypeptide and therapeutic and diagnostic applications

3. Claims: 1-31 partially

Moraxella catarrhalis polynucleotide BVH-MC4 of sequence SEQ ID NO:11 and analogs thereof; BVH-MC4 polypeptide of sequence SEQ ID NO:12 and analogs thereof; vector and host cell; chimeric polypeptide and therapeutic and diagnostic applications

4. Claims: 1-31 partially

Moraxella catarrhalis polynucleotide BVH-MC5 of sequence SEQ ID NO:13 and analogs thereof; BVH-MC5 polypeptide of sequence SEQ ID NO:14 and analogs thereof; vector and host cell; chimeric polypeptide and therapeutic and diagnostic applications

International Application No. PCT/A 02 00706

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/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

Although claims 23-27 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/CA 02/00706

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0078968	A	28-12-2000	AU 1824101 A	09-01-2001
			EP 1218512 A2	03-07-2002
			WO 0078968 A2	28-12-2000
WO 0119996	A	22-03-2001	AU 7519100 A	17-04-2001
			WO 0119996 A1	22-03-2001
			EP 1212426 A1	12-06-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

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

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,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,P L,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ティー 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ティー 1エヌ6 シルリー マリタン 2041

(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 ピンサンズ
869

(72)発明者 ジュリー クチュール

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

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 BA50 CA01 CA09 CA11 DA06 EA04 HA12
HA17

4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 DA01 DA15

4B065 AA01Y AA26X AB01 CA24 CA25 CA45 CA46

4C085 AA03 BA15 CC07 CC08 CC21 CC31 DD62 EE01

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA54 CA11 DA76 EA22 EA31 EA52

FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005500024A5	公开(公告)日	2006-01-12
申请号	JP2002589508	申请日	2002-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	希雷生物化学有限公司		
申请(专利权)人(译)	希雷生物化学公司		
[标]发明人	デニスマーティン ジョセアメル バーナードアールプロデュール ステファンリウクス ジュリークチュール		
发明人	デニス マーティン ジョセ アメル バーナード アール プロデュール ステファン リウクス ジュリー クチュール		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/02 A61P11/00 A61P11/02 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/04 C07K14/195 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/569 C12N5/10		
CPC分类号	A61K39/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/14 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/04 A61P37/04 C07K14/212 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/02 A61P11/00 A61P11/02 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/04 C07K14/195 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.F C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/HA12 4B024/HA17 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA15 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA54 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74		
优先权	60/290653 2001-05-15 US		
其他公开文献	JP2005500024A		

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。

