

(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2004-529601

(P2004-529601A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

4 B O 2 4

A 6 1 K 39/145

A 6 1 K 39/145

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 27/16

A 6 1 P 27/16

4 C O 8 5

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 31/04

4 H O 4 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 336 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-605617 (P2000-605617)

(86) (22) 出願日 平成12年3月16日 (2000.3.16)

(85) 翻訳文提出日 平成13年9月17日 (2001.9.17)

(86) 国際出願番号 PCT/CA2000/000289

(87) 国際公開番号 W02000/055191

(87) 国際公開日 平成12年9月21日 (2000.9.21)

(31) 優先権主張番号 09/268, 347

(32) 優先日 平成11年3月16日 (1999.3.16)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500096994

アヴェンティス パスツール リミテッド
A V E N T I S P A S T E U R L I M
I T E Dカナダ国 エム2アール 3ティー4 オ
ンタリオ州 トロント スティールズ ア
ヴェニュー ウェスト 1 7 5 5

(74) 代理人 100088328

弁理士 金田 暢之

(74) 代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えインフルエンザ菌アドヘシントンパク質

(57) 【要約】

完全長でN末端が切断されている形の、インフルエンザ菌の分類不能型菌株のH i a タンパク質の組み換え生成物が記載されている。分類不能型およびc型インフルエンザ菌のさまざまな菌株のH i a 遺伝子の核酸および演繹アミノ酸配列も記載されている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インフルエンザ菌（ヘモフィルス・インフルエンジー（*Haemophilus influenzae*））の菌株のインフルエンザ菌アドヘシン（*Hia*）タンパク質をエンコードしている単離され精製された核酸分子であって、

（a）図 18、19、20、21、22、23、24 および 25 に示される配列（配列番号 23、25、27、29、31、33、35、37）からなる群から選択される DNA 配列、または

（b）図 18、19、20、21、22、23、24 および 25 に示される配列（配列番号 24、26、28、30、32、34、36、38）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するインフルエンザ菌アドヘシン（*rHia*）タンパク質をエンコードしている DNA 配列を有する単離され精製された核酸分子。

10

【請求項 2】

インフルエンザ菌の菌株の N 末端切断型インフルエンザ菌アドヘシン（*Hia*）タンパク質をエンコードしており、

配列番号 7 と配列番号 15

配列番号 9 と配列番号 15

配列番号 11 と配列番号 15

配列番号 13 と配列番号 15

配列番号 49 と配列番号 51

20

からなる群から選択されるヌクレオチドの 1 対によって増幅可能な、単離され精製された核酸分子。

【請求項 3】

封入体として発現可能なインフルエンザ菌の菌株の切断型インフルエンザ菌アドヘシン（*Hia*）タンパク質をエンコードしている、単離され精製された核酸。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の前記核酸分子を含む宿主を形質転換するためのベクター。

【請求項 5】

請求項 2 または 3 に記載の前記核酸分子を含む宿主を形質転換するためのベクター。

【請求項 6】

プラスミドベクターである、請求項 4 または 5 に記載のベクター。

30

【請求項 7】

前記プラスミドベクターが、

図 1 A 中に示される DS-2008-2-3

図 5 A 中に示される DS-2186-1-1

図 5 A 中に示される DS-2201-1

図 5 A 中に示される DS-2186-2-1

図 5 A 中に示される DS-2168-2-6

図 3 2 中に示される IA-191-3-1

からなる群から選択されるプラスミドの同定特性を有する、請求項 6 に記載のベクター。

40

【請求項 8】

完全長または N 末端切断型インフルエンザ菌アドヘシン（*Hia*）タンパク質および前記完全長または切断型 *Hia* タンパク質を発現するためのプロモーターを含む、宿主を形質転換するためのベクター。

【請求項 9】

大腸菌の遺伝子をさらに含む、請求項 8 に記載のベクター。

【請求項 10】

プラスミドベクターである、請求項 8 に記載のベクター。

【請求項 11】

前記プラスミドベクターが、

50

図 6 A 中に示される B K - 9 6 - 2 - 1 1

図 7 A 中に示される D S - 2 2 4 2 - 1

図 7 A 中に示される D S - 2 2 4 2 - 2

図 8 A 中に示される D S - 2 3 4 0 - 2 - 3

図 9 A 中に示される D S - 2 4 4 7 - 2

図 9 B 中に示される D S - 2 4 4 8 - 1 7

図 3 2 中に示される J B - 2 9 3 0 - 3

からなる群から選択されるプラスミドベクターの同定特性を有する請求項 1 0 に記載のベクター。

【請求項 1 2】

請求項 4、5 または 8 に記載のベクターによって形質転換され、ヘモフィルスの分類不能型菌株の防御性インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質を発現する宿主細胞。

【請求項 1 3】

大腸菌の菌株である、請求項 1 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の形質転換された大腸菌またはその免疫原性断片またはアドヘシン官能性類縁体によって産生可能な、インフルエンザ菌の菌株の組換え防御性インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質。

【請求項 1 5】

(A) インフルエンザ菌の菌株のインフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質をエンコードしている単離され精製された核酸分子であって、

(a) 図 1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 および 2 5 に示される配列 (配列番号 2 3、2 5、2 7、2 9、3 1、3 3、3 5、3 7) からなる群から選択される D N A 配列、または

(b) 図 1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 および 2 5 に示される配列 (配列番号 2 4、2 6、2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8) からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するインフルエンザ菌アドヘシン (r H i a) タンパク質をエンコードしている D N A 配列を有する単離され精製された核酸分子、

(B) インフルエンザ菌の菌株の N 末端切断型インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質をエンコードしており、

配列番号 7 と配列番号 1 5

配列番号 9 と配列番号 1 5

配列番号 1 1 と配列番号 1 5

配列番号 1 3 と配列番号 1 5

配列番号 4 9 と配列番号 5 1

からなる群から選択されるヌクレオチドの 1 対によって増幅可能な、単離され精製された核酸分子、

(C) 封入体として発現可能なインフルエンザ菌の菌株の切断型インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質をエンコードしている、単離され精製された核酸分子、

(D) 請求項 4、5 または 8 に記載の発現ベクターによって形質転換された大腸菌によって産生可能な、インフルエンザ菌の菌株の組換え防御性インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質からなる群から選択される少なくとも 1 つの免疫学的に活性のある成分、および薬学的に許容可能なこれらの担体を含む免疫原性組成物。

【請求項 1 6】

ヘモフィルスに起因する疾患に対して防御するために宿主への *i n v i t r o* 投与用ワクチンとして製剤化される、請求項 1 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 7】

免疫系の特定の細胞または粘膜表面への送達用の標的分子と組み合わせた、請求項 1 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 8】

10

20

30

40

50

ミクロ粒子、カプセル、またはリポソーム調製物として製剤化される、請求項 15 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

アジュバントをさらに含む、請求項 15 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 20】

感受性のある宿主に請求項 15 に記載の免疫原性組成物を有効量投与すること含む、ヘモフィルスに起因する疾患に対する防御を誘導するための方法。

【請求項 21】

前記感受性のある宿主がヒトである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

インフルエンザ菌の分類不能型菌株の防御性インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質の産生のための方法であって、
請求項 5 と同様にベクターによって宿主を形質転換すること、
宿主を成長させてエンコードされている切断型 H i a を発現させること、
前記発現された H i a タンパク質を単離および精製することを含む方法。

【請求項 23】

前記宿主細胞が大腸菌である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記エンコードされている切断型 H i a が封入体内で発現される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記発現された H i a の前記単離および精製が、
成長し形質転換された細胞を破壊して上澄みおよび前記封入体を生成すること、
前記封入体を可溶化して組換え H i a の溶液を生成すること、
クロマトグラフィによって細胞の残骸のない組換え H i a の前記溶液を精製すること、および
前記精製された組換え H i a タンパク質を単離することによって実施される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ヘモフィルスの分類不能型菌株が菌株 11、33、32、29、M4071、K9、K22 および 12 からなる群から選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 27】

前記ベクターが T7 プロモーターを含み、前記大腸菌が誘導量のラクトースの存在下で培養される、請求項 22 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の参照)

本出願は、同時係続の米国特許出願第 09 / 268, 347 号の一部継続出願である。

【0002】

(発明の分野)

本発明は分子遺伝学の分野に関し、詳細には組換えインフルエンザ菌 (ヘモフィルス・インフルエンジエ (H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e)) アドヘシン (H i a) タンパク質の産生に関する。

【0003】

(発明の背景)

インフルエンザ菌は、髄膜炎、喉頭蓋炎、敗血症および中耳炎などのいくつかの重大なヒト疾患の原因である。インフルエンザ菌には、a から f で表され、それらの莢膜多糖によって識別される 6 種類の血清型がある。b 型インフルエンザ菌 (H i b) は、1980 年代にいくつかの H i b 結合ワクチンが導入されるまでは細菌性髄膜炎の主な原因であった (r e f. 1. 本出願全体にわたって、さまざまな参考文献を括弧内に引用し、本発明が

10

20

30

40

50

関係する分野の現状をより完全に説明する。それぞれの引用に関する完全な文献情報は、明細書の最後、特許請求の範囲の直前に見出される。これらの参考文献の開示を、参照により本開示に組み込む）。ジフテリアトキソイド（*ref.* 2）、破傷風トキソイド（*ref.* 3および米国特許第4, 496, 538号）または髄膜炎菌外膜タンパク質（*ref.* 4）に結合したb型インフルエンザ菌莢膜多糖をベースとするワクチンは、b型インフルエンザ菌誘発髄膜炎を減らすのに有効とされてきた。他の血清型インフルエンザ菌が侵襲性疾患に関連する頻度は低い、Hib疾患の発生率が減少するにつれて、これらの菌株に起因する疾患の発生率が増加するようである（*ref.* 5、6）。非被包性すなわち分類不能型インフルエンザ菌（NTHi）もまた中耳炎、喉頭蓋炎、肺炎および気管支炎を含む広範囲のヒト疾患の原因となる。NTHi誘発疾患の発生率は、Hibワクチンの導入によって影響を受けなかった（*ref.* 7）。 10

【0004】

中耳炎は幼児期に最もよく見られる病気であり、2歳未満の子供全体の60から70%が1回から3回の耳感染症を経験する（*ref.* 8）。子供の慢性中耳炎は聴力、発話および認知障害の原因となる。インフルエンザ菌感染症は、急性中耳炎の症例の約30%、慢性中耳炎の約60%を占める。米国だけでも中耳炎の治療には、抗生物質ならびに扁桃摘出術、咽頭扁桃切除術および中耳腔換気用チューブの挿入などの外科的処置に年間10億ドルから20億ドルが費やされている。言語療法および特殊教育授業などの付加的治療に対し、年間さらに300億ドルが費やされていると推定される。さらに、中耳炎の原因となる生物の多くは、抗生物質治療に対して耐性になりつつある。したがって、中耳炎に対する有効な予防ワクチンが望まれている。NTHiによる自然感染では、抗体の応答を刺激する露出した外膜タンパク質が殺菌および／または防御的な抗体として潜在的に重要な標的であり、したがって潜在的なワクチンの候補である。NTHiの上皮細胞への付着の際に重要である高分子量タンパク質（HMW1およびHMW2）のファミリーが、約70から75%のNTHi菌株において同定されている（*ref.* 9、*ref.* 10）。これらの高分子量アドヘシン（*adhesin*）は、中耳炎のチンチラモデルにおいていくらかの防御を可能にすることが分かっている（*ref.* 11）。高分子量アドヘシンタンパク質の第2のファミリーが、約25%のNTHiおよび被包性インフルエンザ菌株において同定されている（*ref.* 12、*ref.* 13、*ref.* 14）。この第2のファミリーのNTHiメンバーは、インフルエンザ菌アドヘシンすなわちHiaと呼ばれ、被包性菌株において発見される相同タンパク質はインフルエンザ菌表面原繊維タンパク質すなわちHsfと呼ばれる。hia遺伝子は、中耳炎患者の回復期血清を使用して発現ライブラリーから最初にクローニングされ、このことはhia遺伝子が疾患における重要な免疫原であることを示す。プロトタイプのHiaおよびHsfタンパク質は約82%の配列類似性を示すが、Hsfタンパク質はかなり高い。これらのタンパク質には保存されたアミノ酸およびカルボキシ末端およびいくつかの繰り返しモチーフが含まれ、HsfはHiaと比較してより多くの繰り返し配列を含む。高分子量タンパク質（200kDa）も、HsfおよびHiaタンパク質といくらかの配列相同性があるMoraxella catarrhalisから同定されている（米国特許第5, 808, 024号）。 20 30 40

【0005】

HiaおよびHsfはインフルエンザ菌の被包性菌株および約20～25%の非被包性菌株中で保存され、アドヘシンであることが示されているので、HiaまたはHiaと特異的に反応する抗体を産生する能力のあるタンパク質を産生する、インフルエンザ菌または他の細菌性病原体によって引き起こされる疾患に対する診断および予防接種において、このタンパク質は有用性がある。 40

【0006】

診断において有用であり予防接種における免疫原としてのアンチHia抗体を産生するために、診断において抗原としてHiaを使用することの欠点は、インフルエンザ菌種からの天然タンパク質の回収があまりできないことである。

【0007】

他の免疫原用のワクチン、担体を含めた免疫調製、および診断試薬の生成において、抗原として使用するための組換えH i aタンパク質を提供することが有利であろう。

【0008】

(発明の概要)

本発明は組換えインフルエンザ菌アドヘシン (r H i a) の提供を対象とする。

【0009】

このような組換えタンパク質の提供に関して、本発明は単離され精製されたある種の核酸分子を提供する。したがってその一態様において、本発明は単離され精製された核酸分子を提供し、この核酸分子はインフルエンザ菌株のインフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質をエンコードしており、以下のものを含む。(a) 図18、19、20、21、22、23、24および25に示される配列(配列番号23、25、27、29、31、33、35、37)からなる群から選択されるDNA配列、または(b) 図18、19、20、21、22、23、24および25に示される配列(配列番号24、26、28、30、32、34、36、38)からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するインフルエンザ菌アドヘシン (r H i a) タンパク質をエンコードしているDNA配列。

【0010】

このような核酸は、プラスミドベクターである可能性のあるベクター中に含まれていてよい。詳細には、分類不能型ヘモフィルスの菌株11または33からのH i aタンパク質を、核酸分子はエンコードしてよい。

【0011】

本発明の他の態様では、インフルエンザ菌の菌株のN末端切断型インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質をエンコードしており、1対のヌクレオチドによって増幅可能な単離され精製された核酸分子が提供される。ヌクレオチドは配列番号7と配列番号15、配列番号9と配列番号15、配列番号11と配列番号15、配列番号13、配列番号15、配列番号49、および配列番号51からなる群から選択される。

【0012】

このような核酸は、プラスミドベクターである可能性のあるベクター中に含まれていてよい。詳細には、分類不能型ヘモフィルスの菌株11または33からのコドンV38またはS44で始まるN末端切断型H i aタンパク質を、核酸分子はエンコードしてよい。

【0013】

本発明のこれらの態様に従って提供される単離され精製された核酸を組み込んでいるプラスミドベクターは、

図1A中に示されるDS-2008-2-3

図5A中に示されるDS-2186-1-1

図5A中に示されるDS-2201-1

図5A中に示されるDS-2186-2-1

図5A中に示されるDS-2168-2-6

図32中に示される1A-191-3-1

からなる群から選択されるプラスミドの同定特性を有する可能性がある。

【0014】

本明細書で提供されるベクターは、大腸菌からのc e r遺伝子を含んでよい。したがって、本発明の他の態様では、完全長またはN末端切断型インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質をエンコードしている核酸分子、前記完全長または切断型H i aタンパク質を発現するためのプロモーター、任意選択で大腸菌のc e r遺伝子含む、宿主を形質転換するためのベクターが提供される。ベクターはプラスミドベクターまたは他の非複製ベクターであってよく、

図6A中に示されるBK-96-2-11

図7A中に示されるDS-2242-1

図7A中に示されるDS-2242-2

図8A中に示されるDS-2340-2-3

図 9 A 中に示される D S - 2 2 4 7 - 2

図 9 B 中に示される D S - 2 4 4 8 - 1 7

図 3 2 中に示される J B - 2 9 3 0 - 3

からなる群から選択されるプラスミドベクターの同定特性を有する可能性がある。

【0015】

本明細書で提供されるベクターは、サルモネラ、BCG、アデノウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアまたはポリオウイルスからのベクターを含めた複製ベクターを含んでよい。

【0016】

本明細書で提供される任意のベクターを使用して、完全長または切断型である可能性のある、ヘモフィルスの分類不能型菌株の防御性インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質を発現するのに適切な宿主細胞を形質転換することができる。このような宿主は、好都合には大腸菌であってよい。このような発現は T 7 プロモーターの制御下で行うことができ、形質転換された宿主からの組換え H i a の発現はラクトースまたは他の好都合な誘導剤の誘導用濃縮液中で培養することによって実施することができる。

【0017】

本発明は他の態様において、形質転換された宿主、特に本明細書で提供される大腸菌によって産生される、分類不能型ヘモフィルス菌株の組換え防御性インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質をさらに含む。このような H i a タンパク質を組換えタンパク質の免疫原性断片またはアドヘシン官能性類縁体の形で提供することができる。

【0018】

完全長または N 末端切断型である本明細書で提供される組換え H i a タンパク質は、免疫原性組成物中の抗原、他の免疫原用の担体、診断用薬としておよび診断用薬の生成において有用である。完全長または N 末端切断型である H i a タンパク質をエンコードしている核酸分子も、診断のための使用用、および免疫原性組成物中においてもプローブとして有用である。

【0019】

追加的な態様において本発明は、本明細書で提供されるのと同様な単離され精製された核酸分子、本明細書で提供されるのと同様なヘモフィルスの菌株の完全長または N 末端切断型である組換え防御性 H i a タンパク質からなる群から選択される少なくとも 1 つの免疫学的に活性のある成分、および薬学的に許容可能なこれらの担体を含む、免疫原性組成物を提供する。

【0020】

本明細書で提供される免疫原性組成物を、宿主への *in vitro* 投与用ワクチンとして製剤化して、インフルエンザ菌に起因する疾患に対する防御を提供することができる。このような目的のために、組成物をマイクロ粒子、カプセル、ISCOM またはリポソーム調製物として製剤化することができる。免疫原性組成物を免疫系の特定の細胞または粘膜表面への送達用の標的分子と組み合わせて提供することができる。

【0021】

本発明の免疫原性組成物（ワクチンを含めて）は少なくとも 1 種の他の免疫原性または免疫刺激性材料をさらに含んでよく、この免疫刺激性材料少なくとも 1 種のアジュバントまたは少なくとも 1 種のサイトカインであってよい。本発明で使用するのに適切なアジュバントには（これらに限らないが）リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、Q S 2 1、Q u i l A、その誘導体および成分、ISCOM マトリックス、リン酸カルシウム、水酸化カルシウム、水酸化亜鉛、糖脂質類縁体、アミノ酸のオクタデシルエステル、ムラミルジペプチド、ポリホスファゼン、ISCO PREP、D C - c h o l、D D B A およびリポタンパク質ならびに他のアジュバントがある。

【0022】

アジュバントの有利な組み合わせは、本出願人と同じ譲受人に譲渡され、その開示を参照（1995 年 11 月 21 日発行の W O 9 5 / 3 4 3 0 8）により本明細書に組み込む

10

20

30

40

50

994年6月16日出願の同時係続の米国特許第08/261,194号、および1995年6月7日出願の第08/483,856号に記載されている。

【0023】

本発明の他の態様に従って、感受性のある宿主に有効量の前述の免疫原性組成物を投与するステップを含む、宿主中で免疫応答を生み出すための方法が提供される。免疫応答は体液の免疫応答であるか、または細胞を介する免疫応答であってよい。その内部で疾患に対する防御を与えることができる宿主には、ヒトを含めた霊長類がある。

【0024】

本発明の他の態様に従って、薬剤として使用されるとき本明細書で提供される免疫原性組成物、および疫原性組成物の製造における免疫原性組成物のこれらの成分の使用法が提供される。 10

【0025】

他の追加的な態様において本発明は、インフルエンザ菌の分類不能型菌株の防御性インフルエンザ菌アドヘシン(Hia)タンパク質の産生のための方法を提供し、この方法は本明細書で提供されるのと同様な菌株のN末端切断型のインフルエンザ菌アドヘシントタンパク質をエンコードしている核酸分子を含むベクターによって、大腸菌などの宿主を形質転換すること、

宿主を成長させてエンコードされている切断型Hiaを発現させること、
発現したHiaタンパク質を単離および精製することを含む。

【0026】

エンコードされている切断型Hiaを封入体中で発現させることができる。成長し形質転換された細胞を破壊して上澄みおよびHiaを含む封入体を生成し、上澄みからの分離の後に封入体を可溶化して組換えHiaの溶液を生成し、クロマトグラフィによって細胞の残骸のない組換えHiaの溶液を精製し、精製された組換えHiaタンパク質を単離することによって、単離および精製ステップを実施することができる。 20

【0027】

大腸菌などの宿主細胞を形質転換するベクターはT7プロモーターを含んでよく、大腸菌または他の宿主細胞を誘導量のラクトースまたは他の好都合な誘導剤の存在下で培養することができる。

【0028】

本明細書のインフルエンザ菌の菌株は、菌株11、33、32、29、M4071、K9、K22および12からなる分類不能型菌株の群から選択することができる。このような菌株からの代表的なHiaタンパク質をエンコードしている遺伝子に特異的な核酸配列が、本明細書で提供され以下に記載される。 30

【0029】

本明細書で提供される核酸配列は、診断に関する適用例において有用である。したがって本発明の他の態様では、サンプル中でインフルエンザ菌アドヘシントタンパク質をエンコードしている核酸の存在を判定するための方法が提供され、この方法は、

a) サンプルを本明細書で提供されるのと同様な核酸分子と接触させて、本明細書で提供される核酸配列、およびサンプル中に存在し特異的にハイブリダイズすることができるヘモフィルスの菌株のHiaタンパク質をエンコードしている核酸を含むデュプレックス(duplex)を生成するステップと、
b) デュプレックスの生成を判定するステップを含む。 40

【0030】

さらに本発明は、サンプル中でインフルエンザ菌アドヘシントタンパク質をエンコードしている核酸の存在を判定するための診断キットを提供し、このキットは、

a) 本明細書で提供されるのと同様な核酸分子と、
b) 核酸分子とサンプルを接触させて、この核酸分子および任意のこのような核酸分子を含むデュプレックスを生成するための手段と、
c) デュプレックスの生成を判定するための手段を含む。 50

【0031】

本明細書で提供される組換えによって産生された切断型H i aタンパク質も、診断に関する適用例において有用である。したがって本発明の他の態様では、サンプル中のH i aタンパク質と特異的に反応する抗体の存在を判定するための方法が提供され、この方法は、
(a) サンプルと本明細書で提供される組換えH i aタンパク質を接触させて、この組換えH i aタンパク質とサンプル中に存在しタンパク質と特異的に反応する任意のこのような抗体の複合体を提供するステップと、
(b) 複合体の生成を判定するステップを含む。

【0032】

本発明の利点には以下のものがある。

10

【0033】

インフルエンザ菌アドヘシントタンパク質またはこのH i aタンパク質の断片または類縁体をエンコードしている単離され精製された核酸分子、
他のいかなるヘモフィルスのタンパク質も含まない組換えによって産生されたH i aタンパク質、
ヘモフィルスの特異的な同定用の診断キットおよび免疫試薬。

【0034】

本発明は、図面を参照しながら以下の記述からさらに理解されるはずである。

【0035】

(発明の全般的な説明)

20

H. i n f l u e n z a e株は、少量のH i aおよびH s fタンパク質を発現するので、N T H i株由来のh i a遺伝子を、E. C o l l i中で組み換えタンパク質を過剰発現させるための発現ベクター中にクローン化した。全長組み換えH i a (r H i a) タンパク質が発現する際、それは比較的少量であった。組み換えタンパク質が発現されているのを確認するために、本出願と同じ譲受人に譲受され、その開示を参照により本明細書に組み込む米国特許第5, 808, 024号で200kDaであると同定されたM o r a x e l l a c a t a r r h a l i s高分子量アドヘシントタンパク質に対する抗体を用いてイムノブロットを実施した。ゲル精製した未変性200kDaタンパク質に対する抗体は、r H i aタンパク質サンプル中に特異的に誘導されたバンドを認識した。r H i aの収量はT 7 h i a遺伝子カセットの遺伝子コピー数を増加させることによって顕著には増加しない。

30

【0036】

E. C o l l iのc e r遺伝子は、大きな挿入部を含むプラスミドを安定化するが(参考文献15)、E. C o l l iのc e r遺伝子を発現ベクターに添加しても、r H i aの収量は顕著には増加しない。しかし、E. C o l l i細胞は培養中に凝集し、このことは、H i aアドヘシントタンパク質の表面発現が起きていることを示唆している。r H i aタンパク質が封入体として生成されればr H i aタンパク質の強い毒性は克服されるので、推定シグナル配列を欠失させるために遺伝子の5' -末端を切断した。この変性の結果、V38位置から出発している切断型r H i aの生産および回収が良好となった。

【0037】

40

全長およびV-38切断型r H i aタンパク質は免疫原性であり、得られる抗-r H i a抗体は、H. i n f l u e n z a eのタイプaまたはタイプb株による菌血症の受動的幼ラットモデルを防護する。さらに、切断型V38 r H i aタンパク質は、チンチラの能動的抗原投与モデルにおける鼻咽頭コロニー形成に対して特に防護に働くことが見出された。N T H i株からのr H i aによってもたらされる防護が、N T H iおよび被包性タイプaまたはタイプb株が原因となって起こる疾患に対するものであることは、一般的な防護エピトープが存在することを意味している。付加的なh i a遺伝子のクローニングおよび配列分析は、保存領域の同定の助けとなる。全長またはN-末端切断型r H i aタンパク質を、H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e疾患に対する防護のためのワクチン成分として使用できる。

50

【0038】

h i a 遺伝子を有する任意の *Haemophilus* 株は、少なくとも本発明の態様で特徴付ける H i a タンパク質をコードする部分を含む核酸分子（おそらく DNA 分子の形）の精製および単離に利用できる。このような株は一般的な臨床所およびバクテリア培養収集所、例えば American Type Culture Collection から入手される。 *Haemophilus influenzae* の適切な株：

分類不能型 *Haemophilus* 株 11；

分類不能型 *Haemophilus* 株 33；

分類不能型 *Haemophilus* 株 32；

分類不能型 *Haemophilus* 株 29；

分類不能型 *Haemophilus* 株 M4071；

分類不能型 *Haemophilus* 株 K9；

分類不能型 *Haemophilus* 株 K22；

分類不能型 *Haemophilus* 株 12；

タイプ C *Haemophilus* 株 A P I。

10

【0039】

本明細書において、“H i a”タンパク質という用語は、H i a タンパク質のファミリーを定義するために使用され、H i a タンパク質には種々の *Haemophilus* 株中で見出されるアミノ酸配列を有する天然の変異体が含まれる。

【0040】

図 1 A は、T7 プロモーターの影響下での、分類不能型 *Haemophilus influenzae* 株 11 由来全長 h i a 遺伝子を含むプラスミド DS-2008-2-3 の制限地図を示す図である。株 11 由来の h i a 遺伝子の核酸（配列番号：43）および推測アミノ酸配列（配列番号：44）は、前記米国特許第 5,646,259 に記載されている（該明細書中では“H A 1”と定義される）。h i a 遺伝子を株 11 の遺伝子の A T G 開始コドンから P C R 増幅するために使用したオリゴヌクレオチドを、図 1 B に示す。

20

【0041】

図 2 は、抗-未変性 *Moraxella catarrhalis* 高分子量アドヘシン抗体により r H i a (11) タンパク質を確認するためのイムノブロットを示す図である。前記米国特許第 5,808,024 に記載される、*M. catarrhalis* 高分子量アドヘシタンパク質または 200 k D a タンパク質は、H i a および H s f タンパク質と、特にカルボキシ末端部に、何らかの配列相同性を有する（図 28）。

30

【0042】

図 3 は、N T H i 株 11 由来の全長 h i a 遺伝子から成る T7 h i a 遺伝子カセットのタンデムコピーを含むプラスミド DS-2092-1 および DS-2092-40 の構築スキームを示す図である。増加した遺伝子コピー数を示すこのようなプラスミドは、しばしば組み換えタンパク質の生産レベルを上昇させる。しかし、以下に示すように、組み換え H i a の低い収率は、遺伝子コピー数の増加によって顕著には増加しない。

【0043】

図 4 は、N T H i 株 11 タンパク質の N-末端配列および経時的に N-末端切断された r H i a タンパク質の位置を示す図である。E21 部分までの N-末端切断型は、H i a のシグナル配列の構成部分であると考えられる長い疎水性領域が欠失している。T33 部分までの欠失は、長い疎水性領域を含み、潜在的な A l a - X - A l a シグナル切断部位を有する。V38 部分までの欠失は、長い疎水性領域を含み、潜在的な A l a - X - A l a シグナル切断部位を有する。S44 部分から始まる組み換え H i a タンパク質は、長い疎水性領域を含み、潜在的な A l a - X - A l a シグナル切断部位を有する。N52 部分から始まる組み換え H i a タンパク質は、*Moraxella catarrhalis* 由来の高分子量（200 k D a）アドヘシンの近接した開始点を模倣しており、アドヘシンは米国特許第 5,808,024 に記載され、該組み換えタンパク質は、V56 から開始

40

50

するようにN-末端切断型されている場合に過剰発現する。

【0044】

図5Aは、4種のN-末端切断型rHiaを製造するための、プラスミドDS-2186-1-1、DS-2201-1、DS-2186-2-1、およびDS-2168-2-6を作製するための構築スキームを示す図である。5'-末端フラグメントをPCR増幅するために使用されるこのオリゴヌクレオチドを図5Bに示す。図30は、S44欠失を製造する、プラスミドJB2930-3を作製するための構築スキームを示す図である。5'-フラグメントをPCR増幅するために使用するオリゴヌクレオチドを図29に示す。

【0045】

図6Aは、NTHi株11由来のV38hia遺伝子ならびにプラスミドを安定化するE. Coli cer遺伝子を含むプラスミドBK-96-2-11を作製するための構築スキームを示す図である。毒性のタンパク質を産生するプラスミドへのcer遺伝子の導入により、タンパク質産生の強化が予測された。cer遺伝子の存在下で全長rHia産生E. Coli細胞の形態に変化が生じ、すなわち細胞が凝集した。このことは、凝集を起こす細胞表面のアドヘシンの発現が強化されたことを示唆する。発現プラスミドBK-96-2-11はさらに、遺伝子安定性を高めると考えられているT7V38hia遺伝子カセットの上流および下流に転写ターミネーターを含んでいる。マルチクロニング部位および転写ターミネーターを作製するために使用されるオリゴヌクレオチドを図6Bに示す。

【0046】

図7Aは、T7プロモーターの影響下に、分類不能型Haemophilus influenzae株33由来の全長hia遺伝子を含むプラスミドDS-2242-1およびDS-2242-2のための構築スキームを示す図である。発現プラスミドは、T7hia(33)遺伝子カセットの上流および下流にE. Coli cer遺伝子および形質転換ターミネーターをも含有する。DS-2242-1は、T7hia(33)遺伝子と同一の鎖上にコードされたターミネーターを有する。しかし、2つのプラスミドに由来するrHiaの発現には違いが見られなかった。NTHi株33の真性5'末端の構築に使用されるオリゴヌクレオチドを図7Bに示す。

【0047】

図8Aは、NTHi株33由来のV38Hia遺伝子ならびにE. Coli cer遺伝子を含むプラスミドDS-2340-2-3のための構築スキームを示す図である。T7V38hia遺伝子カセットの上流および下流の同一の鎖上に転写ターミネーターも存在する。NTHi株33hia遺伝子をV38コドンからPCR増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを図8Bに示す。

【0048】

図9は、T7V38hia(11)またはT7V38hia(33)遺伝子カセットのタンデムコピーをそれぞれ含有するプラスミドDS-2447-2およびDS-2448-17の構築を示す図である。

【0049】

図10、パネルAは、NTHi株11由来の全長または切断型hia遺伝子をコードするプラスミドからのrHiaタンパク質の産生を示す図である。全長rHia(11)タンパク質の産生は非常に低かった。E21およびT33切断型rHiaタンパク質の場合も発現は低かった。しかし、V38およびN52切断型rHiaタンパク質は顕著に改善された発現レベルを示す。図10、パネルBから明らかなように、V38rHia(11)の産生は、E. Coli cer遺伝子を発現プラスミドへ添加した場合に明らかに増加している。

【0050】

図11は、封入体として製造されるrHiaタンパク質の精製スキームを示す図である。細胞を、超音波破碎により溶解し、封入体を連続した抽出により精製した。封入体を、グ

10

20

30

40

50

アニジニウムクロライド中に溶解し、ポリエチレングリコール（PEG）を添加して不純物を沈殿させた。（NH₄）₂SO₄の添加により r H i a が沈殿し、粗 r H i a をさらにゲル濾過により精製した。

【0051】

図12は、株11および33由来の精製されたV38 r H i a タンパク質を示す図である。封入体はレーン3に示され、最終精製タンパク質はレーン4に示される。精製されたタンパク質の推定純度は、SDS-PAGE デンシトメトリーにより測定して、約90%を上回る。

【0052】

図13は、ここに記載されるようにして製造された r H i a タンパク質の、グリセロールを添加した場合としない場合でかつ4℃で、およびグリセロールを添加して-20℃で8週間貯蔵する際の安定性に関する、SDS-PAGE 分析を示す図である。タンパク質はいずれの条件でも安定である。

【0053】

図14は、CD-1 マウス中の株11および33由来V38 r H i a タンパク質の免疫原性を示す図である。0.3~10 μg の用量では、いずれのタンパク質でも、1ないし2回投与した後に強い免疫応答を示す。これらのレベルでは顕著な用量応答は認められない。同様の結果が、BALB/c マウス（図15A）およびモルモット（図15B）でも見られ、このことは r H i a が投与量あたり0.3 μg であっても強い免疫原性を有することを示唆している。

【0054】

図16は、V38 r H i a（33）によってもたらされる、NTHi 株33が引き起こすコロニー形成に対する防護を示す図である。Yang 等（参考文献20）が記載しているように、チンチラ鼻咽頭コロニー形成モデルは、この疾患の初期の段階での防護を評価するために開発された。このモデルは、最初に、h m w 遺伝子を発現するNTHi 株のために確立され、h i a 遺伝子を発現するNTHi 株に適応させなければならなかった。プロトタイプ h m w -発現株（NTHi 12）における感染の確立には10²~10⁸ c f u を使用するが、NTHi 33 株の場合には5×10⁸ c f u が必要であり、このような高レベルであってもプロトタイプ h i a -発現株11では感染が確立されない。100 μg 量で免疫化コホートは明らかに部分的に防護されるが、50 μg 量では防護されない。疾患の初期の段階でのこのような防護は、ワクチン抗原としての r H i a アドヘシンの利用性を示している。

【0055】

図17は、別のH a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e h i a 遺伝子をPCR増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。配列は、H i a およびH s f タンパク質の保存アミノ酸およびカルボキシ末端配列に基づいている。

【0056】

図18は、NTHi 株33 h i a 遺伝子の完全なヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。図19は、NTHi 32 h i a 遺伝子の完全なヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。図20は、NTHi 株29 h i a 遺伝子の完全なヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。図21は、NTHi 株 M4071 h i a 遺伝子の完全なヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。図22は、NTHi 株 K9 h i a 遺伝子の完全なヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。図23は、NTHi 株 K22 h i a 遺伝子の完全なヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。図24は、H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e タイプc 株A P I h i a 遺伝子の完全なヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。図25は、NTHi 株12由来のh i a 座の完全なヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。PCR増幅されたフラグメントは、h i a 遺伝子の3'-末端へ連結したH a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e タイプd 株R d ゲノムのH I 1733 遺伝子に関連する遺伝子の3'-末端を含有する。H I

10

20

30

40

50

1733タンパク質の上流ORFのアラインメントを図27に示す。

【0057】

図26は、前記米国特許5,646,259に記載されるような、NTHi株11由来のHia遺伝子の完全なヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図である。

【0058】

図28は、Hsf、Hiaから推定されるタンパク質の配列のアラインメント、およびM.catarhalis200kDaタンパク質の部分配列を示す図である。

【0059】

本発明の種々の実施態様を、ワクチン摂取、診療、Haemophilus感染の治療、免疫剤の製造の分野の応用に利用できることは、当業者に明らかである。このような使用について以下に述べるが、これに限定するものではない。 10

【0060】

ワクチンの製造および使用

ワクチンとして使用するのに好適な免疫原性組成物は、ここに記載されるような、分類不能型Haemophilus株の免疫原性組み換えHaemophilus influenzaeアドヘシン(rHia)タンパク質、その免疫原性類似体およびフラグメントおよび／または免疫原性ペプチドから製造できる。ワクチンは免疫応答を誘起し、これにより抗-rHia抗体およびオプソニン化または死菌化された抗体を含む抗体が産生される。

【0061】

ワクチンを含む免疫原性組成物は、液体溶液またはエマルジョンのような注入可能な形で製造できる。rHiaタンパク質、その免疫原性類似体およびフラグメントおよび／または免疫原性ペプチドを、製薬学的に認容性の添加剤と混合してよく、該添加剤はrHiaタンパク質、免疫原性フラグメント類似体または免疫原性ペプチドと混和性である。このような添加物には、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールおよびそれらの組合せが含まれる。 20

【0062】

免疫原性組成物およびワクチンはさらに、補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、またはワクチンの効果を増強するためのアジュバントを含有してよい。

【0063】

免疫原性組成物およびワクチンは、皮下注射または筋肉内注射のような非経口投与が可能である。また、本発明で製造される免疫原性組成物を処方し、粘膜表面で免疫応答を喚起する方法で輸送する。従って、免疫原性組成物は例えば鼻または口(胃)のような経路で粘膜表面に適用してよい。 30

【0064】

免疫原性組成物は免疫系の特異的な細胞または粘膜表面へ輸送するために、標的分子と組み合わせる。標的分子には、WO92/17167に記載されるような(Biotecch Australia Pty. Ltd.)、ビタミンB12およびバクテリア毒素、および米国特許第5,194,254(Barber等)に記載されるようなモノクローナル抗体が含まれる。 40

【0065】

また、座剤および経口処方を含む別の投与形態が望ましい。座剤には、結合剤および担体が含まれていてよく、例えばポリアルカレングリコールまたはトリグリセリドである。経口処方には、一般的に使用される添加剤、例えば製薬学的な量のサッカリン、セルロースおよび炭酸マグネシウムが含まれてよい。これらの組成物は、溶剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、持続性製剤または粉剤の形で投与され、rHiaタンパク質、フラグメント類似体および／またはペプチドを約1~95%含有する。

【0066】

ワクチンは、投与処方に適合する方法で、治療効果、防護および免疫原性として機能する量で投与される。投与量は治療対象、例えば個人の免疫系の抗体合成能力および必要であ 50

れば細胞－仲介免疫応答の発現能力により変化する。投与に必要とされる活性成分の適切な量は、専門医の評価に依存する。しかし、好適な投与範囲は当業者により容易に決定可能であり、r H i a、その類似体およびフラグメントおよび／またはペプチドはマイクログラム程度でよい。初期投与およびブースター投与のための好適な治療法も効果的であるが、初期投与には連続投与も含まれる。ワクチンの投与量は、投与経路に依存し、宿主の大きさによっても変化する。

【0067】

分類不能型 H a e m o p h i l u s の r H i a タンパク質をコードする核酸分子を免疫化に直接使用してよく、その際、DNAを直接投与、例えば遺伝子的免疫化として注入するかまたは生ベクター、例えば核酸分子を含むサルモネラ、BCG、アデノウイルス、ポックスウイルス、ワクシニアまたはポリオウイルスを構築する。異種抗体を免疫系へ運ぶために使用される数種の生ベクターについては、例えばO, H a g a n (1992) (参考文献16)に議論されている。遺伝子的免疫化のための、DNAの被検対象への直接的な注入方法は、例えばU l m e r 等、1993 (参考文献17)に記載されている。

10

【0068】

抗原と一般的にリン酸バッファー生理食塩水中の0.05～1.0%溶液として使用されるアジュバントとを同時に投与することにより、免疫原性は著しく向上する。アジュバントは抗原の免疫原性を強化するが、それ自体は免疫原性を必ずしも有さない。アジュバントは、抗原を投与部位の近くに局所的に維持することにより、抗原の免疫系の細胞へのゆっくりとした継続的な放出を助ける、蓄積効果を生み出す。アジュバントはまた、免疫系細胞を蓄積した抗原へと誘引し、そのような細胞を刺激して免疫応答を促す。

20

【0069】

免疫促進剤またはアジュバントは、宿主の免疫応答を向上させるために長年使用されてきており、例えばワクチンが挙げられる。内因性アジュバント、例えばリポポリサッカライドは、一般的にワクチンとして使用される死菌または弱毒化バクテリアの成分である。外因性アジュバントは、典型的に、抗原と非一共役結合した免疫調節物質であり、宿主の免疫応答を強化するために処方される。従って、アジュバントは非経口的に導入された抗体への免疫応答を強化するものである。これらのアジュバントのいくつかは毒性であり、不所望の副作用を起こすので、ヒトおよび多くの動物に使用するのは不适当である。実際、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウム（まとめて一般的にアルムと称される）のみが、ヒトおよび家畜用のワクチン中にアジュバントとして慣用される。アルムによるジフテリアおよび破傷風トキソイドに対する抗体応答の増強は、よく確立されている。

30

【0070】

外因性アジュバントの多くは抗原に対する潜在的な免疫応答を呼び起こす。これらには、前記した特異的アジュバントならびに膜タンパク質抗原と複合するサポニン（免疫刺激複合体）、鉱油を含む複合ポリマー、死んだ微生物および鉱油、フロイドの完全アジュバント、微生物の生成物、例えばムラミルジペプチド(MDP)およびリポポリサッカライド(LPS)ならびにリピドAおよびリポソームが含まれる。

【0071】

効果的に体液性免疫応答(HIR)および細胞－仲介免疫(CMI)を誘導するには、免疫原をアジュバント中に乳化させる。多くのアジュバントは毒性であり、肉芽腫、急性および慢性の炎症(フロイドの完全アジュバント、FCA)、細胞溶解(サポニンおよび複合ポリマー)および発熱、関節炎および前ブドウ膜炎(LPSおよびMDP)を引き起こす。FCAは優れたアジュバントであり研究に汎用されるが、その毒性のために、ヒトまたは家畜用ワクチン中に使用することを許可されていない。

40

【0072】

理想的なアジュバントの所望の特徴は：

- (1) 毒性の欠如；
- (2) 長期にわたる免疫応答刺激能力；
- (3) 製造の容易性および長期貯蔵における安定性；

50

(4) 種々の経路で投与された抗原に対して、C M I および H I R の両方を誘起する能力；所望であれば、
(5) 他のアジュバントとの相乗作用；
(6) 抗原提示細胞 (A P C) 群と選択的に相互作用する能力；
(7) 適切な $T_H 1$ または $T_H 2$ 細胞－特異的免疫応答を特異的に誘起する能力；および
(8) 抗原に対する適切な抗体イソタイプレベル (例えば、I g A) を選択的に増加させる能力
である。

【0073】

参照することでここに組み込んだものとする、L o c k h o f f 等の1989年8月8日 10
付けの米国特許第4, 855, 283には、免疫調節剤またはアジュバントとして、N－
グリコシルアミド、N－グリコシルウレアおよびN－グリコシルカルバメートを含む糖脂
質類似体が記載され、それぞれ糖残基をアミノ酸で置換されていてよい。また、L o c k
h o f f 等、1991 (参考文献18) は、天然の糖脂質と構造的類似性を有するN－糖
脂質類似体、例えばグリコスフィンゴリピドおよびグリコグリセロリピドが、ヘルペス単
純ウイルスワクチンおよび偽性狂犬病ウイルスワクチンの両方で強い免疫応答を誘起する
ことを報告している。ある種の糖脂質は長鎖－アルキルアミンと脂肪酸とから合成され、
芳香族炭素を介して糖と直接結合し、天然の脂質残基の機能を模倣する。

【0074】

本出願と同じ譲受人に譲渡され、参照により本明細書に組み込む、M o l o n y 等による 20
米国特許第4, 258, 029には、破傷風トキソイドおよびホルマリン不活化タイプI
、I I およびI I I ポリオウイルスワクチンと複合させた場合に、オクタデシルチロシン
ヒドロクロライド (O T H) がアジュバントとして機能することが記載されている。また
N i x o n－G e o r g e 等、1990 (参考文献19) は、組み換えB型肝炎表面抗原
と組み合わせた、芳香族アミノ酸のオクタデシルエステルが、B型肝炎ウイルスに対する
宿主の免疫応答を強化することを報告している。

【0075】

イムノアッセイ

本発明により製造されるH a e m o p h i l u s の分類不能型株のr H i a タンパク質、
その類似体およびフラグメントは、免疫原性として、酵素結合性免疫吸着剤検定 (E L I 30
S A) 、R I A および他の非－酵素結合性抗体結合アッセイまたは抗菌、H a e m o p h
i l u s 、および／またはH i a 抗体を検出するための従来公知の方法を含むイムノアッ
セイ中の抗原として、有用である。E L I S A アッセイでは、H i a タンパク質、類似体
およびフラグメントを、選択された表面、例えばポリスチレンマイクロタイタープレート
の壁面のようなタンパク質またはペプチドが結合可能な表面上へ固定する。不完全に吸着
されているH i a タンパク質、類似体および／またはフラグメントを除くために洗浄し、
その後、非特異的タンパク質、例えば試験サンプルに対する抗原性が中性であることを知
られているウシ血清アルブミン (B S A) またはカゼイン溶液を選択表面へ結合させてよ
い。これにより、固定表面上の非特異的吸着部位が遮断され、結果的に、表面上への抗血
清の非特異的結合によって起こるバックグラウンドが減少する。 40

【0076】

次いで固定表面を、臨床または生化学的材料のようなサンプルと接触させ、免疫複合体 (30
抗原／抗体) の形成が起こる方法で試験する。この際、B S A、ウシガンマグロブリン (30
B G G) および／またはリン酸バッファー生理食塩水 (P B S) ／T w e e n のような希
釈剤でサンプルを希釈してよい。サンプルを次に約25℃～37℃程度の温度で約2～約
4時間インキュベートする。インキュベートに続き、サンプル－接触表面を洗浄して、非
－免疫複合材料を除去する。洗浄方法には、P B S ／T w e e n、またはホウ酸バッファ
ーのような溶液による洗浄が含まれてよい。

【0077】

試験サンプルと結合H i a タンパク質、類似体および／またはフラグメントとの間に特異 50

的な免疫複合体が形成された後、次いで洗浄し、複合体形成の出現およびその量を、一次抗体に特異的な二次抗体を免疫複合体へ添加することにより測定する。試験サンプルがヒト起源である場合、二次抗体はヒトイムノグロブリンに特異的な抗体であり、一般的にIgGである。検出可能にするために、二次抗体は、例えば適当な発色性物質とインキュベートすることにより呈色が見られるような酵素活性等の関連活性を有する。定量化は、例えば可視スペクトル分光光度計を用いて呈色の度合いを測定することにより実施される。

【0078】

ハイブリダイゼーションプローブとしての配列の使用

本発明のヌクレオチド配列は、新規に単離および特徴付けされたh i a遺伝子配列を含有し、他のH a e m o p h i l u s分類不能型株から、h i a遺伝子を同定およびクローニングすることができる。

10

【0079】

本発明のh i a遺伝子配列を含有するヌクレオチド配列は、その能力のために、他のh i a遺伝子の補足的部分と倍体分子を選択的に形成するのが有用である。適用に応じて、種々のハイブリダイゼーション条件を利用し、他の分類不能型H a e m o p h i l u s株中の別のh i a遺伝子のための、プローブの選択性の度合いを変化させる。高い選択性のためには、比較的厳しい条件を利用して倍体を形成し、例えば低塩および／または高温条件、例えばNaCl 0.02M~0.15Mでありかつ約50~70℃の温度という条件が挙げられる。ある種の適用では、それほど厳しいハイブリダイゼーション条件は必要とされず、例えば0.15~0.9Mの塩で20~55℃の温度範囲でよい。ハイブリダイゼーション条件は、ホルムアミドの添加量が増加すると、ハイブリッドした倍体が不安定になるので、より厳しい条件が必要とされる。従って、特定のハイブリダイゼーション条件は容易に操作でき、所望の結果に応じて方法を選択するのが一般的である。一般的に、便利なハイブリダイゼーション温度は、50%ホルムアミドの存在下かつNaCl 0.15Mで：h i a遺伝子が標的核酸フラグメントと95~100%の相同性を有する場合に42℃、90~95%の相同性で37℃および85~90%の相同性で32℃である。

20

【0080】

臨床診断の態様において、本発明のh i a遺伝子の核酸配列は、適当な手段、例えばハイブリダイゼーションを測定するための標識、と組み合わせて利用してよい。種々の適当な指示手段が知られており、放射活性、酵素または他のリガンド、例えばアビジン／ビオチンが含まれ、検出可能なシグナルの提供を可能にする。ある診断の態様において、放射活性タグの代わりに、酵素タグ、例えばウレアーゼ、アルカリンホスファターゼまたはペルオキシダーゼを使用してもよい。酵素タグの場合、肉眼または分光光度計で視覚的に捉えられ、H i a遺伝子配列を含むサンプルとの特異的ハイブリダイゼーションを同定できる手段として使用されるものとして、発色指示物質が公知である。

30

【0081】

本発明のH i a遺伝子核酸配列は、溶液ハイブリダイゼーション中のハイブリダイゼーションプローブとして、および液相法で使用される態様として有用である。固相法に関する態様において、滲出液、体液（例えば血清、羊水、中耳滲出液、唾液、気管支肺胞洗浄液）または組織のような臨床サンプルを含むサンプルの試験DNA（またはRNA）を、選択したマトリクスまたは表面へ吸着あるいは固定させる。固定された一本鎖核酸を、次いで、所望の条件下に、本発明のh i a遺伝子またはそのフラグメントの核酸配列を含む選択プローブと特異的にハイブリダイゼーションさせる。選択する条件は、例えばG+C含量、標的核酸のタイプ、核酸源、ハイブリダイゼーションプローブの大きさ等に応じて必要とされる特定の基準に基づく特定の状況に応じて変化する。続いてハイブリダイゼーション表面を洗浄して非特異的に結合したプローブ分子を除去し、標識の手段により、特異的ハイブリダイゼーションを検出または定量化する。H a e m o p h i l u s種で保存されている核酸配列部分を選択するのが好ましい。選択されたプローブは、少なくとも長さ18bpであり、多くの場合30~90bp長さである。

40

【0082】

50

Haemophilus influenzae アドヘシン遺伝子の発現

宿主細胞に適合性の種に由来するレプリコンおよび制御配列を、発現系中の h i a 遺伝子の発現に利用してよい。ベクターは、通常、複製部位ならびに形質転換細胞中の表現型の選択を行うマーカー配列を有する。例えば、E. Coli は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子を含む p B R 3 2 2 を使用して形質転換でき、従って、形質転換細胞を同定するための簡易な方法を提供する。p B R 3 2 2 プラスミド、または他の微生物プラスミドまたはファージは、宿主細胞が自身のタンパク質を発現させるために使用できるプロモーターも含有するか、または含有するように変性する。

【0083】

さらに、宿主細胞に適合性のレプリコンおよび制御配列を含有するファージベクターは、これらの宿主と一緒に形質転換ベクターとして使用できる。例えば、ラムダ G E M^{T M} - 11 中のファージを、E. Coli L E 3 9 2 のような宿主細胞を形質転換させるために使用できる組み換えファージベクターを製造するために使用してよい。

【0084】

組み換え D N A 構築体中で一般的に使用されるプロモーターには、β-ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）およびラクトースプロモーターシステムおよび他の微生物プロモーター、例えばここで好ましい態様として使用される T 7 プロモーターシステム（米国特許第 4, 9 5 2, 4 9 6）が含まれる。プロモーターのヌクレオチド配列の詳細は公知であり、当業者にはそれらを遺伝子を用いて機能的に結合することが可能である。使用される特定のプロモーターは、一般的に、所望の結果に応じて選択されたプロモーターである。H i a タンパク質および免疫学的フラグメントまたはその類似体の発現に適当な宿主には、E. Coli が含まれ、B o r d e t e l l a 種、B a c i l l u s 種、H a e m o p h i l u s u 種、菌体、酵母またはバクテリオファージシステムを使用してもよい。E. Coli がここで使用される好ましい宿主である。

【0085】

本発明において、特に H a e m o p h i l u s 種を培養して精製した天然 H i a タンパク質が微量の毒性物質または他の汚染物質を含む場合に、H i a タンパク質の製造は、組み換え法によるのが好ましい。この問題点は、組み換えにより製造された H i a タンパク質を異種システム中で使用することにより解決され、この際、H i a タンパク質は、特に記載された構築体を使用して、精製物質中の汚染物質を最小化する方法で宿主から単離される。

【0086】

微生物寄託

ここに記載し参照した分類不能型 H a e m o p h i l u s 株の高分子量タンパク質をコードする核酸を含むベクターを、本明細書の出願に先立って、ブタペスト条約に従い、1 0 8 0 1 U n i v e r s i t y B o u l e v a r d, M a n a s s a s, V i r f i n i a 2 0 1 1 0 - 2 2 0 9、米国に所在する A m e r i c a T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) に寄託した。寄託されたベクターのサンプルは、公共に利用可能であり、課される全ての制限または寄託物を利用する権利は、この米国特許出願に基づく特許の許可を受けることとする。さらに、受託者が生存可能なサンプルを分配できない場合には、寄託物を受託者に戻すこととする。寄託された実施形態は本発明を例示するためだけのものである。本明細書に記載および請求された発明が、寄託された生物材料によって範囲を限定されることはない。本出願の記載と等価または同等な抗原をコードする核酸を含むいずれの等価または類似のベクターも本発明の範疇に入るものとする。

寄託概要

プラスミド	A T C C	寄託年月日
BK-96-2-11	203771	1999年2月11日

実施例

上記の開示は概して本発明を説明している。以下の特定した実施例を参照するとさらに完

全な理解が得られる。これらの実施例はただ例示の目的で説明されるものであり、本発明の範囲を限定しようとするものではない。状況によって形状の変化および同等品への置き換えを図ることで好都合なことを示唆できるかまたは提供できる。ここでは特殊な用語を使用した、そのような用語は説明的感覚で使用するつもりであって限定を目的とするものではない。

【0087】

本開示およびこれらの実施例には明記していないが、使用した分子遺伝学、蛋白質生化学、免疫学および発酵技術による方法は科学文献で広く報告されており、当業者の能力に十分に保有されたものである。

【0088】

実施例 1

この実施例は N T H i 菌株 1 1 由来の全長のそろった r H i a 蛋白質を発現するプラスミド D S - 2 0 0 8 - 2 - 3 の構造を説明するものである。

【0089】

N T H i 菌株 1 1 から染色体 D N A を精製し、図 1 B に記載したオリゴヌクレオチド (5 0 3 8 . S L および 5 0 3 9 . S L) を使用して全長のそろった h i a 遺伝子を P C R 増幅した。p T 7 - 7 発現ベクター (r e f . 2 1) にクローン化するために N d e I 部位をこの遺伝子の 5 ' 末端で設計し、B a m H I 部位を 3 ' 末端で設計した。増幅した断片を N d e I / B a m H I で切断し、同じ酵素で切断した p T 7 - 7 にクローン化した。プラスミド D S - 2 0 0 8 - 2 - 3 は T 7 プロモーターの下流に 3 . 4 k b の 1 1 株 h i a 遺伝子を含む (図 1 A) 。このプラスミドは組換え H i a を発現するために使用した (下記の実施例 9) 。

【0090】

実施例 2

この実施例は抗 M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s 野生株高分子量アドヘシン抗体による r H i a の識別を例示するものである。

【0091】

インフルエンザ菌の H i a 蛋白質と前述した米国特許第 5 , 8 0 8 , 0 2 4 号の中で M . c a t a r r h a l i s 2 0 0 k D a 蛋白質として分類される M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s 高分子量アドヘシン (図 2 8) との間にはいくつかの配列不変性が認められる。米国特許第 5 , 8 0 8 , 0 2 4 号の記載では、M . c a t a r r h a l i s 野生株 2 0 0 k D a 蛋白質がゲル精製され、テンジクネズミの抗野生株 2 0 0 k D a 抗体が生成された。T 7 h i a 遺伝子はプラスミド D S - 2 0 0 8 - 2 - 3 から発現され、r H i a 蛋白質を含む細胞培養物がニトロセルロース膜に電気泳動的に転写された。抗野生株 2 0 0 k D a 抗体を使用した免疫ブロット分析から、この抗体が図 2 に見られるように、r H i a 蛋白質を認識することが示された。

【0092】

実施例 3

この実施例は T 7 h i a (1 1) 遺伝子カセットのタンデムコピーを含むプラスミド D S - 2 0 9 2 - 1 および D S - 2 0 9 2 - 4 0 の構造を説明するものである。

【0093】

全長のそろった組換え H i a 蛋白質の生成を向上させるために、菌株 1 1 の h i a 遺伝子 (実施例 1) を含む T 7 h i a 遺伝子カセットのタンデムコピーを単一のベクターに挿入した。プラスミド D S - 2 0 0 8 - 2 - 3 を B g l I I で直線化させ、脱リン酸化した。プラスミド D S - 2 0 0 8 - 2 - 3 はまた、T 7 h i a 遺伝子カセットを切り取るために B g l I I および B a m H I によっても切断された。この T 7 h i a 断片を直線化したベクターに連結し、反時計回り方向に配向して 2 つの T 7 h i a 遺伝子コピーを含むプラスミド D S - 2 0 9 2 - 1 (a , a) および反対方向に配向してタンデムコピーを含むプラスミド D S - 2 0 9 2 - 4 0 (a , c) (図 3) を生成した。どちらの作製試料からも r H i a 発現における顕著な向上は認められなかった (下記の実施例 9 参照

10

20

30

40

50

）。

【0094】

実施例 4

この実施例は末端欠失した菌株 11 の h i a 遺伝子を発現するプラスミドの作製を説明するものである。

【0095】

T7 h i a 遺伝子カセットの単一またはタンデムのコピーからの r H i a 蛋白質生成量は非常に低く、この蛋白質は（下記の実施例 9 で説明するように）E. c o l i に対する毒性を有するようであった。インフルエンザ菌の H i a は表面露出したアドヘシン分子であるので、分泌をするためにはシグナル配列または補助蛋白質のいずれかを使用しなければならないが、しかし関連の補助遺伝子は判明していない。もしも E. c o l i 中での組換え蛋白質発現のためにシグナル配列が除去された場合、r H i a は封入体として発現され、毒性効果が低減される可能性がある。推定されるシグナル配列および切断部位を分類し、N 末端で末端欠失した r H i a 蛋白質を発現する 4 種類の作製試料を設計した（図 4）。菌株 11 の h i a 遺伝子では開始コドンから約 500 b p に独特の S t y I 切断部位が存在する。プラスミド D S - 2008 - 2 - 3 を N d e I および S t y I で切断し、5.7 kb のベクター断片を精製した（図 5 A）。末端欠失部位から S t y I 切断部位までを増幅するために P C R プライマーを設計し、末端欠失したクローンを選別するためにアンチセンスプライマーに独特の N h e I 切断部位を導入した（図 5 B）。増幅した断片は、より操作を容易にするために p C R I I 中でサブクローン化し、プラスミド D S - 2153 R - 1 - 2（E21）、D S - 2165 - 4 - 8（T33）、D S - 2153 - 3 - 5（V38）、および D S - 2153 - 4 - 4（N52）を生成した。この p C R I I h i a プラスミドを N d e I および S t y I で切断し、断片を D S - 2008 - 2 - 3 から得たベクター片と連結した。プラスミド D S - 2186 - 1 - 1（E21）、D S - 2201 - 1（T33）、D S - 2186 - 2 - 1（V38）、および D S - 2168 - 2 - 6（N52）を、カッコ内に示した T7 プロモーターおよび末端欠失した h i a 遺伝子を含ませて生成した。これらのプラスミドは組換え H i a を発現させるために使用した（下記の実施例 9 参照）。

【0096】

実施例 5

この実施例は T7 V38 h i a（11）カセット、E. c o l i c e r 遺伝子、およびカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド B K - 96 - 2 - 11 の作製を説明するものである。

【0097】

プラスミド D S - 1843 - 2 は多数のクローン化部位および 2 つの転写終結部が E c o R I および P s t I 部位の間でオリゴヌクレオチド上に導入され、これによってクロラムフェニコールおよびアンピシリン耐性遺伝子の両方が破壊された p B R 328 を基にしたプラスミドである（図 6 B）。p U C - 4 K から得たカナマイシン耐性遺伝子を S a l I 部位に挿入し、カナマイシン耐性でかつテトラサイクリン感受性のプラスミド D S - 2147 - 1 を生成した。プラスミド D S - 2224 - 1 - 4 はオリゴヌクレオチドから作製して B a m H I 切断部位に接する合成の E. c o l i c e r 遺伝子（r e f. 15）を含む p U C プラスミドである。この c e r 遺伝子の 290 b p の B a m H I 断片を D S - 2147 - 1 の B a m H I 部位に挿入してプラスミド B K - 2 - 1 - 2 を作製した。その結果、この p B R を基にしたプラスミドは多数のクローン化部位、カナマイシン耐性遺伝子および c e r 遺伝子を含む。プラスミド B K - 2 - 1 - 2 は B g l I I で直線化し、脱リン酸化した。プラスミド D S - 2186 - 2 - 1 を B g l I I および B a m H I で切断し、3.6 kb の T7 V38 h i a 断片を B K - 2 - 1 - 2 に挿入してプラスミド B K - 96 - 2 - 11 を作製した（図 6 A）。

【0098】

実施例 6

10

20

30

40

50

この実施例はE. coli cer 遺伝子の存在下で全長のそろったNTHi 菌株33のhia 遺伝子を発現するプラスミドDS-2242-1およびDS-2242-2の作製を説明するものである。

【0099】

NTHi 菌株33から染色体DNAを精製し、オリゴヌクレオチド5039. SLおよび5040. SL (図17)を使用してPCR増幅を実施した。センスプライマー (5040. SL) は菌株11のhiaの5' 隣接配列を基にして設計したものであって、NTHi HiaおよびHib Hsf蛋白質のアミノ末端配列を保存していた。アンチセンスプライマー (5039. SL) は実施例1で述べたものと同じであって、HiaおよびHsf蛋白質のカルボキシ末端配列の保存を基本とした。菌株33の3kbのhia PCR断片をPCR II中でクローン化し、プラスミドDS-1917-3-8を作成した。

10

【0100】

全長のそろった菌株33 hia 遺伝子を発現させるために、この遺伝子の5' 末端の、開始コドンからAlwNI 切断部位まで (図7B) の、およそ106bpをオリゴヌクレオチドから合成した。プラスミドDS-1917-3-8をAlwNIおよびBamHIで切断し、hia 遺伝子を含む約2.9kbの断片を精製した。プラスミドpT7-7をNdeIおよびBamHIで切断し、NdeI-AlwNIオリゴヌクレオチドおよびAlwNI-BamHI hia断片をこのpT7-7ベクターに連結してプラスミドDS-2103-4を作製した。

20

【0101】

E. coli cer 遺伝子を含ませ、カナマイシンによる選択を使用するために、T7 hia (33) 遺伝子カセットを含むBgIII-BamHI断片をDS-2103-4から切り取り、BgIIIで切断されて脱リン酸化されたBK-2-1-1中でクローン化した。プラスミドDS-2242-1およびDS-2242-2は反対方向に配向したT7 hia (33) 遺伝子カセットの単一コピー、E. coli cer 遺伝子、およびカナマイシン耐性遺伝子を含む (図7A)。

【0102】

実施例7

この実施例は末端欠失したV38 菌株33のhia 遺伝子をもつT7 hia 遺伝子カセット、E. coli cer 遺伝子、およびカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドDS-2340-2-3の作製を説明するものである。

30

【0103】

NTHi 菌株33 hia 遺伝子の、V38開始コドンから内側のSnaBI 切断部位に至るまでの、5' 末端の250bp断片を増幅するためにPCRプライマーを設計した。クローン化を目的として5' 末端にNdeI 切断部位を追加し、鋳型としてプラスミドDS-2242-1を使用してこの断片を増幅した。この構成図式は図8Aに示されており、PCRプライマーは図8Bに示されている。この断片をPCR IIにクローン化し、プラスミドDS-2328-1-1を作製した。DS-2242-1をNdeIおよびSnaBIで切断し、8.5kbのベクター断片を精製した。DS-2328-1-1をNdeIおよびSnaBIで切断し、その0.25kbの5' hia断片をDS-2242-1から得た8.5kbのベクター断片と連結してプラスミドDS-2340-2-3を作製した。

40

【0104】

実施例8

この実施例はT7 V38 hia (11) またはT7 V38 hia (33) 遺伝子カセットのタンデムコピーをそれぞれと、E. coli cer 遺伝子、およびカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドDS-2447-2およびDS-2448-17の作製を説明するものである。

【0105】

50

T7 V38 h i a (11) 遺伝子カセットを含むプラスミドBK-96-2-11をBg1 IIで直線化し、脱リン酸化した。DS-2186-2-1から得たBg1 II-I-BamH I T7 V38 h i a (11) 遺伝子カセットをBK-96-2-11に連結し、同じ配向でT7 V38 h i a (11) 遺伝子のタンデムコピーを含むプラスミドDS-2447-2を作製した(図9A)。

【0106】

プラスミドDS-2340-2-3をEcoRIで切断し、そのT7 V38 h i a (33) 遺伝子カセットを、EcoRIで切断して脱リン酸化したpUC-BgXbにサブクローン化した。その結果得られたプラスミドDS-2440-2をBg1 IIおよびBamH Iで切断してT7 V38 h i a (33) カセットを放出させ、Bg1 IIで直線化して脱リン酸化したDS-2340-2-3とそれを連結した。プラスミドDS-2448-17は同じ配向でタンデムのT7 V38 h i a (33) 遺伝子を含む(図9B)。

【0107】

実施例9

この実施例は全長のそろったおよび末端欠失した組換えh i a遺伝子の発現を説明するものである。

【0108】

先行の実施例で説明したようにして調製した発現プラスミドのDNAを、BioRad社のエレクトロポレータを使用して電子的に受容可能となったE. coli BL21 (DE3) 細胞に導入した。細胞は適切な抗生物質選別を使用して、ラクトースを1.0%になるまで加える前に、A₅₇₈が0.3となるまでNZCYM培地中で37℃にて4時間成育させた。サンプルはSDS-PAGE分解液+負荷バッファで0.2OD/μlとなるよう調整し、それぞれの蛋白質サンプルを同じ量でSDS-PAGEゲル(ref. 22)に流した。図10は種々の作製試料からのrH i a (11) 蛋白質相対生成量を図解したものである。パネルAに見られるように、rH i aのサイズが低下するにつれて生成量の増加が認められる。V38-(レーン5)およびN52-末端欠失rH i a (レーン6)はそれらのさらに長い相当物質(レーン2、3、4)よりも有意差をもって高い発現レベルを有する。加えて、パネルBはV38 rH i aの生成がc e r遺伝子の存在下で明らかに増加することを示している。

【0109】

実施例10

この実施例はrH i a蛋白質の精製について説明するものである。

【0110】

すべての組換えH i a蛋白質はE. coli中で封入体として発現され、同じ手法によって精製された(図11)。500mlの培養物から得たE. coli細胞ペレットを0.1MのNaClを含むpH8.0の50mMトリス塩酸50ml中に再懸濁し、超音波破碎した。この抽出物を20,000×gで30分間遠心分離し、その結果生じた上清を廃棄した。このペレット(PPT₁)をさらに0.5%Triton X-100および10mM EDTAを含む50mlの50mMトリス塩酸、pH8.0で抽出処理し、それから20,000×gで30分間遠心分離して上清を廃棄した。このペレット(PPT₂)をさらに1%のオクチルグルコシドを含む50mlの50mMトリス塩酸、pH8.0で抽出し、それから20,000×gで30分間遠心分離して上清を廃棄した。

【0111】

以上の抽出処理後に結果として得られたペレット(PPT₃)は封入体を含んでいる。このペレットを6Mのグアニジンおよび5mMのDTTを含む6mlの50mMトリス塩酸、pH8.0に溶解した。この溶液に12mlの50mMトリス塩酸、pH8.0を加え、混合液を20,000×gで30分間遠心分離した。この上清(SUP₄)を終濃度7%のポリエチレングリコール(PEG)4000で沈降させた。その結果生じたペレット(PPT₅)を20,000×gで30分間遠心分離して除去し、上清を50%飽和の硫

酸アンモニウムで沈降させた。硫酸アンモニウムによる沈降物は20,000×gで30分間遠心分離して採取した。結果として得られたペレット(PPT₆)を6Mのグアニジン塩酸および5mMのDTTを含む2mlの50mMトリス塩酸、pH8.0に溶解し、この透明な液体を、2Mのグアニジン塩酸を含む50mMトリス塩酸、pH8.0で平衡化したSuperdex200ゲル濾過カラムで精製した。画分はSDS-PAGEによって分析し、精製されたrHiaを含む画分をプールし、4℃でPBSに対して一晩透析し、その後、20,000×gで30分間遠心分離した。これらの条件では蛋白質は可溶性を維持しており、-20℃で保存するためにこのrHia調製液にグリセロールを終濃度20%で加えた。精製されたV38 rHia(11)およびV38 rHia(33)のSDS-PAGE分析は図12に図解されている。精製V38 rHia蛋白質の平均収率は約10mg/L培地である。 10

【0112】

rHiaの安定性を調べるために、精製したV38 rHia(11)蛋白質は4℃でグリセロールなしまたは入れて保存するか、あるいはグリセロールを入れて-20℃で保存した。この蛋白質は3つの条件すべてにおいて安定であることが分かり、凍結と解凍を繰り返して少なくとも8週間は完全さを維持した(図13)。

【0113】

実施例11

この実施例はV38 rHia(11)およびV38 rHia(33)蛋白質の免疫原性を説明するものである。 20

【0114】

日程1において完全フロイントアジュバント(CFA、Difco)で乳化した5μgの抗原を筋肉内(i.m.)注入して二匹のテンジクネズミ(Charles River)を免疫感作させることによってrHia蛋白質に対する高度免疫抗血清を生成させた。日程14および28において不完全フロイントアジュバント(IFA)に加えた蛋白質5μgを投与して動物を追加免疫応答させ、日程42において血清を集めた。免疫原として熱で不活化したバクテリア調製物(1回の投与量 1×10^8 cfu)を使用した以外は同じプロトコルを使用して、抗Hib菌株MinnAおよび抗ヘモフィルス属菌株ATCC 9006抗血清を作製した。

【0115】

V38 rHia蛋白質の免疫原性を調べるために、5匹のCD-1マウス(Charles River, Quebec)の複数グループを日程1および28において、リン酸アルミニウム(alum)の存在下(1回の投与量1.5mg)で0.3、1、3、および10μgの抗原によりs.c.免疫感作させた。血液サンプルを日程1、28および42において集めた。顕著に抗V38 rHia抗体を生成したマウスは抗体0.3μgを1回注入されても応答を示し(図14、パネルA)、両方の蛋白質ともに封入体抽出および可溶化処理の後でも免疫原性を維持することを示唆している。菌株11または33に由来するV38 rHia蛋白質によって誘導される抗体力価において統計学的に顕著な差異は認められなかった。 30

【0116】

BALB/cマウスにおいてV38 rHia(11)蛋白質の免疫原性を調べるために、5匹の動物(Charles River, Quebec)の複数グループを日程1、28および42において、リン酸アルミニウムの存在下(1回の投与量1.5mg)で抗原0.3、1、3、および10μgによりs.c.免疫感作させた。血液サンプルは日程1、14、28、42および56において集めた。すべてのグループにおいて高い抗体力価が認められ、この蛋白質が1回の投与量0.3μgにおいてさえ強度の免疫原性であることを示した(図15、パネルA)。 40

【0117】

テンジクネズミにおいてV38 rHia(11)蛋白質の免疫原性を調べるために、5匹の動物(Charles River, Quebec)の複数グループを日程1、28 50

および42において、リン酸アルミニウムの存在下（1回の投与量1.5mg）で抗原0.3、1、3、および10μgによりs.c.免疫感作させた。血液サンプルは日程1、14、28、42および56において集めた。すべてのグループにおいて高い抗体力価が認められ、この蛋白質がテンジクネズミにおいてもまた強度の免疫原性であることを示した（図15、パネルB）。

【0118】

実施例12

この実施例は菌血症の無抵抗な幼齢ラットのモデルにおいて抗rHia抗体によって生じる防御の分析を説明するものである。

【0119】

妊娠中のWistarラットをCharles Riverから入手した。インフルエンザ菌b型の菌血症モデルでは、6~10匹の5日齢の幼齢ラットのグループを、テンジクネズミの抗rHiaまたは抗菌株MinnA抗血清0.1ml、背面でs.c.注入した。比較対照の動物には免疫感作前の血清のみを注入した。20時間後、元気に生育したHib菌株MinnAを200~240コロニー形成ユニット（cfu）で（0.1ml）腹腔内（i.p.）抗原投与した。血液サンプルを抗原投与後20時間に、イソフルラン麻酔して心臓に針を刺して集め、チョコレート寒天培地にまいた。1日後、コロニーをカウントしてその結果をフィッシャー検定（Fisher's Exact test）によって統計学的に分析した。

10

【0120】

インフルエンザ菌a型菌血症モデル（ref. 23）では、9~10匹の5日齢の幼齢ラットのグループを、テンジクネズミの抗rHiaまたは抗菌株ATCC9006抗血清0.1ml、背面でs.c.注入した。比較対照グループの動物にはテンジクネズミの免疫感作前の血清を注入した。20時間後、元気に生育したインフルエンザ菌a型菌株ATCC9006を（0.1ml）100,000cfuで動物にi.p.抗原投与した。血液サンプルを抗原投与の20時間後に集めて上述のように分析した。

20

【0121】

後述の表1および2に示したように、テンジクネズミの抗rHia（11）または抗V38 rHia（11）抗血清のいずれかで受動免疫感作された幼齢ラットは、菌血症を引き起こしたインフルエンザ菌a型またはb型に対してすべてが顕著に防御された。これらの結果は、インフルエンザ菌a型またはb型によって引き起こされる菌血症に対して動物を防御することにおいて、わずかに末端欠失したHia蛋白質（V38 rHia）に対応して生成した抗体が全長のそろった蛋白質に対応して生成したものと同程度に効果的であることを示している。NTHi由来の組換え蛋白質によって生じる、被包性のバクテリアによって引き起こされる侵襲性の疾病に対するそのような防御はrHia蛋白質のワクチン抗原としての有用性を説明するものである。

30

【0122】

実施例13

この実施例は鼻咽頭部でのコロニー形成のチンチラのモデルにおいて、V38 rHia蛋白質の免疫感作によって生じる防御を説明するものである。

40

【0123】

鼻咽頭部のコロニー形成モデルはYangらによって報告された（ref. 20）。このモデルは、HMWアドヘシンを産生するNTHi菌株については適切であるが、しかしHiaを産生する菌株では同じ条件で再現性のあるコロニー形成は達成できなかった。原型のHia産生NTHi菌株11で繰り返したコロニー形成の試みは不成功であった。原型のHMW産生NTHi菌株12ではわずか 10^8 cfuしか必要としなかったのに比べて、NTHi菌株33では1回の植菌当たり 5×10^8 cfuでコロニー形成が達成された。これらの条件下では、100μgのV38 rHia（33）で免疫感作され、同様のNTHi菌株33で抗原投与された動物において部分的な防御が認められた。

【0124】

50

実施例 1 4

この実施例はインフルエンザ菌株に由来する追加の h i a 遺伝子のクローン化および配列分析を説明するものである。

【0125】

保存されたプロモーター、h i a および h s f 遺伝子および蛋白質の N 末端および C 末端配列に基づいて、P C R 増幅のためのオリゴヌクレオチド (5 0 4 0 . S L および 5 0 3 9 . S L) を設計した (図 1 7) 。 P C R 増幅のための選択菌株は抗 r H i a (1 1) 抗血清との反応性に基づいて選んだ。

【0126】

N T H i 菌株 1 2、2 9、3 2、M 4 0 7 1、K 9 および、K 2 2 およびヘモフィルス c 型菌株 A P I から染色体 D N A を調製した。P C R 増幅は以下のようにして実施した。それぞれの反応混合液には 5 ~ 1 0 0 n g の D N A、それぞれ 1 μ g のプライマー、5 ユニットの t a q + または t s g + (S a n g o n) または t a q プラスロング (S t r a t a g e n e)、2 m M の d N T P s、2 0 m M のトリス塩酸 (p H 8 . 8)、1 0 m M の塩化カリウム、1 0 m M の硫酸アンモニウム、2 m M の硫酸マグネシウム、0 . 1 % の T r i t o n X - 1 0 0、B S A を含ませた。サイクル条件は、9 5 ° C で 1 分間、その後、9 5 ° C で 3 0 秒、4 5 ° C で 1 分間、7 2 ° C で 2 分間のサイクルを 2 5 サイクル行い、その後、7 2 ° C で 1 0 分間とした。

【0127】

菌株 3 3 の h i a 遺伝子のヌクレオチドおよびそれに由来するアミノ酸の配列が図 1 8 に示されている。予測された菌株 3 3 由来の H i a 蛋白質は 1 0 3 . 6 k D a の分子量を有し、p I が 9 . 4 7 であった。菌株 3 2 の h i a 遺伝子のヌクレオチドおよびそれに由来するアミノ酸の配列は図 1 9 に示されている。予測された菌株 3 2 由来の H i a 蛋白質は 7 0 . 4 k D a の分子量を有し、p I が 5 . 6 7 であった。残基 4 9 3 と 4 9 6 との間には K D E L 配列が存在する。そのような配列は小胞体への固定蛋白質に付随するものであった。由来する菌株 3 2 の H i a 蛋白質は顕著により小さくかつ顕著に異なる p I を有するが、しかしながら他の H i a 蛋白質に存在する特色の多くを含んでいる。

【0128】

菌株 2 9 の h i a 遺伝子のヌクレオチドおよびそれに由来するアミノ酸の配列が図 2 0 に示されている。予測された菌株 2 9 の H i a 蛋白質は 1 1 4 . 4 k D a の分子量および 7 . 5 8 の p I を有する。菌株 K 2 2 の h i a 遺伝子のヌクレオチドおよびそれに由来するアミノ酸の配列が図 2 3 に示されている。予測された菌株 K 2 2 の H i a 蛋白質は 1 1 4 . 4 k D a の分子量および 7 . 5 8 の p I を有する。N T H i 菌株 2 9 および K 2 2 に由来する H i a 配列は同一であることが判明した。菌株 2 9 はオハイオ州クリーブランドの中耳炎の生後 7 カ月の乳児から単離され、それに対して菌株 K 2 2 はオーストラリアのキンバリー近郊のアボリジニから単離された。

【0129】

菌株 4 0 7 1 の h i a 遺伝子のヌクレオチドおよびそれに由来するアミノ酸の配列が図 2 1 に示されている。予測された M 4 0 7 1 の H i a 蛋白質は 1 0 3 . 4 k D a の分子量および 9 . 4 9 の p I を有する。残基 5 3 4 と 5 3 7 との間には K D E L 配列が存在する。

【0130】

菌株 K 9 の h i a 遺伝子のヌクレオチドおよびそれに由来するアミノ酸の配列が図 2 2 に示されている。予測された菌株 K 9 の H i a 蛋白質は 1 1 3 . 8 k D a の分子量および 6 . 4 5 の p I を有する。

【0131】

ヘモフィルス c 型菌株 A P I の h i a 遺伝子のヌクレオチドおよびそれに由来するアミノ酸の配列が図 2 4 に示されている。予測された A P I の H i a 蛋白質は 2 4 9 . 4 k D a の分子量および 5 . 3 4 の p I を有する。c 型菌株 A P I の由来する H i a / H s f 配列は 6 0 残基の挿入部があることを除いて公表されている b 型の H s f 配列と殆ど同一である。ここに提示した N T H i に基づく H i a 蛋白質は a 型および b 型感染の受動モデルに

において防御をするので、b型とc型蛋白質との間の配列類似性に起因するc型の疾病に対してもまた防御をすることはありそうである。

【0132】

菌株12のh i a遺伝子座のヌクレオチドおよびそれに由来するアミノ酸の配列が図25に示されている。NTH i 菌株12はH i aを生成しない。しかしながら、h i a遺伝子部分はPCR増幅可能であり、SB12細胞溶解物と抗rH i a抗体とのつじつまの合わない陽性の反応性が存在し、サザンブロットでは菌株11のh i a遺伝子の3'末端に由来するDNAプローブとの反応性がある。PCR増幅したDNAの分析から、上流HI1732関連遺伝子の3'末端の1 kbおよびh i a遺伝子の3'末端の0.8 kbを含む1.8 kbの断片が明らかになった。

10

【0133】

菌株12中のこれら2つの遺伝子の推定される接合部を交差して増幅するであろうプライマーを使用してPCR増幅したところ、この遺伝子座の遺伝子組成が確認された。したがって、菌株12はh i a遺伝子の5'末端の欠失を生じたためにH i aを生成しないようであった。図27は菌株12の上流ORFとRdゲノム由来HI1733蛋白質との配列比較を示すものである。相同の領域によって、これら2つの蛋白質は95%が同一である。

【0134】

NTH i 菌株33、32、29、K22、M4071、11、9およびc型菌株APIからの由来H i a配列のアラインメントが、インフルエンザ菌b型H s f、Rdゲノムのa i d A類似(H s f/H i a) HI1732遺伝子、と菌株4223およびLES-1のM. c a t a r r h a l i s 200kDa蛋白質と比較して図28に示されている。HI1732蛋白質の早期末端欠失の結果生じる、Rdゲノム配列内のフレーム移動が認められる。h i aに関連する付加的な下流配列はここに含まれる。配列の下にある星印は保存された残基を示している。N末端(約50残基)およびC末端配列(約150残基)はヘモフィルス菌株の中で高度に保存されており、M. c a t a r r h a l i sの相応部分とのある程度の類似性は明白である。配列分析から、H i a蛋白質について2つの可能性のある遺伝子集団が存在し、1つは原型の菌株11に関係し、他方はさらに密接に菌株33に関係することは明らかである。菌株11およびK9の蛋白質は、より一層ヘモフィルス菌株のb型、c型またはd型由来のH s f蛋白質に類似しているようであるが、一方で、菌株33、32、29、K22およびM4071の蛋白質は第2の集団を構成するようである。

20

30

【0135】

実施例15

この実施例は末端欠失したS44 菌株11 h i a遺伝子をもつT7 h i a遺伝子カセット、E. c o l i c e r遺伝子、およびカナマイシン抗生物質耐性遺伝子を含むプラスミドJB-2930-3の作製、およびS44 H i a蛋白質の発現を説明するものである。

【0136】

S44アミノ酸から内側のS t y I切断部位までのNTH i 菌株11 h i a遺伝子のS44 H i a N末端(図29)を増幅するためにPCRプライマーを設計した。クロン化を目的として5'末端にN d e I切断部位を追加し、鋳型としてプラスミドDS-2242-1を使用してこの断片を増幅した。この断片をp C R I Iにクロン化してプラスミドJB-2910-1-1を作製した。この構成図式を図30に示す。プラスミドJB-2910-1-1をN d e IおよびS t y Iで切断し、5' PCR h i a断片を単離した。V38 h i a遺伝子を含むプラスミドIA-46-5をN d e IおよびS t y Iで切断し、大きい方の約8.5 kbの断片を精製した。これら2つの精製断片を連結してプラスミドJB-2917-1を作製した。その後、このプラスミドをN d e Iで切断し、ウシ腸のホスファターゼ(CAP)で処理し、プラスミドIA-46-5から得たT7プロモーターをその中でクロン化した。このプロモーターはIA-

40

50

46-5のNde I切断により切り取った。結果として得られたプラスミドJB-2925-3をBgl I IおよびBamH Iで切断してhia遺伝子を単離した。Bgl I I / CAP処理したプラスミドBK-2-1-2にこの断片を連結し、プラスミドJB-2930-3を作製した。このプラスミドはT7プロモーターS44 hia遺伝子およびE. coli cer遺伝子を含み、カナマイシン耐性である。

【0137】

発現を調べるため、組換えS44 hiaベクターをE. coli BL21 (DE3) に転換した。E. coliにおける発現のための手法は実施例9に記載したりである。図31のSDS-PAGE分析は、2つの異なるベクター、(上述の)JB-2930-3およびpETベクターのIA-191-3-1からの組換えS44 hiaの発現を示している。プラスミドIA-191-3-1は、それがlacI^qリプレッサーを含むpETベクターであり、したがって生成するS44 Hiaの量がJB-2930-3からのT7 S44よりも少ないということを除くとJB-2930-3と同じである。このプラスミドは、プラスミドJB-2930-3とともに、図32に示されている。図31は二重のバンド(レーン3)としておよそ116 kDaのS44 Hiaを示している。JB-2930-3から精製したS44 hiaを使用した追加の分析によると、この二重バンドの下側のバンドはC末端の94アミノ酸の末端欠失を有するがN末端と考えられるものはそのまま存在することが判明した。末端欠失したHiaの単離に使用した精製方法は実施例10に記載した通りであった。

10

【0138】

20

(開示の概要)

本開示の概要では、本発明は新たに単離精製した、ヘモフィルスから得たインフルエンザ菌アドヘシン(Hia)蛋白質の全長を有するものおよびN末端欠失したものをコードし、防御力のあるHia蛋白質を遺伝子組換えにより生成することを可能にする核酸分子を提供する。本発明の範囲内での変更態様は可能である。

【0139】

【表1】

表1

菌血症の幼齡ラットモデルにおけるインフルエンザ菌 a 型または b 型に対するテンジクネズミの抗 rHia（全長）抗血清の防御効果。

グループ (#)	テンジクネズミ 血清	抗 rHia 抗体力価	菌血症数／ 抗原投与数	平均 cfu/ 100 μ l 血液
1	抗 a 型	nd	0/10*	0**
2	抗 rHia	204,800	1/10*	0**
3	免疫感作前	<100	7/10	88
グループ (#)	テンジクネズミ 血清	抗 rHia 抗体力価	菌血症数／ 抗原投与数	平均 cfu/ 2.5 μ l 血液
4	抗 MinnA	nd	0/10*	0**
5	抗 rHia	204,800	1/10*	2**
6	免疫感作前	<100	10/10	600

5 日齡の幼齡ラットを、示したテンジクネズミ抗血清または免疫感作前血清 0.1 ml で受動的に s.c.免疫感作させた。20 時間後、生育した元気なインフルエンザ菌 a 型菌株 ATCC9006 (10^5 cfu, 0.1 ml) を#1～3 のグループの幼齡ラットに、生育した元気な Hib 菌株 MinnA (240 cfu, 0.1 ml) を#4～6 のグループの幼齡ラットに i.p.抗原投与した。感染した動物の定義は、#1～3 のグループについては血液 100 μ l から>20 cfu が回収されること、#4～6 のグループについては血液 2.5 μ l から>30 cfu が回収されることとした。

* フィッシャー検定。グループ 3 または 6 の動物と比較したときの統計的有意差 ($P<0.05$) を検出した。

** スチューデントの不對の t 検定。グループ 3 または 6 の動物と比較したときの統計的有意差 ($P<0.05$) を検出した。

nd: 非測定。

【 0 1 4 0 】

【 表 2 】

表 2

菌血症の幼齡ラットモデルにおけるインフルエンザ菌 a 型または b 型に対するテンジクネズミの抗 V38 rHia(SB11) 抗血清の防御効果。

グループ (#)	テンジクネズミ 血清	抗 rHia 抗体力価	菌血症数/ 抗原投与数	平均 cfu/ 20 μ l 血液
1	抗 a 型	nd	0/6*	0**
2	抗 rHia	204,800	1/9*	5**
3	免疫感作前	<100	5/8	165
グループ (#)	テンジクネズミ 血清	抗 rHia 抗体力価	菌血症数/ 抗原投与数	平均 cfu/ 2 μ l 血液
4	抗 MinnA	nd	0/6*	0**
5	抗 rHia	204,800	1/9*	2**
6	免疫感作前	<100	10/10	820

5 日齡の幼齡ラットを示したテンジクネズミ抗血清または免疫感作前血清 0.1 ml で受動的に s.c.免疫感作させた。20 時間後、生育した元気なインフルエンザ菌 a 型菌株 ATCC9006 (10^5 cfu, 0.1 ml) を#1~3 のグループの幼齡ラットに、生育した元気な Hib 菌株 MinnA (190 cfu, 0.1 ml) を#4~6 のグループの幼齡ラットに i.p.抗原投与した。感染した動物の定義は、#1~3 のグループについては血液 20 μ l から>20 cfu が回収されること、#4~6 のグループについては血液 2 μ l から>30 cfu が回収されることとした。

* フィッシャー検定。グループ 3 または 6 の動物と比較したときの統計的有意差 ($P<0.05$) を検出した。

** スチューデントの不對の t 検定。グループ 3 または 6 の動物と比較したときの統計的有意差 ($P<0.05$) を検出した。

nd: 非測定。

【 0 1 4 1 】

参考文献

【 0 1 4 2 】

【表 3】

REFERENCES

1. Barbour, M.L., R.T. Mayon-White, C. Coles, D.W.M. Crook, and E.R. Moxon. 1995. The impact of conjugate vaccine on carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Infect. Dis.* **171**:93-98.
2. Berkowitz et al. 1987. *J. Pediatr.* **110**:509.
3. Claesson et al. 1989. *J. Pediatr.* **114**:97. 10
4. Black, S.B., H.R. Shinefield, B. Fireman, R. Hiatt, M. Polen, E. Vittinghoff, The Northern California Kaiser Permanent Vaccine Study Center Pediatrics Group. Efficacy in infancy of oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine in a United States population of 61,080 children. 1991. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **10**:97-104.
5. Nitta, D.M., M.A. Jackson, V.F. Burry, and L.C. Olson. 1995. Invasive *Haemophilus influenzae* type f disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **14**:157-160. 20
6. Waggoner-Fountain, L.A., J.O. Hendley, E.J. Cody, V.A. Perriello, and L.G. Donowitz. 1995. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens. *Clin. Infect. Dis.* **21**:1322-1324.
7. Madore, D.V. 1996. Impact of immunization on *Haemophilus influenzae* type b disease. *Infectious Agents and Disease* **5**:8-20. 30
8. Bluestone, C.D. 1982. Current concepts in otolaryngology. Otitis media in children: to treat or not to treat? *N. Engl. J. Med.* **306**:1399-1404.
9. Barenkamp, S.J., and E. Leininger. 1992. Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **60**:1302-1313. 40

【 0 1 4 3 】

【表 4】

10. St. Geme III, J.W., S. Falkow, and S.J. Barenkamp. 1993. High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2875-2879.
11. Barenkamp, S.J. 1996. Immunization with high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* modifies experimental otitis media in chinchillas. *Infect. Immun.* 64:1246-1251. 10
12. St. Geme, J.W. and D. Cutter. 1995. Evidence that surface fibrils expressed by *Haemophilus influenzae* type b promote attachment to human epithelial cells. *Molec. Microbiol.* 15:77-85.
13. Barenkamp, S.J. and J.W. St. Geme. 1996. Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. *Molec. Microbiol.* 19:1215-1223. 20
14. St. Geme, J.W., D. Cutter, and S.J. Barenkamp. 1996. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J. Bact.* 178:6281-6287.
15. Patient, M.E., and D.K. Summers. 1993. ColE1 multimer formation triggers inhibition of *Escherichia coli* cell division. *Molec. Microbiol.* 9:1089-1095. 30
16. O'Hagan, DT. 1992. Oral delivery of vaccines. Formulation and clinical pharmaco kinetic considerations. *Clin. Pharmacokinet* 22(t): 1-10.
17. Ulmer et al. 1993. *Curr. Opinion Invest. Drugs* 2:983-989. 40
18. Lockhoff, O., 1991. Glycolipids as immunomodulators: Synthesis and properties.
19. Nixon-George A., et al., 1990. The adjuvant effect of stearyl tyrosine on a recombinant subunit

【 0 1 4 4 】

【表 5】

- hepatitis B surface antigen. J. Immunol 144 (12):4798-4802.
20. Yang, Y-P., S.M. Loosmore, B.J. Underdown, and M.H. Klein. 1998. Nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in chinchillas. Infect. Immun. 66:1973-1980.
 21. Tabor, S., and C.C. Richardson. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1074-1078. 10
 22. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227:680-685.
 23. Loosmore, S.M., Y-P. Yang, D.C. Coleman, J.M. Shortreed, D.M. England, and M.H. Klein. 1997. Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease. Infect. Immun. 65:3701-3707. 20
 24. Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453.
 25. Sellers, P.H. 1974 On the theory and computation of evolutionary distances. J. Appl. Math(Siam) 26:787-793. 30
 26. Waterman, M.S., Smith, T.F. and Beyer, W.A. 1976. Advan. Math. 20:367-387.
 27. Smith, T.F. and Waterman, M.S. 1981 Identification of common molecular subsequences. J. Mol. Biol. 147:195-197.
 28. Sobel, E. and Martinez, H.M. 1985 A multiple Sequence Alignment Program. Nucleic Acid Res. 14:363-374. 40

【図面の簡単な説明】

【図 1 A】

T 7 プロモーターおよび完全長 N T H i 菌株 1 1 の h i a 遺伝子を含むプラスミド D S - 2 0 0 8 - 2 - 3 の制限地図を示す図である。

【図 1 B】

菌株 1 1 の h i a 遺伝子を P C R 増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図 50

である。センス鎖 (5038. SL) : 配列番号1、エンコードされているアミノ酸配列番号2 ; アンチセンス鎖 (5039. SL) : 配列番号3、相補配列番号4、エンコードされているアミノ酸配列番号5。制限酵素部位はB、BamH I ; Bg、BgI I I ; H、Hind I I I ; N、Nde I ; Ps、Pst I ; Sty、Sty I である。他の略語はT7p、T7プロモーター ; ApR、アンピシリン耐性である。

【図2】

抗ネイティブ *Moraxella catarrhalis* の高分子量アドヘシン抗体による、完全長 *rHia* タンパク質の認識のイムノブロットを示す図である。レーン1、非誘導型 DS-2043-1 ; レーン2、4時間かけて誘導された DS-2043-1 ; レーン3、非誘導型 DS-2043-2 ; レーン4、4時間かけて誘導された DS-2043-2 ; レーン5、分子量マーカー。DS-2043-1 および DS-2043-2 は、BL21 (DE3) 内の pT7hia (11) の独立したクローンである。 10

【図3】

菌株11の *hia* 遺伝子用の T7hia 遺伝子カセットのタンデムコピーを含むプラスミド DS-2092-1 および DS-2092-40 の構築を示す図である。制限酵素部位はB、BamH I ; Bg、BgI I I ; H、Hind I I I ; Ps、Pst I ; Xb、Xba I である。他の略語はCAP、子牛のアルカリホスファターゼ ; T7p、T7プロモーター ; ApR、アンピシリン耐性である。

【図4】

菌株11の *Hia* タンパク質の切断部位 (配列番号6) を示す図である。 20

【図5A】

菌株11からの切断型 *hia* 遺伝子を発現するプラスミドの構築を示す図である。制限酵素部位はB、BamH I ; Bg、BgI I I ; H、Hind I I I ; N、Nde I ; Nhe、Nhe I ; Ps、Pst I ; R、EcoR I ; Sty、Sty I ; Xb、Xba I である。他の略語はT7p、T7プロモーター ; ApR、アンピシリン耐性 ; KanR、カナマイシン耐性である。

【図5B】

切断型遺伝子用に5'断片をPCR増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。E21切断部 : センス (5524. SL) : 配列番号7、エンコードされているアミノ酸配列番号8 ; T33切断部 : センス (5525. SL) : 配列番号9、エンコードされているアミノ酸配列番号10 ; V38切断部 : センス (5526. SL) : 配列番号11、エンコードされているアミノ酸配列番号12 ; N52切断部 : センス (5527. SL) : 配列番号13、エンコードされているアミノ酸配列番号14 ; アンチセンス (5528. SL) : 配列番号15、相補配列番号16、エンコードされているアミノ酸配列番号17。 30

【図6A】

NTHi 菌株11および大腸菌の *cer* 遺伝子からの V38 *hia* 遺伝子を含むプラスミド BK-96-2-11 の構築を示す図である。制限酵素部位はB、BamH I ; Bg、BgI I I ; K、Kpn I ; N、Nde I ; P、Pst I ; R、EcoR I ; S、Sal I ; Sm、Sma I ; Sty、Sty I ; Xb、Xba I ; Xho I である。他の略語はT7p、T7プロモーター ; ApR、アンピシリン耐性 ; KanR、カナマイシン耐性 ; CAP、子牛のアルカリホスファターゼ ; tt1、trpAからの転写ターミネーター1 ; tt2、T7遺伝子10からの転写ターミネーター2である。 40

【図6B】

複数のクローン部位および転写ターミネーターを構築するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。「R」および「Ps」はEcoR I または Pst I の端部とオーバーラップする末端を示すが、これらの部位を再び生成するわけではない。上側鎖 (配列番号50)、下側 (配列番号51)。

【図7A】

T7プロモーターおよび完全長のNTHi菌株33のh i a遺伝子、大腸菌のc e r遺伝子およびカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドDS-2241-1およびDS-2242-2の構築を示す図である。制限酵素部位はA、A l w N I ; B、B a m H I ; B g、B g l I I ; H、H i n d I I I ; K、K p n I ; N、N d e I ; P s、P s t I ; R、E c o R I ; S、S a l I ; S m、S m a I ; ; X b、X b a I ; X h o、X h o Iである。他の略語はT7p、T7プロモーター；A p R、アンピシリン耐性；K a n R、カナマイシン耐性；t t 1、t r p Aからの転写ターミネーター1；t t 2、T7遺伝子10からの転写ターミネーター2である。

【図7B】

鎖（配列番号52）、相補鎖（配列番号53）、およびエンコードされているアミノ酸配列（配列番号54）をコードしている菌株33のh i a遺伝子の5'末端を生成するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。

【図8A】

T7プロモーターおよび菌株33からのV38遺伝子、大腸菌のc e r遺伝子およびカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドDS-2340-2-3の構築を示す図である。制限酵素部位はB、B a m H I ; B g、B g l I I ; H、H i n d I I I ; N、N d e I ; P s、P s t I ; R、E c o R I ; S、S a l I ; S n、S n a B I ; ; X b、X b a Iである。他の略語はT7p、T7プロモーター；A p R、アンピシリン耐性；K a n R、カナマイシン耐性；t t 1、t r p Aからの転写ターミネーター1；t t 2、T7遺伝子10からの転写ターミネーター2である。

【図8B】

切断型遺伝子用の5'端をPCR増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。センス（6286.SL）：配列番号16、エンコードされているアミノ酸配列番号17；アンチセンス（6287.SL）：配列番号18、相補配列番号19、エンコードされているアミノ酸配列番号20。

【図9Aおよび9B】

T7のV38h i a（11）およびT7のV38h i a（33）遺伝子のタンデムコピーをそれぞれ含むプラスミドDS-2447-2およびDS-2448-17の構築を示す図である。制限酵素部位はB、B a m H I ; B g、B g l I I ; H、H i n d I I I ; P s、P s t I ; R、E c o R I ; S、S a l I ; X b、X b a Iである。他の略語はT7p、T7プロモーター；A p R、アンピシリン耐性；K a n R、カナマイシン耐性；C A P、子牛のアルカリホスファターゼ；t t 1、t r p Aからの転写ターミネーター1；t t 2、T7遺伝子10からの転写ターミネーター2である。

【図10】

r H i aの発現を示す図である。パネルA：レーン1、誘導されていない完全長r H i a（11）；レーン2、完全長r H i a（11）；レーン3、E21r H i a（11）；レーン4、T33r H i a（11）；レーン5、V38r H i a（11）；レーン6、N52r H i a（11）。パネルB：レーン1、誘導されていないV38r H i a（11）；レーン2、V38r H i a（11）；レーン3、V38r H i a（11）／c e r。

【図11】

r H i aの精製スキームを示す図である。略語はS P、上澄み；P P T、沈殿；D T T、ジチオスレイトール；O G、オクチルグルコシドであり、（x）は捨てられたことを意味する。

【図12】

パネルAおよびBを有し、精製されたr H i aのSDS-PAGE分析を示す図である。パネルAは菌株11からの精製されたV38r H i aタンパク質を示し、パネルBは菌株33からのV38r H i aタンパク質を示す。レーン1、分子量マーカー；レーン2、全細胞の溶解物；レーン3、未精製抽出物；レーン4、精製されたr H i aタンパク質。

【図13】

パネルA、BおよびCを有し、V38r H i a（11）の安定性を示す図である。パネル

Aは、グリセロールなしで4℃で保存されたサンプルを示す。パネルBは、20%グリセロールの存在下で4℃で保存されたサンプルを示す。パネルCは、20%グリセロールの存在下で-20℃で保存されたサンプルを示す。レーン0は t_0 を示し、レーン1～8は1～8週間保存されたサンプルを示す。

【図14】

パネルAおよびBを有し、CD-1マウスのV38rHia(11)またはV38rHia(33)の免疫原性を示す図である。パネルAは単一の免疫化後の応答を示し、パネルBは最初の／追加の免疫化の応答を示す。

【図15Aおよび15B】

BALB/cマウスおよびモルモットのV38rHia(11)の免疫原性を示す図である。図15Aはマウスにおける抗体の応答を示し、図15Bはモルモットにおける応答を示す。 10

【図16】

チンチラモデルにおける鼻咽頭コロニー形成に対するV38rHia(33)の防御能力を示す図である。

【図17】

追加のhia遺伝子をPCR増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。センス(5040.SL)：配列番号21、エンコードされているアミノ酸配列番号22；アンチセンス(5039.SL)：配列番号3、相補配列番号4、エンコードされているアミノ酸配列番号5。 20

【図18】

NTHi菌株33からのhia遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号23)および演繹アミノ酸配列(配列番号24)を示す図である。

【図19】

NTHi菌株32からのhia遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号25)および演繹アミノ酸配列(配列番号26)を示す図である。

【図20】

NTHi菌株29からのhia遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号27)および演繹アミノ酸配列(配列番号28)を示す図である。

【図21】

NTHi菌株M4071からのhia遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号29)および演繹アミノ酸配列(配列番号30)を示す図である。 30

【図22】

NTHi菌株K9からのhia遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号31)および演繹アミノ酸配列(配列番号32)を示す図である。

【図23】

NTHi菌株K22からのhia遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号33)および演繹アミノ酸配列(配列番号34)を示す図である。

【図24】

c型菌株APIからのhia遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号35)および演繹アミノ酸配列(配列番号36)を示す図である。 40

【図25】

NTHi菌株12からのhia遺伝子座のヌクレオチド配列(配列番号37)および演繹アミノ酸配列(配列番号38)を示す図である。上線または下線を引かれた配列は、2つのorfの接合部を越えてPCR増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す。センス(6431.SL)：配列番号39、(6432.SL)配列番号40；アンチセンス(6295.SL)配列番号41、(6271.SL)配列番号42。

【図26】

米国特許第5,646,259号において公開されている、NTHi菌株11からのhia遺伝子座のヌクレオチド配列(配列番号43)および演繹アミノ酸配列(配列番号44 50

）を示す図である。

【図 27】

菌株 12 の h i a 遺伝子座からの上流 O R F（配列番号 45）の配列および b 型インフルエンザ菌株 R d から H I 1732 タンパク質（配列番号 46）の一部の整列を示す図である。

【図 28】

H i a（配列番号 24、26、28、34、30、44、32）、H s f（配列番号 47）、および菌株 4223 および L E S-1（配列番号 48、49）からの M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s の高分子量タンパク質（200 k D a）からの一部の配列からのアミノ酸配列の整列を示す図である。配列内の星印はストップコドンを示すが、配列の下部では配列の相同性が示された。ドットは同一の残基を示す。配列の整列は、それぞれのタンパク質のアミノ酸配列を直接比較することによって作製された。

10

【図 29】

h i a 遺伝子の 5' 端を S 44 切断位置で P C R 増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。センス（6817. S L）配列番号 49、エンコードされているアミノ酸配列番号 50；アンチセンス（6818. S L）配列番号 51、相補配列番号 52、エンコードされているアミノ酸配列番号 53。

【図 30】

N T H i 菌株 11 から S 44 h i a 遺伝子および大腸菌の c e r 遺伝子および T 7 プロモーターを含む、プラスミド J B-2930-3 の構築を示す図である。制限酵素部位は B、B a m H I；B g、B g l I I；K、K p n I；N、N d e I；P、P s t I；R、E c o R I；S、S a l I；S m、S m a I；S t y、S t y I；X b、X b a I；X h o、X h o I である。他の略語は T 7 p、T 7 プロモーター；A p R、アンピシリン耐性；K a n R、カナマイシン耐性；C A P、子牛のアルカリホスファターゼ；t t 1、t r p A から転写ターミネーター 1；t t 2、T 7 遺伝子 10 から転写ターミネーター 2 である。

20

【図 31】

S 44 から r H i a の発現の S D S-P A G E 分析を示す図である。レーン 1、時間 0 での（誘導なしで）p E T S 44 ベクターからの発現体；レーン 2、4 時間の誘導後の p E T S 44 ベクターからの発現体；レーン 3、4 時間の誘導後の J B-2930-3 から

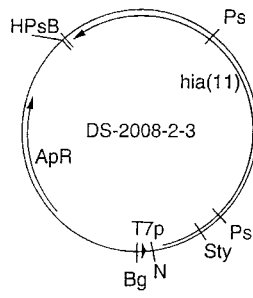
30

【図 32】

発現試験用に使用された 2 つのベクター、S 44 切断型 r H i a の J B-2930-3 および I A-191-3-1 の概略を示す図である。

【図 1 A】

DS-2008-2-3, pT7 hia(11)遺伝子の制限マップ



pT7 hia(11)

FIG.1A

【図 1 B】

発現試験用の完全長菌株11hla遺伝子をPCR増幅するために使用されるオリゴヌクレオチド

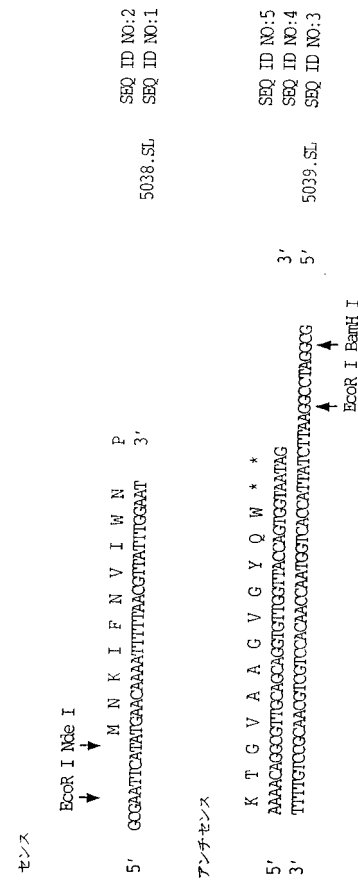
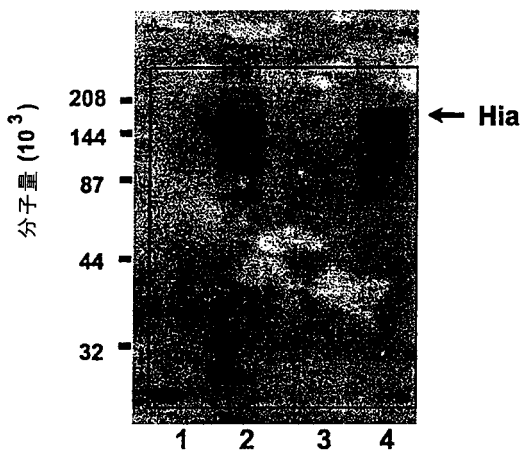


FIG.1B

【図 2】



【図 3】

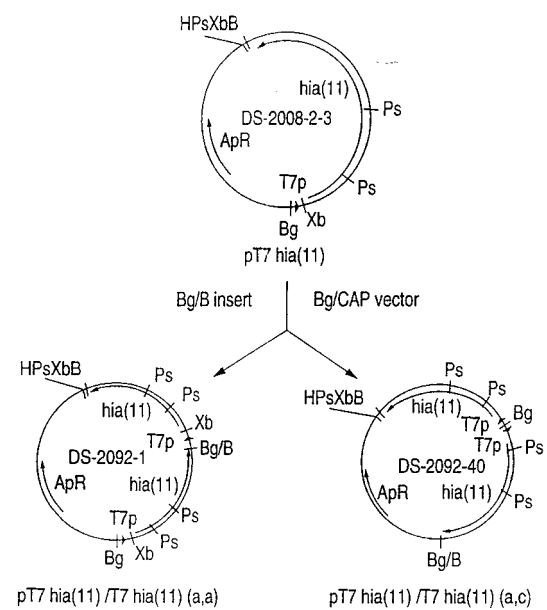
タンデムT7hla(11)遺伝子を含む
プラスミドDS-2092-1およびDS-2092-40の構築

FIG.3

【図 4】

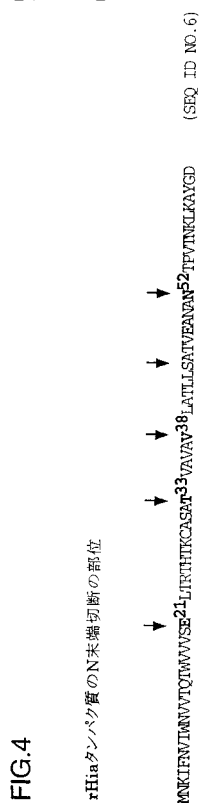
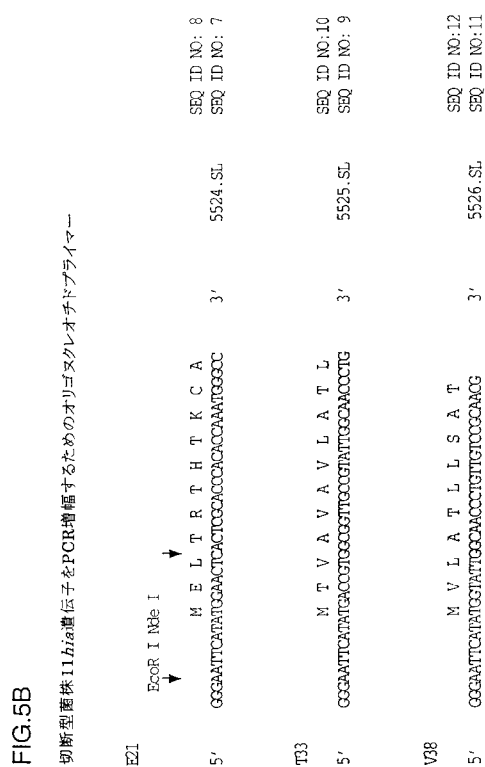


FIG. 4

【 図 5 B 】



【図 5 A】

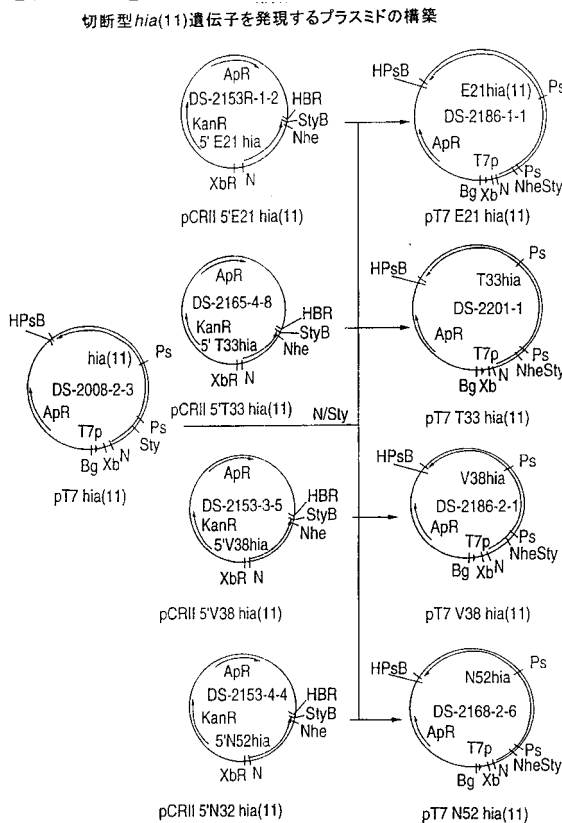
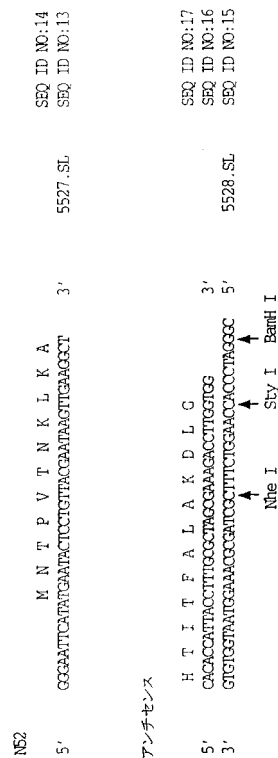


FIG. 5B'



【図 6 A】

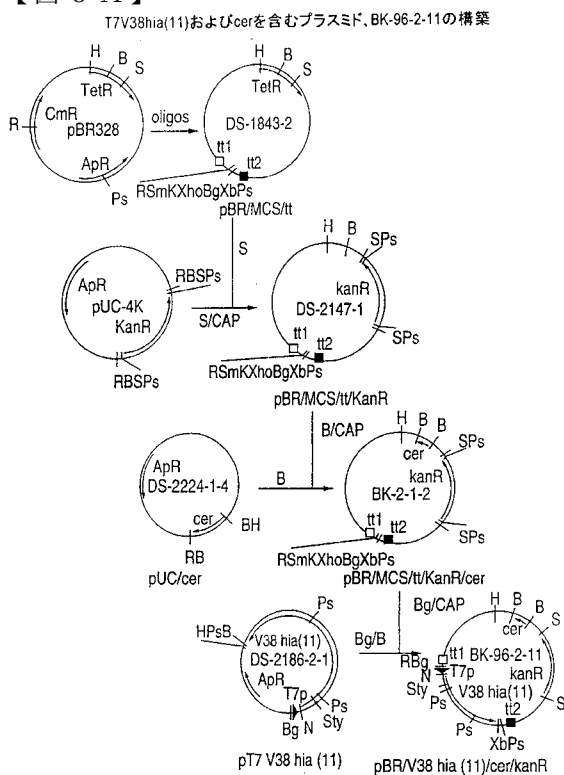


FIG. 6A

【 図 6 B 】

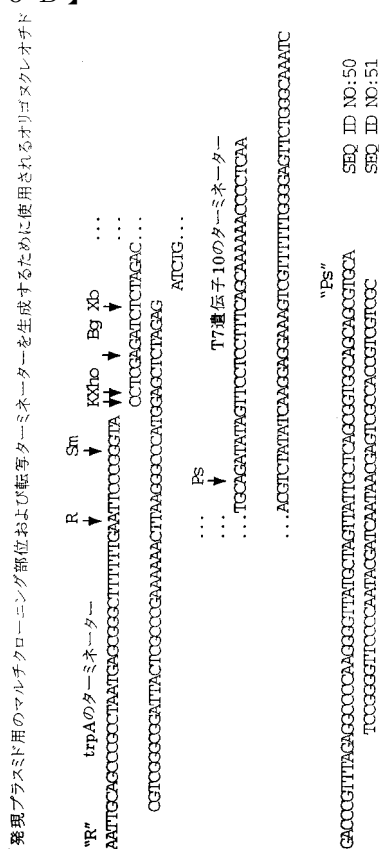


FIG. 6B

【図 7 A】

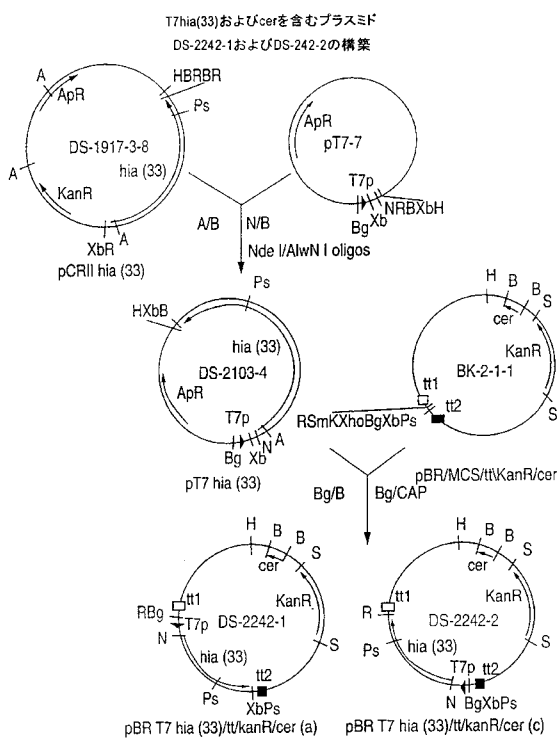


FIG.7A

【図 7 B】

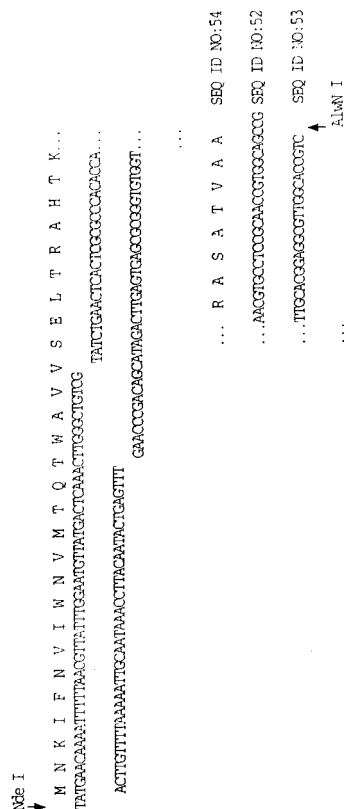


FIG. 7B

【图 8 A】

T7hiaV38(33)およびcerを含むプラスミド、DS-2340-2-3の構築

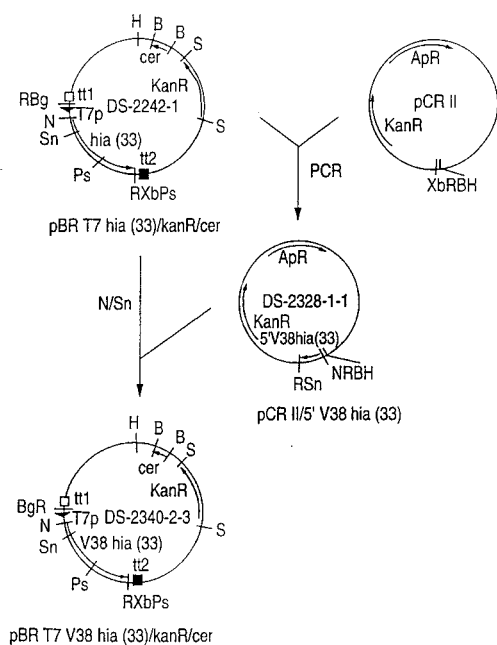


FIG. 8A

【 図 8 B 】

V38コドンからSnaB I部位までの菌株33hla遺伝子をPCR増幅するために使用されるオリゴヌクレオチド

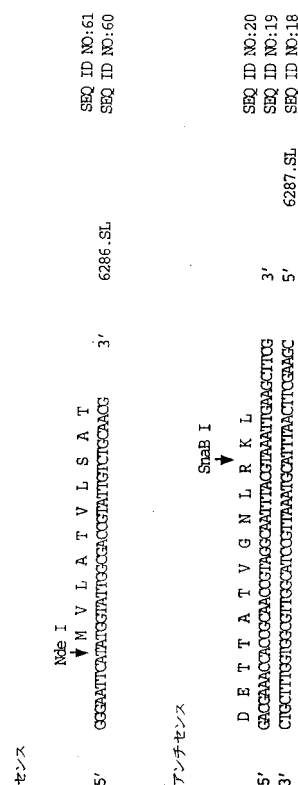


FIG. 8B

【図 9 A】

T7V38hia(11)カセットおよびcerを含むプラスミド、DS-2447-2の構築

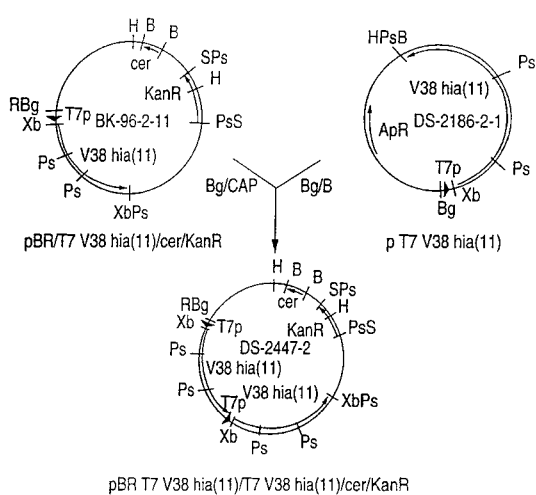


FIG.9A

【 図 9 B 】

T7V38hia(33)カセットおよびcerを含むプラスミド、DS-2448-17の構築

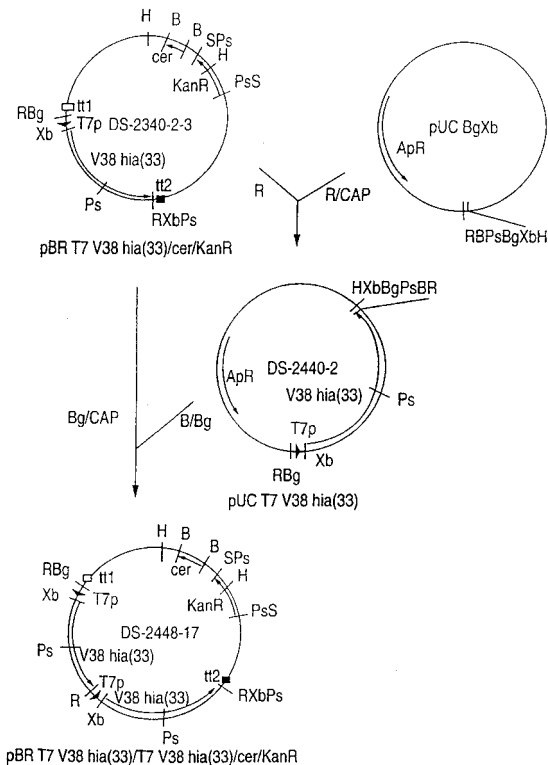
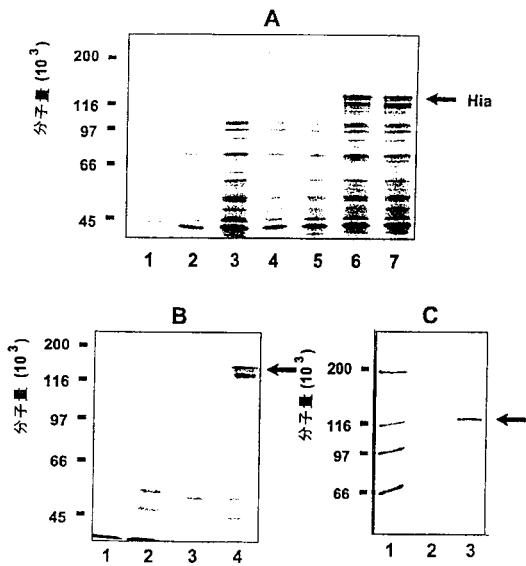
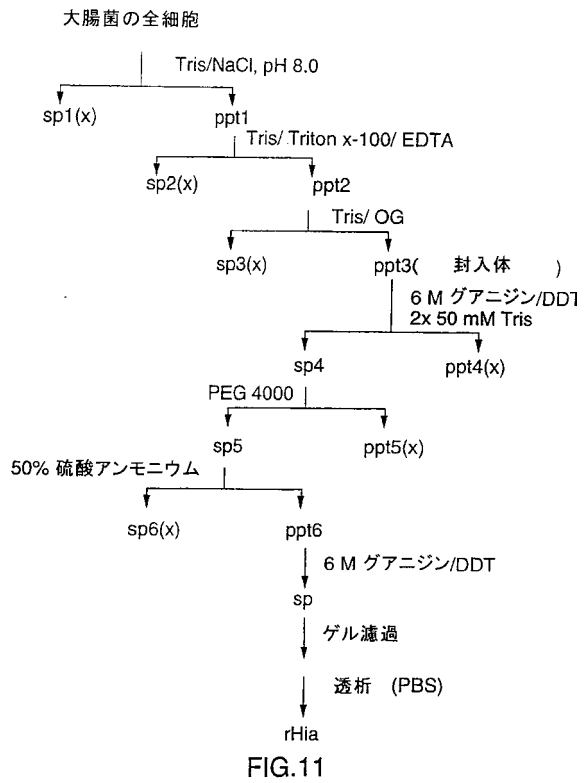


FIG.9B

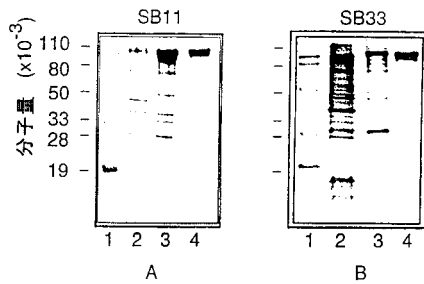
【図 1 0】
FIG.10



【図 1 1】
大腸菌からのrHiaタンパク質の精製



【図 1 2】
大腸菌からのrHia(V38)タンパク質の精製



1. 予め染色された分子量マーカー
2. 大腸菌の全細胞の溶菌産物
3. 未精製抽出物
4. 精製rHiaタンパク質

FIG.12

【図 1 3 A】
rHia(V38/SB11)の安定性

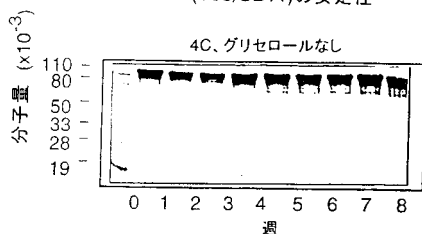


FIG.13A

【図 1 3 B】

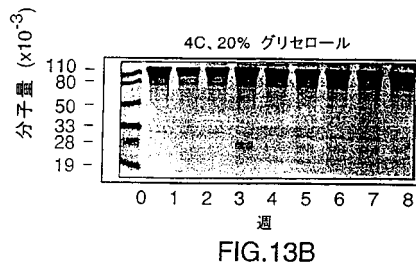


FIG.13B

【図 1 3 C】

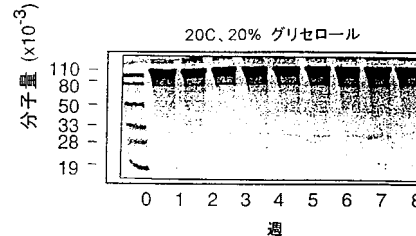
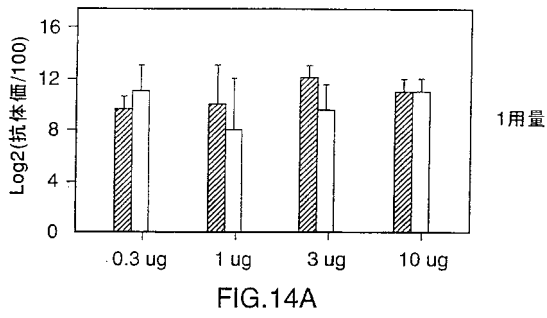


FIG.13C

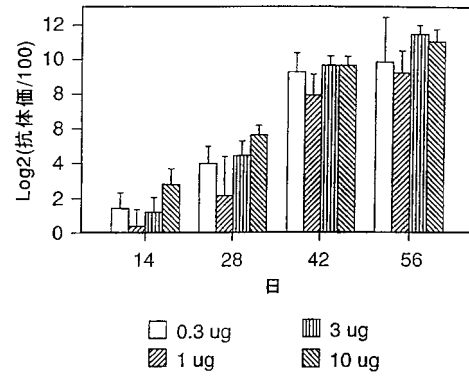
【図 1 4 A】

マウスの抗rHia(V38)抗体価

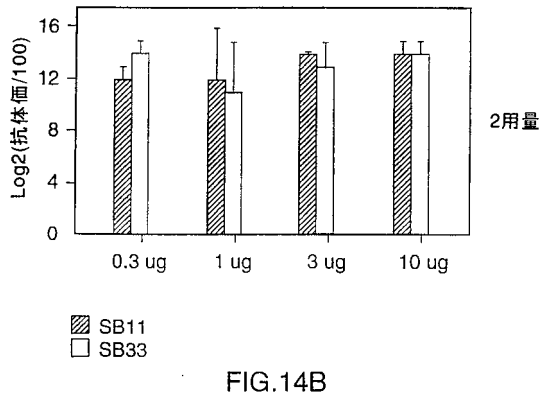


【図 1 5 A】

BALB/cマウスの抗V38rHia(SB11)抗体価

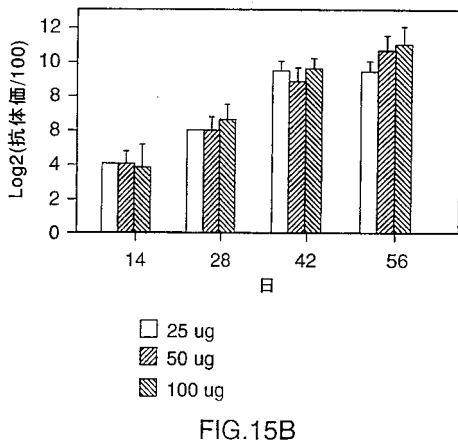


【図 1 4 B】



【図 1 5 B】

モルモットの抗V38rHia(SB11)抗体価



【図 1 6】

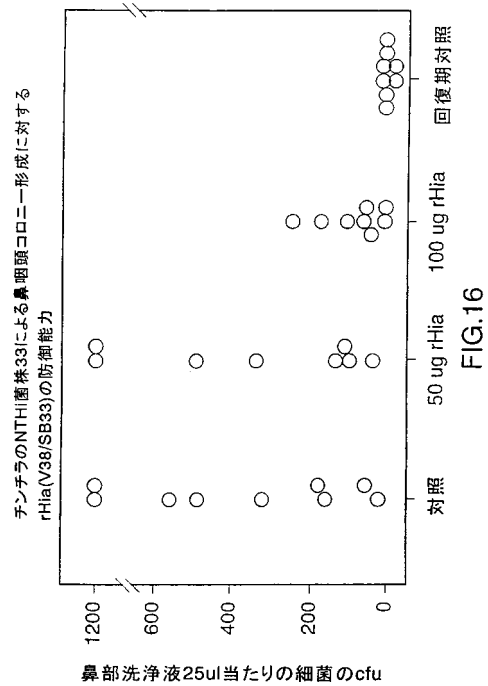


FIG.19A

NTHi菌株32の *hia*

```
GAATTTCGGCTTTAAATATATAAGGTAAATAAA... 10 20 30 ...
...MET ASN LYS ILE PHE ASN VAL ILE TRP ASN 40 50 60
...AATGAACACAAATTTTAAACGTTATTTGGAA
...
VAL VAL THR GEN THR TRP VAL VAL VAL SER... 70 80 90 ...
TGTGTGACTCAAACTTGGGTGTCGTATC...
...GLU LEU THR ARG THR HIS THR LYS CYS ALA 100 110 120
...TGAACCTCACTGCGACCCACACCAAAATGCGC
...
SER ALA THR VAL ALA VAL ALA LEU ALA... 130 140 150 ...
CTCCGCCACCGTGGCAGTTGCCGTATTGGC...
...THR LEU LEU SER ALA THR VAL GEN ALA ASN 160 170 180
...AACCTGTGTGCCGCAACGGTTCAGGCCGAA
...
ALA THR ASP GLU ASN GLU ASP GLU GLU... 190 200 210 ...
TGCTACCGATGAAACGAAGATGATGAAGA...
```

FIG.17

追加の *hia* 遺伝子をPCR増幅するために使用されるオリゴヌクレオチド

```
センス
5' TTAAATATAGGTAATATAAAATGACAAAATTTTACGTT 3' 5040.SL
M N K I F N V
SEQ ID NO:22
SEQ ID NO:21
アンチセンス
K T G V A A G V G Y Q W *
5' AAAACAGCGTTCACACGAGTGTGGTTACGAGTGATNG 3'
SEQ ID NO:5
3' TTTTGTCCGCAACGTGTCCACACCAATGTCACCATTCCTTTAGGCGCTACGGG 5'
SEQ ID NO:4
5039.SL
SEQ ID NO:3
↑ ↑
EcoR I BamH I
```

FIG.20A

NTHi菌株29の *Hia*

```
TTAAATATATAAGGTAAATAAAATGAAACAAA... 10 20 30 ...
...ILE PHE ASN VAL ILE TRP ASN VAL VAL THR 40 50 60
...ATTTTAAACGTTATTTTGGAAATGTTGTGACT
...
GEN THR TRP VAL VAL SER GLU LEU THR... 70 80 90 ...
CAAACTTGGGTTGTCGTATCTGAACTCACT...
...ARG ALA HIS THR LYS CYS ALA SER ALA THR 100 110 120
...CGCGCCACACCAAAATGCGCTCCGCCACC
...
VAL ALA VAL ALA VAL LEU ALA THR ALA LEU... 130 140 150 ...
GTGGCGGTTGCCGTATTTGGCAACTGCGTTG...
...SER ALA THR ALA GLU ALA ASN ASN THR 160 170 180
...TCTGCAACGGCTGAAGCGAACAACAATACT
...
SER VAL THR ASN GLY LEU ASN ALA THR GLY... 190 200 210 ...
TCTGTTACGAATGGGTTGAATGCTTATGCG...
```

FIG.18A

NTHi菌株33の *Hia*

```
GAATTTCGGCTTAAATATAAAATGAAACAA... 10 20 30 ...
...ILE PHE ASN VAL ILE TRP ASN VAL MET THR GEN 40 50 60
...AATTTTAAACGTTATTTTGGAAATGTTATGACTCA
...
THR TRP ALA VAL VAL SER GLU LEU THR... 70 80 90 100 110 120
AACTTGGGCTGTCGTATCTGAACTCAC...
...ARG ALA HIS THR LYS ARG ALA SER ALA THR VAL 130 140 150 160 170 180
...TCGCGCCACACCAACGTCCTCCGCCAACCGT
...
ALA ALA ALA VAL LEU ALA THR VAL LEU... 190 200 210 ...
GGCAGCCGCTGTATTTGGCGACCGTATT...
...SER ALA THR VAL GEN ALA SER ALA GLY SER THR 220 230 240 250 260 270
...GTCTGCAACGGTTCAGCGGAGTGCGAGGCAGTAC
...
THR GLY THR ASN SER LEU ASN VAL TYR... 280 290 300 310 320 330
GACAGGTACAAATAGTTTGAATGTTTA...
```

【図 19 A】

【図 20 A】

【図 17】

【図 18 A】

FIG.23A

NTHi菌株K22のHia

MET ASN LYS ILE PHE ASN...
 10 ... 20 ...
 GCGAATTTCATATGAACAATAATTTTAA...
 ... VAL ILE TRP ASN VAL THR GIN THR TRP VAL
 ...CGTTATTGGGAATGTTGTGACTCAAACTTGGGT
 ... 30 40 50 60
 VAL VAL SER GLU LEU THR ARG ALA HIS...
 70 ... 80 ...
 TGTCTGATCTGAACCTCACTCGGCCCA...
 ... THR LYS CYS ALA SER ALA THR VAL ALA VAL ALA
 ...CACCAAATGCGCTCCGCCACCGTGGCGGTGC
 ... 90 100 110 120
 VAL LEU ALA THR ALA LEU SER ALA THR...
 130 ... 140 ...
 CGTATTGGCACTGCGTTGTCTGCAAC...
 ... ALA GLU ALA ASN ASN THR SER VAL THR ASN
 ...GGCTGAAGCGAACAACAATACTTCTGTACGAA
 ... 150 160 170 180

FIG.21A

NTHi菌株M4071のHia

MET ASN LYS ILE PHE ASN VAL...
 10 ... 20 ... 30 ...
 GCGAATTTCATATGAACAATAATTTTAAACGT...
 ... ILE TRP ASN VAL MET THR GIN THR TRP ALA
 ...TATTGGGAATGTTATGACTCAAACTTGGGC
 ... 40 50 60
 VAL VAL SER GLU LEU THR ARG ALA HIS THR...
 70 ... 80 ... 90 ...
 TGTCTGATCTGAACCTCACTCGGCCCAAC...
 ... LYS ARG ALA SER ALA THR VAL ALA THR ALA
 ...CAAACGTGCTCCGCCAACCGTGGCAACCGC
 ... 100 110 120
 VAL LEU ALA THR LEU LEU SER THR THR VAL...
 130 ... 140 ... 150 ...
 CGTATTGGCGACGTTGTTGTCTACAACAGT...
 ... GIN ALA THR THR THR GLY THR THR SER
 ...TCAGGCGACAACTACTGGCGGTACGACAG
 ... 160 170 180
 THR ASN GLY LEU LYS ALA TYR GLY SER THR...
 190 ... 200 ... 210 ...
 TACAACGGTTTGAAGCTTATGGAAGTAC...

FIG.24A

c型インフルエンザウイルス株A/P10/hia遺伝子の配列

MET ASN LYS ILE PHE ASN VAL ILE TRP ASN...
 10 ... 20 ... 30...
 ATGAACAATAATTTTAAACGTTATTGGAA...
 ... VAL MET THR GIN THR TRP VAL VAL VAL SER
 ...GTTATGACTCAAACTTGGGTTGTCTGTATCT
 ... 40 50 60
 GLU LEU THR ARG THR HIS THR LYS ARG ALA...
 70 ... 80 ... 90...
 GAACTCACTCGCACCCACACCAACGCGCC...
 ... SER ALA THR VAL GLU THR ALA VAL LEU ALA
 ...TCCGCAACCGTGGAGACCGCGTATTGCGC
 ... 100 110 120
 THR LEU LEU PHE ALA THR VAL GIN ALA ASN...
 130 ... 140 ... 150...
 ACACTGTTGTTTGCAACGGTTCAGGCGAAT...
 ... ALA THR ASP GLU ASP GLU GLU LEU ASP PRO
 ...GCTACCGATGAAGATGAAGAGTTAGACCCC
 ... 160 170 180
 VAL VAL ARG THR ALA PRO VAL LEU SER PHE...
 190 ... 200 ... 210...
 GTAGTACGCACTGCTCCCGTGTGAGCTTC...

FIG.22A

NTHi菌株K9のhia遺伝子の配列

MET ASN LYS ILE PHE ASN VAL ILE TRP ASN...
 10 ... 20 ... 30...
 ATGAACAATAATTTTAAACGTTATTGGAA...
 ... VAL MET THR THR TRP ALA VAL VAL SER
 ...GTTATGACTCAAACTTGGGCTGTCGTATCT
 ... 40 50 60
 GLU LEU THR ARG ALA HIS THR LYS ARG ALA...
 70 ... 80 ... 90...
 GAACTCACTCGCGCCCAACCAACCGTGCC...
 ... SER ALA THR VAL ALA THR ALA VAL LEU ALA
 ...TCCGCAACCGTGGCGACCGCGTATTGGCGC
 ... 100 110 120
 THR GIN LEU SER ALA THR ALA GLU ALA ASN...
 130 ... 140 ... 150...
 ACGCAGTTGTCTGCAACGGCTGAAGCGGAC...
 ... SER SER ALA SER VAL THR SER ARG LEU ASN
 ...AGTAGTCTTCTGTTACGAGTAGGTTGAAT
 ... 160 170 180
 VAL TYR GLY ASP THR ASN THR LYS PHE ASN...
 190 ... 200 ... 210...
 GTTTATGGCGGATACGAATACTAAATTCAAT...

【図 2 1 A】

【図 2 2 A】

【図 2 3 A】

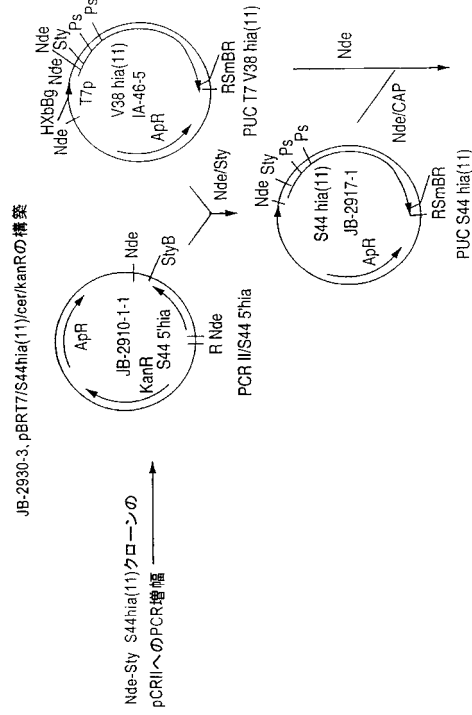
【図 2 4 A】

【図 29】

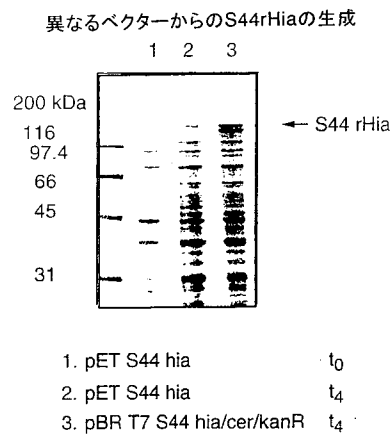
FIG.29
切断型菌株11S44のhia遺伝子をPCR増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマー

5'	Nde I GGGAAATTCATATGTCGCGACGCTGCGCGACACACTACT	3'	M S44A T V E A N N N T GGGAAATTCATATGTCGCGACGCTGCGCGACACACTACT	6817.SL	SEQ ID NO:56 SEQ ID NO:55
3'	Sty I CACACCATACCTTGGCTTACCGACACACTTGGT GCTGCTATTCGACCAACGAAATCGCTTCTTCGACCAACCTTAGGCC	5'	H T I T F A L A K D L G CACACCATACCTTGGCTTACCGACACACTTGGT GCTGCTATTCGACCAACGAAATCGCTTCTTCGACCAACCTTAGGCC	6818.SL	SEQ ID NO:59 SEQ ID NO:58 SEQ ID NO:57

【図 30 A】



【図 31】



【国際公開パンフレット】

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 7 : C07K 14/00		A2	(11) International Publication Number: WO 00/55191
		(43) International Publication Date: 21 September 2000 (21.09.00)	
(21) International Application Number: PCT/CA00/00289		(74) Agent: STEWART, Michael, L; Sim & McBurney, 6th Floor, 330 University Avenue, Toronto, Ontario M5G 1R7 (CA).	
(22) International Filing Date: 16 March 2000 (16.03.00)			
(30) Priority Data: 09/268,347 16 March 1999 (16.03.99) US		(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(63) Related by Continuation (CON) or Continuation-in-Part (CIP) to Earlier Application US 09/268,347 (CIP) Filed on 16 March 1999 (16.03.99)			
(71) Applicant (for all designated States except US): CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED [CA/CA]; 1755 Steeles Ave- nue, Toronto, Ontario M2R 3T4 (CA).		Published Without international search report and to be republished upon receipt of that report.	
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): LOOSMORE, Sheena, M. [CA/CA]; 70 Crawford Rose Drive, Aurora, Ontario L4G 4R4 (CA). YANG, Yan-Ping [CA/CA]; Apt. 709, 120 Torredale Avenue, Willowdale, Ontario M2R 3N7 (CA). KLEIN, Michel, H. [CA/CA]; 16 Munro Boulevard, Willowdale, Ontario M2P 1B9 (CA).			
(54) Title: RECOMBINANT HAEMOPHILUS INFLUENZAE ADHESIN PROTEINS			
(57) Abstract			
Recombinant production of Hia protein, in full-length and N-terminally truncated forms, of non-typeable strains of <i>Haemophilus influenzae</i>, is described. The nucleic acid and deduced amino acid sequences of Hia genes of various strains of non-typeable and type c <i>Haemophilus influenzae</i> also are described.			
Restriction map of DS-2008-2-3, pT7 hia (11).			

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

TITLE OF INVENTIONRECOMBINANT HAEMOPHILUS INFLUENZAE ADHESIN PROTEINSREFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application is a continuation-in-part of
copending United States Patent Application No.
09/268,347.

FIELD OF INVENTION

The present invention relates to the field of
5 molecular genetics and, in particular, to the
production of recombinant *Haemophilus influenzae*
adhesin (Hia) proteins.

BACKGROUND TO THE INVENTION

Haemophilus influenzae is the cause of several
10 serious human diseases, such as meningitis,
epiglottitis, septicemia and otitis media. There are
six serotypes of *H. influenzae*, designated a to f, that
are identified by their capsular polysaccharide. *H.*
influenzae type b (Hib) was a major cause of bacterial
15 meningitis until the introduction of several Hib
conjugate vaccines in the 1980's (ref. 1. Throughout
this application, various references are referred to in
parenthesis to more fully describe the state of the art
to which this invention pertains. Full bibliographic
20 information for each citation is found at the end of
the specification, immediately preceding the claims.
The disclosures of these references are hereby
incorporated by reference into the present disclosure).
Vaccines based upon *H. influenzae* type b capsular
25 polysaccharide conjugated to diphtheria toxoid (ref.
2), tetanus toxoid (ref. 3 and US patent 4,496,538), or
Neisseria meningitidis outer membrane protein (ref. 4)
have been effective in reducing *H. influenzae* type b-

30

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

2

induced meningitis. The other serotypes of *H. influenzae* are associated with invasive disease at low frequencies, although there appears to be an increase in the incidence in disease caused by these strains as the incidence of Hib disease declines (ref. 5; ref. 6). Non-encapsulated or non-typeable *H. influenzae* (NTHi) are also responsible for a wide range of human diseases including otitis media, epiglottitis, pneumonia, and tracheobronchitis. The incidence of NTHi-induced disease has not been affected by the introduction of the Hib vaccines (ref. 7).

Otitis media is the most common illness of early childhood, with 60 to 70% of all children, of less than 2 years of age, experiencing between one and three ear infections (ref. 8). Chronic otitis media is responsible for hearing, speech and cognitive impairments in children. *H. influenzae* infections account for about 30% of the cases of acute otitis media and about 60% of chronic otitis media. In the United States alone, treatment of otitis media costs between 1 and 2 billion dollars per year for antibiotics and surgical procedures such as tonsillectomies, adenoidectomies and insertion of tympanostomy tubes. It is estimated that an additional \$30 billion is spent per annum on adjunct therapies, such as speech therapy and special education classes. Furthermore, many of the causative organisms of otitis media are becoming resistant to antibiotic treatment. An effective prophylactic vaccine against otitis media is thus desirable.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

3

During natural infection by NTHi, surface-exposed outer membrane proteins that stimulate an antibody response are potentially important targets for bactericidal and/or protective antibodies and, therefore, potential vaccine candidates. A family of high molecular weight proteins (HMW1 and HMW2) that are important in attachment of NTHi to epithelial cells has been identified in about 70 to 75% of NTHi strains (ref. 9; ref. 10). These high molecular weight adhesins have been shown to afford some protection in the chinchilla model of otitis media (ref. 11). A second family of high molecular weight adhesion proteins has been identified in about 25% of NTHi and in encapsulated *H. influenzae* strains (ref. 12; ref. 13, ref. 14). The NTHi member of this second family is termed *Haemophilus influenzae* adhesin or Hia and the homologous protein found in encapsulated strains is termed *Haemophilus influenzae* surface fibril protein or Hsf. The *hia* gene was originally cloned from an expression library using convalescent sera from an otitis media patient, which indicates that it is an important immunogen during disease. The prototype Hia and Hsf proteins demonstrate about 82% sequence similarity, although the Hsf protein is considerably larger. The proteins are comprised of conserved amino and carboxy termini and several repeat motifs, with Hsf containing more repeat sequences than Hia. A high molecular weight protein (200 kDa) has also been identified from *Moraxella catarrhalis* that has some sequence homology with the Hsf and Hia proteins (U.S. Patent No. 5,808,024).

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

4

Since Hia or Hsf is conserved amongst encapsulated strains of *Haemophilus influenzae* and about 20 to 25% of non-encapsulated strains, and has been demonstrated to be an adhesin, the protein has utility in diagnosis of and vaccination against disease caused by *H. influenzae* or other bacterial pathogens that produce Hia or a protein capable of raising antibodies specifically reactive with Hia.

A disadvantage of Hia for use as an antigen in diagnosis, for the generation of anti-Hia antibodies useful in diagnosis and as an immunogen in vaccination is the low recovery of the native protein from *Haemophilus influenzae* species.

It would be advantageous to provide recombinant Hia protein for use as antigens, in immunogenic preparations including vaccines, carriers for other immunogens and in the generation of diagnostic reagents.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed towards the provision of recombinant *H. influenzae* adhesin (rHia) proteins.

In connection with the provision of such recombinant proteins, the present invention provides certain isolated and purified nucleic acid molecules. Accordingly, in one aspect thereof, the present invention provides an isolated and purified nucleic acid molecule encoding a *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a strain of *Haemophilus influenzae* having: (a) a DNA sequence selected from the group consisting of those shown in Figures 18, 19, 20, 21,

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

5

22, 23, 24 and 25 (SEQ ID Nos: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37); or (b) a DNA sequence encoding a *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein having an amino acid sequence selected from the group consisting of those
5 shown in Figures 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 and 25 (SEQ ID Nos: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38).

Such nucleic acid may be included in a vector, which may be a plasmid vector. In particular, the nucleic acid molecule may encode the Hia protein from
10 strain 11 or 33 of non-typeable *Haemophilus*.

In another aspect of the present invention, there is provided an isolated and purified nucleic acid molecule encoding an N-truncated *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a strain of *Haemophilus*
15 *influenzae* which is amplifiable by a pair of nucleotides which are selected from the group consisting of SEQ ID No: 7 and SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 9 and SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 11 and SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 13; SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 49; and
20 SEQ ID No: 51.

Such nucleic acid may be included in a vector, which may be a plasmid vector. In particular, the nucleic acid molecule may encode an N-truncated Hia protein from strain 11 or 33 of non-typeable
25 *Haemophilus*, starting at codon V38 or S44.

The plasmid vector incorporating the isolated and purified nucleic acid provided in accordance with these aspects of the invention may have the identifying characteristics of a plasmid which is selected from the
30 group consisting of:

DS-2008-2-3 as shown in Figure 1A

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

6

DS-2186-1-1 as shown in Figure 5A

DS-2201-1 as shown in Figure 5A

DS-2186-2-1 as shown in Figure 5A

DS-2168-2-6 as shown in Figure 5A

5 1A-191-3-1 as shown in Figure 32

The vector provided herein may include the *cer* gene from *E. coli*. Accordingly, in another aspect of the present invention, there is provided a vector for transforming a host, comprising a nucleic acid molecule encoding a full-length or N-truncated *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein, a promoter for expression of said full-length or truncated Hia protein and, optionally, the *cer* gene of *E. coli*. The vector may be a plasmid vector or other non-replicating vector, which may have the identifying characteristics of a plasmid vector which is selected from the group consisting of:

BK-96-2-11 as shown in Figure 6A

DS-2242-1 as shown in Figure 7A

20 DS-2242-2 as shown in Figure 7A

DS-2340-2-3 as shown in Figure 8A

DS-2447-2 as shown in Figure 9A

DS-2448-17 as shown in Figure 9B

JB-2930-3 as shown in Figure 32

25 The vectors provided herein may comprise a replicating vector, including a vector from *Salmonella*, BCG, adenovirus, poxvirus, vaccinia or poliovirus.

Any of the vectors provided herein may be employed to transform a suitable host cell for expression therein of a protective *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a non-typeable strain of *Haemophilus*,

30

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

7

which may be in full-length or truncated form. Such host conveniently may be *E. coli*. Such expression may be under the control of the T7 promoter and expression of the recombinant Hia from the transformed host may be
5 effected by culturing in an inducing concentration of lactose or other convenient inducing agent.

The present invention further includes, in a further aspect thereof, a recombinant protective *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a non-
10 typeable *Haemophilus* strain producible by the transformed host, particularly *E. coli*, provided herein. Such Hia protein may be provided in the form of an immunogenic fragment or adhesin-functional analog of the recombinant protein.

15 The recombinant Hia proteins, full-length or N-truncated, provided herein are useful as antigens in immunogenic compositions, carriers for other immunogens, diagnostic agents and in the generation of diagnostic agents. The nucleic acid molecules which
20 encode the Hia protein, full-length or N-truncated, also are useful as probes for diagnostic use and also in immunogenic compositions.

The present invention, in an additional aspect thereof, provides an immunogenic composition,
25 comprising at least one immunologically active component which is selected from the group consisting of an isolated and purified nucleic acid molecule as provided herein and a recombinant protective Hia protein, full-length or N-truncated, of a strain of
30 *Haemophilus*, as provided herein, and a pharmaceutically-acceptable carrier therefor.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

8

The immunogenic compositions provided herein may be formulated as a vaccine for in vivo administration to a host to provide protection against disease caused by *H. influenzae*. For such purpose, the compositions
5 may be formulated as a microparticle, capsule, ISCOM or liposome preparation. The immunogenic composition may be provided in combination with a targeting molecule for delivery to specific cells of the immune system or to mucosal surfaces.

10 The immunogenic compositions of the invention (including vaccines) may further comprise at least one other immunogenic or immunostimulating material and the immunostimulating material may be at least one adjuvant or at least one cytokine. Suitable adjuvants for use
15 in the present invention include (but are not limited to) aluminum phosphate, aluminum hydroxide, QS21, Quil A, derivatives and components thereof, ISCOM matrix, calcium phosphate, calcium hydroxide, zinc hydroxide, a glycolipid analog, an octadecyl ester of an amino acid,
20 a muramyl dipeptide, polyphosphazene, ISCOPREP, DC-chol, DDBA and a lipoprotein and other adjuvants.

Advantageous combinations of adjuvants are described in copending United States Patent Application Serial No. 08/261,194 filed June 16, 1994 and
25 08/483,856 filed June 7, 1995, assigned to the assignee hereof and the disclosure of which is incorporated herein by reference (WO 95/34308 published November 21, 1995).

In accordance with another aspect of the
30 invention, there is provided a method for generating an immune response in a host, comprising the step of

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

9

administering to a susceptible host an effective amount of the immunogenic composition as recited above. The immune response may be humoral or a cell-mediated immune response. Hosts in which protection against
5 disease may be conferred include primates, including humans.

In accordance with other aspects of the invention, there is provided the immunogenic compositions provided herein when used as a medicament and the use of these
10 components of the immunogenic compositions in the manufacture of an immunogenic composition.

The present invention includes, in a yet additional aspect thereof, a method for the production of a protective *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia)
15 protein of a non-typeable strain of *Haemophilus influenzae*, which comprises:

transforming a host, such as *E. coli*, with a vector comprising a nucleic acid molecule encoding an N-truncated form of the *Haemophilus influenzae* adhesin
20 protein as provided herein,

growing the host to express the encoded truncated Hia, and

isolating and purifying the expressed Hia protein.

The encoded truncated Hia may be expressed in
25 inclusion bodies. The isolation and purification step may be effected by disrupting the grown transformed cells to produce a supernatant and the inclusion bodies containing the Hia, solubilizing the inclusion bodies after separation from the supernatant, to produce a
30 solution of the recombinant Hia, chromatographically purifying the solution of recombinant Hia free from

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

10

cell debris, and isolating the purified recombinant Hia protein.

The vector transforming the host cell, such as *E. coli*, may include the T7 promoter and the *E. coli* or other host cell may be cultured in the presence of an inducing amount of lactose or other convenient inducing agent.

The strain of *Haemophilus influenzae* herein may be selected from the group of non-typeable strains consisting of strains 11, 33, 32, 29, M4071, K9, K22 and 12. Specific nucleic acid sequences for the genes encoding the respective Hia proteins from such strains are provided herein and are described below.

The nucleic acid molecules provided herein are useful in diagnostic applications. Accordingly, in a further aspect of the invention, there is provided a method of determining the presence, in a sample, of nucleic acid encoding a *Haemophilus influenzae* adhesin protein, comprising the steps of:

a) contacting the sample with a nucleic acid molecule as provided herein to produce duplexes comprising the nucleic acid molecule provided herein are nucleic acid encoding the Hia protein of a strain of *Haemophilus* present in the sample and specifically hybridizable therewith; and

b) determining the production of the duplexes.

In addition, the present invention provides a diagnostic kit for determining the presence, in a sample, of nucleic acid encoding a *Haemophilus influenzae* adhesin protein, comprising:

a) a nucleic acid molecule as provided herein;

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

11

b) means for contacting the nucleic acid molecule with the sample to produce duplexes comprising the nucleic acid molecule and any such nucleic acid molecule; and

5 c) means for determining production of the duplexes.

The recombinantly produced truncated Hia proteins provided herein also are useful in diagnostic applications. Accordingly, in another aspect of the invention, there is provided a method of determining the presence of antibodies specifically reactive with the Hia protein in a sample, comprising the steps of (a) contacting the sample with the recombinant Hia protein provided herein to provide complexes of the recombinant Hia protein and any such antibodies present in the sample specifically reactive therewith; and (b) determining production of the complexes.

Advantages of the present invention include:

- an isolated and purified nucleic acid molecule encoding a *Haemophilus influenzae* adhesin protein or a fragment or an analog of the Hia protein;
- 20 - recombinantly-produced Hia proteins, free from any other *Haemophilus* proteins; and
- diagnostic kits and immunological reagents for specific identification of *Haemophilus*.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

The present invention will be further understood from the following description with reference to the drawings, in which:

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

12

Figure 1A shows a restriction map for plasmid DS-2008-2-3 that contains the T7 promoter and the full-length NTHi strain 11 *hia* gene.

Figure 1B shows the oligonucleotides used to PCR amplify the strain 11 *hia* gene. Sense Strand (5038.SL): SEQ ID No: 1, encoded amino acids SEQ ID No: 2; Antisense Strand (5039.SL): SEQ ID No: 3, complement SEQ ID No: 4, encoded amino acids SEQ ID No: 5. Restriction enzyme sites are: B, *Bam*H I; Bg, *Bgl* II; H, *Hind* III; N, *Nde* I; Ps, *Pst* I; Sty, *Sty* I. Other abbreviations are: T7p, T7 promoter; ApR, ampicillin resistance.

Figure 2 shows an immunoblot of the recognition of full-length rHia protein by anti-native *Moraxella catarrhalis* high molecular weight adhesin antibody. Lane 1, DS-2043-1 uninduced; lane 2, DS-2043-1, induced for 4h; lane 3, DS-2043-2 uninduced; lane 4, DS-2043-2, induced for 4h; lane 5, molecular weight markers. DS-2043-1 and DS-2043-2 are independent clones of *pT7 hia(11)* in BL21 (DE3).

Figure 3 shows the construction of plasmids DS-2092-1 and DS-2092-40 that contain tandem copies of the T7 *hia* gene cassette for the strain 11 *hia* gene. Restriction enzyme sites are: B, *Bam*H I; Bg, *Bgl* II; H, *Hind* III; Ps, *Pst* I; Xb, *Xba* I. Other abbreviations are: CAP, calf alkaline phosphatase; T7p, T7 promoter; ApR, ampicillin resistance.

Figure 4 shows the sites of truncation for the strain 11 Hia protein (SEQ ID No: 6).

Figure 5A shows the construction of plasmids expressing truncated *hia* genes from strain 11.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

13

Restriction enzyme sites are: B, *Bam*H I; Bg, *Bgl* II; H, *Hind* III; N, *Nde* I; Nhe, *Nhe* I; Ps, *Pst* I; R, *Eco*R I; Sty, *Sty* I; Xb, *Xba* I. Other abbreviations are: T7p, T7 promoter; ApR, ampicillin resistance; KanR, kanamycin resistance.

Figure 5B shows the oligonucleotides used to PCR amplify the 5'-fragments for the truncated genes. E21 truncation: Sense (5524.SL): SEQ ID No: 7, encoded amino acids SEQ ID No: 8; T33 truncation: Sense (5525.SL) SEQ ID No: 9, encoded amino acids SEQ ID No: 10; V38 truncation: Sense (5526.SL): SEQ ID No: 11, encoded amino acids, SEQ ID No: 12; N52 truncation: Sense (5527.SL): SEQ ID No: 13, encoded amino acids SEQ ID No: 14; Antisense (5528.SL): SEQ ID No: 15; complement SEQ ID No: 16, encoded amino acids SEQ ID No: 17.

Figure 6A shows the construction of plasmid BK-96-2-11 that contains the V38 *hla* gene from NTHi strain 11 and the *E. coli* *cer* gene. Restriction enzyme sites are: B, *Bam*H I; Bg, *Bgl* II; K, *Kpn* I; N, *Nde* I; P, *Pst* I; R, *Eco*R I; S, *Sal* I; Sm, *Sma* I; Sty, *Sty* I; Xb, *Xba* I; Xho, *Xho* I. Other abbreviations are: T7p, T7 promoter; ApR, ampicillin resistance; KanR, kanamycin resistance; CAP, calf alkaline phosphatase; *tt1* transcription terminator 1 from *trpA*; *tt2*, transcription terminator 2 from T7 gene 10.

Figure 6B shows the oligonucleotides used to construct the multiple cloning site and transcription terminators. "R" and "Ps" indicate termini that will overlap with *Eco*R I or *Pst* I ends, but will not re-

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

14

generate the sites. Upperstrand (SEQ ID No.: 50) lower strand (SEQ ID No.: 51).

Figure 7A shows the construction of plasmids DS-2242-1 and DS-2242-2 that contain the T7 promoter and full-length NTHi strain 33 *hia* gene, the *E. coli* *cer* gene and the kanamycin resistance gene. Restriction enzyme sites are: A, *Alw*N I; B, *Bam*H I; Bg, *Bgl* II; H, *Hind* III; K, *Kpn* I; N, *Nde* I; Ps, *Pst* I; R, *Eco*R I; S, *Sal* I; Sm, *Sma* I; Xb, *Xba* I; Xho, *Xho* I. Other abbreviations are: T7p, T7 promoter; ApR, ampicillin resistance; KanR, kanamycin resistance; tt1, transcription terminator 1 from *trpA*; tt2, transcription terminator 2 from T7 gene 10.

Figure 7B shows the oligonucleotides used to generate the 5'-end of the strain 33 *hia* gene coding strand (SEQ ID No.: 52), complementary strand (SEQ ID No.: 53), and encoded amino acid sequence (SEQ ID No.: 54).

Figure 8A shows the construction of plasmid DS-2340-2-3 that contains the T7 promoter and the V38 *hia* gene from strain 33, the *E. coli* *cer* gene and the kanamycin resistance gene. Restriction enzyme sites are: B, *Bam*H I; Bg, *Bgl* II; H, *Hind* III; N, *Nde* I; Ps, *Pst* I; R, *Eco*R I; S, *Sal* I; Sn, *Sna*B I; Xb, *Xba* I. Other abbreviations are: T7p, T7 promoter; ApR, ampicillin resistance; KanR, kanamycin resistance; tt1, transcription terminator 1 from *trpA*; tt2, transcription terminator 2 from T7 gene 10.

Figure 8B shows the oligonucleotides used to PCR amplify the 5'-end of the truncated *hia* gene. Sense (6286.SL): SEQ ID No: 16, encoded amino acids SEQ ID

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

15

No: 17; antisense (6287.SL) SEQ ID No: 18, complement
SEQ ID No: 19, encoded amino acids SEQ ID No: 20.

Figures 9A and 9B show the construction of
plasmids DS-2447-2 and DS-2448-17, that contain tandem
5 copies of the T7 V38 hia (11) and T7 V38 hia (33)
genes, respectively. Restriction enzyme sites are: B,
BamH I; Bg, Bgl II; H, Hind III; Ps; Pst I; R, EcoR I;
S, Sal I; Xb, Xba I. Other abbreviations are: T7p, T7
promoter; ApR, ampicillin resistance; KanR, kanamycin
10 resistance; CAP, calf alkaline phosphatase; tt1,
transcription terminator 1 from *trpA*; tt2,
transcription terminator 2 from T7 gene 10.

Figure 10 shows the expression of rHia. Panel A:
lane 1, full-length rHia (11) no induction; lane 2,
15 full-length rHia (11); lane 3, E21 rHia (11); lane 4,
T33 rHia (11); lane 5, V38 rHia (11); lane 6, N52 rHia
(11). Panel B: lane 1, V38 rHia (11) no induction;
lane 2, V38 rHia (11); lane 3, V38 rHia (11)/cer.

Figure 11 shows a purification scheme for rHia
20 proteins. Abbreviations are: SP, supernatant; PPT,
precipitate; DTT, dithiothreitol; OG, octyl glucoside;
(x) means discarded.

Figure 12, having panels A and B, shows the SDS-
PAGE analysis of purified rHia. Panel A shows purified
25 V38 rHia protein from strain 11 and panel B shows
purified V38 rHia protein from strain 33. Lane 1,
molecular weight markers; lane 2, whole-cell lysate;
lane 3, crude extract; lane 4, purified rHia protein.

Figure 13, having panels A, B and C, shows the
30 stability of V38 rHia (11). Panel A shows samples
stored at 4°C without glycerol. Panel B shows samples

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

16

stored at 4°C, in the presence of 20% glycerol. Panel C shows samples stored at -20°C in the presence of 20% glycerol. Lane 0 indicates t_0 ; lanes 1 to 8 indicate samples stored for 1 to 8 weeks.

5 Figure 14, having panels A and B, shows the immunogenicity of V38 rHia (11) or V38 rHia (33) in CD-1 mice. Panel A shows the response after a single immunization and panel B shows the response of a prime/boost immunization.

10 Figures 15A and 15B show the immunogenicity of V38 rHia (11) in BALB/c mice and guinea pigs. Figure 15A shows the antibody response in mice and Figure 15B shows the response in guinea pigs.

15 Figure 16 illustrates the protective ability of V38 rHia (33) against nasopharyngeal colonization in a chinchilla model.

20 Figure 17 shows the oligonucleotides used to PCR amplify additional *hia* genes. Sense (5040.SL), SEQ ID No: 21, encoded amino acids SEQ ID No: 22; Antisense (5039.SL), SEQ ID No: 3, complement SEQ ID No: 4, encoded amino acids SEQ ID No: 5.

 Figure 18 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No: 23) and deduced amino acid sequence (SEQ ID No: 24) of the *hia* gene from NTHi strain 33.

25 Figure 19 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No: 25) and deduced amino acid sequence (SEQ ID No: 26) of the *hia* gene from NTHi strain 32.

30 Figure 20 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No: 27) and deduced amino acid sequence (SEQ ID No: 28) of the *hia* gene from NTHi strain 29.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

17

Figure 21 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No: 29) and deduced amino acid sequence (SEQ ID No: 30) of the *hla* gene from NTHi strain M4071.

Figure 22 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No: 31) and deduced amino acid sequence (SEQ ID No: 32) of the *hla* gene from NTHi strain K9.

Figure 23 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No: 33) and deduced amino acid sequence (SEQ ID No: 34) of the *hla* gene from NTHi strain K22.

Figure 24 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No: 35) and deduced amino acid sequence (SEQ ID No: 36) of the *hla* gene from type c strain API.

Figure 25 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No: 37) and deduced amino acid sequence (SEQ ID No: 38) of the *hla* locus from NTHi strain 12. The overlined or underlined sequences indicate oligonucleotides used to PCR amplify across the junction of the two orfs. Sense (6431.SL) SEQ ID No: 39, (6432.SL) SEQ ID No: 40; antisense (6295.SL) SEQ ID No: 41, (6271.SL) SEQ ID No: 42.

Figure 26 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No.: 43) and deduced amino acid sequence (SEQ ID No.: 44) of the *hla* locus from NTHi strain 11, as published in U.S. Patent No. 5,646,259.

Figure 27 shows the alignment of the upstream ORF from the strain 12 *hla* locus (SEQ ID No: 45) with part of the HI1732 protein (SEQ ID No: 46) from *H. influenzae* type b strain Rd.

Figure 28 shows the alignment of amino acid sequences from Hia (SEQ ID Nos. 24, 26, 28, 34, 30, 44, 32), Hsf (SEQ ID No.: 47) and partial sequences from

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

18

Moraxella catarrhalis high molecular weight proteins (200 kDa) from strains 4223 and LES-1 (SEQ ID Nos.: 48, 49). Asterisks within sequences indicate stop codons, but below the sequence they indicated sequence
 5 homology. Dots indicate identical residues. The sequence alignments were prepared by direct comparison of the amino acid sequences of the respective proteins.

Figure 29 shows the oligonucleotides used to PCR
 10 amplify the 5' end of the *hla* gene at the S44 truncated position. Sense (6817.SL) SEQ ID No: 49, encoding amino acids SEQ ID No: 50; antisense (6818.SL) SEQ ID No: 51, complement SEQ ID No: 52, encoded amino acids SEQ ID No: 53.

Figure 30 shows the construction of plasmid JB-2930-3 that contains the S44 *hla* gene from NTHi strain 11 and the *E. coli* *cer* gene and the T7 promoter. Restriction enzyme sites are: B, *Bam*H I; Bg, *Bgl* II; K, *Kpn* I; N, *Nde* I; P, *Pst* I; R, *Eco*R I; S, *Sal* I; Sm, *Sma*
 20 I; Sty, *Sty* I; Xb, *Xba* I; Xho, *Xho* I. Other abbreviations are: T7p, T7 promoter; ApR, ampicillin resistance; KanR, kanamycin resistance; CAP, calf alkaline phosphatase; tt1 transcription terminator 1 from *trpA*; tt2, transcription terminator 2 from T7 gene
 25 10.

Figure 31 shows SDS-PAGE analysis of the expression of rHia from S44. Lane 1, expression from pET S44 vector at time 0 (no induction); lane 2 expression from pET S44 vector after 4 hours induction;
 30 lane 3 expression from JB-2930-3 after 4 hours induction.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

19

Figures 32 shows a schematic representation of the two vectors used for the expression study, JB-2930-3 and IA-191-3-1, of S44-truncated rHia.

GENERAL DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 Since *H. influenzae* strains produce low quantities of the Hia and Hsf proteins, the *hia* gene from NTHi strains was cloned into an expression vector for overproduction of the recombinant protein in *E. coli*. When the full-length recombinant Hia (rHia) protein was
10 expressed, it was made in relatively low quantities. In order to confirm that there was expression of the recombinant protein, an immunoblot was performed using antibody raised to a *Moraxella catarrhalis* high molecular weight adhesin protein identified as 200 kDa
15 in US Patent No. 5,808,024, assigned to the assignee and the disclosure of which is incorporated herein by reference. Antibody against the gel-purified native 200 kDa protein recognized a specific induced band in the rHia protein sample. The yield of rHia was not
20 significantly improved by increasing the gene copy number of the T7 *hia* gene cassette.

The *E. coli* *cer* gene has been shown to stabilize plasmids containing large inserts (ref. 15), but the yield of rHia was not significantly improved by adding
25 the *E. coli* *cer* gene to the expression vector. However, the *E. coli* cells were observed to clump during culture, suggesting that there was surface expression of the Hia adhesin protein. The apparent toxicity of the rHia protein might be overcome if it
30 were made as inclusion bodies, so truncations were made at the 5'-end of the gene to delete putative signal

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

20

sequences. This modification resulted in good production and recovery of truncated rHia starting from the V38 position.

The full-length and V38-truncated rHia proteins were immunogenic and the resultant anti-rHia antibodies were protective in passive infant rat models of bacteremia due to *H. influenzae* type a or type b strains. In addition, the truncated V38 rHia protein was found to be partially protective against nasopharyngeal colonization in an active challenge model in chinchillas. The protection afforded by rHia derived from an NTHi strain against disease caused by NTHi and encapsulated type a or type b strains, indicates that there may be common protective epitopes. The cloning and sequence analysis of additional *hia* genes may help to identify conserved regions. The full-length or N-terminal truncated rHia proteins may be used as vaccine components to protect against *Haemophilus influenzae* disease.

Any *Haemophilus* strains that have *hia* genes may be conveniently used to provide the purified and isolated nucleic acid molecules (which may be in the form of DNA molecules), comprising at least a portion coding for a Hia protein as typified by embodiments of the present invention. Such strains are generally available from clinical sources and from bacterial culture collections, such as American Type Culture Collection. Appropriate strains of *Haemophilus* include:

Non-typeable *Haemophilus* strain 11;
Non-typeable *Haemophilus* strain 33;
Non-typeable *Haemophilus* strain 32;

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

21

Non-typeable *Haemophilus* strain 29;
Non-typeable *Haemophilus* strain M4071;
Non-typeable *Haemophilus* strain K9;
Non-typeable *Haemophilus* strain K22;
5 Non-typeable *Haemophilus* strain 12;
Type C *Haemophilus* strain API.

In this application, the term "Hia" protein is used to define a family of Hia proteins that includes those having naturally occurring variations in their amino acid sequences as found in various strains of *Haemophilus*.
10

Referring to Fig. 1A, there is illustrated a restriction map of plasmid DS-2008-2-3 that contains a full-length *hia* gene from non-typeable *Haemophilus influenzae* strain 11, under the influence of the T7 promoter. The nucleic acid (SEQ ID No.: 43) and deduced amino acid sequence (SEQ ID No.: 44) of the *hia* gene from strain 11, are described in the aforementioned U.S. Patent No. 5,646,259 (and identified therein as "HA1"). The oligonucleotides used to PCR amplify the *hia* gene from the ATG start codon of the gene of strain 11 are shown in Fig. 1B.
15
20

Referring to Fig. 2, there is illustrated an immunoblot demonstrating the recognition of the rHia (11) protein by anti-native *Moraxella catarrhalis* high molecular weight adhesin antibody. The *M. catarrhalis* high molecular weight adhesin or 200 kDa protein described in the aforementioned US Patent No. 5,808,024 has some sequence homology with the Hia and Hsf proteins, especially at the carboxy terminus (Fig. 28).
25
30

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

22

Referring to Fig. 3, there is illustrated a construction scheme for plasmids DS-2092-1 and DS-2092-40 that contain tandem copies of T7 *hia* gene cassettes comprising the full-length *hia* gene from NTHi strain 11. Such plasmids that contain increased copy numbers of genes often have enhanced production levels for recombinant proteins. However, as seen below, the low yield of recombinant Hia was not significantly improved by increasing the gene copy number.

Referring to Fig. 4, there is illustrated the N-terminal sequence of the NTHi strain 11 protein and the position of time N-terminally truncated rHia proteins. The N-terminal truncation up to position E21 deletes a long hydrophobic region that may constitute part of a signal sequence for Hia. The deletion up to position T33 includes a long hydrophobic region and follows a potential Ala-X-Ala signal cleavage site. The deletion up to position V38 includes a long hydrophobic region and follows a potential Ala-X-Ala signal cleavage site. The recombinant Hia protein starting at position S44 includes a long hydrophobic region and follows a potential Ala-X-Ala signal cleavage site. The recombinant Hia protein starting at position N52 mimics the approximate start of the related high molecular weight (200 kDa) adhesin from *Moraxella catarrhalis* described in the aforementioned US Patent No. 5,808,024, which recombinant protein is over-produced if truncated at its N-terminus to start at V56.

Referring to Fig. 5A, there is illustrated the construction scheme for the generation of plasmids DS-2186-1-1, DS-2201-1, DS-2186-2-1, and DS-2168-2-6

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

23

producing four of the N-terminal truncated rHia proteins. The oligonucleotides used to PCR amplify the 5'-fragments are shown in Fig. 5B. In Figure 30, there is illustrated the construction scheme for the generation of plasmids JB-2930-3, which produces the S44 deletion. The oligonucleotides used to PCR amplify the 5'-fragments are shown in Figure 29.

Referring to Fig. 6A, there is illustrated a construction scheme for the generation of plasmid BK-96-2-11 that contains the V38 *hla* gene from NTHi strain 11 as well as the *E. coli* *cer* gene that has been shown to stabilize plasmids. The introduction of the *cer* gene into plasmids producing toxic proteins, was predicted to enhance protein production. There was an observed change in the morphology of the *E. coli* cells producing full-length rHia in the presence of the *cer* gene, in that they clumped. This suggests that there was enhanced expression of the adhesin at the surface of the cells that caused the clumping. The expression plasmid BK-96-2-11 also contains transcription terminators upstream and downstream of the T7 V38 *hla* gene cassette that were predicted to enhance the gene stability. The oligonucleotides used to generate the multiple cloning site and transcription terminators are shown in Fig. 6B.

Referring to Fig. 7A, there is illustrated a construction scheme for plasmids DS-2242-1 and DS-2242-2 that contain a full-length *hla* gene from non-typeable *Haemophilus influenzae* strain 33, under the influence of the T7 promoter. The expression plasmids also contain the *E. coli* *cer* gene and transcription

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

24

terminators upstream and downstream of the T7 *hla* (33) gene cassette. DS-2242-1 has the terminators coded on the same strand as the T7 *hla* (33) gene. However, there was no observable difference in the expression of rHla from the two plasmids. The oligonucleotides used to construct the authentic 5'-end of the NTHi strain 33 gene are shown in Fig. 7B.

Referring to Fig. 8A, there is illustrated a construction scheme for plasmid DS-2340-2-3 that contains the V38 *hla* gene from NTHi strain 33 as well as the *E. coli* *cer* gene. There are also transcription terminators located upstream and downstream of the T7 V38 *hla* gene cassette, on the same strand. The oligonucleotides used to PCR amplify the NTHi strain 33 *hla* gene from the V38 codon, are shown in Fig. 8B.

Referring to Fig. 9, there is shown the construction of plasmids DS-2447-2 and DS-2448-17 that contain tandem copies of the T7 V38 *hla* (11) or T7 V38 *hla* (33) gene cassettes, respectively.

Referring to Fig. 10, panel A, there is illustrated the production of rHla proteins from plasmids encoding full-length or truncated *hla* genes from NTHi strain 11. The production of the full-length rHla (11) protein was very low. There was also low expression observed for the E21 and T33 truncated rHla proteins. However, the V38 and N52 truncated rHla proteins have significantly improved expression levels. As shown in Fig. 10, panel B, the production of V38 rHla (11) appears to be enhanced when the *E. coli* *cer* gene is added to the expression plasmid.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

25

Referring to Fig. 11, there is illustrated a purification scheme for rHia proteins, produced as inclusion bodies. Cells were lysed by sonication and the inclusion bodies purified by serial extractions.

5 The inclusion bodies were solubilized in guanidinium chloride and impurities precipitated by the addition of polyethylene glycol (PEG). Addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ resulted in precipitation of rHia and the crude rHia was further purified by gel filtration.

10 Referring to Fig. 12, there is illustrated the purified V38 rHia proteins from strains 11 and 33. The inclusion bodies are shown in lane 3 and the final purified protein in lane 4. The estimated purity of the purified protein is greater than about 90% as
15 determined by SDS-PAGE densitometry.

Referring to Fig. 13, there is shown the SDS-PAGE analysis of the stability of rHia proteins produced as described herein during 8 weeks of storage with or without glycerol at 4°C and with glycerol at -20°C. The
20 protein is stable under any of these conditions.

Referring to Fig. 14, there is illustrated the immunogenicity of V38 rHia proteins from strains 11 and 33 in CD-1 mice. At doses from 0.3 to 10 µg, there is a strong immune response after one or two doses with
25 either protein. There is no obvious dose response at these levels. Similar results were observed in BALB/c mice (Fig. 15A) and in guinea pigs (Fig. 15B), indicating that rHia was very immunogenic, even at 0.3 µg per dose.

30 Referring to Fig. 16, there is illustrated the protection afforded by V38 rHia (33) against

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

26

colonization by NTHi strain 33. As described by Yang et al (ref. 20), a chinchilla nasopharyngeal colonization model has been developed to assess protection against this earliest stage of disease. The model was initially established for NTHi strains that express *hmr* genes and had to be adapted for NTHi strains expressing *hia* genes. For the prototype *hmr*-expressing strain (NTHi 12), 10^3 to 10^8 cfu could be used to establish infection, but 5×10^8 cfu of NTHi strain 33 was required, and even at this high level no infection could be established with the prototype *hia*-expressing strain 11. At a 100 μ g dose, it is evident that there is partial protection in the immunized cohort, although there is no protection at a 50 μ g dose. Such protection against the early stages of disease illustrates the utility of the rHia adhesins as vaccine antigens.

Referring to Fig. 17, there is illustrated the oligonucleotides used to PCR amplify additional *Haemophilus influenzae hia* genes. The sequences are based upon the conserved amino and carboxy terminal sequences of the Hia and Hsf proteins.

Referring to Fig. 18, there is illustrated the complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the NTHi strain 33 *hia* gene. Referring to Fig. 19, there is illustrated the complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the NTHi strain 32 *hia* gene. Referring to Fig. 20, there is illustrated the complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the NTHi strain 29 *hia* gene. Referring to Fig. 21, there is illustrated the

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

27

complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the NTHi strain M4071 *hia* gene. Referring to Fig. 22, there is illustrated the complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the NTHi strain K9 *hia* gene. Referring to Fig. 23, there is illustrated the complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the NTHi strain K22 *hia* gene. Referring to Fig. 24, there is illustrated the complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *Haemophilus influenzae* type c strain API *hia* gene. Referring to Fig. 25, there is illustrated the complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *hia* locus from NTHi strain 12. The PCR amplified fragment contains the 3'-end of a gene related to HI1733 gene of the *Haemophilus influenzae* type d strain Rd genome joined to the 3'-end of an *hia* gene. An alignment of the upstream ORF with the HI1733 protein is shown in Fig. 27.

Figure 26 shows the complete nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of the *Hia* gene from NTHi strain 11, as published in the aforementioned USP 5,646,259.

Referring to Fig. 28, there is illustrated an alignment of the deduced protein sequences from Hsf, *Hia*, and partial sequences of the *M. catarrhalis* 200 kDa protein.

It is clearly apparent to one skilled in the art, that the various embodiments of the present invention have use in applications in the fields of vaccination, diagnosis, treatment of *Haemophilus* infection and the generation of immunological agents. A further non-

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

28

limiting discussion of such uses is further presented below.

Vaccine Preparation and Use

Immunogenic compositions, suitable to be used as
5 vaccines, may be prepared from immunogenic recombinant *Haemophilus influenzae* adhesin (rHia) proteins of non-typeable *Haemophilus* strains, immunogenic analogs and fragments thereof and/or immunogenic peptides as disclosed herein. The vaccine elicits an immune
10 response which produces antibodies, including anti-rHia antibodies and antibodies that are opsonizing or bactericidal.

Immunogenic compositions, including vaccines, may be prepared as injectables, as liquid solutions or
15 emulsions. The rHia protein, immunogenic analogs and fragments thereof and/or immunogenic peptides may be mixed with pharmaceutically acceptable excipients which are compatible with the rHia protein, immunogenic fragments analogs or immunogenic peptides. Such
20 excipients may include, water, saline, dextrose, glycerol, ethanol and combinations thereof.

The immunogenic compositions and vaccines may further contain auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, or adjuvants
25 to enhance the effectiveness of the vaccines.

Immunogenic compositions and vaccines may be administered parenterally, by injection subcutaneously or intramuscularly. Alternatively, the immunogenic compositions formed according to the present invention,
30 may be formulated and delivered in a manner to evoke an immune response at mucosal surfaces. Thus, the

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

29

immunogenic composition may be administered to mucosal surfaces by, for example, the nasal or oral (intragastric) routes.

The immunogenic composition may be provided in combination with a targeting molecule for delivery to specific cells of the immune system or to mucosal surfaces. Some such targeting molecules include vitamin B12 and fragments of bacterial toxins, as described in WO 92/17167 (Biotech Australia Pty. Ltd.), and monoclonal antibodies, as described in U.S. Patent No. 5,194,254 (Barber et al).

Alternatively, other modes of administration including suppositories and oral formulations may be desirable. For suppositories, binders and carriers may include, for example polyalkylene glycols or triglycerides. Oral formulations may include normally employed excipients such as, for example pharmaceutical grades of saccharine, cellulose and magnesium carbonate. These compositions take the form of solutions, suspensions, tablets, pills, capsules, sustained release formulations or powders and contain about 1 to 95% of the rHia protein, fragment analogs and/or peptides.

The vaccines are administered in a manner compatible with the dosage formulation, and in such amount as will be therapeutically effective, protective and immunogenic. The quantity to be administered depends on the subject to be treated, including, for example, the capacity of the individual's immune system to synthesize antibodies, and if needed, to produce a cell-mediated immune response. Precise amounts of

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

30

active ingredient required to be administered depend on the judgment of the practitioner. However, suitable dosage ranges are readily determinable by one skilled in the art and may be of the order of micrograms of the rHia, analogs and fragments thereof and/or peptides. Suitable regimes for initial administration and booster doses are also variable, but may include an initial administration followed by subsequent administrations. The dosage of the vaccine may also depend on the route of administration and will vary according to the size of the host.

The nucleic acid molecules encoding the rHia proteins of non-typeable *Haemophilus* may also be used directly for immunization by administration of the DNA directly, for example by injection for genetic immunization or by constructing a live vector, such as *Salmonella*, BCG, adenovirus, poxvirus, vaccinia or poliovirus, containing the nucleic acid molecule. A discussion of some live vectors that have been used to carry heterologous antigens to the immune system is contained in, for example, O'Hagan (1992) (ref. 16). Processes for the direct injection of DNA into test subjects for genetic immunization are described in, for example, Ulmer et al., 1993 (ref. 17).

Immunogenicity can be significantly improved if the antigens are co-administered with adjuvants, commonly used as an 0.05 to 1.0 percent solution in phosphate - buffered saline. Adjuvants enhance the immunogenicity of an antigen but are not necessarily immunogenic themselves. Adjuvants may act by retaining the antigen locally near the site of administration to

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

31

produce a depot effect facilitating a slow, sustained release of antigen to cells of the immune system. Adjuvants can also attract cells of the immune system to an antigen depot and stimulate such cells to elicit
5 immune responses.

Immunostimulatory agents or adjuvants have been used for many years to improve the host immune responses to, for example, vaccines. Intrinsic adjuvants, such as lipopolysaccharides, normally are
10 the components of the killed or attenuated bacteria used as vaccines. Extrinsic adjuvants are immunomodulators which are typically non-covalently linked to antigens and are formulated to enhance the host immune responses. Thus, adjuvants have been
15 identified that enhance the immune response to antigens delivered parenterally. Some of these adjuvants are toxic, however, and can cause undesirable side-effects, making them unsuitable for use in humans and many animals. Indeed, only aluminum hydroxide and aluminum
20 phosphate (collectively commonly referred to as alum) are routinely used as adjuvants in human and veterinary vaccines. The efficacy of alum in increasing antibody responses to diphtheria and tetanus toxoids is well established.

25 A wide range of extrinsic adjuvants can provoke potent immune responses to antigens. These include the specific adjuvants detailed above as well as saponins complexed to membrane protein antigens (immune stimulating complexes), pluronic polymers with mineral
30 oil, killed mycobacteria and mineral oil, Freund's complete adjuvants, bacterial products, such as muramyl

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

32

dipeptide (MDP) and lipopolysaccharide (LPS), as well as lipid A, and liposomes.

To efficiently induce humoral immune responses (HIR) and cell-mediated immunity (CMI), immunogens are emulsified in adjuvants. Many adjuvants are toxic, inducing granulomas, acute and chronic inflammations (Freund's complete adjuvant, FCA), cytotoxicity (saponins and pluronic polymers) and pyrogenicity, arthritis and anterior uveitis (LPS and MDP). Although FCA is an excellent adjuvant and widely used in research, it is not licensed for use in human or veterinary vaccines because of its toxicity.

Desirable characteristics of ideal adjuvants include:

- (1) lack of toxicity;
 - (2) ability to stimulate a long-lasting immune response;
 - (3) simplicity of manufacture and stability in long-term storage;
 - (4) ability to elicit both CMI and HIR to antigens administered by various routes, if required;
 - (5) synergy with other adjuvants;
 - (6) capability of selectively interacting with populations of antigen presenting cells (APC);
 - (7) ability to specifically elicit appropriate T_H1 or T_H2 cell-specific immune responses; and
 - (8) ability to selectively increase appropriate antibody isotype levels (for example, IgA) against antigens.
- US Patent No. 4,855,283 granted to Lockhoff et al on August 8, 1989 which is incorporated herein by

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

33

reference thereto teaches glycolipid analogues including N-glycosylamides, N-glycosylureas and N-glycosylcarbamates, each of which is substituted in the sugar residue by an amino acid, as immuno-modulators or
5 adjuvants. Thus, Lockhoff et al. 1991 (ref. 18) reported that N-glycolipid analogs displaying structural similarities to the naturally-occurring glycolipids, such as glycosphingolipids and glyco-
10 glycerolipids, are capable of eliciting strong immune responses in both herpes simplex virus vaccine and pseudorabies virus vaccine. Some glycolipids have been synthesized from long chain-alkylamines and fatty acids that are linked directly with the sugars through the anomeric carbon atom, to mimic the functions of the
15 naturally occurring lipid residues.

U.S. Patent No. 4,258,029 granted to Moloney, assigned to the assignee hereof and incorporated herein by reference thereto, teaches that octadecyl tyrosine hydrochloride (OTH) functions as an adjuvant when
20 complexed with tetanus toxoid and formalin inactivated type I, II and III poliomyelitis virus vaccine. Also, Nixon-George et al. 1990 (ref. 19), reported that octadecyl esters of aromatic amino acids complexed with a recombinant hepatitis B surface antigen, enhanced the
25 host immune responses against hepatitis B virus.

Immunoassays

The rHia protein of a non-typeable strain of *Haemophilus*, analogs and fragments thereof produced according to the present invention are useful as
30 immunogens, as antigens in immunoassays including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), RIAs and

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

34

other non-enzyme linked antibody binding assays or procedures known in the art for the detection of anti-bacterial, *Haemophilus*, and/or Hia antibodies. In ELISA assays, the Hia protein, analogs and fragments are
5 immobilized onto a selected surface, for example a surface capable of binding proteins or peptides, such as the wells of a polystyrene microtiter plate. After washing to remove incompletely adsorbed Hia protein, analogs and/or fragments, a nonspecific protein such as
10 a solution of bovine serum albumin (BSA) or casein that is known to be antigenically neutral with regard to the test sample may be bound to the selected surface. This allows for blocking of nonspecific adsorption sites on the immobilizing surface and thus reduces the
15 background caused by nonspecific bindings of antisera onto the surface.

The immobilizing surface is then contacted with a sample, such as clinical or biological materials, to be tested in a manner conducive to immune complex
20 (antigen/antibody) formation. This may include diluting the sample with diluents, such as BSA, bovine gamma globulin (BGG) and/or phosphate buffered saline (PBS)/Tween. The sample is then allowed to incubate for
25 from about 2 to about 4 hours, at temperature such as of the order of about 25° to about 37°C. Following incubation, the sample-contacted surface is washed to remove non-immunocomplexed material. The washing procedure may include washing with a solution such as PBS/Tween, or a borate buffer.

30 Following formation of specific immunocomplexes between the test sample and the bound Hia protein,

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

35

analogs and/or fragments, and subsequent washing, the occurrence, and even amount, of immunocomplex formation may be determined by subjecting the immunocomplex to a second antibody having specificity for the first
5 antibody. If the test sample is of human origin, the second antibody is an antibody having specificity for human immunoglobulins and in general IgG. To provide detecting means, the second antibody may have an associated activity, such as an enzymatic activity,
10 that will generate, for example, a color development, upon incubating with an appropriate chromogenic substrate. Quantification may then achieved by measuring the degree of color generation using, for example, a visible spectra spectrophotometer.

15 **Use of Sequences as Hybridization Probes**

The nucleotide sequences of the present invention, comprising the newly-isolated and characterized sequences of the *hia* genes, allow for the identification and cloning of the *hia* genes from other
20 non-typeable strains of *Haemophilus*.

The nucleotide sequences comprising the sequence of *hia* genes of the present invention are useful for their ability to selectively form duplex molecules with complementary stretches of other *hia* genes. Depending
25 on the application, a variety of hybridization conditions may be employed to achieve varying degrees of selectivity of the probe toward the other *hia* genes in other strains of non-typeable *Haemophilus*. For a high degree of selectivity, relatively stringent
30 conditions are used to form the duplexes, such as low salt and/or high temperature conditions, such as

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

36

provided by 0.02 M to 0.15 M NaCl at temperatures of between about 50°C to 70°C. For some applications, less stringent hybridization conditions are required such as 0.15 M to 0.9 M salt, at temperatures ranging from 5 between 20°C to 55°C. Hybridization conditions can also be rendered more stringent by the addition of increasing amount of formamide, to destabilize the hybrid duplex. Thus, particular hybridization conditions can be readily manipulated, and will 10 generally be a method of choice depending on the desired results. In general, convenient hybridization temperatures in the presence of 50% formamide and 0.15 M NaCl are: 42°C for an *hla* gene which is about 95 to 100% homologous to the target nucleic acid fragment, 15 37°C for about 90 to 95 homology and 32°C for about 85 to 90% homology.

In a clinical diagnostic embodiment, the nucleic acid sequences of the *hla* genes of the present invention may be used in combination with an 20 appropriate means, such as a label, for determining hybridization. A wide variety of appropriate indicator means are known in the art, including radioactive, enzymatic or other ligands, such as avidin/biotin, which are capable of providing a detectable signal. In 25 some diagnostic embodiments, an enzyme tag, such as urease, alkaline phosphatase or peroxidase, instead of a radioactive tag may be used. In the case of enzyme tags, colorimetric indicator substrates are known which can be employed to provide a means visible to the human 30 eye or spectrophotometrically, to identify specific

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

37

hybridization with samples containing *Hia* genes sequences.

The nucleic acid sequences of *Hia* genes of the present invention are useful as hybridization probes in solution hybridizations and in embodiments employing solid-phase procedures. In embodiments involving solid-phase procedures the test DNA (or RNA) from samples, such as clinical samples, including exudates, body fluids (e.g., serum, amniotic fluid, middle ear effusion, sputum, bronchoalveolar lavage fluid) or even tissues, is adsorbed or otherwise affixed to a selected matrix or surface. The fixed, single-stranded nucleic acid is then subjected to specific hybridization with selected probes comprising the nucleic acid sequences of the *hia* genes or fragments thereof of the present invention under desired conditions. The selected conditions will depend on the particular circumstances based on the particular criteria required depending on, for example, the G+C contents, type of target nucleic acid, source of nucleic acid, size of hybridization probe etc. Following washing of the hybridization surface so as to remove non-specifically bound probe molecules, specific hybridization is detected, or even quantified, by means of the label. It is preferred to select nucleic acid sequence portions which are conserved among species of *Haemophilus*. The selected probe may be at least 18 bp in length and may be in the range of 30 bp to 90 bp long.

Expression of the *Haemophilus influenzae* adhesin Genes

Plasmid vectors containing replicon and control sequences which are derived from species compatible

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

38

with the host cell may be used for the expression of the *hla* genes in expression systems. The vector ordinarily carries a replication site, as well as marking sequences which are capable of providing phenotypic selection in transformed cells. For example, *E. coli* may be transformed using pBR322 which contains genes for ampicillin and tetracycline resistance and thus provides easy means for identifying transformed cells. The pBR322 plasmid, or other microbial plasmid or phage, must also contain, or be modified to contain, promoters which can be used by the host cell for expression of its own proteins.

In addition, phage vectors containing replicon and control sequences that are compatible with the host can be used as a transforming vector in connection with these hosts. For example, the phage in lambda GEM™-11 may be utilized in making recombinant phage vectors which can be used to transform host cells, such as *E. coli* LE392.

Promoters commonly used in recombinant DNA construction include the β -lactamase (penicillinase) and lactose promoter systems and other microbial promoters, such as the T7 promoter system employed herein in preferred embodiments (U.S. Patent 4,952,496). Details concerning the nucleotide sequences of promoters are known, enabling a skilled worker to ligate them functionally with genes. The particular promoter used will generally be a matter of choice depending upon the desired results. Hosts that are appropriate for expression of the *Hla* protein and immunological fragments or analogs thereof include *E.*

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

39

coli, *Bordetella* species, *Bacillus* species, *Haemophilus*, fungi, yeast or the baculovirus expression system may be used. *E. coli* is the preferred host used herein.

5 In accordance with this invention, it is preferred to produce the Hia proteins by recombinant methods, particularly when the naturally occurring Hia protein as purified from a culture of a species of *Haemophilus* may include trace amounts of toxic materials or other
10 contaminants. This problem can be avoided by using recombinantly produced Hia protein in heterologous systems which can be isolated from the host in a manner to minimize contaminants in the purified materials, specifically employing the constructs described herein.

15 BIOLOGICAL DEPOSITS

A vector that contains nucleic acid coding for a high molecular weight protein of a non-typeable strain of *Haemophilus* that is described and referred to herein has been deposited with the America Type Culture
20 Collection (ATCC) located at 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA, pursuant to the Budapest Treaty and prior to the filing of this application. Samples of the deposited vector will become available to the public and all restrictions
25 imposed or access to the deposits will be received upon grant of a patent based on this United States patent application. In addition, the deposit will be replaced if viable samples cannot be dispensed by the Depository. The invention described and claimed herein
30 is not limited in scope by the biological materials deposited, since the deposited embodiment is intended

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

40

only as an illustration of the invention. Any equivalent or similar vectors that contain nucleic acid which encodes equivalent or similar antigens as described in this application are within the scope of the invention.

Deposit Summary

<u>Plasmid</u>	<u>ATCC</u>	<u>Deposit Date</u>
BK-96-2-11	203771	February 11, 1999

EXAMPLES

The above disclosure generally describes the present invention. A more complete understanding can be obtained by reference to the following specific Examples. These Examples are described solely for purposes of illustration and are not intended to limit the scope of the invention. Changes in form and substitution of equivalents are contemplated as circumstances may suggest or render expedient. Although specific terms have been employed herein, such terms are intended in a descriptive sense and not for purposes of limitations.

Methods of molecular genetics, protein biochemistry, immunology and fermentation technology used, but not explicitly described in this disclosure and these Examples, are amply reported in the scientific literature and are well within the ability of those skilled in the art.

Example 1

This Example describes the construction of plasmid DS-2008-2-3 that expresses full-length rHia proteins from NTHi strain 11.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

41

Chromosomal DNA was purified from NTHi strain 11 and the full-length *hia* gene was PCR amplified using the oligonucleotides (5038.SL and 5039.SL) described in Figure 1B. An Nde I site was engineered at the 5'-end of the gene and a BamH I site was engineered at the 3'-end for cloning into the pT7-7 expression vector (ref. 21). The amplified fragment was digested with Nde I/BamH I and cloned into pT7-7 that had been digested with the same enzymes. Plasmid DS-2008-2-3 contains a 3.4 kb strain 11 *hia* gene downstream of the T7 promoter (Fig. 1A). The plasmid was used to express recombinant Hia (Example 9 below).

Example 2

This Example illustrates the recognition of rHia by anti-native *Moraxella catarrhalis* high molecular weight adhesin antibody.

There is some sequence conservation observed between the *Haemophilus influenzae* Hia proteins and a *Moraxella catarrhalis* high molecular weight adhesin identified as the *M. catarrhalis* 200 kDa protein in aforementioned US Patent No. 5,808,024 (Fig. 28). The native *M. catarrhalis* 200 kDa protein was gel purified as described in US Patent No. 5,808,024 and guinea pig anti-native 200 kDa antibody was generated. The T7 *hia* gene was expressed from plasmid DS-2008-2-3 and the cell culture containing the rHia protein was electroblotted to nitrocellulose membrane. Immunoblot analysis using anti-native 200 kDa antibody showed that the antibody recognized the rHia protein, as seen in Figure 2.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

42

Example 3

This Example describes the construction of plasmids DS-2092-1 and DS-2092-40 that contain tandem copies of *T7 hia* (11) gene cassettes.

5 In order to improve the production of full-length recombinant Hia protein, tandem copies of the *T7 hia* gene cassette containing the strain 11 *hia* gene (Example 1) were inserted into a single vector. Plasmid DS-2008-2-3 was linearized with *Bgl* II and
10 dephosphorylated. Plasmid DS-2008-2-3 was also digested with *Bgl* II and *Bam*H I to excise the *T7 hia* gene cassette. The *T7 hia* fragment was ligated into the linearized vector to generate plasmid DS-2092-1 that contains two copies of the *T7 hia* gene in the
15 anti-clockwise orientation (a,a) and plasmid DS-2092-40 that contains tandem copies in opposite orientations (a,c) (Fig. 3). There was no obvious improvement in expression of rHia from either construct (see Example 9 below).

20 Example 4

This Example describes the construction of plasmids expressing truncated strain 11 *hia* genes.

The production of the rHia protein from single or tandem copies of the *T7 hia* gene cassette was very low
25 and the protein seemed to be toxic to *E. coli* (as described below in Example 9). Since *H. influenzae* Hia is a surface-exposed adhesin molecule, it must either utilize a signal sequence or accessory protein(s) for secretion, but there are no known accessory genes
30 involved. If the signal sequence were removed for expression of the recombinant protein in *E. coli*, the

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

43

rHia might be expressed as inclusion bodies and the toxic effect reduced. A putative signal sequence and cleavage sites were identified and four constructs expressing N-terminally truncated rHia proteins were designed (Fig. 4). There is a unique *Sty* I site in the strain 11 *hla* gene about 500 bp from the start codon. Plasmid DS-2008-2-3 was digested with *Nde* I and *Sty* I and the 5.7 kb vector fragment purified (Fig. 5A). PCR primers were designed to amplify from the truncation site to the *Sty* I site and a unique *Nhe* I site was introduced into the antisense primer for screening truncated clones (Fig. 5B). The amplified fragments were subcloned into pCRII for easier manipulation, generating plasmids DS-2153R-1-2 (E21), DS-2165-4-8 (T33), DS-2153-3-5 (V38), and DS-2153-4-4 (N52). The pCRII *hla* plasmids were digested with *Nde* I and *Sty* I and the fragments ligated with the vector piece from DS-2008-2-3. Plasmids DS-2186-1-1 (E21), DS-2201-1 (T33), DS-2186-2-1 (V38), and DS-2168-2-6 (N52) were generated that contained the T7 promoter and truncated *hla* genes as indicated in parentheses. These plasmids were used to express recombinant Hia (see Example 9 below).

Example 5

This Example describes the construction of plasmid BK-96-2-11 that contains the T7 V38 *hla* (11) cassette, the *E. coli* *cer* gene, and the kanamycin resistance gene.

Plasmid DS-1843-2 is a pBR328-based plasmid in which a multiple cloning site and two transcription terminators have been introduced on oligonucleotides,

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

44

between the *EcoR* I and *Pst* I sites, thus destroying both the chloramphenicol and ampicillin resistance genes (Fig. 6B). The kanamycin resistance gene from pUC-4K was inserted at the *Sal* I site, to generate 5 plasmid DS-2147-1 that is kanamycin resistant and tetracycline sensitive. Plasmid DS-2224-1-4 is a pUC plasmid containing a synthetic *E. coli* *cer* gene (ref. 15) constructed from oligonucleotides and flanked by *BamH* I sites. The 290 bp *BamH* I fragment of the *cer* 10 gene was inserted into the *BamH* I site of DS-2147-1 creating plasmid BK-2-1-2. This pBR-based plasmid thus contains a multiple cloning site, the kanamycin resistance gene and the *cer* gene. Plasmid BK-2-1-2 was linearized with *Bgl* II and dephosphorylated. Plasmid 15 DS-2186-2-1 was digested with *Bgl* II and *BamH* I and the 3.6 kb *T7 V38 hia* fragment was inserted into BK-2-1-2, creating plasmid BK-96-2-11 (Fig. 6A).

Example 6

This Example describes the construction of 20 plasmids DS-2242-1 and DS-2242-2 that express the full-length NTHi strain 33 *hia* gene in the presence of the *E. coli* *cer* gene.

Chromosomal DNA was purified from NTHi strain 33 and PCR amplification was performed using 25 oligonucleotides 5039.SL and 5040.SL (Fig. 17). The sense primer (5040.SL) was designed based upon the 5'-flanking sequence of strain 11 *hia* and the conserved amino terminal sequences of the NTHi Hia and Hib Hsf proteins. The antisense primer (5039.SL) was the same 30 as that described in Example 1 and was based upon the conserved carboxy terminal sequences of the Hia and Hsf

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

45

proteins. The 3 kb strain 33 *hla* PCR fragment was cloned into pCR II, generating plasmid DS-1917-3-8.

In order to express the full-length strain 33 *hla* gene, approximately 106 bp of the 5'-end of the gene was synthesized from oligonucleotides, from the start codon to an *Alw*NI site (Fig. 7B). Plasmid DS-1917-3-8 was digested with *Alw*NI and *Bam*HI and the approximately 2.9 kb fragment containing the *hla* gene was purified. Plasmid pT7-7 was digested with *Nde*I and *Bam*HI. The *Nde*I - *Alw*NI oligonucleotides and *Alw*NI - *Bam*HI *hla* fragment were ligated into the pT7-7 vector, generating plasmid DS-2103-4.

In order to include the *E. coli* *cer* gene and utilize kanamycin selection, the *Bgl*II - *Bam*HI fragment containing the T7 *hla* (33) gene cassette was excised from DS-2103-4 and cloned into BK-2-1-1 that had been digested with *Bgl*II and dephosphorylated. Plasmids DS-2242-1 and DS-2242-2 contain single copies of the T7 *hla* (33) gene cassette in opposite orientations, the *E. coli* *cer* gene, and the kanamycin resistance gene (Fig. 7A).

Example 7

This Example describes the construction of plasmid DS-2340-2-3 that contains a T7 *hla* gene cassette with a truncated V38 strain 33 *hla* gene, the *E. coli* *cer* gene, and the kanamycin resistance gene.

PCR primers were designed to amplify a 250 bp fragment of the 5'-end of the NTHi strain 33 *hla* gene from a V38 start codon up to an internal *Sna*BI site. An *Nde*I site was added at the 5'-end for cloning purposes and the fragment was amplified using plasmid

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

46

DS-2242-1 as template. The construction scheme is shown in Figure 8A and the PCR primers are shown in Figure 8B. The fragment was cloned into pCR II generating plasmid DS-2328-1-1. DS-2242-1 was digested with *Nde* I and *Sna*B I and the 8.5 kb vector fragment purified. DS-2328-1-1 was digested with *Nde* I and *Sna*B I and the 0.25 kb 5' *hla* fragment was ligated with the 8.5 kb vector fragment from DS-2242-1, to generate plasmid DS-2340-2-3.

10 Example 8

This Example illustrates the construction of plasmids DS-2447-2 and DS-2448-17 that contain tandem copies of *T7 V38 hla* (11) or *T7 V38 hla* (33) gene cassettes, respectively, the *E. coli* *cer* gene, and a kanamycin resistance gene.

Plasmid BK-96-2-11, that contains a *T7 V38 hla* (11) gene cassette, was linearized with *Bgl* II and dephosphorylated. The *Bgl* II-*Bam*H I *T7 V38 hla* (11) gene cassette from DS-2186-2-1 was ligated into BK-96-2-11, generating plasmid DS-2447-2 that contains tandem copies of the *T7 V38 hla* (11) gene in the same orientation (Fig. 9A).

Plasmid DS-2340-2-3 was digested with *Eco*R I and the *T7 V38 hla* (33) gene cassette was subcloned into pUC-BgXb that had been digested with *Eco*R I and dephosphorylated. The resultant plasmid, DS-2440-2 was digested with *Bgl* II and *Bam*H I to release the *T7 V38 hla* (33) cassette that was ligated with DS-2340-2-3 that had been linearized with *Bgl* II and dephosphorylated. Plasmid DS-2448-17 contains tandem *T7 V38 hla* (33) genes in the same orientation (Fig. 9B).

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

47

Example 9

This Example illustrates the expression of full-length and truncated recombinant *hia* genes.

DNA from expression plasmids prepared as described in the preceding Examples, was introduced into 5 electrocompetent *E. coli* BL21 (DE3) cells using a BioRad electroporator. Cells were grown at 37°C in NZCYM medium using the appropriate antibiotic selection to A₅₇₈ of 0.3 before the addition of lactose to 1.0% for 4 hours. Samples were adjusted to 0.2 OD/μl with 10 SDS-PAGE lysis + loading buffer and the same amount of each protein sample was loaded onto SDS-PAGE gels (ref. 22). Figure 10 illustrates the relative production of rHia (11) proteins from various constructs. As seen in panel A, there is an increase in production with 15 decreased size of rHia. V38- (lane 5) and N52-truncated rHia (lane 6) have significantly higher expression levels than their longer counterparts (lanes 2, 3, 4). In addition, panel B demonstrates that the production of V38 rHia is apparently increased in the presence of 20 the *cer* gene.

Example 10

This Example illustrates the purification of rHia proteins.

All the recombinant Hia proteins were expressed as 25 inclusion bodies in *E. coli* and were purified by the same procedure (Fig.11). *E. coli* cell pellets from 500 ml culture were resuspended in 50 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 0.1 M NaCl, and disrupted by sonication. The extract was centrifuged at 20,000 g 30 for 30 min and the resultant supernatant was discarded.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

48

The pellet (PPT₁) was further extracted, in 50 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 containing 0.5% Triton X-100 and 10 mM EDTA, then centrifuged at 20,000 g for 30 min, and the supernatant was discarded. The pellet (PPT₂) was
5 further extracted in 50 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 1% octylglucoside, then centrifuged at 20,000 g for 30 min, and the supernatant was discarded.

The resultant pellet (PPT₃) obtained after the above extractions contains the inclusion bodies. The
10 pellet was solubilized in 6 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 6 M guanidine and 5 mM DTT. Twelve ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 was added to this solution and the mixture was centrifuged at 20,000 g for 30 min. The supernatant (SUP₄) was precipitated with
15 polyethylene glycol (PEG) 4000 at a final concentration of 7%. The resultant pellet (PPT₅) was removed by centrifugation at 20,000 g for 30 min and the supernatant was precipitated by (NH₄)₂SO₄ at 50% saturation. The (NH₄)₂SO₄ precipitate was collected by
20 centrifugation at 20,000 g for 30 min. The resultant pellet (PPT₆) was dissolved in 2 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 6 M guanidine HCl and 5 mM DTT and the clear solution was purified on a Superdex 200 gel filtration column equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH
25 8.0, containing 2 M guanidine HCl. The fractions were analysed by SDS-PAGE and those containing the purified rHia were pooled and dialysed overnight at 4°C against PBS, then centrifuged at 20,000 g for 30 min. The protein remained soluble under these conditions and
30 glycerol was added to the rHia preparation at a final concentration of 20% for storage at -20°C. SDS-PAGE

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

49

analysis of purified V38 rHia (11) and V38 rHia (33) is illustrated in Figure 12. The average yield of the purified V38 rHia proteins is about 10 mg L⁻¹ culture.

In order to study the stability of rHia, the purified V38 rHia (11) protein was stored at 4°C with or without glycerol and at -20°C with glycerol. The protein was found to be stable under all three conditions and remained intact for at least eight weeks with repeated freezing and thawing (Fig. 13).

10 Example 11

This Example illustrates the immunogenicity of V38 rHia (11) and V38 rHia (33) proteins.

Hyperimmune antisera against rHia proteins were produced by immunizing two guinea pigs (Charles River) intramuscularly (i.m.) with 5 µg doses of antigen emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA, Difco) on day 1. Animals were boosted on days 14 and 28 with 5 µg doses of protein in incomplete Freund's adjuvant (IFA) and sera were collected on day 42. Anti-Hib strain Minna and anti- *Haemophilus* type a strain ATCC 9006 antisera were generated using the same protocol, except that a heat-inactivated bacterial preparation was used as the immunogen (1x10⁸ cfu per dose).

To study the immunogenicity of the V38 rHia proteins, groups of five CD-1 mice (Charles River, Quebec) were immunized s.c. on days 1 and 28 with 0.3, 1, 3, and 10 µg of antigen, in the presence of AlPO₄ (alum) (1.5 mg per dose). Blood samples were collected on days 1, 28 and 42. Mice generated significant anti-V38 rHia antibody responses even with a single injection of 0.3 µg antigen (Fig. 14, panel A),

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

50

suggesting that both proteins had retained immunogenicity after inclusion body extraction and solubilization. No statistically significant difference was found in the antibody titers induced by the V38 rHia proteins derived from strains 11 or 33.

To study the immunogenicity of the V38 rHia (11) protein in BALB/c mice, groups of five animals (Charles River, Quebec) were immunized s.c. on days 1, 28 and 42 with 0.3, 1, 3, and 10 µg of antigen, in the presence of AlPO₄ (1.5 mg per dose). Blood samples were collected on days 1, 14, 28, 42 and 56. High antibody titers were observed in all groups, indicating that the protein is very immunogenic even at 0.3 µg per dose (Fig. 15, panel A).

To study the immunogenicity of the V38 rHia (11) protein in guinea pigs, groups of five animals (Charles River, Quebec) were immunized s.c. on days 1, 28 and 42 with 0.3, 1, 3, and 10 µg of antigen, in the presence of AlPO₄ (1.5 mg per dose). Blood samples were collected on days 1, 14, 28, 42 and 56. High antibody titers were observed in all groups, indicating that the protein is also very immunogenic in guinea pigs (Fig. 15, panel B).

Example 12

This Example illustrates the analysis of the protection afforded by anti-rHia antibodies in passive infant rat models of bacteremia.

Pregnant Wistar rats were purchased from Charles River. In the *H. influenzae* type b bacteremia model, groups of 6 to 10 five-day old infant rats were injected s.c. in the dorsal region with 0.1 ml of

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

51

guinea pig anti-rHia or anti-strain MinnA antiserum. The control animals received injections with pre-immune sera only. Twenty hours later, the animals were challenged intraperitoneally (i.p.) with 200 to 240 colony-forming units (cfu) of freshly grown Hib strain MinnA (0.1 ml). Blood samples were collected 20 h post-challenge, via cardiac puncture under isoflurane anesthesia and plated on chocolate agar plates. Colonies were counted after one day and the results were statistically analyzed by Fisher's Exact test.

In the *H. influenzae* type a bacteremia model (ref. 23), groups of 9 to 10 five-day old infant rats were injected s.c. in the dorsal region with 0.1 ml of guinea pig anti-rHia or anti-strain ATCC 9006 antiserum. The animals in the control group were injected with guinea pig pre-immune serum. Twenty hours later, the animals were challenged i.p. with 100,000 cfu of freshly grown *H. influenzae* type a strain ATCC 9006 (0.1 ml). Blood samples were collected 20 h post-challenge and analysed as described above.

As shown in Tables 1 and 2 below, the infant rats that were passively immunized with either guinea pig anti-rHia (11) or anti-V38 rHia (11) antisera, were all significantly protected against type a or type b *H. influenzae* caused bacteremia. These results demonstrate that antibodies raised to the slightly truncated Hia protein (V38 rHia) are as efficacious as those raised to the full-length protein at protecting animals against bacteremia caused by type a or type b *H. influenzae*. Such protection afforded by an NTHi-derived recombinant protein against invasive disease

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

52

caused by encapsulated bacteria, illustrates the utility of the rHia proteins as vaccine antigens.

Example 13

This Example illustrates the protection afforded
5 by immunization with V38 rHia protein in a chinchilla model of nasopharyngeal colonization.

A nasopharyngeal colonization model has been described by Yang et al (ref. 20). The model works well for those NTHi strains that produce the HMW
10 adhesins, but reproducible colonization could not be established with Hia-producing strains under the same conditions. Repeated attempts to colonize with the prototype Hia-producing NTHi strain 11, were unsuccessful. Colonization was achieved with NTHi
15 strain 33 at 5×10^8 cfu per inoculum, compared with only 10^6 cfu required for the prototype HMW-producing NTHi strain 12. Under these conditions, partial protection was observed in animals immunized with 100 μ g of V38 rHia (33) and challenged with the homologous
20 NTHi strain 33.

Example 14

This Example illustrates the cloning and sequence analysis of additional *hia* genes from *H. influenzae* strains.

25 Oligonucleotides (5040.SL and 5039.SL) for PCR amplification were designed based upon the conserved promoter, N-terminal and C-terminal sequences of the *hia* and *hsf* genes and proteins (Fig. 17). The strains chosen for PCR amplification were chosen based upon
30 their reactivity with anti-rHia (11) antisera.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

53

Chromosomal DNA was prepared from NTHi strains 12, 29, 32, M4071, K9 and, K22 and *Haemophilus* type c strain API. PCR amplification was performed as follows: each reaction mixture contained 5 to 100 ng of DNA, 1 5 µg of each primer, 5 units of taq+ or tsq+ (Sangon) or taq plus long (Stratagene), 2 mM dNTPs, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, BSA. Cycling conditions were: 95°C for 1 min, followed by 25 cycles of 95°C for 30 sec, 45°C for 10 1 min, 72°C for 2 min; then 72°C for 10 min.

The nucleotide and deduced amino acid sequences of the *hla* gene from strain 33 are shown in Figure 18. The predicted Hla protein from strain 33 has a molecular weight of 103.6 kDa and a pI of 9.47. The nucleotide 15 and deduced amino acid sequences of the *hla* gene from strain 32 are shown in Figure 19. The predicted Hla protein from strain 32 has a molecular weight of 70.4 kDa and a pI of 5.67. There is a KDEL sequence present between residues 493 and 496. Such sequences have been 20 associated with anchoring proteins to the endoplasmic reticulum. The deduced strain 32 Hla protein is significantly smaller and has a significantly different pI, however it does contain many of the motifs present in other Hla molecules.

The nucleotide and deduced amino acid sequences of the *hla* gene from strain 29 are shown in Figure 20. The predicted Hla protein from strain 29 has a molecular weight of 114.4 kDa and a pI of 7.58. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the *hla* gene from 30 strain K22 are shown in Figure 23. The predicted Hla protein from strain K22 has a molecular weight of 114.4

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

54

kDa and a pI of 7.58. The deduced Hia sequences from NTHi strains 29 and K22 were found to be identical. Strain 29 was isolated from a 7-month old child with otitis media in Cleveland, Ohio, while strain K22 was
5 isolated from an aborigine near Kimberly, Australia.

The nucleotide and deduced amino acid sequences of the *hia* gene from strain 4071 are shown in Figure 21. The predicted Hia protein from strain M4071 has a molecular weight of 103.4 kDa and a pI of 9.49. There
10 is a KDEL sequence present between residues 534 and 537.

The nucleotide and deduced amino acid sequences of the *hia* gene from strain K9 are shown in Figure 22. The predicted Hia protein from K9 has a molecular weight of
15 113.8 kDa and a pI of 6.45.

The nucleotide and deduced amino acid sequences of the *hia* gene from strain type c *Haemophilus* API are shown in Figure 24. The predicted Hia protein from API has a molecular weight of 249.4 kDa and a pI of 5.34.
20 The deduced Hia/Hsf sequence from the type c strain API is nearly identical to the published type b Hsf sequence except for a 60 residue insert. Since the NTHi-based Hia protein provided herein protects in passive models of type a and type b infection, it is
25 likely that it will also protect against type c disease due to sequence similarity between the type b and type c proteins.

The nucleotide and deduced amino acid sequences of the *hia* locus from strain 12 are shown in Figure 25.
30 NTHi strain 12 does not produce Hia. However, part of the *hia* gene can be PCR amplified, there is

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

55

inconsistent positive reactivity of SB12 cell lysates with anti-rHia antibody, and there is reactivity with a DNA probe derived from the 3'-end of the strain 11 *hia* gene, on Southern blots. Analysis of the PCR amplified
5 DNA, revealed a 1.8 kb fragment that contains 1 kb of the 3'-end of the upstream HI1732-related gene and 0.8 kb of the 3'-end of the *hia* gene.

PCR amplification using primers that would amplify across the putative junction of these two genes in
10 strain 12, confirmed the genetic composition of the locus. Thus it would appear that strain 12 does not produce Hia because it has suffered a deletion of the 5'-end of the *hia* gene. Figure 27 shows a sequence comparison between the upstream orf of strain 12 and
15 the Rd genome deduced HI1733 protein. Over the region of homology, the two proteins are 95% identical.

An alignment of the deduced Hia sequences from NTHi strains 33, 32, 29, K22, M4071, 11 and K9 and type c strain API compared with *H. influenzae* type b Hsf,
20 the aidA-like (Hsf/Hia) HI1732 gene from the Rd genome, and the *M. catarrhalis* 200 kDa protein from strains 4223 and LES-1 is shown in Figure 28. There is a frame shift in the Rd genome sequence resulting in premature truncation of the HI1732 protein. Additional
25 downstream sequence related to *hia*, is included here. The asterisks below the sequence indicate conserved residues. The N-terminal (approximately 50 residues) and C-terminal sequences (approximately 150 residues) are highly conserved amongst the *Haemophilus* strains,
30 while some similarity is evident with the *M. catarrhalis* counterpart. Sequence analysis reveals that

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

56

there are two potential gene families of Hia proteins, one related to the prototype strain 11 and the other more closely related to strain 33. The strains 11 and K9 proteins appear to be more like the Hsf proteins from the type b, type c or type d *Haemophilus* strains while the strains 33, 32, 29, K22 and M4071 proteins appear to form a second family.

Example 15

This Example describes the construction of plasmid JB-2930-3 that contains a T7 *hla* gene cassette with a truncated S44 strain 11 *hla* gene, the *E. coli* *cer* gene, and the kanamycin antibiotic resistance gene, and expression of S44 Hia proteins.

PCR primers were designed to amplify the S44 Hia N-terminus of the NTHi strain 11 *hla* gene from the S44 amino acid to an internal *Sty* I site (Fig 29). An *Nde* I site was added at the 5'-end for cloning purposes and the fragment was amplified using plasmid DS-2242-1 as a template. The fragment was cloned into pCR II generating plasmid JB-2910-1-1. The construction scheme is shown in Figure 30. Plasmid JB-2910-1-1 was digested with *Nde* I and *Sty* I and the 5' PCR *hla* fragment isolated. Plasmid IA-46-5 containing the V38 *hla* gene was digested with *Nde* I and *Sty* I and the larger approximately 8.5 kb fragment purified. The two purified fragments were ligated together to produce plasmid JB-2917-1. This plasmid was then digested with *Nde* I and treated with calf intestinal phosphatase (CAP), and into it was cloned the T7 promoter from plasmid IA-46-5. The promoter was cut out using *Nde* I digestion of IA-46-5. The resulting plasmid, JB-2925-3,

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

57

was digested with *Bgl* II and *Bam* HI and the *hla* gene was isolated. This fragment was ligated into the *Bgl* II/CAP-treated plasmid BK-2-1-2 to produce plasmid JB-2930-3. This plasmid contains the T7 promoter S44 *hla* gene and *E. coli* *cer* gene and kanamycin resistance.

The recombinant S44 *hla* vector was transformed into *E. coli* BL21(DE3) for expression studies. The procedure for expression in *E. coli* was as described in Example 9. Figure 31 SDS-PAGE analysis of shows the expression of recombinant S44 *hla* from two different vectors, JB-2930-3 (described above) and pET vector IA-191-3-1. Plasmid IA-191-3-1 is identical to JB-2930-3 except it is a pET vector containing the *lacI^q* repressor and, therefore, the amount of S44 *Hia* produced is less than the T7 S44 from JB-2930-3. The plasmid is shown, along with plasmid JB-2930-3, Figure 32. Figure 31 shows the S44 *Hia* as a doublet band (lane 3) at approximately 116 kDa. Upon further analysis using purified S44 *hla* from JB-2930-3, the lower band of the doublet was found to have a C-terminal truncation of 94 amino acids, while retaining the expected N-terminus. The purification process used for isolation of the truncated *Hia* was as described in Example 10.

SUMMARY OF THE DISCLOSURE

In summary of this disclosure, the present invention provides novel isolated and purified nucleic acid molecules encoding full-length and N-terminal truncated *Haemophilus influenzae* adhesin (*Hia*) proteins from *Haemophilus* which enable protective *Hia* proteins

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

58

to be produced recombinantly. Modifications are possible within the scope of this invention.

REFERENCES

1. Barbour, M.L., R.T. Mayon-White, C. Coles, D.W.M. Crook, and E.R. Moxon. 1995. The impact of conjugate vaccine on carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Infect. Dis.* **171**:93-98.
2. Berkowitz et al. 1987. *J. Pediatr.* **110**:509.
3. Claesson et al. 1989. *J. Pediatr.* **114**:97.
4. Black, S.B., H.R. Shinefield, B. Fireman, R. Hiatt, M. Polen, E. Vittinghoff, The Northern California Kaiser Permanent Vaccine Study Center Pediatrics Group. Efficacy in infancy of oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine in a United States population of 61,080 children. 1991. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **10**:97-104.
5. Nitta, D.M., M.A. Jackson, V.F. Burry, and L.C. Olson. 1995. Invasive *Haemophilus influenzae* type f disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **14**:157-160.
6. Waggoner-Fountain, L.A., J.O. Hendley, E.J. Cody, V.A. Perriello, and L.G. Donowitz. 1995. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens. *Clin. Infect. Dis.* **21**:1322-1324.
7. Madore, D.V. 1996. Impact of immunization on *Haemophilus influenzae* type b disease. *Infectious Agents and Disease* **5**:8-20.
8. Bluestone, C.D. 1982. Current concepts in otolaryngology. Otitis media in children: to treat or not to treat? *N. Engl. J. Med.* **306**:1399-1404.
9. Barenkamp, S.J., and E. Leininger. 1992. Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **60**:1302-1313.

10. St. Geme III, J.W., S. Falkow, and S.J. Barenkamp. 1993. High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2875-2879.
11. Barenkamp, S.J. 1996. Immunization with high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* modifies experimental otitis media in chinchillas. *Infect. Immun.* **64**:1246-1251.
12. St. Geme, J.W. and D. Cutter. 1995. Evidence that surface fibrils expressed by *Haemophilus influenzae* type b promote attachment to human epithelial cells. *Molec. Microbiol.* **15**:77-85.
13. Barenkamp, S.J. and J.W. St. Geme. 1996. Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. *Molec. Microbiol.* **19**:1215-1223.
14. St. Geme, J.W., D. Cutter, and S.J. Barenkamp. 1996. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J. Bact.* **178**:6281-6287.
15. Patient, M.E., and D.K. Summers. 1993. ColE1 multimer formation triggers inhibition of *Escherichia coli* cell division. *Molec. Microbiol.* **9**:1089-1095.
16. O'Hagan, D.T. 1992. Oral delivery of vaccines. Formulation and clinical pharmacokinetic considerations. *Clin. Pharmacokinet* **22**(t): 1-10.
17. Ulmer et al. 1993. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2**:983-989.
18. Lockhoff, O., 1991. Glycolipids as immunomodulators: Synthesis and properties.
19. Nixon-George A., et al., 1990. The adjuvant effect of stearyl tyrosine on a recombinant subunit

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

61

- hepatitis B surface antigen. J. Immunol 144 (12):4798-4802.
20. Yang, Y-P., S.M. Loosmore, B.J. Underdown, and M.H. Klein. 1998. Nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in chinchillas. Infect. Immun. 66:1973-1980.
 21. Tabor, S., and C.C. Richardson. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1074-1078.
 22. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227:680-685.
 23. Loosmore, S.M., Y-P. Yang, D.C. Coleman, J.M. Shortreed, D.M. England, and M.H. Klein. 1997. Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease. Infect. Immun. 65:3701-3707.
 24. Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453.
 25. Sellers, P.H. 1974 On the theory and computation of evolutionary distances. J. Appl. Math(Siam) 26:787-793.
 26. Waterman, M.S., Smith, T.F. and Beyer, W.A. 1976. Advan. Math. 20:367-387.
 27. Smith, T.F. and Waterman, M.S. 1981 Identification of common molecular subsequences. J. Mol. Biol. 147:195-197.
 28. Sobel, E. and Martinez, H.M. 1985 A multiple Sequence Alignment Program. Nucleic Acid Res. 14:363-374.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

62

TABLE 1

Protective effect of guinea pig anti-rHia (full-length) antiserum against type a or b *H. influenzae* in the infant rat model of bacteremia

Group (#)	Guinea pig serum	Anti-rHia antibody titers	No. bacteremic/ No. challenged	Mean cfu/ 100 µl blood
1	Anti-type a	nd	0/10*	0**
2	Anti-rHia	204,800	1/10*	0**
3	Preimmune	<100	7/10	88
Group (#)	Guinea pig serum	anti-rHia antibody titers	No. bacteremic/ No. challenged	Mean cfu/ 2.5 µl blood
4	Anti-MinnA	nd	0/10*	0**
5	Anti-rHia	204,800	1/10*	2**
6	Preimmune	<100	10/10	600

Five-day old infant rats were passively immunized s.c. with 0.1 ml of indicated guinea pig antiserum or preimmune serum. Twenty hours later, infant rats were challenged i.p. with either freshly grown *H. influenzae* type a strain ATCC 9006 (10⁸ cfu, 0.1 ml) for groups #1 to 3; or with freshly grown Hib strain MinnA (240 cfu, 0.1 ml) for groups # 4 to 6. Infected animals are defined as >20 cfu recovered from 100 µl of blood for groups #1 to 3; or >30 cfu recovered from 2.5 µl of blood for groups # 4 to 6.

* Fisher exact test. Statistical significance compared to animals in group 3 or 6 was found ($P < 0.05$).

** Student's unpaired t test. Statistical significance compared to animals in group 3 or 6 was found ($P < 0.05$).

nd: not determined.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

63

TABLE 2

Protective effect of guinea pig anti-V38 rHia (SB11) antiserum against type a or b *H. influenzae* in the infant rat model of bacteremia

Group (#)	Guinea pig serum	Anti-rHia antibody titers	No. bacteremic/ No. challenged	Mean cfu/ 20 µl blood
1	Anti-type a	nd	0/6*	0**
2	Anti-rHia	204,800	1/9*	5**
3	Preimmune	<100	5/8	165
Group (#)	Guinea pig serum	anti-rHia antibody titers	No. bacteremic/ No. challenged	Mean cfu/ 2 µl blood
4	Anti-MinnA	nd	0/6*	0**
5	Anti-rHia	204,800	1/9*	2**
6	Preimmune	<100	10/10	820

Five-day old infant rats were passively immunized s.c. with 0.1 ml of indicated guinea pig antiserum or preimmune serum. Twenty hours later, infant rats were challenged i.p. with either freshly grown *H. influenzae* type a strain ATCC 9006 (10^5 cfu, 0.1 ml) for groups #1 to 3; or with freshly grown Hib strain MinnA (190 cfu, 0.1 ml) for groups #4 to 6. Infected animals is defined as >20 cfu recovered from 20 µl of blood for groups #1 to 3; or >30 cfu recovered from 2 µl of blood for groups #4 to 6.

* Fisher exact test. Statistical significance compared to animals in group 3 or 6 was found ($P<0.05$)

** Student's unpaired t test. Statistical significance compared to animals in group 3 or 6 was found ($P<0.05$).

nd: Not determined.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

64

CLAIMS

What we claim is:

1. An isolated and purified nucleic acid molecule encoding a *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a strain of *Haemophilus influenzae* having:

(a) a DNA sequence selected from the group consisting of those shown in Figures 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 and 25 (SEQ ID Nos: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37); or

(b) a DNA sequence encoding a *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein having an amino acid sequence selected from the group consisting of those shown in Figures 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 and 25 (SEQ ID Nos: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38).

2. An isolated and purified nucleic acid molecule encoding an N-truncated *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a strain of *Haemophilus influenzae* which is amplifiable by a pair of nucleotides which are selected from the group consisting of:

SEQ ID No: 7 and SEQ ID No: 15

SEQ ID No: 9 and SEQ ID No: 15

SEQ ID No: 11 and SEQ ID No: 15

SEQ ID No: 13 and SEQ ID No: 15

SEQ ID No: 49 and SEQ ID No: 51

3. An isolated and purified nucleic acid encoding a truncated *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a strain of *Haemophilus influenzae* expressible as inclusion bodies.

4. A vector for transforming a host comprising the nucleic acid molecule of claim 1.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

65

5. A vector for transforming a host comprising the nucleic acid molecule of claim 2 or 3.

6. The vector of claim 4 or 5 which is a plasmid vector.

7. The vector of claim 6 wherein said plasmid vector has the identifying characteristics of a plasmid which is selected from the group consisting of:

DS-2008-2-3 as shown in Figure 1A

DS-2186-1-1 as shown in Figure 5A

DS-2201-1 as shown in Figure 5A

DS-2186-2-1 as shown in Figure 5A

DS-2168-2-6 as shown in Figure 5A

IA-191-3-1 as shown in Figure 32

8. A vector for transforming a host, comprising a nucleic acid molecule encoding a full-length or N-truncated *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein and a promoter for expression of said full-length or truncated Hia protein.

9. The vector of claim 8 further comprising the *cer* gene of *E. coli*.

10. The vector of claim 8 which is a plasmid vector.

11. The vector of claim 10 wherein said plasmid vector has the identifying characteristics of a plasmid vector which is selected from the group consisting of:

BK-96-2-11 as shown in Figure 6A

DS-2242-1 as shown in Figure 7A

DS-2242-2 as shown in Figure 7A

DS-2340-2-3 as shown in Figure 8A

DS-2447-2 as shown in Figure 9A

DS-2448-17 as shown in Figure 9B

JB-2930-3 as shown in Figure 32

12. A host cell transformed by a vector as claimed in claim 4, 5 or 8 and expressing a protective *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a non-typeable strain of *Haemophilus*.

13. The host cell of claim 12 which is a strain of *E. coli*.

14. A recombinant protective *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a strain of *Haemophilus influenzae* producible by the transformed *E. coli* of claim 13 or an immunogenic fragment or an adhesin-functional analog thereof.

15. An immunogenic composition, comprising at least one immunologically-active component selected from the group consisting of:

(A) an isolated and purified nucleic acid molecule encoding a *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a strain of *Haemophilus influenzae* having:

(a) a DNA sequence selected from the group consisting of those shown in Figures 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 and 25 (SEQ ID Nos: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37); or

(b) a DNA sequence encoding a *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein having an amino acid sequence selected from the group consisting of those shown in Figures 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 and 25 (SEQ ID Nos: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38);

(B) an isolated and purified nucleic acid molecule encoding an N-truncated *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a strain of *Haemophilus influenzae* which is amplifiable by a pair of

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

67

nucleotides which are selected from the group consisting of:

SEQ ID No: 7 and SEQ ID No: 15

SEQ ID No: 9 and SEQ ID No: 15

SEQ ID No: 11 and SEQ ID No: 15

SEQ ID No: 13 and SEQ ID No: 15

SEQ ID No: 49 and SEQ ID No: 51;

(C) an isolated and purified nucleic acid molecule encoding a truncated *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a strain of *Haemophilus influenzae* expressible as inclusion bodies; and

(D) a recombinant protective *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a strain of *Haemophilus influenzae* producible by a strain of *E. coli* transformed by an expression vector as claimed in claim 4, 5 or 8; and

a pharmaceutically-acceptable carrier therefor.

16. The immunogenic composition of claim 15 formulated as a vaccine for *in vivo* administration to protect against disease caused by *Haemophilus*.

17. The immunogenic composition of claim 15 in combination with a targeting molecule for delivery to specific cells of the immune system or to mucosal surfaces.

18. The immunogenic composition of claim 15 formulated as a microparticle, capsule or liposome preparation.

19. The immunogenic composition of claim 15 further comprising an adjuvant.

20. A method for inducing protection against disease caused by *Haemophilus*, comprising administering to a

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

68

susceptible host an effective amount of the immunogenic composition of claim 15.

21. The method of claim 20 wherein the susceptible host is a human.

22. A method for the production of a protective *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) protein of a non-typeable strain of *Haemophilus influenzae*, which comprises:

transforming a host with a vector as claimed in claim 5,

growing the host cell to express the encoded truncated Hia, and

isolating and purifying the expressed Hia protein.

23. The method of claim 22 wherein the host cell is *E. coli*.

24. The method of claim 22 wherein said encoded truncated Hia is expressed in inclusion bodies.

25. The method of claim 24 wherein said isolation and purification of the expressed Hia is effected by:

disrupting the grown transformed cells to produce a supernatant and the inclusion bodies,

solubilizing the inclusion bodies to produce a solution of the recombinant Hia,

chromatographically purifying the solution of recombinant Hia free from cell debris, and

isolating the purified recombinant Hia protein.

26. The method of claim 22 wherein said non-typeable strain of *Haemophilus* is selected from the group consisting of strains 11, 33, 32, 29, M4071, K9, K22 and 12.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

69

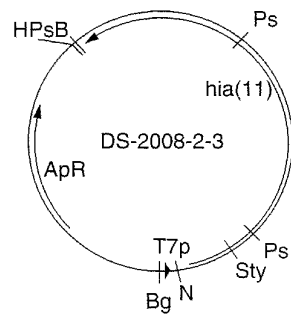
27. The method of claim 22 wherein said vector includes the T7 promoter and said *E. coli* is cultured in the presence of an inducing amount of lactose.

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

1/204

Restriction map of DS-2008-2-3, pT7 hia (11).



pT7 hia (11)

FIG.1A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

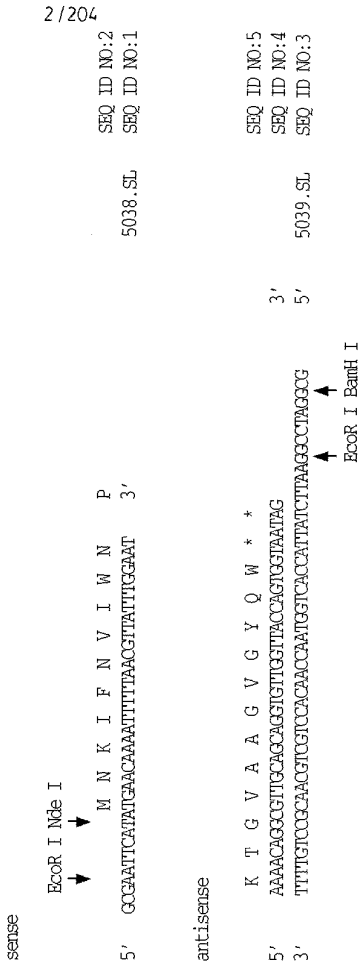
WO 00/55191

PCT/CA00/00289

2/204

FIG.1B

Oligonucleotides used to PCR amplify the full-length strain 11 hia gene for expression studies.

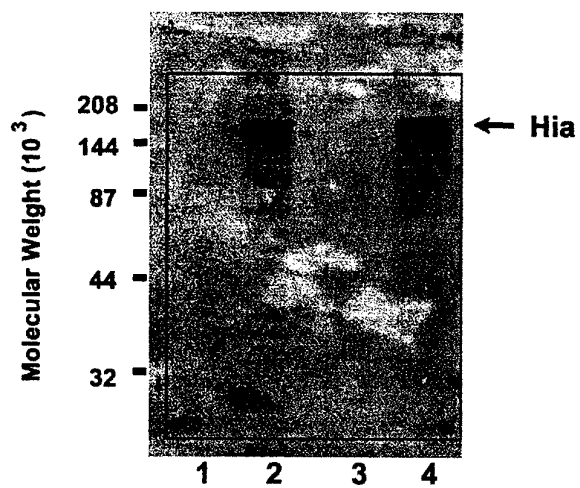


WO 00/55191

PCT/CA00/00289

3/204

FIG.2



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

4/204

Construction of DS-2092-1 and DS-2092-40,
plasmids containing tandem T7 hia(11) genes.

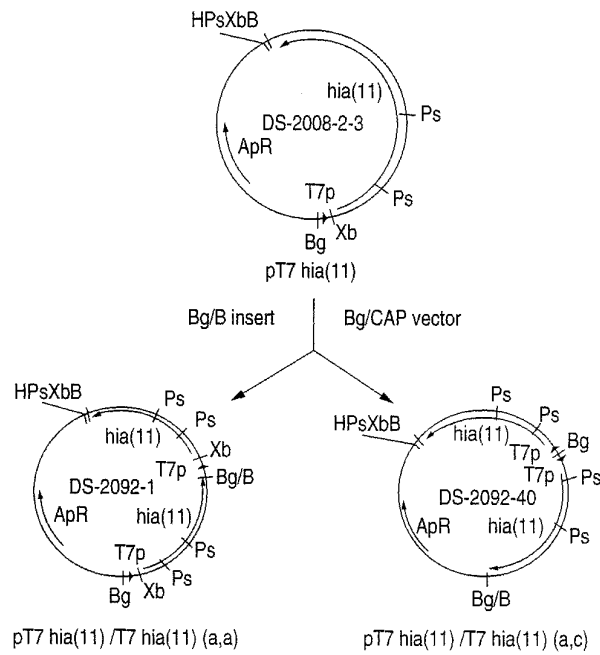


FIG.3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

5/204

FIG.4

Sites for N-terminal truncations of rha proteins.

↓ ↓ ↓ ↓ ↓
MKKIFNVINNVITQIWWVSE²¹LIRTHKCSA³³AVAV³⁸LATLSAIVEAN⁵²TPVINKLKAYGD (SEQ ID NO.6)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

6/204

Construction of plasmids expressing truncated hia(11) genes.

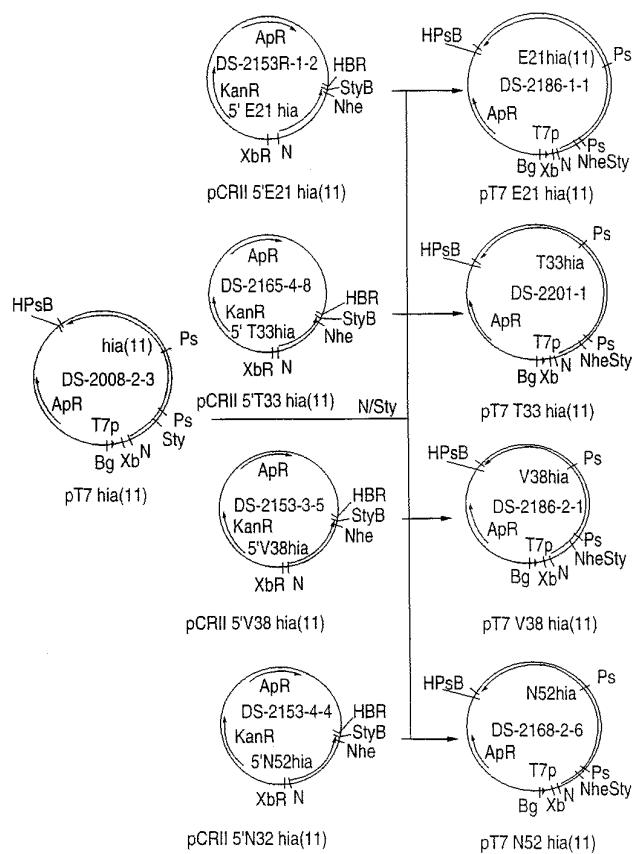


FIG.5A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

7/204

FIG.5B

Oligonucleotide primers to PCR amplify truncated strain 11 hia genes.

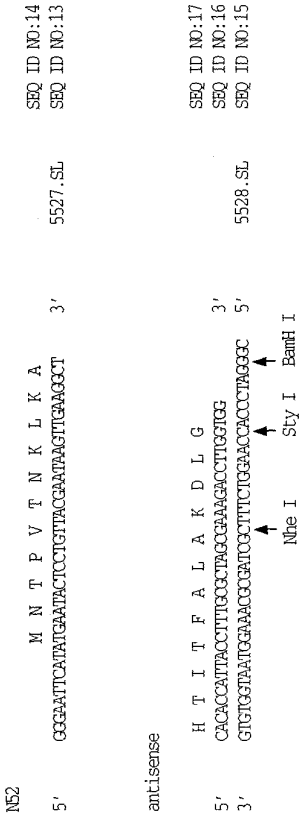
E21	EcoR I Nde I ↓ ↓ M E L T R T H T K C A GGCAATTCATATGGAACTCTCTGGACCCACACCAATGGGC	5'	3'	5524.SL	SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 7
T33	M T V A V A V L A T L GGCAATTCATATGGACGGGGGCTGGCGTATGGCAACCTG	5'	3'	5525.SL	SEQ ID NO:10 SEQ ID NO: 9
V38	M V L A T L L S A T GGCAATTCATATGGTATGGCAACCTGTGTGGCAAG	5'	3'	5526.SL	SEQ ID NO:12 SEQ ID NO:11

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

8/204

FIG.5B'



WO 00/55191

PCT/CA00/00289

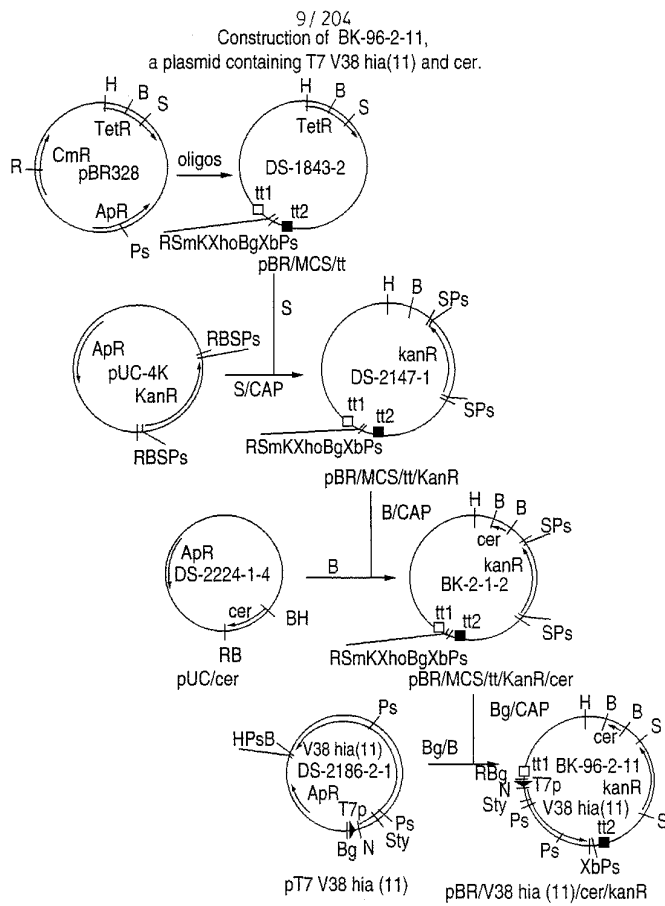


FIG.6A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 6B

oligonucleotides used to generate the multiple cloning site and transcription terminators for the expression plasmids

"P" R Sm KMo Bg Xb ...
 trpA terminator ↓ KMo ↓ Bg Xb ↓ ...
 AATTTCAGCCCGCTAATGAGCGGCTTTTTCGATTCGCGGTA ↓↓ CCTGAGATCTCTAGAC...
 CGTCGGCGGCTTACTTCGCCCGCAAAAACCTAAGGCCCATCGAGCTCTAGAG
 ... Ps ...
 ... ↓ T7 gene 10 terminator
 ...TTCAGATATAGTTCCTCCTTCAGCAAAAAACCCCTCAA
 ... AGCTCTATATCAAGTCAGAAAGTCGTTTTTTTGGCGAGTCTCGCCCAATC
 "P"

SEQ ID NO: 50
 SEQ ID NO: 51

SEQ	ID	NO
2AC0C0GTTTAAAGAGCCCCCAAGGGGHTATGCTAGTATTATTGCTCAGCGGTGCGCAGACGGTGCA	SEQ	ID NO: 50
TTCCGGGGTTCCCAATAACGATCAATTAACGAGTGTCGCAACCGTGCTGC	SEQ	ID NO: 51

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

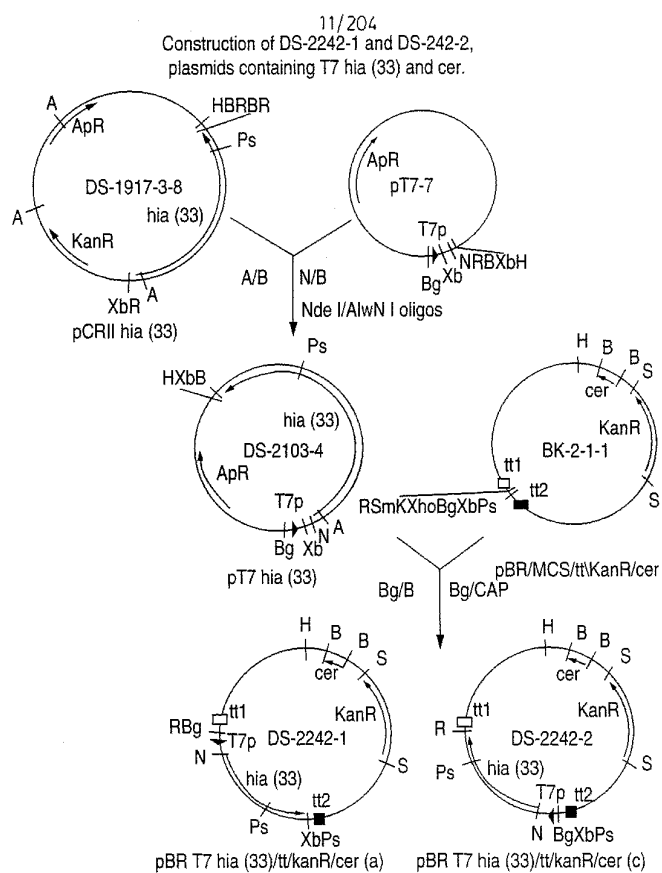


FIG.7A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

oligonucleotides used to generate the 5'-end of the strain 33 *hla* gene for expression studies.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

13/204

Construction of DS-2340-2-3,
a plasmid containing T7 V38 hia (33) and cer.

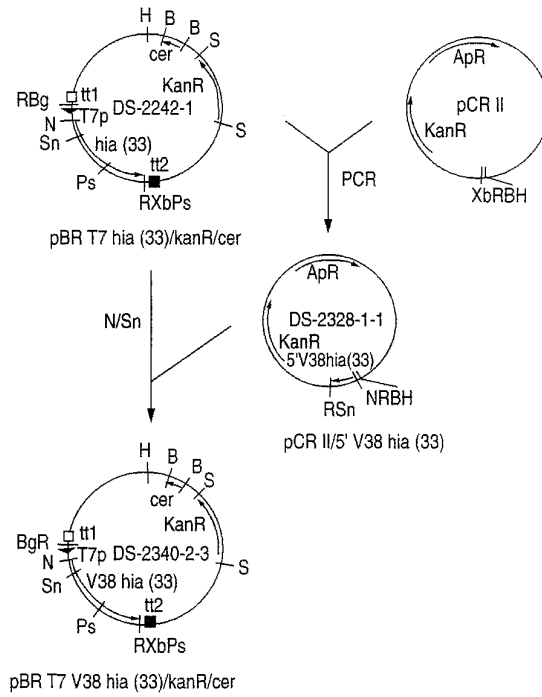


FIG.8A

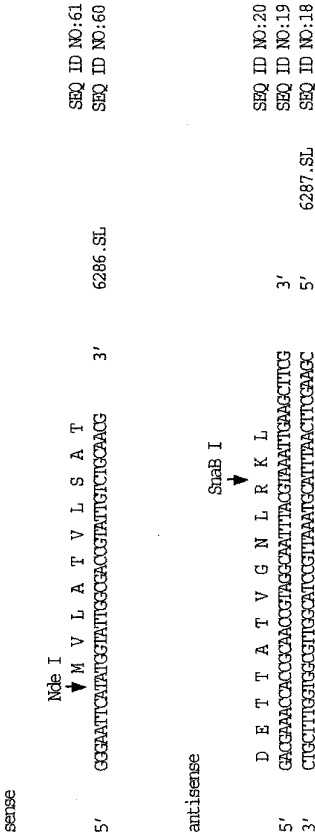
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

14/204

FIG.8B
Oligonucleotides used to PCR amplify the strain 33 hia gene from the V38 codon to the SnaB I site.



WO 00/55191

PCT/CA00/00289

15/204

Construction of DS-2447-2,
a plasmid containing tandem T7 V38 hia (11) cassettes and cer.

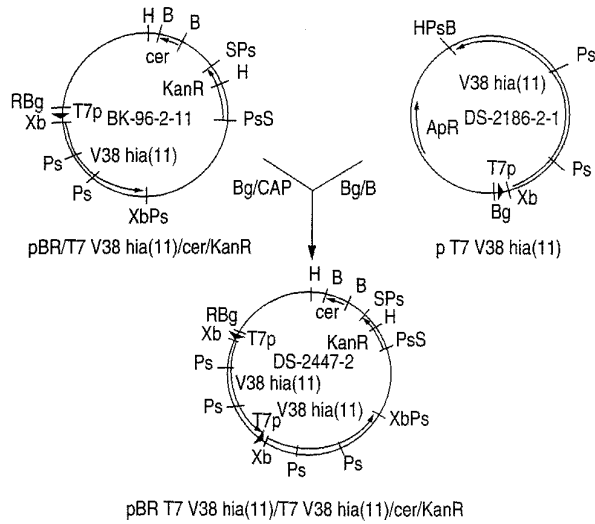


FIG.9A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

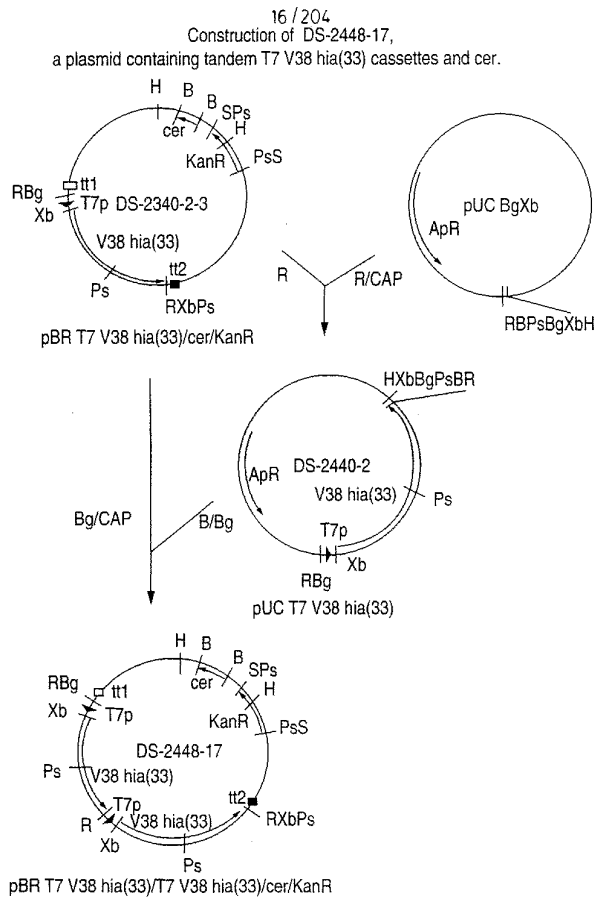


FIG.9B

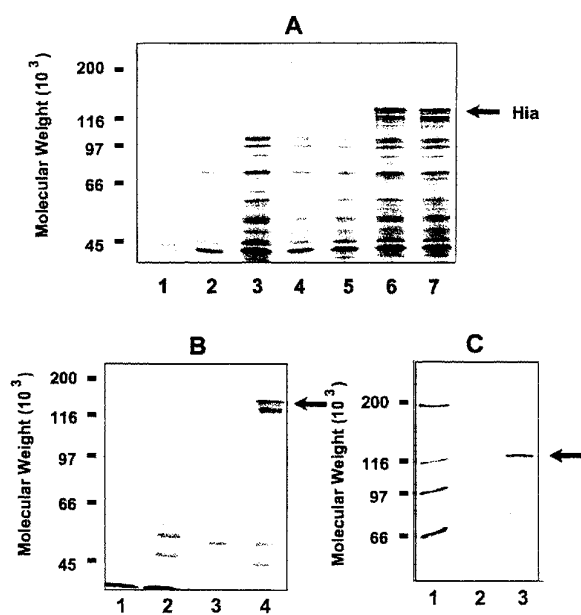
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

17/204

FIG.10



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

18/204

Purification of rHia Proteins from E. coli

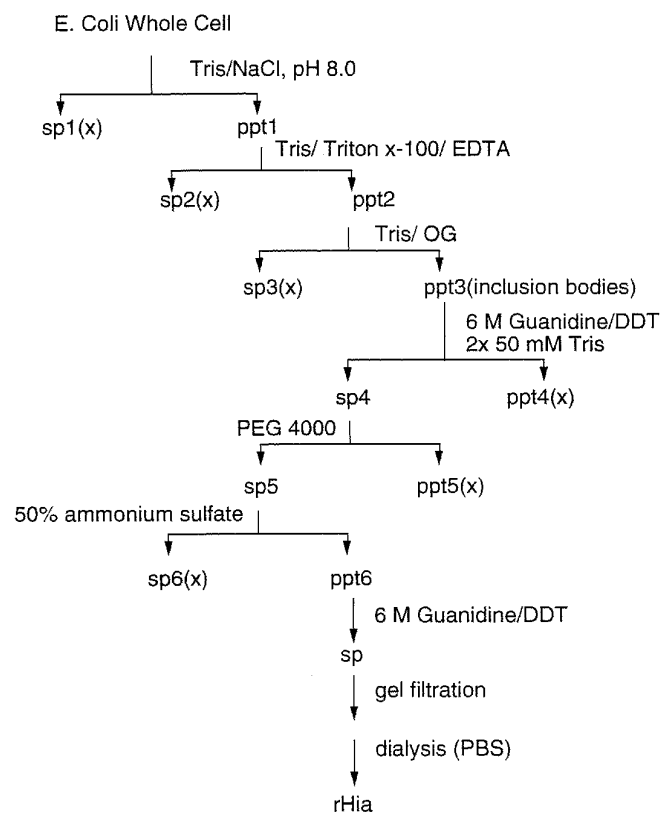


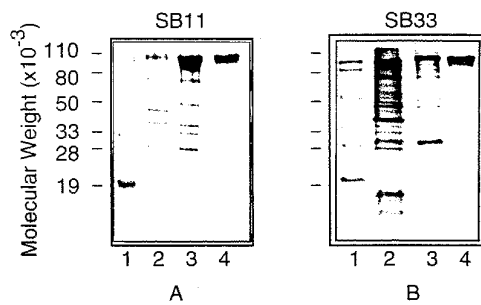
FIG.11

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

19/204

Purification of rHia (V38) from E. coli



1. Prestained molecular weight markers
2. E. coli whole cell lysate
3. Crude extract
4. Purified rHia protein

FIG.12

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

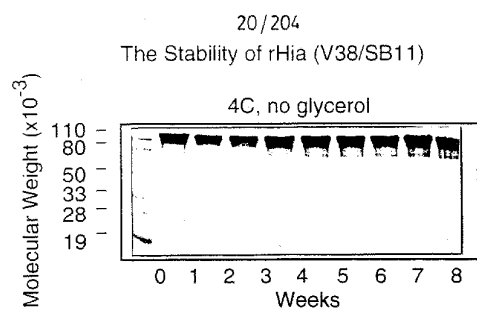


FIG.13A

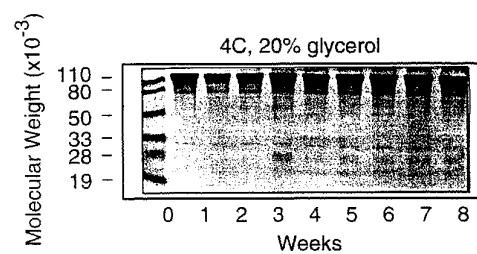


FIG.13B

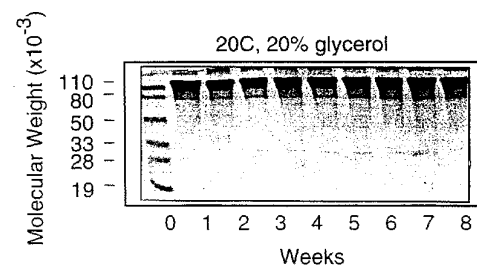


FIG.13C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

21/204

Anti-rHia (V38) Antibody Titers in Mice

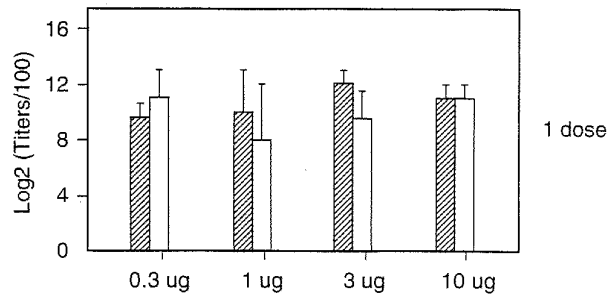
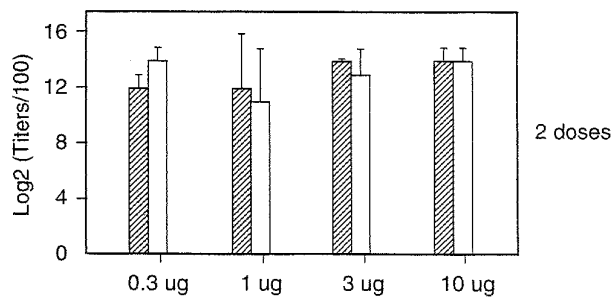


FIG.14A



SB11
SB33

FIG.14B

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

22/204

Anti-V38 rHia (SB11) Antibody Titers in BALB/c Mice

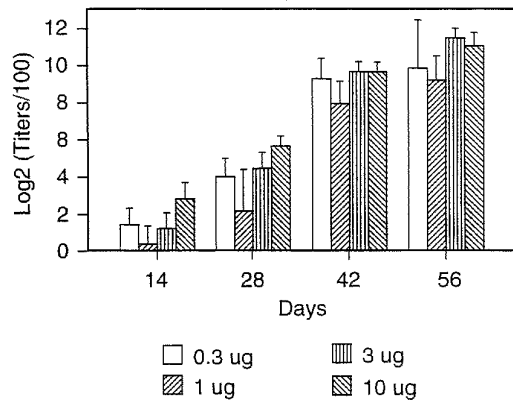


FIG.15A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

23/204

Anti-V38 rHia (SB11) Antibody Titers in Guinea Pigs

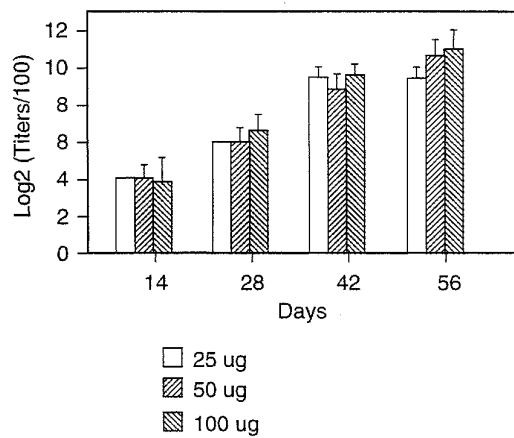


FIG.15B

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

24/204

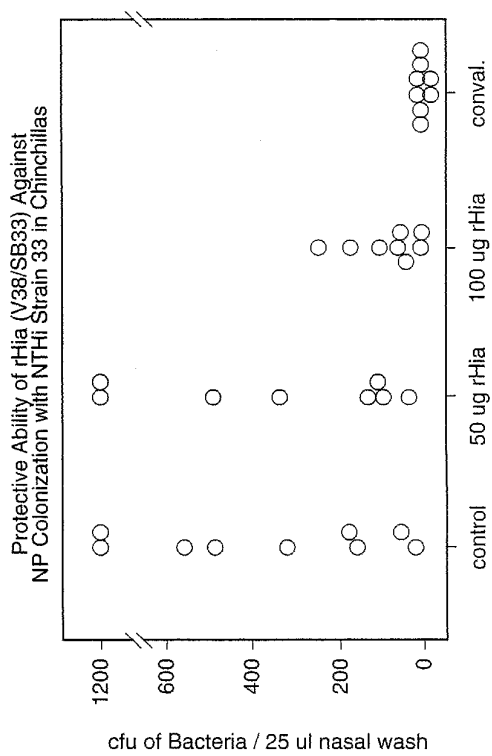


FIG. 16

PCT/CA00/00289

oligonucleotides used to PCR amplify additional *hla* genes.

5'	TTAAATATTAAGTAAATAAAAATCAACAAAATTTTACGTT	3'	5040..SL	SEQ ID NO:22
antisense				
5'	K T G V A A G V G Y Q W * *			SEQ ID NO:5
3'	TTTGTGCCACAGTGTGCACACCAATGTGCACCAATATCTTAAAGCTGTAGCG	5'	5039..SL	SEQ ID NO:4
				SEQ ID NO:3
		↑		
		↑		
				EcoR I BstH I

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18A

NHI strain 33 Hia

```

      MET ASN LYS...
GAATTCGGCTTAAATAAAATGAACAA ...
10      ... ILE PHE ASN VAL ILE TRP ASN VAL MET THR GIN
      ...ATTTTAAACGTTATTTGGAAATGTTATGACTCA
      ... 30      40      50      60

      THR TRP ALA VAL VAL SER GLU LEU THR...
      AACTTGGGCTGTCGTATCTGAACTCAC ...
70      ... ARG ALA HIS THR LYS ARG ALA SER ALA THR VAL
      ...TCGGGCCCCACCAACGTCCTCCGCAACCGT
      ... 90      100      110      120

      ALA ALA ALA VAL LEU ALA THR VAL LEU...
      GGCAGCCGCTGTATTGGCGACCGTATT ...
130      ... SER ALA THR VAL GIN ALA SER ALA GLY SER THR
      ...GTC TGCAACGGTTCAAGCGAGTGCAAGGCAGTAC
      ... 150      160      170      180

      THR GLY THR ASN SER LEU ASN VAL TYR...
      GACAGGTACAATAAGTTTGAAATGTTTA ...
190      ...
200
```

26/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18B

ASN SER ILE ALA ASP LEU ASN LYS GLN...
TAA TCA ATAGCAGATT TAAATAACA...
... 250
... ASN ASP SER VAL TYR ASP GLY LEU LEU ASN LEU
...AATGATAGTGT TACGATGGTTTATTAAATCT
... 260
... 270 280 290 300
ASN GLU LYS GLY THR ASP LYS SER LYS...
GAATGA AAGGTACGGATAGTCAAA...
... 310
... PHE LEU VAL ALA ASP GLU THR THR ALA THR VAL
...ATTCTGGTTGCTGACGAAACCCGCAACCGT
... 320 330 340 350 360
GLY ASN LEU ARG LYS LEU GLY TRP VAL...
AGGCAATT TACGTAAATTGGGTGGGT...
... 370
... VAL SER THR LYS ASN SER THR LYS GLU GLU SER
...AGTATCAACCAAAACAGTACGAAAGAGAAAG
... 380 390 400 410 420

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

27/ 204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18C

ASN GLN VAL LYS GLN ALA ASP GLU VAL...
CAATCAAGTCAACAGCGGATGAAGT ...
430 ...
... LEU PHE GLU GLY LYS ASP GLY VAL THR VAL THR
...GTTGTTTGAAGGCAAGACGGTGTACGGTTAC
... 450 460 470 480

SER LYS SER GLU ASN GLY LYS HIS THR...
TTCCAAATCTGAAACAGGCAACACAC ...
490 ...
... VAL THR PHE ALA LEU ALA ASN ASP LEU ASN VAL
...CGTTACTTTTGCCCTTGCGAATGACCTTAATGT
... 510 520 530 540

LYS ASN ALA THR VAL SER ASP LYS LEU...
AAAACAGCAACCGTTAGCGATAAATT ...
550 ...
... SER LEU GLY ALA ASN GLY LYS LYS VAL ASP ILE
...ATCGCTTGGTGCAACGGCAAGAAAGTCGATAT
... 570 580 590 600

THR SER ASP ALA ASN GLY LEU LYS PHE...
TACCAGTGATGCAACAGCGCTTGAATT ...
610 ...

28/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18D

... ALA LYS GLN GLY THR ASN GLY GLN ASN GLY ASN
...TGC GAACACAGGGTACGAATGGTCAAAACGGTAA 660
... 630 640 650

VAL HIS LEU ASN GLY ILE ALA SER THR...
TGTTCACTTAACGGTATTGCTTCGAC... 680
... LEU ASP ASP PRO ARG VAL GLY GLY LYS THR ALA
...TTAGATGATCCTCGTGTGGGTGGAAACACAGC 720
... 690 700 710

HIS LEU THR LYS GLU ILE SER ASP THR...
ACACCTTACAAAGAAATCAGCGATAC... 740
... GLU ARG ASN ARG ALA ALA SER VAL GLY ASP VAL
...AGAACGTAAACCGTGCTGCCGAGCGTGGCGGATGT 780
... 750 760 770

LEU ASN ALA GLY TRP ASN ILE ARG GLY...
ATTGAATCGGGGTGGAAATATTTCGTGG... 800
... ALA LYS THR ILE GLY GLY THR VAL ASP ASN VAL
...CGCAAAACGATTGGCGGTACAGTGGATAATGT 840
... 810 820 830

29/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18E

ASP PHE VAL SER THR TYR ASP THR VAL...
TGATTTTGTTCAACTTATGACACTGT...
850 ...
... GLU PHE ALA SER GLY ALA ASN ALA ASN VAL SER
...TGAAATTGCGCAGCGCGCAACGCAAAATGTGAG
860 ...
... 870 880 890 900

VAL THR THR ASP ASP ASN LYS LYS THR...
CGTTACGACTGATGATGATAACAAAAAC...
910 ...
... THR VAL ARG VAL ASP VAL THR GLY LEU PRO VAL
...AACCGTCCGTGTGGATGTACAGGCTTGCCGGT
920 ...
... 930 940 950 960

GLN TYR VAL THR GLU ASP SER LYS THR...
CCAATATGTTACGGGAAGACAGCAAAAC...
970 ...
... VAL VAL LYS VAL GLY ASN GLU TYR TYR GLU ALA
...CGTTGTGAAGTGGCAATGAGTATTACGAAGC
980 ...
... 990 1000 1010 1020

LYS GLN ASP GLY SER ALA ASP MET ASP...
CAGCAAGACGGTTCGGCGGATATGGA...
1030 ...
... 1040

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18F

... LYS LYS VAL GLU ASN GLY LYS LEU ALA LYS THR
...TAAAAAGTCGAAATGGCAAGCTGGCGAAAC 1080
... 1050 1060 1070

LYS VAL LYS LEU VAL SER ALA ASN GLY...
TAAAGTGAAATTGGTATCGGGCAACGG... 1090
... 1100

... THR ASN PRO VAL LYS ILE SER ASN VAL ALA ASP
...TACAAATCCGGTGAAATAATCAGCAATGTTGCGGA 1140
... 1110 1120 1130

GLY THR GLU ASP THR ASP ALA VAL SER...
CGGCACGGGAAGATACCGATCGGGTCAG... 1150
... 1160

... PHE LYS GLN LEU LYS ALA LEU GLN ASP LYS GLN
...CTTAAAGCAGTTGAAGCCCTTGCAAGATAACA 1200
... 1170 1180 1190

VAL THR LEU SER ALA SER ASN ALA TYR...
GTTACGTTAAGTGGGAGCAATGCTTA... 1210
... 1220

... ALA ASN GLY SER ASP ALA ASP GLY GLY LYS
...TGCCAATGGCGGTAGCGATGCCGACGGCGGCAA 1260
... 1230 1240 1250

31/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18G

ALA THR GLN THR LEU GLY ASN ASP LEU...
GGCAACTCAAACTTTAGGCAATGATTT...
1270 ...
... ASN PHE LYS PHE LYS SER THR ASP SER GLU LEU
...GAAATTTTAAATTTTAAATCCACAGACAGCGAGTT
... 1290 1300 1310 1320
LEU ASN ILE LYS ALA ALA GLY ASP THR...
GTTGAACATCAAGCAGCAGGTGACAC...
1330 ...
... VAL THR PHE THR PRO LYS LYS GLY SER VAL GLN
...GGTTACCTTTACGCCGAAATAAGGTTCCGGTGCA
... 1350 1360 1370 1380
VAL GLY ASP ASP GLY LYS ALA THR ILE...
GGTTGGCGATGATGGTAAGGCTACGAT...
1390 ...
... GLN ASP GLY ALA LYS THR THR THR GLY LEU VAL
...TCAAGACGGCGGAAACAACTACCGTTTGGT
... 1410 1420 1430 1440
GLU ALA SER GLU LEU VAL ASP SER LEU...
TGAGGCTTC TGAA TTGGTTGACAGCCT...
1450 ...

32/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18H

... ASN LYS LEU GLY TRP LYS VAL GLY VAL GLY LYS
...GAACAAATTGGCTGGAAAGTGGCGTTGGTAA 1500
... 1470 1480 1490

ASP GLY THR GLY ALA THR ASP GLY THR...
AGACGGCACAGGAGCGACCGATGGCAC ... 1510
... 1520
... HIS THR ASP THR LEU VAL LYS SER GLY ASP LYS
...GCATACCGACACTTTAGTGAAGTCGGCGGATAA 1560
... 1530 1540 1550

VAL THR LEU LYS ALA GLY ASP ASN LEU...
AGTAACCTTGAAGCCGGCGGATAATCT ... 1570
... 1580
... LYS VAL LYS GLN GLY THR ASN PHE THR TYR
...GAAGGTCAACAAGAGGGGTACAAACTTCACTTA 1620
... 1590 1600 1610

VAL LEU ARG ASP GLU LEU THR GLY VAL...
CGTGCTCAGAGATGAATTGACGGGCGT ... 1630
... 1640
... LYS SER VAL GLU PHE LYS ASP THR GLU ASN GLY
...AAGAGCGTGGAGTTTAAAGACACGGGAGAAATGG 1680
... 1650 1660 1670

33/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG. 18I

ALA ASN GLY ALA SER THR LYS ILE THR...
 TGCAAAACGGTGCAAGCACGAAGATTAC...
 1690 1700 ...
 ... LYS ASP GLY LEU THR ILE THR PRO ALA ASN ASP
 ...CAAAGACGGCTTGACCATTCGCCGGCAACGA
 ... 1710 1720 1730 1740

ALA ASN GLY ALA ALA THR ASP ALA...
 TGCGAATGGTGGCGGGCGGACTGATGC...
 1750 1760 ...
 ... ASP LYS ILE LYS VAL ALA SER ASP GLY ILE SER
 ...TGACAAAGATTAAAGTGGCTTCAGACGGCATTAG
 ... 1770 1780 1790 1800

ALA GLY ASN LYS ALA VAL LYS ASN VAL...
 TGCGGGTAATAAAGCAGTTAAACGT...
 1810 1820 ...
 ... VAL SER GLY LEU LYS LYS PHE GLY ASP ALA ASN
 ...TGAGCGGACTGAAGAAATTGGTGATGCCGA
 ... 1830 1840 1850 1860

PHE ASN PRO LEU THR SER SER ALA ASP...
 TTTCAAATCCGCTGACTAGCTCAGCCGA...
 1870 1880 ...

34/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18J

... ASN LEU THR LYS GIN TYR ASP ASN ALA TYR LYS
...CAACTTAACGAAACAATATGACAATGCCCTATAA 1920
... 1890

GLY LEU THR ASN LEU ASP GLU LYS SER...
AGGCTTGACCAATCTGGATGAAAAAG... 1940
... LYS GLY LYS GIN THR PRO THR VAL ALA ASP ASN
...TAAAGGCAAGCAAACTCCGACCGTTGCTGACAA 1980
... 1950

THR ALA ALA THR VAL GLY ASP LEU ARG...
TACCGCTGCAACCGTGGGCGATTGCG... 2000
... GLY LEU GLY TRP VAL ILE SER ALA ASP LYS THR
...CGGTTTGGGCTGGGTCAATTCTGCAGACAAAC 2040
... 2010

THR GLY GLU SER LYS GLU TYR SER ALA...
CACAGGCGAGTCAAGGAATATAGCGC... 2060
... GIN VAL ARG ASN ALA ASN GLU VAL LYS PHE LYS
...GCAAGTGGCTAACGCCAATGAGTGAATTCAA 2100
... 2070

35/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18K

```
SER GLY ASN GLY ILE ASN VAL SER GLY...
GAGCGGCAACGGTATCAATGTTTCCGG...
2110
... LYS THR LEU ASP ASN GLY THR ARG GLU ILE THR
...TAAACACATTGGGATAACGGTACGCGGAAATTAC
... 2130 2140 2150 2160
PHE GLU LEU ALA LYS ASP GLU ASN ALA...
TTTGTGAATTGGCTAAGACGGAATAATGC...
2170
... ILE ALA PHE GLY SER GLY SER LYS ALA LEU ARG
...CATTGCTTTCGGTCTCTGGCTCAAAAGCCTTGCG
... 2190 2200 2210 2220
ASP ASN THR VAL ALA ILE GLY THR GLY...
CGATAACACGGTGGCGATTGGTACGGG...
2230
... ASN VAL VAL ASN ALA GLU LYS SER GLY ALA PHE
...CAACGTTGTGAATGCGGAAATACTGGTGCAATT
... 2250 2260 2270 2280
GLY ASP PRO ASN TYR ILE GLU ASP LYS...
CGGCGATCCGAACCTACATCGAAGATAA...
2290 2300
```

36/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18L

... ALA GLY GLY SER TYR ALA PHE GLY ASN ASP ASN
 ...AGCCGGTGGCAGCTACGCTTTCGGTAACGATAA 2340
 ... 2310 2320 2330
 ARG ILE THR SER LYS ASN THR PHE VAL...
 CCGTATTACTTCTAAACACCTTTTGT... 2350
 ... 2360
 ... LEU GLY ASN GLY VAL ASN ALA LYS TYR LYS ALA
 ...GTTGGGTAAATGGAGTTAATGCCGAAATATAAGC 2400
 ... 2370 2380 2390
 ASN GLY ASP VAL ASP THR GLU THR VAL...
 CAATGGAGATGTGTGATACGGGAAACCGT... 2410
 ... 2420
 ... THR VAL LYS ASP LYS ASP GLY LYS GLU THR THR
 ...AACTGTTAAGGACAAAGACGGTAAAGAGACTAC 2460
 ... 2430 2440 2450
 VAL THR VAL PRO LYS ALA LEU GLY ALA...
 CGTTACTGTTCCTAAAGCGTTAGGGGC... 2480
 ... 2470
 ... THR VAL GLU ASN SER VAL TYR LEU GLY ASN LYS
 ...TACGGTTGAAAACTCCGTTTATTGCGGTAATAA 2520
 ... 2490 2500 2510

37/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18M

```
SER THR ALA THR LYS ASP LYS GLY LYS...
ATCGACTGCGACAAAAGATAAGGGTAA...
2530
... ASN LEU LYS SER ASP GLY THR ALA GLY ASN THR
...AATCTGAAATCTGATGGTACGGCGGGTTAACAC
... 2550 2560 2570 2580
38/204

THR THR ALA GLY THR THR GLY THR VAL...
TACAACTGCTGGGTACAAACGGGTACGGT...
2590
... ASN GLY PHE ALA GLY ALA THR ALA HIS GLY ALA
...AACGGCTTTGCCGGTGCAACGGCGGCACGGTGCC
... 2610 2620 2630 2640

VAL SER VAL GLY ALA SER GLY GLU...
GGTTTCTGTCGGCGCAAGCGGCGAAGA...
2650
... ARG ARG ILE GIN ASN VAL ALA ALA GLY GLU ILE
...AAGACGTATCCAAACCGTTGCGGCAGGCGAAAT
... 2670 2680 2690 2700

SER ALA THR SER THR ASP ALA ILE ASN...
TTCGGCTACTTCCACCGATGCCGATTAA...
2710 2720
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.18N

39/204

... GLY SER GLN LEU TYR ALA VAL ALA LYS GLY VAL
...CGGCAGCCAGTTGTATGCCCGTGGCAAAAGGGGT 2760
... 2730 2740 2750

THR ASN LEU ALA GLY GLN VAL ASN LYS...
AACAAACCTTGCTGGACAGTGAATAA ...
... 2770 2780

... VAL GLY LYS ARG ALA ASP ALA GLY THR ALA SER
...AGTGGGCAACGTGCAGATGCAGGTACAGCAAG 2820
... 2790 2800 2810

ALA LEU ALA ALA SER GLN LEU PRO GLN...
TGCAATTAGCGGCTTCACAGTTACCAACA ...
... 2830 2840

... ALA SER MET SER GLY LYS SER MET VAL SER ILE
...AGCCTCTATGTCAGGTAAATCAATGGTTTCTAT 2880
... 2850 2860 2870

ALA GLY SER SER TYR GLN GLY GLN SER...
TCCGGGAAGTAGTTATCAAGGTCAAAG ...
... 2890 2900

... GLY LEU ALA ILE GLY VAL SER ARG ILE SER ASP
...TGGTTTAGCTATCGGGGTATCAAGAAATTCCGA 2940
... 2910 2920 2930

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

40/204

FIG.180

```
ASN GLY LYS VAL ILE ILE ARG LEU SER...
T A T G G C A A A G T G A T T A T T C G C T T G T C ...
2950
... GLY THR THR ASN SER GLN GLY LYS THR GLY VAL
... A G G C A C A C C A A T A G C C A A G G T A A A C A G G C G T
2980
... 2970
2990
3000

ALA ALA GLY VAL GLY TYR GLN TRP ***
T G C A G C A G G T G T T G G T T A C C A G T G G T A ...
3010
...
... A T A G A A T T C
... 3030
```

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.19A

Nthi strain 32 hia

```
GAATTGGGCTTTAAATATAAGGTAAATAAA...
10          20          30          40          50          60
      MET ASN LYS ILE PHE ASN VAL ILE TRP ASN
      ...ATGAACAAATTTTAAACGTTATTGGAA
      ...
      VAL VAL THR GIN THR TRP VAL VAL SER...
      TGTGTGACTCAAACTTGGGTTGTCGTATC...
      70          80          90          100          110          120
      ... GLU LEU THR ARG THR HIS THR LYS CYS ALA
      ...TGAACTCACTCGCACCCACACCAAAATGCGC
      ...
      SER ALA THR VAL ALA VAL ALA LEU ALA...
      CTCGGCCACCGTGGCAGTTGCCGTTGGC...
      130          140          150          160          170          180
      ... THR LEU LEU SER ALA THR VAL GIN ALA ASN
      ...AACCTGTGTCCGCAACCGTTCAGGCGGAA
      ...
      ALA THR ASP GLU ASN GLU ASP ASP GLU...
      TGCTACCGATGAACCAAGATGATGAAGA...
      190          200          210          220          230          240
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.19B

... GLU LEU GLU PRO VAL GLN ARG SER VAL LEU
...AGAGTTAGAACCCGTAACAACGCTCTGTTT
... 220 230 240

ARG TRP SER PHE LYS SER ALA LYS GLU GLY...
AAGGTGGAGCTTCAAAATCCGCTAAGGAAG...
250 260 270 ...

... THR GLY GLU GLN GLU GLY THR THR GLU VAL
...CACTGGAGAACCAAGAGGGAAACAACAGAGGT
... 280 290 300

42/204

ILE ASN LEU ASN THR ASP SER SER GLY ASN...
AATAAATTGAAACACAGATTCTCAGGAAA...
310 320 330 ...

... ALA VAL GLY SER SER THR ILE THR PHE LYS
...TGCAGTAGGAAGCAGCACAATCACCTTCAA
... 340 350 360

ALA GLY ASP ASN LEU LYS ILE LYS GLN SER...
AGCCGGCGACAAACCTGAAATAACAACAAG...
370 380 390 ...

... GLY ASN ASP PHE THR TYR SER LEU LYS LYS
...CGGCAATGACTTCACTACTCGCTGAAAAA
... 400 410 420

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.19C

GLU LEU LYS ASN LEU THR SER VAL GLU THR...
AGAGCTGAAAAACCTGACCAGTGTGAAC...
430 440 450 ...
... GLU LYS LEU SER PHE GLY ALA ASN GLY ASN
...TGAAAAATTATCGTTTGGCGCAACGGCAA
460 470 480
...

LYS VAL ASP ILE THR SER ASP ALA ASN GLY...
TAAAGTTGATATTACCAGTGATGCAATGG...
490 500 510 ...
... LEU LYS LEU ALA LYS THR GLY ASN GLY ASN
...CTTGAAATTGGCGAAACACAGGTAAACGGAAA
520 530 540
...

GLY GLN ASN SER ASN VAL HIS LEU ASN GLY...
TGGTCAAAACAGTAATGTTCACTTAAACGG...
550 560 570 ...
... ILE ALA SER THR LEU THR ASP THR LEU ALA
...TATTGCTTCGACTTTGACCCGATACGCTTGC
580 590 600
...

GLY GLY THR THR GLY HIS VAL ASP THR ASN...
CGGTGGCACAACAGGACACGTTGACACCAA...
610 620 630 ...

43/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.19D

... ILE ASP ALA VAL ASN TYR HIS ARG ALA ALA
...CATGATGCGGTAAATATCATCGCGCTGC 650
... 640

SER VAL GIN ASP VAL LEU ASN SER GLY TRP...
AAGCGTACAAGATGTGTAAACAGCGGTG... 680
... 670

... ASN ILE GIN GLY ASN GLY ASN ASN VAL ASP
...GAATATCCAAGGCAATGGAAACAATGTCTGA 710
... 700

PHE VAL ARG THR TYR ASP THR VAL ASP PHE...
TTTGTCCGTACTTACGACACCGGTGGACTT... 740
... 730

... VAL ASN GLY ALA ASN ALA ASN VAL SER VAL
...TGTCAAATGGCGCGGAATGCCAATGTGAGCGT 770
... 760

THR ALA ASP THR ALA HIS LYS LYS THR THR...
TACGGCTGATACGGCTCACAAAGACAAAC... 800
... 790

... VAL ARG VAL ASP VAL THR GLY LEU PRO VAL
...TGTCGGTGTGGATGTACACAGGCTTGCCCGT 830
... 820

44/204

PCT/CA00/00289

FIG. 19E

45/204

GIN	THR	VAL	THR	GLU	ASP	GLY	LYS	THR	VAL...	
TCAATAATGTTACGGAAGACGGCAAAACCCT...										870
...										860
... VAL LYS VAL GLY ASP GLU TYR TYR LYS ALA										
...TGTGAAAGTGGGCAATGAGTATTACAAAGC										900
...										880
...										890
...										910
LYS	ASP	ASP	GLY	SER	ALA	ASP	MET	ASN	GIN...	
CAAGAATGACGGTTTCGGCGGATATGAATCA...										930
...										920
... LYS VAL GLU ASP GLY LEU ALA LYS THR										
...AAAAAGTCGAAACGGCGAGCTGGCGAAAC										950
...										940
...										960
LYS	VAL	LYS	LEU	VAL	SER	ALA	SER	GLY	THR...	
CAAGTGAAATTGGTATCGGCGCAAGCGGTAC...										970
...										980
... ASN PRO VAL LYS ILE SER ASN VAL ALA ASP										
...AATCCGGTGAAAATTAGCAATGTTGCAGA										1020
...										1010
...										1000
...										1030
GLY	THR	GLU	ASP	THR	ASP	ALA	VAL	SER	PHE...	
CGGCACGGAAGACACCGATCGGGTTCAGCTT...										1040
...										1050

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.19F

... LYS GLN LEU LYS ALA LEU GLN ASP LYS GLN
...TAAGCAATTAAAGCCTTGCAAGACAAACA
... 1060 1070 1080

VAL THR LEU SER THR SER ASN ALA THR ALA...
GGTTACGTTGAGCAGCAATGCTTATGC...
... 1090 1100 1110 ...
... ASN GLY GLY THR ASP ASN ASP GLY GLY LYS
...CAATGGCGGTACAGTACGACGGCGGCAA
... 1120 1130 1140

ALA THR GLN THR LEU SER ASN GLY LEU ASN...
GGCAACTCAAACTTTAAGCAATGGTTTGAA...
... 1150 1160 1170 ...
... PHE LYS PHE LYS SER SER ASP GLY GLU LEU
...TTTAAATTAAATCTAGCGATGGCGAGTT
... 1180 1190 1200

LEU LYS ILE SER ALA THR GLY ASP THR VAL...
GTTGAAATTAGCGGACCGCGATACGGT...
... 1210 1220 1230 ...
... THR PHE THR PRO LYS LYS GLY SER VAL GLN
...TACTTTTACGCCGAAAGGTTCTGGTACA
... 1240 1250 1260

46/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.19G

VAL GLY ASP ASP GLY LYS ALA SER ILE SER...
GGTTGGCGATGATGGCAAGGCTTCAATTTC...
1280
... LYS GLY ALA ASN THR THR GLU GLY LEU VAL
...AAAGGTGCAATACAACTGAAGGTTTGGT
1300
...

GLU ALA SER GLU LEU VAL GLU SER LEU ASN...
TGAGGCTTCTGAATTGGTTGAAGCCTGAA...
1330
... LYS LEU GLY TRP LYS VAL GLY VAL GLU LYS
...CAAACTGGGTGGAAAGTAGGGTTGAGAA
1360
...

VAL GLY SER GLY GLU LEU ASP GLY THR SER...
AGTCGGCAGCGCGAGCTTGATGGTACATC...
1390
... LYS GLU THR LEU VAL LYS SER GLY ASP LYS
...CAAGGAACCTTAGTGAAGTCGGGCGATAA
1420
...

VAL THR LEU LYS ALA GLY ASP ASN LEU LYS...
AGTAAC TTGAAGCGCGCGACCAATCTGAA...
1450
1460
1470 ...

47/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.19H

... VAL LYS GLN GLU THR GLY THR ASN PHE THR TYR 1500
 ...GGTCAACAAGAGGGCCACAACTTCACTTA 1490
 ... 1480
 ... 1470
 ... 1460
 ... 1450
 ... 1440
 ... 1430
 ... 1420
 ... 1410
 ... 1400
 ... 1390
 ... 1380
 ... 1370
 ... 1360
 ... 1350
 ... 1340
 ... 1330
 ... 1320
 ... 1310
 ... 1300
 ... 1290
 ... 1280
 ... 1270
 ... 1260
 ... 1250
 ... 1240
 ... 1230
 ... 1220
 ... 1210
 ... 1200
 ... 1190
 ... 1180
 ... 1170
 ... 1160
 ... 1150
 ... 1140
 ... 1130
 ... 1120
 ... 1110
 ... 1100
 ... 1090
 ... 1080
 ... 1070
 ... 1060
 ... 1050
 ... 1040
 ... 1030
 ... 1020
 ... 1010
 ... 1000
 ... 990
 ... 980
 ... 970
 ... 960
 ... 950
 ... 940
 ... 930
 ... 920
 ... 910
 ... 900
 ... 890
 ... 880
 ... 870
 ... 860
 ... 850
 ... 840
 ... 830
 ... 820
 ... 810
 ... 800
 ... 790
 ... 780
 ... 770
 ... 760
 ... 750
 ... 740
 ... 730
 ... 720
 ... 710
 ... 700
 ... 690
 ... 680
 ... 670
 ... 660
 ... 650
 ... 640
 ... 630
 ... 620
 ... 610
 ... 600
 ... 590
 ... 580
 ... 570
 ... 560
 ... 550
 ... 540
 ... 530
 ... 520
 ... 510
 ... 500
 ... 490
 ... 480
 ... 470
 ... 460
 ... 450
 ... 440
 ... 430
 ... 420
 ... 410
 ... 400
 ... 390
 ... 380
 ... 370
 ... 360
 ... 350
 ... 340
 ... 330
 ... 320
 ... 310
 ... 300
 ... 290
 ... 280
 ... 270
 ... 260
 ... 250
 ... 240
 ... 230
 ... 220
 ... 210
 ... 200
 ... 190
 ... 180
 ... 170
 ... 160
 ... 150
 ... 140
 ... 130
 ... 120
 ... 110
 ... 100
 ... 90
 ... 80
 ... 70
 ... 60
 ... 50
 ... 40
 ... 30
 ... 20
 ... 10
 ... 0

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG. 191

ALA GLY ASN LYS ALA VAL LYS ASN VAL ALA...
CGCGGGTAATAAGCAGTTAAACGTCGC...
1690 1700 1710 ...
... ALA GLY GLU ILE SER ALA THR SER THR ASP
...GCGAGGCGAAATTCTGCCACTTCCACCGA 1720 1730 1740
...

ALA ILE ASN GLY SER GLN LEU TYR ALA VAL...
TGCGATTAAACGGAAGCCAGTTGTATGCCGT...
1750 1760 1770 ...
... ALA LYS GLY VAL THR ASN LEU ALA GLY GLN
...GCCAAAGGGGTAAACAACCTTGCTGGACA 1780 1790 1800
...

VAL ASN ASN LEU GLU GLY LYS VAL ASN LYS...
AGTGAATAATCTTGAGGCAAGTGATAA...
1810 1820 1830 ...
... VAL GLY LYS ARG ALA ASP ALA GLY THR ALA
...AGTGGGCAACCGTGCCAGATGCAGGTACTGC 1840 1850 1860
...

SER ALA LEU ALA ALA SER GLN LEU PRO GLN...
AGTGCAATTAGCGGCTTCACAGTTACCAACA...
1870 1880 1890 ...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.19J

... ALA THR MET PRO GLY LYS SER MET VAL SER
 ...AGCCACTATGCCCAGGTAAATCAATGGTTTC 1920
 ... 1900
 ILE ALA GLY SER TYR GLN GLY ASN...
 TATTGGGGGAAGTAGTTATCAAGGTCAAAA... 1940
 ... 1930
 ... GLY LEU ALA ILE GLY VAL SER ARG ILE SER
 ...TGGTTTAGCTATCGGGGTATCAAGAATTTC 1980
 ... 1960
 ASP ASN GLY LYS VAL ILE ARG LEU SER...
 CGATAATGGCAAAGTGATTTTCGCTTGT... 2000
 ... 1990
 ... GLY THR THR ASN SER GLN GLY LYS THR GLY
 ...AGGCCACAACCAATAGTCAAGGTAAACACAGG 2040
 ... 2020
 VAL ALA ALA GLY VAL GLY TYR GLN TRP ***
 CGTTGCAGCAGGTGTTGGTTACCAGTGGTA...
 ...ATAGAATTTC

50/204

FIG.20A

NTHi strain 29 Hia

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

TTAAATATAAGGTAAATAAATAATGAACAA...
10 20 30...
... ILE PHE ASN VAL ILE TRP ASN VAL VAL THR
... ATTTTAAACGTTATTTGGAAATGTTGTGACT
... 40 50 60

GEN THR TRP VAL VAL SER GLU LEU THR...
CAAACTTGGGTTGTCTGTATCTGAACCTCACT...
70 80 90...
... ARG ALA HIS THR LYS CYS ALA SER ALA THR
... CGCGCCCAACACCAAAATGCGCCTCCGCCACC
... 100 110 120

VAL ALA VAL ALA VAL LEU ALA THR ALA LEU...
GTGGCGTTGCCGTTATTTGGCAACTGCGTTG...
130 140 150...
... SER ALA THR ALA GLU ALA ASN ASN THR
... TCTGCAACGGCTGAAGCGAACAACAATACT
... 160 170 180

SER VAL THR ASN GLY LEU ASN ALA TYR GLY...
TCTGTTACGAATGGGTTGAATGCTTATGGC...
190 200 210...

51/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20B

... ASP THR ASN PHE ASN THR THR ASN ASN SER
 ... GATACATAATTATAACCAATAATTCTG 240
 ... 220
 ILE ALA ASP LEU GLU LYS HIS VAL GIN ASP ...
 ATAGCAGATTGTGGAAAAACAACGTTCAAGAT... 250
 ... 260
 ... ALA TYR LYS GLY LEU LEU ASN LEU ASN GLU
 ... GCTTATAAAGGCTTATTAAATCTGAATGAA 300
 ... 280
 LYS ASP THR ASN LYS SER PHE LEU VAL ...
 AAGATACAAATAAGTCAAGTTCTTGGTT... 310
 ... 320
 ... ALA ASP ASN THR ALA ALA THR VAL GLY ASN
 ... GCCGACAAATACCGCCGCCAACCGTAGGCAAT 360
 ... 340
 LEU ARG LYS LEU GLY TRP VAL LEU SER ...
 TTGCGTAAATTGGGCTGGGTATTGTCTAGC... 370
 ... 380
 ... LYS ASN GLY THR ARG ASN GLU LYS SER TYR
 ... AAAACGGCACAGGACGAGGAAAAGCTAT 420
 ... 400
 ... 410

52/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20C

GLN VAL LYS LYS GLN ALA ASP GLU VAL LEU PHE ...
CAAGTAAACAAAGCTGATGAAGTTCTCTT...
430 ... 440 450...
... THR GLY SER GLY ALA ALA THR VAL SER SER
... ACTGGATCTGGTGCTGCAACGGTTAGTTCC 460 470 480
...
SER SER LYS ASP GLY LYS HIS THR ILE THR ...
AGCTCTAAAGACGGTAACATACCATACC...
490 ... 500 510...
... ILE SER VAL THR LYS GLY SER PHE ALA GLU
... ATTTCTGTTCACCAAGGTAGTTTGTCTGAGG 520 530 540
...
VAL LYS THR ASP ALA THR THR GLY GLN ...
GTAAACCTGATGCAACTACTGGAGGTCAA...
550 ... 560 570...
... VAL ASN ALA ASP ARG GLY LYS VAL LYS ALA
... GTAAACGCCGACCGTGGTAAAGTGAAAGCT 580 590 600
...
GLU ASP GLU ASN GLY ALA ASP VAL ASP LYS ...
GAGGACGAGAAATGGAGCTGATGTTGATAAG... 610 620 630...
...

53/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20D

... LYS VAL ALA THR VAL LYS ASP VAL ALA LYS
... AAGTTGCAACTGTAAAGATGTTGCTAAG 660
... 640

ALA ILE ASN ASP ALA ALA THR PHE VAL LYS ...
GCGATTAAACGATGCCGCACTTTCGTGAAA... 680
... VAL GLU SER THR ASP ASP ASP ILE GLU ASN 690...
... GTGGAAGCACAGATGATGACATTGAAAT 720
... 700 710 720

GLY ALA ALA GLY LYS ASN GLU THR THR ASP ...
GGTGCTGCAGGCAAAATGAACACACAGAC... 740
... GLN ALA LEU LYS ALA GLY ASP THR LEU THR 750...
... CAGCTCTCAAGCAGCGCACCTTAACC 770
... 760 780

LEU LYS ALA GLY LYS ASN LEU LYS ALA LYS ...
TTAAAGCGGGTTAAACCTTAAAGCTAAG... 800
... LEU ASP GLN ASN GLY LYS SER VAL THR PHE 810...
... TTAGACCAAAATGGTAAATCAGTACCCTTT 840
... 820 830

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20E

ALA LEU ALA LYS ASP LEU ASP VAL THR SER ...
GCTTTAGCGAAAGACCTTGATGTGACCTCT...
850 ... ALA LYS VAL SER ASP LYS LEU SER ILE GLY
... GCGAAAGTGAGTGATAAGTTGCTCTATTGGT
860 ...
870...
880 ...
890 ...
900 ...

LYS ASP THR ASN LYS VAL ASP ILE THR SER ...
AAAGATACGAATAAAGTTGATATTACCAGT...
910 ...
920 ... ASP ALA ASN GLY LEU LYS LEU ALA LYS THR
... GATGCAAAATGGCTTGAAATTGGCGAAACCA
930...
940 ...
950 ...
960 ...

GLY ASN GLY ASN GLY GIN ASN GLY ASN VAL ...
GGTAACGGAAATGGTCAAAACGGTAATGTC...
970 ...
980 ... HIS LEU ASN GLY ILE ALA SER THR LEU THR
... CACTTAAATGGTATTGCTTCGACTTTGACC
...
1000 ...
1010 ...
1020 ...

ASP THR ILE THR GLY MET THR GIN ALA ...
GATACCATTACAGGTATGACACACACAGCA...
1030 ...
1040 ...
1050...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20F

... SER ASN GLY VAL ALA VAL GLN ASN HIS ASN 1080
... AGCAATGGCGTGGCTGTGCAGAAATCATAT 1070
... 1060

ARG ALA ALA SER VAL ALA ASP VAL LEU ASN ...
CGTGTGCGAGTGTGGCTGATGTTAAT... 1100
... 1090

... ALA GLY TRP ASN ILE GLN GLY ASN GLY ALA 1140
... GCAGGCTGGAATATTCAAGGCACGGAGCG 1130
... 1120

SER VAL ASP PHE VAL ASN ALA TYR ASP THR ...
AGCGTTGATTTTGTCAATGCTTACGACACA... 1160
... 1150

... VAL ASP PHE VAL ASN GLY THR ASN THR ASN 1200
... GTAGATTTTGTCAATGGTACAAACCAAT 1190
... 1180

VAL ASN VAL THR THR ASP THR ALA HIS LYS ...
GTGAACGTACGACTGATACGGCTCACA... 1220
... 1210

... LYS THR THR VAL ARG VAL ASP VAL THR GLY 1260
... AAGACAACCGTCCGTGTGGATGTACAGGC 1250
... 1240

56/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20G

LEU PRO VAL GLN TYR VAL THR GLU ASP GLY ...
 TTGCCGGTTCAATATGTACGGAGACGGC...
 1270
 ... LYS THR VAL VAL LYS VAL ASP ASN LYS TYR
 ... AAACCGTTGTGAAGTGGACAATAAGTAT
 1280
 ...
 1290...
 1300
 1310
 1320

TYR GLU ALA LYS GLN ASP GLY SER ALA ASP ...
 TACGAAGCTAAGCAAGACGGTTCCGGCGGAT...
 1330
 ... MET ASP LYS LYS VAL GLU ASN GLY GLU LEU
 ... ATGGATAAAGTAAAGTAAATGGCGAGCTG
 1340
 ...
 1350...
 1360
 1370
 1380

ALA LYS THR LYS VAL LYS LEU VAL SER ALA ...
 GCGAAACCAAGTGAATTTGGTGTCGGCA...
 1390
 ... SER GLY GLN ASN PRO VAL LYS ILE SER ASN
 ... AGCGGTCAAAATCCGGTGAAATCAGCAAT
 1400
 ...
 1420
 1430
 1440

VAL ALA GLU GLY THR GLU GLU ASN ASP ALA ...
 GTTCCGGAAGCCACCGGAAGAAACGATGCG...
 1450
 1460
 1470...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

PCT/CA00/00289

FIG. 20H

58/204

... VAL SER PHE LYS GLN LEU LYS ALA LEU GIN	1480	1490	1500
... GTCAGCTTTAAGCAATTGAAAAGCCTTGCAA			
...			
GLU LYS GIN VAL THR LEU THR ALA SER ASN ...			
GAGAAACAGGTTACTTTAACTGCGAGCAAT...	1520	1530...	
... ALA TVR ALA ASN GLY GLY ASN ASP ALA ASP	1540	1550	1560
... GCTTATGCCCAATGGTGGTAACGATGCCGAC			
...			
GLY GLY LYS ALA THR GIN THR LEU ASN ASN ...			
GGCGGCAAGGCAACTCAACTTTAAACAAT...	1570	1580	1590...
... GLY LEU ASN PHE LYS PHE LYS SER THR ASP			1600
... GGT TTGAATTTTAAATTTAAATCCACAGAC			1610
...			1620
GLY GLU LEU LEU ASN ILE LYS VAL GLU ASN ...			
GGCGAGTTGTTGAACATCAAAAGTAGAAAT...	1630	1640	1650...
... ASP THR VAL THR PHE THR PRO LYS LYS GLY			1660
... GACACAGTTACCTTTACGCCCGAAAAAAGGT			1670
...			1680

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20I

SER VAL GLN VAL GLY GLU ASP GLY LYS ALA ...
TCGGTACAGGTTGGCGAAGACGGTAAAGGCT...
1690 1700 1710...
... THR ILE GLN ASN GLY THR LYS THR THR ASP
... ACGATTCAAAATGGTACGAAACACACCGAC 1740
... 1720

GLY LEU VAL GLU ALA SER GLU LEU VAL GLU ...
GGTTTGGTTGAAGCTTCCGAAATTGGTTGAA...
1750 1760 1770...
... SER LEU ASN LYS LEU GLY TRP LYS VAL GLY
... AGCCTGAACAAACTGGGCTGGAAAGTGGGC 1800
... 1780

VAL ASP LYS ASP GLY SER GLY GLU LEU ASP ...
GTTGATTAAGACGGCGAGCGCGGAGCTTGAT...
1810 1820 1830...
... GLY ALA SER ASN GLU THR LEU VAL LYS SER
... GGTGCATCCCAATGAACCTTTAGTGAAGTCG 1860
... 1840 1850

GLY ASP LYS VAL THR LEU LYS ALA GLY GLU ...
GGCGATAAAGTAACCTTGAAAGCCGGCGAG...
1870 1880 1890...

59/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20J

... ASN LEU LYS VAL LYS GLN ASP GLY THR ASN
... AATCTGAAGGTCAAAACAAGACGGCACCAAC
... 1910 1920

PHE THR TYR ALA LEU LYS ASP GLU LEU THR ...
TTCACCTACGCGCTCAAAAGATGATGACG...
... 1940 1950...
... GLY VAL LYS SER VAL GLU PHE LYS ASP THR
... GCGGTGAAGAGCGGTGGAGTTTAAAGACACG
... 1960 1970 1980

ALA ASN GLY SER ASN GLY ALA SER THR LYS ...
GCGAATGGTTCAAAACGGTGCAAGCACGAAG...
... 1990 2000 2010...
... ILE THR LYS ASP GLY LEU THR ILE THR SER
... ATTACCAAGACGGCTTGACCATTACGTCG
... 2020 2030 2040

ALA ASN GLY ALA ASN GLY ALA ALA THR ...
GCAACGGTGCGAATGGTGCGGGCGGACT...
... 2050 2060 2070...
... ASP ALA ASP LYS ILE LYS VAL ALA SER ASP
... GATGCGGACCAAGATTAAAGTGGCTTCAGAC
... 2080 2090 2100

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20K

GLY ILE SER ALA GLY ASN LYS ALA VAL LYS ...
GGCATCAGTGGGGTAAATAAGCGGTTAA...
2110 2120 2130...
... ASN VAL VAL SER GLY LEU LYS LYS PHE GLY
... AACGTTGTGAGCGGACTGAAGAAATTTGGT 2140 2150 2160
...
ASP ALA ASN PHE ASN PRO LEU THR SER ...
GATGCGAATTTCATCCACTGACCAAGTTCC...
2170 2180 2190...
... ALA ASP ASN LEU THR LYS LYS GIN TYR ASP ASP
... GCCGACAACCTTAACGAAACAAATATGACGAT 2200 2210 2220
...
ALA TYR LYS GLY LEU THR ASN LEU ASP GLU ...
GCCTATAAGGCTTGACCAATTGGGATGA...
2230 2240 2250...
... LYS GLY ALA ASP LYS LYS GIN THR LEU THR VAL
... AAGGTGCGGACAGCAAACTCTGACTGTT 2260 2270 2280
...
ALA ASP ASN THR ALA ALA THR VAL GLY ASP ...
GCCGACATACTGCCGCAACCGTGGGCCGAT...
2290 2300 2310...

61/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20L

... LEU ARG GLY LEU GLY TRP VAL ILE SER ALA
... TTGGCGGCTTGGGCTGGGTCTATTCTCTGCG 2330 2340
...
ASP LYS THR THR GLY GLU LEU ASN LYS GLU ...
GACAAACCCACAGCGCAACTCAATAAGGA... 2350
... TYR ASN ALA GLN VAL ARG ASN ALA ASN GLU 2370...
... TACAACGGCGCAAGTGGGTACGCCCAATGAA 2380 2390 2400
...
VAL LYS PHE LYS SER GLY ASN GLY ILE HIS ...
GTGAAATTCAAGAGCGGCAACGGTATCCAT... 2410 2420 2430...
... VAL SER GLY LYS THR VAL ASN GLY ARG ARG 2440 2450 2460
... GTTTCGGGTAAACGGTCAACGGTAGGCGC
...
GLU ILE THR PHE GLU LEU ALA LYS ASP GLU ...
GAATTACTTTTGAAATTGGCTAAAGACGA... 2470 2480 2490...
... ASN ALA ILE ALA PHE GLY TYR GLY SER LYS
... AATGCCATTGCTTTTCGGTTATGGCTCAAA 2500 2510 2520
...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20M

ALA LEU ARG ASP ASN THR VAL ALA ILE GLY ...
GCCTTGGCGGATACACGGTGGCAATTGGT... 2530
... THR GLY ASN VAL VAL ASN ALA GLU LYS SER 2540
... ACGGGCAACGTTGTGAATGCCGAAAAATCT 2550
... 2560

GLY ALA PHE GLY ASP PRO ASN TYR ILE GLU ...
GGTGCAATTCGGCGATCCGAACCTACATCGAA... 2590
... ASP LYS ALA GLY GLY SER TYR ALA PHE GLY 2600
... GATAAGCCGGTGGCAGCTACGCTTTCGGT 2610
... 2620

ASN ASP ASN ARG ILE THR SER LYS ASN THR ...
AACGATAACCGTATTACTTCTAATAAACACT... 2650
... PHE VAL LEU GLY ASN GLY VAL ASN ALA LYS 2660
... TTTGTGTTGGGTAATGGAGTTAATGCCGAAA 2670
... 2680

TYR LYS ALA ASN GLY ASP VAL THR GLU ...
TATAAGCCCAATGGAGATGTTGTGATACGGAA... 2700
... 2710

63/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20N

... THR VAL THR VAL LYS ASP LYS ASP GLY LYS
... ACCGTAAACCGTTAAGGACAAAGACGGTAAA 2760
... 2740

GLU THR THR VAL THR VAL PRO LYS ALA LEU ...
GAGACTAACCGTTACTGTTCCCTAAAGCGTTA... 2780
... GLY ALA THR VAL GLU ASN SER VAL THR LEU 2790...
... GGGGCTACGGTTGAAACACTCCGTTTATTG 2800
... 2810

GLY ASN LYS SER THR ALA THR LYS ASP LYS ...
GGTAATAATCGACTGCGACAAAAGATAAG... 2840
... GLY LYS ASN LEU LYS SER ASP GLY THR ALA 2850...
... GGTAATAACCTGAAATCTGATGGTACGGCG 2860
... 2870

GLY ASN THR THR THR ALA GLY THR GLY ...
GGTAACACTACAACTGCTGGCACACGGGT... 2900
... THR VAL ASN GLY PHE ALA GLY ALA THR ALA 2910...
... ACGGTAAACGGCTTTGCCGGTGCAACGGCG 2920
... 2930

64/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.200

HIS GLY ALA VAL SER VAL GLY ALA SER GLY ...
C A C G G T G C G G T T T C T G T C G G C C A A G C G C ...
2950
... GLU GLU ARG ARG ILE GLN ASN VAL ALA ALA
... G A A G A A A G A C G T A T C C A A A A C G T C G C G G C A
2980
...
65/204
GLY GLU ILE SER ALA THR SER THR ASP ALA ...
G G C G A A A T T C C G C C A C T T C C A C C G A T G C G ...
3010
... ILE ASN GLY SER GIN LEU TYR ALA VAL ALA
... A T T A C G G C A G C C A G T T G T A T G C T G T G C A
3040
...
LYS GLY VAL THR ASN LEU ALA GLY GIN VAL ...
A A A G G G T A A C A A A T C T T G C T G G A C A G T G ...
3070
... ASN LYS VAL GLY LYS ARG ALA ASP ALA GLY
... A A T A A G T G G G C A A A C G T G C A G A T G C A G G T
3100
...
THR ALA SER ALA LEU ALA ALA SER GIN LEU ...
A C A G C A A G T G C A T T A G C A G C T T C A C A G T A ...
3130
3140
3150...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.20P

... PRO GLN ALA SER MET PRO GLY LYS SER MET 3180
... CCACAAGCCTCTATGCCAGGTAAATCAATG 3170
... 3160

VAL SER ILE ALA GLY SER TYR GLN GLY ...
GTTTCTATTGCGGGAAGTAGTTATCAAGGT... 3200
... 3190

... GLN ASN GLY LEU ALA ILE GLY VAL SER ARG 3240
... CAAATGGTTTAGCTATCGGGGTATCA CGA 3230
... 3220

66/204

ILE SER ASP ASN GLY LYS VAL ILE ARG ...
ATTTCCGATAATGGCAAGTGATTATTTCGC... 3260
... 3250

... LEU SER GLY THR THR ASN SER GLN GLY LYS 3300
... TTGTCAGGCACAACCAATAGCCCAAGGTAAA 3290
... 3280

THR GLY VAL ALA ALA GLY VAL GLY TYR GLN ...
ACAGGCGTTGCAGCAGGTGTTGGTTACCAAG... 3320
... 3310

... TRP ***
... TGGTAATAGAATTCCGGGATCCCGC 3350
... 3340

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21A

NTHI strain M4071 Hia

67/204

10 20 30 40 50 60
MET ASN LYS ILE PHE ASN VAL...
GCGAATTCAATGAAACAATAATTTTAAAGT...
... ILE TRP ASN VAL MET THR GLN THR TRP ALA
...TATTTGGAATGTTATGACTCAAACTTGGGC
...

70 80 90 100 110 120
VAL VAL SER GLU LEU THR ARG ALA HIS THR...
TGTCGTATCTGAACCTCACTCGCGCCACAC...
... LYS ARG ALA SER ALA THR VAL ALA THR ALA
...CAACCGTGCCCTCCGCAACCGTGGCAACCGC
...

130 140 150 160 170 180
VAL LEU ALA THR LEU SER THR THR VAL...
CGTATTGGCGACGTTGTGTTCTACACAGT...
... GLN ALA THR THR THR GLY GLY THR THR SER
...TCAGGCGACAACTACTGGCGGTACGACAAG
...

190 200 210 ...
THR ASN GLY LEU LYS ALA TYR GLY SER THR...
TACAAACGGTTTGAAGCTTATGGAAGTAC...
...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21B

... ASN ASN PRO ASN PHE ASN ALA ALA GLY ASN 240
...GAATAATCCGAATTTCATGCTGCGAGGTAA 230
... 220

SER ALA THR ASP LEU ALA ARG GIN PHE ASP...
CTCTGCAACTGATTTAGCTAGACAGTTTGA... 250
... 260
... GLY ALA TYR ASP GLY LEU LEU ASN LEU ASN 270
...TGGTGCTTATGACGGTTTATTAAATCTAA 280
... 290 300

68/204

GLU LYS ASP ALA ASN LYS ASN LEU LEU VAL...
TGAAAAGATGCCGAATAAAATCTGTGGT... 310
... 320
... THR ASP ASP LYS ALA ALA THR VAL GLY ASN 330
...GACTGATGATAAGCGCGACCGTAGGCAA 340
... 350 360

LEU ARG LYS LEU GLY TRP VAL LEU SER...
TTTGCGTAATAATTGGGTTGGGTATTGTCTAG... 370
... 380
... LYS ASN GLY THR ARG ASN GLU LYS SER GIN 390
...TAAACACGGCACAAAGGAACGAGAAAAGCCA 400
... 410 420

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21C

GEN VAL LYS HIS ALA ASP GLU VAL LEU PHE...
ACAAGTCAACACCGGATGAAGTTGTT... 430
... GLU GLY LYS ASP 450 ...
...TGAAAGCAAGACGGTGTAACGGTTACTTC 470
... 460

LYS SER GLU ASN GLY LYS HIS THR VAL THR...
CAAACTCTGAACACCGGTAACACACCGTTAC... 490
... PHE THR LEU GLU LYS ASP LEU ASN VAL LYS 510 ...
...TTTACCCTTGAGAAAGACCTTAATGTAAA 530
... 520

ASN ALA THR VAL SER ASP LYS LEU SER LEU...
AAACGCAACCGTTAGCGATAAATTATCGCT... 550
... GLY ALA ASN GLY ASN LYS VAL ASP ILE THR 570 ...
...TGGTGCAACCGGCAATAAAGTCGATATTAC 590
... 580

SER ASP THR ASN GLY LEU LYS PHE ALA LYS...
CAGTGATACAAACGGCTTGAAATTTCGGAA... 610
... 630 ...

69/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21D

... PRO SER THR ASN GLY ASN GLY ASN VAL
 ... ACCAAGTACGAATGGTCAAAACGGTAATGT 660
 ... 640

 HIS LEU ASN GLY ILE ALA SER THR LEU THR...
 TCACTTAACGGTATTGCCCTCTACCTTAAAC... 670
 ... 680
 ... ASP THR ILE THR GLY THR THR LYS SER ALA
 ...TGACACACAATTACAGGTACAACAATACTGTC 720
 ... 700

 THR ASN GLY VAL ASP VAL GLN ASN HIS ASN...
 AACTAATGGTGTAGATGTGCAGAATCATAA... 730
 ... 740
 ... ARG ALA ALA SER VAL ALA ASP VAL LEU ASN
 ...TCGTGCTGCGAGTGTAGCTGATGTATTGAA 780
 ... 760

 ALA GLY TRP ASN ILE GLN GLY ASN GLY ALA...
 TGCAGGCTGGAAATATTCAAGGCCACGGAGC... 790
 ... 800
 ... SER VAL ASP PHE VAL ASN THR THR ASP THR
 ...GAGCGTTGATTTTGTCAATACTTACGACAC 840
 ... 820

70/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21E

```
VAL ASP PHE VAL ASN GLY LEU ASN THR ASN...
AGTAGATTTTGTGTC AATGGTTTAAATACCAA ...
860 ... VAL ASN VAL THR THR ASP THR ALA HIS ASN
...TGTGAACGTTACGACTGATACGGCTCACAA 900
... 880

LYS LYS THR THR VAL ARG VAL ASP VAL THR...
CAAAAGACAAACCGTCCGTGTGGATGTAAAC ...
910 ... GLY LEU PRO VAL GLN TYR VAL THR GLU ASP
...GGGCTTGGCGGTCCAAATATGTTACGGAAGA 960
... 940

GLY GLU THR VAL LYS VAL GLY ASN GLU...
CGGCGAAACCGTTGTGAAAGTGGGCAATGA ...
970 ... TYR TYR GLU ALA LYS GLN ASP GLY SER ALA
...GTATACGAAGCCAGCAAGACGGTTCGGC 1020
... 1000

ASP MET ASP LYS LYS VAL GLU ASN GLY LYS...
GGATATGGATAAATAAGTCGAAAATGGCAA ...
1030 ... 1050
```

71/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21F

... LEU ALA LYS THR LYS VAL LYS LEU VAL SER
...GCTGGCGAAACTAAAGTTAAATTGGTATC 1080
... 1060

ALA ASN GLY THR ASN PRO VAL LYS ILE SER...
GGCAACGGTACAAATCCGGTGAAATCAG ...
... 1090

... ASN VAL ALA ASP GLY THR GLU ASN THR ASP
...CAATGTTGCGGACGGCACGGGAAATACCGA 1140
... 1120

ALA VAL SER PHE LYS LYS LEU LYS ALA LEU...
TGCGGTCAGCTTTAAGCAGTTGAAAGCCTT ...
... 1150

... ASN LYS LYS LYS VAL THR LEU SER ALA SER
...GCAAGACAAACAGGTTACGTTAAGTGCGGAG 1200
... 1180

ASN ALA TYR ALA ASN GLY GLY SER ASP ALA...
CAATGCTTATGCCAATGGCGGTAGCGATGC ...
... 1210

... ASP GLY LYS GLY ILE GLN THR LEU SER
...CGACGGCGGCAAGGGAATTCAAACTTTAAG 1260
... 1240

72/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21G

ASN GLY LEU ASN PHE LYS PHE LYS SER THR...
CAATGGTTTGAAATTTTAAATTAAATCCAC...
1270 1280 1290 ...
... ASP GLY GLU LEU LEU ASN ILE LYS ALA GLU
...A GACGGCGAGTTGTTGAATATCAAAGCAGA
1300 1310 1320
...

ASN ASP THR VAL THR PHE THR PRO LYS LYS...
AAATGACACGGTTACCTTTACGCCGAA...
1330 1340 1350 ...
... GLY SER VAL GIN VAL GLY ASP ASP GLY LYS
...AGGTTCGGTGCAGGTTGGCGATGATGGTAA
1360 1370 1380
...

ALA THR ILE GIN ASP GLY ALA LYS THR THR...
GGCTACGATTCAAGACGGCGCAAAACAAC...
1390 1400 1410 ...
... THR GLY LEU VAL GLU ALA SER GLU LEU VAL
...TACCGGTTTGGTTGAGGCTTCTGAATTGGT
1420 1430 1440
...

ASP SER LEU ASN LYS LEU GLY TRP LYS VAL...
TGACAGCCTGAACAAATTGGGTTGGAAAGT...
1450 1460 1470 ...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21H

... GLY THR GLY THR ASP GLY THR GLY VAL THR
...GGGCACCGGCACCTGACGGCACAGGAGTGAC
... 1480 1490 1500

ASP GLY THR HIS THR ASP THR LEU VAL LYS...
CGATGGCACGCATACCGACACTTAGTGAA...
1510 1520 1530 ...
... SER GLY ASP LYS VAL THR LEU LYS ALA GLY
...GTCGGGGGATAAAGTAACCTTTGAAAGCCGG
... 1540 1550 1560

ASP ASN LEU LYS VAL LYS GLN GLU GLY THR...
CGACAATCTGAAGGTCAACACAGAGGGTAC...
1570 1580 1590 ...
... ASN PHE THR TYR ALA LEU LYS ASP GLU LEU
...AACTTCACTTATGCGCTCAAGATGAATT
... 1600 1610 1620

THR ASP VAL LYS SER VAL GLU PHE LYS ASP...
GACGGACGTGAAGAGCGTGAGTTTAAAGA...
1630 1640 1650 ...
... THR ALA ASN GLY ALA ASN GLY ALA SER THR
...CACGGCGAATGGTGCAACCGTGCAAGCAC
... 1660 1670 1680

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21I

LYS ILE THR LYS ASP GLY LEU THR ILE THR...
 GAAGATTACCAAGACGGCTTGACCATTAC... 1710 ...
 ... PRO ALA ASN GLY ALA GLY ALA ALA GLY ALA
 ...GCCGGGCAACGGTGCGGGTGCGGGCAGGTGC 1730
 ... 1720 1740

ASN THR ALA ASN THR ILE SER VAL THR LYS...
 AACA CTGCAACACCATTAGCGTAACCAA... 1760
 ... ASP GLY ILE SER ALA GLY ASN LYS ALA VAL
 ...AGACGGCATTAGCGGGTAATAAGCAGT 1780
 ... 1770 1800

LYS ASN VAL VAL SER GLY LEU LYS LYS PHE...
 TAAACGTTGTGAGCGGACTGAAGAAATT... 1820
 ... GLY ASP ALA ASN PHE ASP PRO LEU THR SER
 ...TGGTGATGCGGAATTTGATCCGCTGACTAG 1840
 ... 1830 1860

SER ALA ASP ASN LEU THR LYS GLN THR ASP...
 CTCAGCCGACCAACTTACGAACAATATGA... 1880
 ... 1870 1890 ...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21J

... ASN ALA TYR LYS GLY LEU THR ASN LEU ASP
 ...CAATGGCTATAAAGGCTTGACCAATCTGGA 1920
 ... 1900
 GLU LYS SER LYS GLY LYS GLN THR PRO THR...
 TGA A A A A G T A A A G G C A A G C A A A C T C C G A C ...
 ... 1930
 ... VAL ALA ASP ASN THR ALA ALA THR VAL GLY
 ...CGTTGCTGACAAATACCGCTGCAACCGTGGG 1980
 ... 1960
 76/204
 ASP LEU ARG GLY LEU TRP VAL ILE SER...
 CGATTTCGGCGGCTTGGGCTGGGTCTTTC...
 ... 1990
 ... ALA ASP LYS THR LYS GLY GLU LEU ASN LYS
 ...TGCAAGACAAACCAGGCGGAACCTCAATAA 2040
 ... 2020
 GLU TYR ASN ALA GIN VAL ARG ASN ALA ASN...
 GGAATACACGCACAGTGCGTAACGCTAA...
 ... 2050
 ... GLU VAL LYS PHE LYS SER GLY ASN GLY ILE
 ...TGAAAGTGAAATTCAAGAGCGGCACGGGTAT 2100
 ... 2080

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21K

```

ASN VAL SER GLY LYS THR LEU ASP ASN GLY...
CAATGTTTCCTGGTAAACATGGATAACGG...
2110
...THR ARG GLU ILE THR PHE GLU LEU ALA LYS
...TACGCCGGAATTACTTTTGAATTGGCTAA
2140
...
ASP GLU ASN ALA ILE ALA PHE GLY SER GLY...
AGACGAAATGCCATTGCTTTCGGTTCTGG...
2170
...SER LYS ALA LEU ARG ASP ASN THR VAL ALA
...CTCAAAAGCCTTGCGGATAACACGGTGGC
2200
...
ILE GLY THR GLY ASN VAL VAL ASN ALA GLU...
ATTGTTACGGCAACGTTGTGTAATGCCGA...
2230
...LYS SER GLY ALA PHE GLY ASP PRO ASN TYR
...AAATCTGGTGCAATTCGGCGATCCGAACCTA
2260
...
ILE GLU ASP LYS ALA GLY GLY SER THR ALA...
CATCGAAGATAAGCCGGTGGCAGCTACGC...
2290
2300
2310

```

77/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21L

... PHE GLY ASN ASP ASN ARG ILE THR SER LYS
...TTCCGGTAACGATAACCGTATTACTTCTTAA 2340
... 2320 2330

ASN THR PHE VAL LEU GLY ASN SER VAL ASN...
AAACACTTTTGTGTTGGGTAATAAGTGTAA... 2360
... 2350 2370 ...
... ALA LYS ARG ASP ALA ASN GLY ASN VAL LEU
...TGCGAAACGTGATGCAATGGCAATGTACT 2400
... 2380 2390

THR GLU GLU LYS GLU VAL VAL GLY LYS ASP...
GACCGAAGAAAGAGTGGTTGGAAGA... 2420
... 2410 2430 ...
... GLY ALA LYS THR LYS VAL THR VAL PRO GLN
...CGGTGCGAAGACGAAAGTAACCGTGCCGCA 2460
... 2440 2450

ALA LEU GLY GLU THR VAL GLU ASN SER VAL...
AGCCTTAGGCGAAACCGTAGAAAATTCTGT... 2480
... 2470 2490 ...
... THR LEU GLY ASN ALA SER THR ALA THR LYS
...TTATCTCGGTAAATGCTTCAACTGCCGACAA 2520
... 2500 2510

78/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21M

ASP LYS GLY LYS ASN LEU LYS SER ASP GLY...
AGATAAGGGTAAAAACCTGAAATCTGATGG ...
2530 ... THR ALA GLY ASN THR THR THR ALA GLY ALA
...TACGGCGGGTAACACTACACTGCTGGCGGC 2570 2580
...

THR GLY THR VAL ASN GLY PHE ALA GLY ALA...
AACGGGTACGGGTAAACGGCTTTGCCGGTGCC ...
2590 ... THR ALA HIS GLY ALA VAL SER VAL GLY ALA
...AACGGCGCACGGTGCGGTTTCTGTCGGCGGC 2620 2630 2640
...

SER GLY GLU GLU ARG ARG ILE GIN ASN VAL...
AGTGCGCGAAGAAAGACGTATCCAAACGT ...
2650 ... ALA ALA GLY GLU ILE SER ALA THR SER THR
...CGCGCGCAGCGCAAAATTTCGGCTACTTCCAC 2680 2690 2700
...

ASP ALA ILE ASN GLY SER GIN LEU TYR ALA...
AGATGCGATTAAACGGTAGCCAGTTGTATGC ...
2710 2720 2730 ...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.21N

... VAL ALA LYS GLY VAL THR ASN LEU ALA GLY 2760
 ...TGTGGCAAAAGGGTTACAAACCTTGCTGG
 ... 2740 2750

 GIN VAL ASN LYS VAL GLY LYS ARG ALA ASP...
 ACAAGTGATATAAGTGGGCAAAACGTGCAGA ... 2780
 ... 2770 2790 ...
 ... ALA GLY THR ALA SER ALA LEU ALA ALA SER
 ...TGCAGGTACAGCAAGTGCAATTAGCGGCTTC 2820
 ... 2800 2810

 GIN LEU PRO GIN ALA SER MET PRO GLY LYS...
 ACAGTTACCAACAAGCCTCTATGCCAGGTAA... 2840
 ... 2830 2850 ...
 ... SER MET VAL SER ILE ALA GLY SER SER TYR
 ...ATCAATGGTTTCTATTGCGGGGAAGTAGTTA 2880
 ... 2860 2870

 GIN GLY GIN SER GLY LEU ALA ILE GLY VAL...
 TCAAGGTCAAAGTGGTTTAGCTATCGGGGT... 2900
 ... 2890 2910 ...
 ... SER ARG ILE SER ASP ASN GLY LYS VAL ILE
 ...ATCAAGAATTTCGGATAATGGCAAAAGTGAT 2940
 ... 2920 2930

80/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

81/204

FIG.210

```

      ILE ARG LEU SER GLY THR THR ASN SER GIN...
      TATTCCGCTTGTCAGGCACAACCAATAGCCA...
      2950
      ... GLY LYS THR GLY VAL ALA ALA GLY VAL GLY
      ...AGGTAAACACAGGCCGTGCAGCAGGTGTTGG
      ...
      2980
      TYR GLN TRP *** ASN SER GLY SER
      TTACCA GTGGTAATAGAAATTCGGGATCCGC
      3010
      3020
      3030
      2990
      3000
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22A

NTHi strain K9 hia sequence

MET ASN LYS ILE PHE ASN VAL ILE TRP ASN ...
 ATGAACAAATTTTAAACGTTATTTGGAAT...
 10 20 30...
 ... VAL MET THR GIN THR TRP ALA VAL VAL SER
 ... GTTATGACTCAAACTTGGGCTGTCGTATCT
 40 50 60
 ...
 GLU LEU THR ARG ALA HIS THR LYS ARG ALA ...
 GAAC TCACTCGCGCCCAACCAACGTCGCC...
 70 80 90...
 ... SER ALA THR VAL ALA THR ALA VAL LEU ALA
 ... TCCGCAACCGTGCGGACCGCCGTATTGGCG
 100 110 120
 ...
 THR GIN LEU SER ALA THR ALA GLU ALA ASN ...
 ACGCAGTTGTCTGCAACGGCTGAAGCGGAC...
 130 140 150...
 ... SER SER ALA SER VAL THR SER ARG LEU ASN
 ... AGTAGTCTTCTGTACGAGTAGGTTGAAT
 160 170 180
 ...
 VAL TYR GLY ASP THR ASN THR LYS PHE ASN ...
 GTTATGGCGATACGAATACTAAATTCAAT...
 190 200 210...

82/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22B

... ALA ALA ASN ASN SER ILE ALA ASP LEU ASN
... GCAGCCAAATAATTCAATAGCAGATTAAAT 240
... 220 230

LYS GLN ASN ASP GLY VAL HIS ASP GLY LEU ...
AAACAAATGATGGTGTTCACGATGGTTTA... 250
... 260 270...
... LEU ASN LEU ASN GLU ASN GLY ALA ASN LYS
... TTAAATCTGAATGAACGAGTCCGAATAAA 300
... 280 290

LYS LEU LEU VAL ASP ASP THR ALA ALA ...
AAGCTGTTGGTGGATGACAAATACTGCGGCG... 310
... 320 330...
... THR VAL GLY ASP LEU ARG LYS LEU GLY TRP
... ACCGTAGGCGATTACGTAAATTGGGCTGG 360
... 340 350

VAL VAL SER THR LYS ASN GLY LYS GLU ASN ...
GTCGTATCAACCAAAATGGCAAGGAAAT... 370
... 380 390...
... GLU LYS SER GLN GLN VAL LYS GLN ALA ASP
... GAGAAAGCCCAACAAGTCAACAGCGGAT 420
... 400 410

83/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22C

```
GLU VAL LEU PHE LYS GLY SER LYS GLY GLY ...
GAAGTGTGTTTAAAGGCAGCAAAAGCGGGT...
430 ... VAL GLN VAL THR SER THR SER GLU ASN GLY
... GTGCAGGTTACTTCCACCTCTGAACGGGC
440 ...
450 ...
460 ...
470 ...
480 ...

LYS HIS ALA ILE THR PHE ALA LEU ALA LYS ...
AAACAGCCCATTAACCTTTGCTTTTAGCGGAA...
490 ... ASP LEU ASP MET ARG THR ALA THR VAL SER
... GACCTTGATATGAGAACTGCCGACTGTGAGT
500 ...
510 ...
520 ...
530 ...
540 ...
550 ...

ASP THR LEU THR ILE GLY GLY SER THR THR ...
GATACCTTAACGATTGGCGGTTAGTACTACT...
560 ... THR GLY SER ALA THR THR PRO LYS VAL ASN
... ACAGGTTAGTGCAACACCAACCAAAAGTGAAT
570 ...
580 ...
590 ...
600 ...

VAL THR SER THR ALA SER GLY LEU ASN PHE ...
GTGACTAGCACGGCAAGCGGCTTGAACTT...
610 ...
620 ...
630 ...
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22D

... ALA LYS GLY ALA THR GLY ALA ASN GLY ASP
... GCGAAAGGCGCTACAGGTCCTAATGGCGAT 660
... 640

THR THR VAL HIS LEU THR ASN ILE ALA SER ...
ACTACGGTTCACCTTGACTAATAATTGCTTCA...
680 690...

... THR LEU GLN ASP THR LEU LEU ASN THR GLY
... ACTTGGCAAGATACTCTATTGAATACTGGG 720
... 710

VAL VAL SER LYS LEU ASP GLY ASN GLY ILE ...
GTTGTGAGTAAATTAGATGGTAATGGTATT... 750...
730 740

... THR ALA ASP GLU LYS LYS ARG ALA ALA SER
... ACTGCTGACGAGAAAAACGTGCGGCAAGC 780
... 760 770

VAL GLN ASP VAL LEU ASN SER GLY TRP ASN ...
GTTCAAGATGTTTTTAAATAGTGGTTGGAAT... 800
790 810...

... ILE LYS GLY VAL LYS THR GLY ALA THR THR
... ATCAAGGGTGTTAAACACAGGTGCGACGACT 840
... 820

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22E

SER ASP ASN VAL ASP PHE VAL ARG THR TYR ...
TCTGATAACGTTGATTTTGTCCGTACTTAC...
850 ... ASP THR VAL GLU PHE LEU SER GLY SER GLU
... GACACAGTTGAGTTTGTAGCGGAGTGAA
860 ...
870 ...
880 ...
890 ...
900 ...

GLU THR THR LEU VAL THR VAL ASP SER GLU ...
GAACTACACTGGTTTACAGTGGATAGTGAA...
910 ... SER ASN GLY LYS SER THR LYS VAL LYS ILE
... AGTAATGGAAATCTACTATAAGTTAAATC
920 ...
930 ...
940 ...
950 ...
960 ...

GLY ALA LYS THR SER VAL ILE LYS GLU LYS ...
GGTGGAGAGACCTCTGTATTATCAAGAA...
970 ... ASP GLY LYS LEU PHE THR GLY LYS ALA ASN
... GACGGTAAGTTATTACTGGGAAAGCTAAT
980 ...
990 ...
1000 ...
1010 ...
1020 ...

LYS ASP THR ASN GLN VAL ALA SER ASN ...
AAGACACAAATCAAGTCGCAAGTAATAAT...
1030 ...
1040 ...
1050 ...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22F

... ALA ALA ASP ASP THR ASP GLU GLY IYS GLY
... GCAGCTGATGATACGGATGAGGGCAAAGGC 1070 1080
...
LEU VAL THR ALA GLU THR VAL ILE ASN ALA ...
TTAGTCACTGCAGAGACTGTTATCAATGCA...
... VAL ASN LYS ALA GLY TRP ARG ILE IYS THR
... GTAAACAAGGCTGGTTGGAGAATTAAACA 1120 1130 1140
...
THR GLY ALA ASN ASN GLN ALA GLY GLN PHE ...
ACGGGTGCTAATAATCAAGCTGGTCAGTTT...
... GLU THR VAL THR SER GLY THR ASN VAL THR
... GAACTGTCAATCAAGGCACAAATGTAAACC 1160 1170... 1180 1190 1200
...
PHE ALA ASP GLY ASN GLY THR THR ALA VAL ...
TTTGCTGATGGCAATGGTACAACTGCAGTC...
... VAL THR GLY ASP ALA THR ASN GLY ILE THR
... GTAACTGGCGATGCTACCAATGGTATTACT 1220 1230... 1240 1250 1260
...

87/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22G

VAL LYS THR GLU ALA LYS VAL GLY ASP GLY ...
GTTAAATACGAAGCGAAGTTGGCGACGGC...
1270
... LEU LYS ILE GLY ASN ASP GLN LYS ILE THR
... TTGAAGATTGGTAACGACCAAAATCACT
1280
...
1300
1320

ALA ASP THR THR ALA LEU THR VAL THR GLY ...
GCAGATACGACCGCACTTACTGTGACGGGC...
1330
... GLY LYS VAL THR ALA PRO ASP ALA THR ASN
... GGTAAGTTACTGCCCTGTGATGCAACCAAT
1340
...
1360
1370
1380

GLY LYS LYS LEU VAL ASN ALA SER GLY LEU ...
GGTAAGAACTTGTTAATGCAAGTGGTTTA...
1390
... ALA ASP ALA LEU ASN LYS LEU SER TRP THR
... GCTGATGCGTTAAACAAATTAAGTTGGACT
1400
...
1420
1430
1440

ALA LYS ALA GLU ALA ASP THR ALA ASN GLY ...
GCAAGAGCTGAAGCAGATCTGCTAATGGC...
1450
1460
1470...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22H

... GLY GLU LEU ASP GLY THR ALA ASP GLU LYS
... GCGGAGCTTGATGGAACTGCAGATGAAAAA 1490 1500
...
GLU VAL LYS ALA GLY GLU THR VAL THR PHE...
GAAGTTAAAGCAGGCGAAACGGTAACCTTT... 1520
... LYS ALA GLY LYS ASN LEU LYS VAL LYS GLN 1530...
... AAGCGGCGCAAGAACTTAAAGTGAAACAA 1540 1550 1560
...
ASP GLY ALA ASN PHE THR TYR SER LEU GLN...
GATGGTGCGAACCTTTACTTTATTTCACTGCAA... 1570 1580 1590...
... ASP ALA LEU THR GLY LEU THR SER ILE THR
... GATGCTTTAACACGGCTTAACGAGCATTTACT 1600 1610 1620
...
LEU GLY THR GLY ASN ASN GLY ALA LYS THR...
TAGGTACAGGAAATAATGGTGCGAAACT... 1630 1640 1650...
... GLU ILE ASN LYS ASP GLY LEU THR ILE THR
... GAATCAACAAGACGGCTTAACCATCACA 1660 1670 1680
...

89/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22I

PRO ALA ASN GLY ALA GLY ALA ASN ALA ...
 CCAGCAAAATGGTGCGGGTGCAATAATGCA...
 1690 1700 1710...
 ... ASN THR ILE SER VAL THR LYS ASP GLY ILE
 ... AACACCATCAGCGGTAAACCAAGACGGCATT
 ... 1720 1730 1740
 ...
 SER ALA GLY GLY GLN SER VAL LYS ASN VAL...
 AGTGCGGGGCGGTCTAGTCGGTTTAAACGTT...
 1750 1760 1770...
 ... VAL SER GLY LEU LYS LYS PHE GLY ASP ALA
 ... GTGAGCGGACTGAAGAAATTGGTGATGCCG
 ... 1780 1790 1800
 ...
 ASN PHE ASP PRO LEU THR SER SER ALA ASP...
 AATTTCGATCCGCTGACTAGCTCCGCCGC...
 1810 1820 1830...
 ... ASN LEU THR LYS GLN TYR ASP ASP ALA TYR
 ... AACTTAACGAACAATATGACCGATGCCCTAT
 ... 1840 1850 1860
 ...
 LYS GLY LEU THR ASN LEU ASP GLU LYS GLY...
 AAGGCTTGACCAATTGGGATGAAAAGGT...
 1870 1880 1890...

90/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22J

ASN THR ALA ALA THR VAL GLY ASP LEU ARG ...
... ALA ASP LYS GLN THR LEU THR VAL ALA ASP
... GCGGACAAAGCAACTCTGACTGTTGCCGAC 1920
... 1900
AATAC TGCCGCAACCGTGGCGGATTGGCGC...
1940
... GLY LEU GLY TRP VAL ILE SER ALA ASP LYS
... GGC TTGGCTGGGTCTATTTCTGCGGACAAA 1980
... 1960
THR THR GLY GLU LEU ASP LYS GLU TYR ASN ...
ACCACAGGCGGAACCTCGATAAGGAATACAA C...
2000
... ALA GLN VAL ARG ASN ALA ASN GLU VAL LYS
... GCGCAAGTGCGGTAAACGCCAATGAAGTGAAA 2040
... 2020
PHE LYS SER GLY ASN GLY ILE ASN VAL SER ...
TTCAAAAGCGGCAACGGTATCAATGTTTCC...
2060
... GLY LYS THR VAL ASN GLY ARG ARG GLU ILE
... GGTAACACTGTCAACGGTAGGCGTGAAATT 2100
... 2080

91/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22K

```
THR PHE GLU LEU ALA LYS GLY GLU VAL ...
ACTTTTGAATTGGCTAAAGCGCAAGTGGTT...
2120
... LYS SER ASN GLU PHE THR VAL LYS GLU THR
... AAATCGAATGAATTTACTGTCAAAGAAACC
... 2140
... 2150
... 2160
ASN GLY LYS GLU THR SER LEU VAL LYS VAL ...
AATGGCAAGGAAACGAGCCTGGTTAAAGTT...
2170
... GLY ASP LYS TYR TYR SER LYS GLU ASP ILE
... GCGATAAATATTACAGCAAAGAGGATATT
... 2200
... 2210
... 2220
ASP PRO ALA THR GLY LYS PRO LYS VAL THR ...
GACCAAGCAACCGGTAAACCGAAGTTACA...
2230
... ASN GLY ASN ALA VAL ALA LYS TYR GLN
... AATGGCAATGCAGTTGCTGCCGAAATATCAA
... 2260
... 2270
... 2280
ASP LYS ASP GLY LYS VAL SER ALA ASP ...
GATAAGATGGCAAGTCGTTTCTGCTGAC...
2290
... 2300
... 2310...
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22L

... GLY SER SER ASN THR ALA VAL THR LEU THR
... GGCAGCAGCAATACCGCTGTACCCTAAC 2340
... 2320

ASN LYS GLY TYR GLY TYR VAL THR GLY ASN ...
AACAAAGGTTATGGCTATGTACAGGTAAAC... 2360
... GIN VAL ALA ASP ALA ILE ALA LYS SER GLY 2370...
... CAAGTGGCAGATGCGATTGCGAAATCAGGC 2380
... 2390 2400

93/204

PHE GLU LEU GLY LEU ALA ASP ALA GLU LYS ...
TTTGAGCTTGGTTGGCTGTATGCAGAA... 2420
... ALA LYS ALA ALA PHE GLY ASP GLU THR LYS 2430...
... GCGAAAGCTGCCGTTTGGCGATGAACAA 2440
... 2450 2460

ALA LEU SER SER ASP LYS LEU GLU THR VAL ...
GCTTGTCCTCTGTATAATTGGAAACCGTA... 2480
... ASN ALA ASN ASP LYS VAL ARG PHE ALA ASN 2490...
... AATGCCAACGACAAAGTCCGTTTGGCTAAT 2500
... 2510 2520

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22M

GLY LEU ASN THR LYS VAL SER ALA ALA THR ...
GGTTTAAATACCAAAGTGAGCGCGGCAACG...
2530 ... VAL GLU SER ILE ASP ALA ASN GLY ASP LYS
2540 ... GTGGAAAGCATCGATGCAAAACGGCGATAAA
2550 ...
2560 ...
2570 ...
2580 ...

VAL THR THR THR PHE VAL LYS THR ASP VAL ...
GTGACTACAACTTTGTGAAACCGATGTG...
2590 ... GLU LEU PRO LEU THR GLN ILE TYR ASN THR
2600 ... GAATTGCCCTTTACGCAAAATCTACAATACCC
2610 ...
2620 ...
2630 ...
2640 ...

ASP ALA ASN GLY LYS LYS ILE VAL LYS ASN ...
GATGCAACACGGTAAGAAATCGTTAAAT...
2650 ... GLY ASP LYS TRP TYR THR LYS ASP ASP
2660 ... GCGATAAATGGTATTACACGAAAGATGAC
2670 ...
2680 ...
2690 ...
2700 ...

GLY SER THR ASP MET THR LYS GLU VAL THR ...
GGCTCAACTGATATGACTAAAGAGTTACC...
2710 ...
2720 ...
2730 ...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22N

... LEU GLY ASN VAL ASP SER ASP GLY LYS LYS
... CTTGGCAATGTGGATTTCAGACGGCAAGAAA 2760
... 2740

VAL VAL LYS GLU ASP ASN LYS TRP TRP HIS ...
GTTGTGAAGAAGACAAACAAGTGGTATCAC... 2780
... VAL LYS SER ASP GLY SER THR ASP LYS THR 2820
... GTTAAATCTGTGATGGTTCTACGGATATAACA 2810
... 2800

GLN VAL VAL GLU GLU ALA LYS VAL SER THR ...
CAGGTGGTCGAAGAAGCTAAAGTTTCTACC... 2840
... ASP GLU LYS HIS VAL VAL SER LEU ASP PRO 2850...
... GATGAACAAACACGTTGTTCAGCCTTGATCCA 2870
... 2860

ASN ASP GLN SER LYS GLY VAL VAL ...
ATGATCAATCAAAAGGTAAAGCGTGGTC... 2900
... ILE ASN ASN MET ALA ASN GLY GLU ILE SER 2910...
... ATTAACAATATGGCTAATGGCGAATTTCT 2930
... 2920

95/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.220

ALA THR SER THR ASP ALA ILE ASN GLY SER ...
GCCACTTCCACCGATGCGATTACGGAGT...
2950 2960 2970...
... GIN LEU TYR ALA VAL ALA LYS GLY VAL THR
... CAGTTGTATGCCCGTGGCAAAAGGGGTAAACA
... 2980 2990 3000

ASN LEU ALA GLY GIN VAL ASN ASN LEU GLU ...
AACCTTGCTGGACAAAGTGAAATAATCTTGAG...
3010 3020 3030...
... GLY LYS VAL ASN LYS VAL GLY LYS ARG ALA
... GGCAAAAGTGAAATAAGTGGGCAACGTGCCA
... 3040 3050 3060

ASP ALA GLY THR ALA SER ALA LEU ALA ALA ...
GATGCAGGTACTGCAAGTGCAATTAGCGGT...
3070 3080 3090...
... SER GIN LEU PRO GIN ALA THR MET PRO GLY
... TCACAGTTACCACCAAGCCACTATGCCAGGT
... 3100 3110 3120

LYS SER MET VAL SER ILE ALA GLY SER ...
AAATCAATGGTTTCTATTGCGGGGAAGTAGT...
3130 3140 3150...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.22P

... TYR GLN GLY GLN ASN GLY LEU ALA ILE GLY
... TATCAAGGTCAAATGGTTTAGCTATCGGG
... 3160 3170 3180

VAL SER ARG ILE SER ASP ASN GLY LYS VAL ...
GTATCAAGAAATTCCGATAATGGCAAAGTG...
... 3190 3200 3210...

... ILE ILE ARG LEU SER GLY THR THR ASN SER
... ATTATTCGCTTGTCAGGCACAAACCAATAGT
... 3220 3230 3240

GLN GLY LYS THR GLY VAL ALA GLY VAL ...
CAGGTAAACACAGGCGTTGCAGCAGGTGT...
... 3250 3260 3270...

... GLY TYR GLN TRP ***
... GGTACCAGTGGTAATAGAAATTCGGGATCC
... 3280 3290 3300

97/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23A

NHI strain K22 Hia

```

      MET ASN LYS ILE PHE ASN...
      GCGAATTCAATGAACAAATTTTAA...
      10          20          30          40          50          60
      ... VAL ILE TRP ASN VAL THR GLN THR TRP VAL
      ...CGTTATTGGAAATGTTGTGACTCAAACTTGGGT
      ...          30          40          50          60

      VAL VAL SER GLU LEU THR ARG ALA HIS...
      TGTCGTATCTGAACCTCACTGCGCCCA...
      70          80          90          100          110          120
      ... THR LYS CYS ALA SER ALA THR VAL ALA VAL ALA
      ...CACCAAATGCGCCTCCGCCACCGTGCGGTGTC
      ...          90          100          110          120

      VAL LEU ALA THR ALA LEU SER ALA THR...
      CGTATTGGCACTGCGTTGTCTGCAC...
      130          140          150          160          170          180
      ... ALA GLU ALA ASN ASN THR SER VAL THR ASN
      ...GGCTGAAGCGGAACAACAATACTTCTGTACGAA
      ...          150          160          170          180

```

98/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23B

```

    GLY LEU ASN ALA TYR GLY ASP THR ASN...
    TGGGTTGAATGCTTATGGCGATACTAA ...
    190
    ... PHE ASN THR THR ASN ASN SER ILE ALA ASP LEU
    ...TTTAAATACCAACCAATAATTGCGATAGCAGATT
    ... 210 220 230 240
    99/204
    GLU LYS HIS VAL GLN ASP ALA THR LYS...
    GGAAAAACACGTTCAAGATGCTTATAA ...
    250
    ... GLY LEU LEU ASN LEU ASN GLU LYS ASP THR ASN
    ...AGGCTTATTAAATCTGAATGAAAAAGATACAAA
    ... 270 280 290 300
    LYS SER SER PHE LEU VAL ALA ASP ASN...
    TAAGTCAAGTTTCTTGTTGTCGACAA ...
    310
    ... THR ALA ALA THR VAL GLY ASN LEU ARG LYS LEU
    ...TACCGCCGCAACCGTAGGCAATTGCGTAAATT
    ... 330 340 350 360
    GLY TRP VAL LEU SER SER LYS ASN GLY...
    GGGCTGGGTATTGTCTAGCAAAAACGG ...
    370
    ...
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23C

... THR ARG ASN GLU LYS SER TYR GLN VAL LYS GLN
 ...CACAAGGAACGAGAAAGCTATCAAGTAAACA 410 420
 ... 390
 ALA ASP GLU VAL LEU PHE THR GLY SER...
 AGCTGATGAAGTTCTCTTTACTGGATC... 440
 ... GLY ALA ALA THR VAL SER SER SER LYS ASP
 ...TGGTGCTGCAACGGTTAGTTCAGCTCTAAAGA 460 470 480
 ... 450
 GLY LYS HIS THR ILE THR ILE SER VAL...
 CCGTAAACATACCATTTCTCTGT... 500
 ... THR LYS GLY SER PHE ALA GLU VAL LYS THR ASP
 ...TACCAAGGTAGTTTGTGCTGAGGTAAACTGA 520 530 540
 ... 510
 ALA THR THR GLY GLY GLN VAL ASN ALA...
 TGCACTACTGGAGGTCAAGTAAACGC... 560
 ... ASP ARG GLY LYS VAL LYS ALA GLU ASP GLU ASN
 ...CGACCGTGGTAAAGTGAAGCTGAGGACGAGAA 580 590 600
 ... 570

100/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23D

GLY ALA ASP VAL ASP VAL LYS LYS VAL ALA...
TGGAGCTGATGTTGATAAGAAAGTTGC...
610 ...
... THR VAL LYS ASP VAL ALA LYS ALA ILE ASN ASP
...ACTGTAAAGATGTTGCTAAGGCGATTAAACGA
620 ... 630 640 650 660

ALA ALA THR PHE VAL LYS VAL GLU SER...
TGCCGCAACTTTCGTGAAAGTGGAAG...
670 ...
... THR ASP ASP ILE GLU ASN GLY ALA ALA GLY
...CACAATGATGACATTGAAAATGGTGCTGCAGG
680 ... 690 700 710 720

LYS ASN GLU THR THR ASP GLN ALA LEU...
CAAAATGAACCTACAGACCAGCTCT...
730 ...
... LYS ALA GLY ASP THR LEU THR LEU LYS ALA GLY
...CAAAGCAGCGCACCTTAACCTTAAAGCGGG
740 ... 750 760 770 780

LYS ASN LEU LYS ALA LYS LEU ASP GLN...
TAAAACTTAAAGCTAAGTTAGACCA...
790 ... 800

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23E

... ASN GLY LYS SER VAL THR PHE ALA LEU ALA LYS
...AAATGGTAAATCAGTAAACCTTTGCTTTAGCGAA 840
... 810 820 830

ASP LEU ASP VAL THR SER ALA LYS VAL...
AGACCTTGATGTGACCTCTGCGAAAGT... 850
... 860

... SER ASP LYS LEU SER ILE GLY LYS ASP THR ASN
...GAGTGATAAGTTGTCTATTGGTAAAGATACGAA 900
... 870 880 890

LYS VAL ASP ILE THR SER ASP ALA ASN...
TAAAGTTGATATTACCAAGTGCGCAA... 910
... 920

... GLY LEU LYS LEU ALA LYS THR GLY ASN GLY ASN
...TGGCTTGAAATTGGCGAAACACAGGTAAACGGAAA 960
... 930 940 950

GLY GLN ASN GLY ASN VAL HIS LEU ASN...
TGGTCAAAACGGTAATGTCCACTTAA... 970
... 980

... GLY ILE ALA SER THR LEU THR ASP THR ILE THR
...TGGTATTGCTTCGACTTGGACCGATACCATTAC 1020
... 990 1000 1010

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23F

```

      GLY MET THR THR GLN ALA SER ASN GLY...
      AGGTATGACACACAAAGCAATGG ...
      1030
      ... VAL ALA VAL GLN ASN HIS ASN ARG ALA ALA SER
      ...CGTGGCTGTCAGAAATCATAATCGTGCGGAG
      ... 1050 1060 1070 1080
      VAL ALA ASP VAL LEU ASN ALA GLY TRP...
      TGTGGCTGATGTATTAAATGCAGGCTG ...
      1090
      ... ASN ILE GLN GLY ASN GLY ALA SER VAL ASP PHE
      ...GAATATTCAAGGCAACGGAGCGGCGTTGATT
      ... 1110 1120 1130 1140
      VAL ASN ALA TYR ASP THR VAL ASP PHE...
      TGTCAATGCTTACGACACACAGTAGATT ...
      1150
      ... VAL ASN GLY THR ASN THR ASN VAL ASN VAL THR
      ...TGTCAATGGTACAAACACCAATGTGAACGTTAC
      ... 1170 1180 1190 1200
      THR ASP THR ALA HIS LYS LYS THR THR...
      GACTGATACGGCTCACAAAGACCAAC ...
      1210 1220

```

103/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23G

... VAL ARG VAL ASP VAL THR GLY LEU PRO VAL GLN
...CGTCCGTGTGGATGTAAACAGGCTTGCCGGTTCA 1260
... 1230 1240 1250

THR VAL THR GLU ASP GLY LYS THR VAL...
ATATGTTACGGGAGACGGCAAAACCGT... 1270
... 1280 ...
... VAL LYS VAL ASP ASN LYS TYR TYR GLU ALA LYS
...TGTGAAAGTGGACAATAAGTATTACGAAAGCTAA 1320
... 1290 1300 1310 1320

GLN ASP GLY SER ALA ASP MET ASP LYS...
GCAAGACCGGTCGGCGGATATGGATAA... 1330
... 1340 ...
... LYS VAL GLU ASN GLY GLU LEU ALA LYS THR LYS
...AAAGTCGAAATGGCGAGCTGGCGAAACCAA 1380
... 1350 1360 1370

VAL LYS LEU VAL SER ALA SER GLY GLN...
AGTGAAATTTGGTGTCTGGGCAAGCGGTCA... 1390
... 1400 ...
... ASN PRO VAL LYS ILE SER ASN VAL ALA GLU GLY
...AATCCGGTGAAATCAGCAATGTTGCGGAAGG 1440
... 1410 1420 1430 1440

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23H

```
THR GLU GLU ASN ASP ALA VAL SER PHE...
CACGGAAGAAACGATGCGGTCAGCTT ...
1450
... LYS GLN LEU LYS ALA LEU GLN GLU LYS GLN VAL
...TAAAGCAATTGAAGCCCTTGCAAGAGAAACAGGT
... 1470 1480 1490 1500

105/204
THR LEU THR ALA SER ASN ALA TYR ALA...
TACTTTAACTGCGAGCAATGCTTATGC...
1510
... ASN GLY GLY ASN ASP ALA ASP GLY GLY LYS ALA
...CAATGGTGTTAACGATGCCGACGGCGGCAAGGC
... 1530 1540 1550 1560

THR GLN THR LEU ASN ASN GLY LEU ASN...
AACTCAAACTTTAAACAATGGTTTGAA...
1570
... PHE LYS PHE LYS SER THR ASP GLY GLU LEU LEU
...TTTAAATTTAAATCCACAGACGGCGAGTTGTT
... 1590 1600 1610 1620

ASN ILE LYS VAL GLU ASN ASP THR VAL...
GAACATCAAGTAGAAATGACACAGT...
1630 1640
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23I

... THR PHE THR PRO LYS LYS GLY SER VAL GLN VAL
...TACCTTTACGCCCGAAAAAGGTCGGTACAGGT 1680
... 1650 1660 1670

GLY GLU ASP GLY LYS ALA THR ILE GLN...
TGGCGAAGACGGTAAGGCTACGATTCA ... 1690
... 1700

... ASN GLY THR LYS THR THR ASP GLY LEU VAL GLU
...AAATGGTACGAAAAACAACCGACGGTTGGTTGA 1740
... 1710 1720 1730

ALA SER GLU LEU VAL GLU SER LEU ASN...
AGCTTCCGAATTGGTTGAAAGCCTGAA ... 1750
... 1760

... LYS LEU GLY TRP LYS VAL GLY VAL ASP LYS ASP
...CAAACTGGGCTGGAAAGTGGGCGTTGATAAAGA 1800
... 1770 1780 1790

GLY SER GLY GLU LEU ASP GLY ALA SER...
CGGCAGCGCGAGCTTGATGGTGCATC ... 1810
... 1820

... ASN GLU THR LEU VAL LYS SER GLY ASP LYS VAL
...CAATGAACCTTTAGTGAAGTCGGGCGATAAAGT 1860
... 1830 1840 1850

106/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23J

```

    THR LEU LYS ALA GLY LEU ASN LEU LYS...
    AACTTTGAAAGCCGCGAGAACTGAA...
    1870
    ... VAL LYS GIN ASP GLY THR ASN PHE THR TYR ALA
    ...GGTCAAACAAGACGCGCAACAACCTTCACTTACGC
    ... 1890
    ... 1900
    LEU LYS ASP GLU LEU THR GLY VAL LYS...
    GCTCAAAGATGAATTGACGCGCGTGAA...
    1930
    ... SER VAL GLU PHE LYS ASP THR ALA ASN GLY SER
    ...GAGCGTGGAGTTTAAAGACACGCGCAATGGTTC
    ... 1950
    ... 1960
    ... 1970
    ... 1980
    ASN GLY ALA SER THR LYS ILE THR LYS...
    AACGGTGCAAGCACGAAGATTACCAA...
    1990
    ... ASP GLY LEU THR ILE THR SER ALA ASN GLY ALA
    ...AGACGGCTTGACCATTAACGTCGCGCAACGGTGC
    ... 2010
    ... 2020
    ... 2030
    ... 2040
    ASN GLY ALA ALA ALA THR ASP ALA ASP...
    GATGGTGCGGCGCGCACTGATGCGGA...
    2050
    ...

```

107/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23K

... LYS ILE LYS VAL ALA SER ASP GLY ILE SER ALA
...CAAAGATTAAAGTGGCTTCAGACGGCATCAGTGC 2100
... 2070 2080 2090

GLY ASN LYS ALA VAL LYS ASN VAL VAL...
GGGTAATAAAGCGGTTTAAACGTTGT... 2110
... 2120

... SER GLY LEU LYS LYS PHE GLY ASP ALA ASN PHE
...GAGCGGACTGAAGAAATTGGTGATGCGAATTT 2160
... 2130 2140 2150

ASN PRO LEU THR SER SER ALA ASP ASN...
CAATCCACTGACCCAGTTCCGCCGACAA... 2170
... 2180

... LEU THR LYS GLN TYR ASP ASP ALA TYR LYS GLY
...CTTAACGAACAATATGACGATGCCCTATAAAGG 2220
... 2190 2200

LEU THR ASN LEU ASP GLU LYS GLY ALA...
CTTGACCAATTTGGATGAATAAGGTGC... 2230
... 2240

... ASP LYS GLN THR LEU THR VAL ALA ASP ASN THR
...GGACAAGCAAACTCTGACTGTGCCCCACAATAC 2280
... 2250 2260 2270

108/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23L

ALA ALA THR VAL GLY ASP LEU ARG GLY...
TGCCGCAACCGTGGCGGATTGCGGG...
2290
... LEU GLY TRP VAL ILE SER ALA ASP LYS THR THR
...CTTGGGCTGGGTCAATTCTGCGGACAAACCAC
... 2310 2320 2330 2340

GLY GLU LEU ASN LYS GLU TYR ASN ALA...
AGCGCAACTCAATAAGGAATACACGC...
2350
... GIN VAL ARG ASN ALA ASN GLU VAL LYS PHE LYS
...GCAAGTGCCTAACGCCAATGAAGTGAATTCAA
... 2370 2380 2390 2400

SER GLY ASN GLY ILE HIS VAL SER GLY...
GAGCGCAACGGTATCCATGTTTCGG...
2410
... LYS THR VAL ASN GLY ARG ARG GLU ILE THR PHE
...TAAACCGGTCAACGGTAGCGCGGAAATTACTTT
... 2430 2440 2450 2460

GLU LEU ALA LYS ASP GLU ASN ALA ILE...
TGAATTGGCTAAAGACGAAATGCCAT...
2470 2480

109/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23M

... ALA PHE GLY TYR GLY SER LYS ALA LEU ARG ASP
...TGCTTTCGGTTATGGCTCAAAAGCCCTTGCGCGA 2510 2520
... 2490 2500

ASN THR VAL ALA ILE GLY THR GLY ASN...
TAACACGGTGGCAATTGGGTACGGGCAA... 2530
... VAL VAL ASN ALA GLU LYS SER GLY ALA PHE GLY
...CGTTGTGAATGCGGAAATACTGGTGCAATTCGG 2560 2570 2580
... 2550 2560

ASP PRO ASN TYR ILE GLU ASP LYS ALA...
CGATCCGAACTACATCGAAGATAAGC... 2590
... GLY GLY SER TYR ALA PHE GLY ASN ASP ASN ARG
...CGGTGGCAGCTACGCTTTCGGTAACGATAACCG 2620 2630 2640
... 2610 2620

ILE THR SER LYS ASN THR PHE VAL LEU...
TATTACTTCTAAACACACTTTTGTGTT... 2650
... GLY ASN GLY VAL ASN ALA LYS TYR LYS ALA ASN
...GGGTAATGGAGTTAATGCGGAAATATAAGCCAA 2680 2690 2700
... 2670 2680

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.23N

GLY ASP VAL ASP THR GLU THR VAL THR...
 TGGAGATGTTGATACGGAAACCGTAAC...
 ...
 ... VAL LYS ASP LYS ASP GLY LYS GLU THR THR VAL
 ...CGTTAAGGACAAAGACGGTAAAGAGACTACCGT 2760
 ... 2730 2740 2750
 ...
 THR VAL PRO LYS ALA LEU GLY ALA THR...
 TACTGTTCTTAAAGCGTTAGGGGCTAC...
 ...
 ... VAL GLU ASN SER VAL THR LEU GLY ASN LYS SER
 ...GGTTGAAAACTCCGTTTATTGGGTAATAATC 2820
 ... 2780 2800 2810
 ...
 THR ALA THR LYS ASP LYS GLY LYS ASN...
 GACTGCCGACAAAGATAGGGTAAAA...
 ...
 ... LEU LYS SER ASP GLY THR ALA GLY ASN THR THR
 ...CCTGAAATCTGATGGTACGGGGTAACTACTC 2880
 ... 2840 2860 2870
 ...
 THR ALA GLY THR THR GLY THR VAL ASN...
 AACTGCTGGCACAAACGGGTACGGTAA...
 ... 2890 2900
 ...

111/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.230

... GLY HIE ALA GLY ALA THR ALA HIS GLY ALA VAL
...CGGCTTTGCCGGTGCACGGCGCACGGTGGGT
... 2910 2920 2930 2940

SER VAL GLY ALA SER GLY GLU ARG...
TTCTGTGGCGCAAGCGGCGAAGAAAG...
... 2950 2960 ...

... ARG ILE GEN ASN VAL ALA ALA GLY GLU ILE SER
...ACGTATCCAAACGTCGCGGCGAGCGAAATTTC
... 2970 2980 2990 3000

ALA THR SER THR ASP ALA ILE ASN GLY...
CGCCACTTCCACCGATGCGATTACGG...
... 3010 3020 ...

... SER GEN LEU TYR ALA VAL ALA LYS GLY VAL THR
...CAGCCAGTTGTATGCTGTGGCAAAAGGGGTAAAC
... 3030 3040 3050 3060

ASN LEU ALA GLY GEN VAL ASN LYS VAL...
AAATCTTGCTGGACAAAGTGAATAAGT...
... 3070 3080 ...

... GLY LYS ARG ALA ASP ALA GLY THR ALA SER ALA
...GGGCAAACGTGCAGATGTCAGGTACAGCAAGTGC
... 3090 3100 3110 3120

112/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

113/204

FIG.23P

```
LEU ALA ALA SER GLN LEU PRO GLN ALA...
ATTAGCAGCTTCACAGTTACCAACAGC ...
3130
...SER MET PRO GLY LYS SER MET VAL SER ILE ALA
...CTCTATGCCAGGTAAATCAATGGTTTCTATTGTC
... 3150 3160 3170 3180

GLY SER SER TYR GLN GLY GLN ASN GLY...
GGGAAGTAGTTATCAAGGTCAAAATGG ...
3190 3200
...LEU ALA ILE GLY VAL SER ARG ILE SER ASP ASN
...TTTAGCTATCGGGGTATCAAGAAATTCGGATAA
... 3210 3220 3230 3240

GLY LYS VAL ILE ILE ARG LEU SER GLY...
TGGCAAAGTGATTATTTCGCTTGTCAGG ...
3250 3260
...THR THR ASN SER GLN GLY LYS THR GLY VAL ALA
...CACAAACCAATAGCCCAAGGTAAACAGGCGTTGC
... 3270 3280 3290 3300

ALA GLY VAL GLY TYR GLN TRP ***
AGCAGGTGTTGGTTACCAAGTGGTAATA ...
3310 3320
...GAATTGATCCGC
... 3330
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG.24A

H. influenzae type c strain API *hia* sequence

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

```

MET ASN LYS ILE PHE ASN VAL ILE TRP ASN ...
ATGAACAATAATTTTAACGTTATTGGAAAT...
10          20          30...
... VAL MET THR GLN THR TRP VAL VAL VAL SER
... GTTATGACTCAAACTTGGGTTGTCGTATCT
...          40          50          60

GLU LEU THR ARG THR HIS THR LYS ARG ALA ...
GACTCCTCGCACCCACACCAACGCGCC...
70          80          90...
... SER ALA THR VAL GLU THR ALA VAL LEU ALA
... TCCGCAACCGTGAGAGACCGCGTATTGGCG
...          100         110         120
114/204

THR LEU LEU PHE ALA THR VAL GLN ALA ASN ...
ACACTGTTGTTGCCAACGGTTCAGGCCGAAT...
130         140         150...
... ALA THR ASP GLU ASP GLU GLU LEU ASP PRO
... GCTACCGATGAAGATGAGAGTTAGACCCC
...          160         170         180

VAL VAL ARG THR ALA PRO VAL LEU SER PHE ...
GTAGTACGCACCTGCTCCCGTGTGAGCTTC...
190         200         210...

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

PCT/CA00/00289

FIG. 24B

115/204

```
... HIS SER ASP LYS GLU GLY THR GLY LYS  
... CATCCGATAAGAAAGCACGGGAGAAAAA  
...  
230  
  
GLU VAL THR GLU ASN SER ASN TRP GLY ILE ...  
GAAGTTACAGAAAAATTGGGGGAATA...  
270...  
250  
... THR PHE HIS ASN LYS GLY VAL LEU LYS ALA  
... TATTTCCACAATAAAGGAGTACTAAAGGCC  
300  
...  
280  
  
GLY ALA ILE THR LEU LYS ALA GLY ASP ASN ...  
GGAGCAATCACCCTCAAAGCGCGGCACAA...  
330...  
310  
... LEU LYS ILE LYS GIN SER THR ASN ALA SER  
... CTGAAAATCAAAACAAGCACCAATGCCAGT  
360  
...  
340  
  
SER PHE THR TRP SER LEU LYS LYS ASP LEU ...  
AGCTTCACCTACTCGCTGAAAAAAGACCTC...  
390...  
370  
... THR ASP LEU THR SER VAL ALA THR GLU LYS  
... ACAGATCTGACCAGTGTTGCACTGAAAAA  
420  
...  
400
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24C

```

LEU SER PHE GLY ALA ASN GLY ASP LYS VAL ...
TTATCGGTTTGGCGCAACGGCGGATAAGTT...
430
... ASP ILE THR SER ASP ALA ASN GLY LEU LYS
... GATATTACCAGTGATGCAAAATGGCTTGAAA
440
...
450
...
460
...
470
...
480
...
490
LEU ALA LYS THR GLY ASN GLY ASN VAL HIS ...
TTGGCGGAAACAAGGTACGGGAAATGTTTCAT...
500
... LEU ASN GLY LEU ASP SER THR LEU PRO ASP
... TTGAATGGTTTGGATTTCACCTTGCCTGAT
510
...
520
...
530
...
540
...
550
ALA VAL THR ASN THR GLY VAL LEU SER ...
GCGGTACGGAATACAGGTGTGTTAAGTTCA...
560
... SER SER PHE THR PRO ASN ASP VAL GLU LYS
... TCAAGTTTTCACACCTAATGATGTTGAAAAA
570
...
580
...
590
...
600
...
610
THR ARG ALA ALA THR VAL LYS ASP VAL LEU ...
ACAAGAGCTGCCAACCTGTTAAAGATGTTTAA...
620
...
630
...

```

116/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24D

```

... ASN ALA GLY TRP ASN ILE LYS GLY ALA LYS 660
... AATGCAGGTTGGAACATTATAAGGTGCTAAA 650
...
640
THR ALA GLY GLY ASN VAL GLU SER VAL ASP ...
ACTGCTGGAGGTAATGTTGAGAGTGTGAT...
680
... LEU VAL SER ALA TYR ASN ASN VAL GLU PHE 690...
... TTAGTGTCCTCGCTTATAATAATGTTGAATTT 700
... 710
117/204
ILE THR GLY ASP LYS ASN THR LEU ASP VAL ...
ATTACAGGCGATAAAACACGCTTGATGTT...
730
... VAL LEU THR ALA LYS GLU ASN GLY LYS THR 740
... GTATTACAGCTAAAGAAACCGGTAAACA 750...
... 760
770
THR GLU VAL LYS PHE THR PRO LYS THR SER ...
ACCGAAGTGGAATTCCACACCGAAACCTCT...
790
... VAL ILE LYS GLU LYS ASP GLY LYS LEU PHE 800
... GTATCAAGAAAGACGGTAAGTTATTT 810...
... 820
830
840

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24E

118/204

```
THR GLY LYS GLU ASN ASN ASP THR ASN LYS ...
ACTGGAAAGAGAGAAATAACGACACAAATAAA...
850
... VAL THR SER ASN THR ALA THR ASP ASN THR
... GTTACAAGTAAACACGCGGACTGATAATACCA
860
... 880
... 890
... 900

ASP GLU GLY ASN GLY LEU VAL THR ALA LYS ...
GATGAGGGTAATGGCTTTAGTCACTGCAAAA...
910
... ALA VAL ILE ASP ALA VAL ASN LYS ALA GLY
... GCTGTGATTGATGCTGTGAACAAGGCTGGT
920
... 940
... 950
... 960

TRP ARG VAL LYS THR THR THR ALA ASN GLY ...
TGGAGAGTTAAACAACAATACTACTGCTAATGGT...
970
... GLN ASN GLY ASP PHE ALA THR VAL ALA SER
... CAAAATGGCGACTTCGCAACTGTTGCCGTC A
980
... 1000
... 1010
... 1020

GLY THR ASN VAL THR PHE GLU SER GLY ASP ...
GGCACAAATGTACCTTTGAAAAGTGGCGAT...
1030
... 1040
... 1050...
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24F

... GLY THR THR ALA SER VAL THR LYS ASP THR 1080
... GGTACAACAGCGTCACTAATAAGATACT 1070
... 1060
ASN GLY ASN GLY ILE THR VAL LYS THR ASP ...
ACGGCAATGGCATCACTGTTAAGTACGAC... 1100
... 1110...
... ALA LYS VAL GLY ASP GLY LEU LYS PHE ASP 1140
... GCGAAAGTTGGCGACGGCTTGAAATTTGAT 1130
... 1120
... 119/204
SER ASP LYS LYS ILE VAL ALA ASP THR ...
AGCGATAAATAAATCGTTGCAGATACGACC... 1170...
... 1160
... ALA LEU THR VAL THR GLY LYS VAL ALA 1200
... GCACTTACTGTGACAGGTGGTAAGGTAGCT 1190
... 1180
GLU ILE ALA LYS GLU ASP LYS LYS ...
GAAATTGCTAAGAGAGATGACAAAGAAA... 1230...
... 1220
... LEU VAL ASN ALA GLY ASP LEU VAL THR ALA 1260
... CTGTGTTAATGCGCGCGATTTGGTAACAGCT... 1250
... 1240

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24G

LEU GLY ASN LEU SER TRP LYS ALA LYS ALA ...
TTAGGTAATCTAAGTTGGAAAGCAAAAGCT...
1270 1280 1290...
... GLU ALA ASP THR ASP THR ASP GLY ALA LEU
... GAGGCTGATCTACTGATGATGGTGGCTT
... 1300 1310 1320

120/204

GLU GLY ILE SER LYS ASP GIN GLU VAL LYS ...
GAGGGATTTCAAAAGACCAGAAAGTCAAA...
1330 1340 1350...
... ALA GLY GLU THR VAL THR PHE LYS ALA GLY
... GCAGGCGAAACGGTACCCTTTAAAGCGGGC
... 1360 1370 1380

LYS ASN LEU LYS VAL LYS GIN ASP GLY ALA ...
AAGAACTTAAAGTGAAACAGGATGGTGCG...
1390 1400 1410...
... ASN PHE THR TYR SER LEU GIN ASP ALA LEU
... AACTTACTTATTCACCTGCAAGATGCTTTA
... 1420 1430 1440

THR GLY LEU THR SER ILE THR LEU GLY ...
ACGGGTTTAACGAGCATTACTTTAGGTGGT...
1450 1460 1470...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24H

```
... THR THR ASN GLY GLY ASN ASP ALA LYS THR 1480 1490 1500
... ACAACTAATGGCGGAATGATGCGAAAACC
...
VAL ILE ASN LYS ASP GLY LEU THR ILE THR ...
GTCATCAACAAGACGGTTTAACCATCACG...
1510 1520 1530...
... PRO ALA GLY ASN GLY THR THR GLY THR
... CCAGCAGGTAATGGCGGTACGACAGGTACA 1540 1550 1560
...
ASN THR ILE SER VAL THR LYS ASP GLY ILE ...
AACACCATCAGCGTAACCAAGATGGCAT...
1570 1580 1590...
... LYS ALA GLY ASN LYS ALA ILE THR ASN VAL
... AAGCAGGTAATAAGCTATTACTAATGTT 1600 1610 1620
...
ALA SER GLY LEU ARG ALA TYR ASP ASP ALA ...
GCGAGTGGTTTAAGAGCTTATGACGATGCG...
1630 1640 1650...
... ASN PHE ASP VAL LEU ASN ASN SER ALA THR
... AATTTTGATGTTTAAATAACTCTGCAACT 1660 1670 1680
...
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24I

```
ASP LEU ASN ARG HIS VAL GLU ASP ALA THR ...  
GATTTAATAGACACGTTGAAGATGCTTAT...  
1690 ... LYS GLY LEU LEU ASN LEU ASN GLU LYS ASN  
... AAAGGTTTATTAAATCTAAATGAAAAAAT 1740  
... 1720  
  
ALA ASN LYS GIN PRO LEU VAL THR ASP SER ...  
GCAATAAACACCGTTGGTGACTGACAGC...  
1750 ... THR ALA THR VAL GLY ASP LEU ARG LYS  
... ACGCGGCGACTGTAGGCGATTACGTAA 1800  
... 1780  
  
LEU GLY TRP VAL VAL SER THR LYS ASN GLY ...  
TTGGGTTGGGTAGTATCAACCAAAACGGT...  
1810 ... THR LYS GLU GLU SER ASN GIN VAL LYS GIN  
... ACGAAAGAGAGAAAGCAATCAAGTTAAACA 1860  
... 1840  
  
ALA ASP GLU VAL LEU PHE THR GLY ALA GLY ...  
GCTGATGAGTCCTCTTTACCGGAGCCGGT...  
1870 ... 1890
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24J

... ALA THR VAL THR SER LYS SER GLU ASN
... GCTGCTACGGTTACTTCCAAATCTGAAAC
... 1900 1910 1920

GLY LYS HIS THR ILE THR VAL SER VAL ALA ...
GGTAAACATACGATTACCGTTAGTGGCT...
... 1930 1940 1950...

... GLU THR LYS ALA ASP SER GLY LEU GLU LYS
... GAAACTAAAGCGGATAGCGGCTCTTGAAAAA
... 1960 1970 1980

ASP GLY ASP THR ILE LYS LEU LYS VAL ASP ...
GATGGCGATACCTATTAAAGCTCAAAGTGGAT...
... 1990 2000 2010...

... ASN GLN ASN THR ASP ASN VAL LEU THR VAL
... AATCAAAACACTGATATGTTTAACTGTT
... 2020 2030 2040

GLY ASN ASN GLY THR ALA VAL THR LYS GLY ...
GGTAATAATGGTACTGCTGTCTACTAAAGGT...
... 2050 2060 2070...

... GLY PHE GLU THR VAL LYS THR GLY ALA THR
... GGCTTTGAAACTGTTAAACTGGAGCGGACT
... 2080 2090 2100

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24K

```
ASP ALA ASP ARG GLY LYS VAL THR VAL LYS ...  
GATGCAAGATCGCGGTAAAGTAACTGTAA...  
2110 ...  
... ASP ALA THR ALA ASN ASP ALA ASP LYS LYS  
... GATGCTACTGCTAATGACGCTGATAAGAAA  
... 2140 2150 2160  
  
VAL ALA THR VAL LYS ASP VAL ALA THR ALA ...  
GTCCCAACTGTAAAGATGTTGCCAACCACA...  
2170 ...  
... ILE ASN SER ALA ALA THR PHE VAL LYS THR  
... ATTATAGTGCGCGGACTTTGTGAAAACAAA  
... 2200 2210 2220  
  
GLU ASN LEU THR THR SER ILE ASP GLU ASP ...  
GAGAAATTAACTACCTCTCTATTGTGAAGAT...  
2230 ...  
... ASN PRO THR ASP ASN GLY LYS ASP ASP ALA  
... AATCCTACAGATAACGGCAAAAGATGACGCA  
... 2260 2270 2280  
  
LEU LYS ALA GLY ASP THR LEU THR PHE LYS ...  
CTTAAAGCGGCGGATACCTTAACCTTTTAA...  
2290 ...  
... 2300 2310
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24L

... ALA GLY LYS ASN LEU LYS VAL LYS ARG ASP
... GCAGGTAAACCTGAAAGTTAAACGTGAT 2340
... 2320 2330

GLY LYS ASN ILE THR PHE ASP LEU ALA LYS ...
GGAAAAAATATTACTTTTGACTTGGCGAAA... 2350
... 2360 2370...
... ASN LEU GLU VAL LYS THR ALA LYS VAL SER
... AACCTTGAGGTGAAACTGCCGAAAGTGAGT 2400
... 2380 2390

ASP THR LEU THR ILE GLY GLY ASN THR PRO ...
GATACTTTAACGATTGGCGGGAATACACCT... 2410
... 2420 2430...
... THR GLY GLY THR THR ALA THR PRO LYS VAL
... ACAGGTGGCACTACTGCCGACGCCAAAGTG 2460
... 2440 2450

ASN ILE THR SER THR ALA ASP GLY LEU ASN ...
AATATTACTAGCACGGCTGATGGTTTGAAAT... 2470
... 2480 2490...
... PHE ALA LYS GLU THR ALA ASP ALA SER GLY
... TTGCAAAAGAAACAGCCGATGCCCTCGGGT 2520
... 2500 2510

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24M

SER LYS ASN VAL TYR LEU LYS GLY ILE ALA ...
TCTAAGAAATGTTTATTGAAAGGTATTGCG...
2530 2540 2550...
... THR THR LEU THR GLU PRO SER ALA GLY ALA
... ACAACTTTAACTGAGCCCAAGCGGGGAGCG
... 2560 2570 2580

LYS SER SER HIS VAL ASP LEU ASN VAL ASP ...
AAGTCTTCACACGTTTGATTTTAAATGTGGAT...
2590 2600 2610...
... ALA THR LYS LYS SER ASN ALA ALA SER ILE
... GCGACGAAATAATCCAAATGCCAGCAAGTATT
... 2620 2630 2640

GLU ASP VAL LEU ARG ALA GLY TRP ASN ILE ...
GAAGATGTATTGCGCGCAGGTTGGAAATATT...
2650 2660 2670...
... GLN GLY ASN GLY ASN ASN VAL ASP TYR VAL
... CAGGTAATGGTAATAATGTGTGATTATGTA
... 2680 2690 2700

ALA THR TYR ASP THR VAL ASN PHE THR ASP ...
GCGACGTATGACACACAGTAACCTTTACCGAT...
2710 2720 2730...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24N

... ASP SER THR GLY THR THR THR VAL THR VAL
... GACAGCACAGGTACACACACGGTAACCGTA 2760
... 2740 2750

THR GLN LYS ALA ASP GLY LYS GLY ALA ASP ...
ACCCAAAGCAGATGGCAAGGTGCTGAC... 2770
... VAL LYS ILE GLY ALA LYS THR SER VAL ILE
... GTTAAATCGGTGCGAAACTCTGTATC 2820
... 2800 2810

LYS ASP HIS ASN GLY LYS LEU PHE THR GLY ...
AAGACCACACGGCAAACTGTTTACAGGC... 2830
... LYS ASP LEU LYS ASP ALA ASN ASN GLY ALA
... AAGACCTGAAAGATGCGAATAATGGTGCA 2880
... 2860 2870

THR VAL SER GLU ASP GLY LYS ASP THR ...
ACCGTAGTGAAGATGATGGCAAGACACC... 2890
... GLY THR GLY LEU VAL THR ALA LYS THR VAL
... GGCACAGGCTTAGTTACTGCAAAAACCTGTG 2940
... 2920 2930

127/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.240

ILE ASP ALA VAL ASN LYS SER GLY TRP ARG ...
ATTGATGCAGTAAATAAAGCGGTTGGAGG...
2950
... VAL THR GLU GLY ALA THR ALA GLU THR
2960
... GTAACCGGTGAGGCGGCGACTGCCGAACC
2980
...
GLY ALA THR ALA VAL ASN ALA GLY ASN ALA ...
GGTGCAACCGCGTGGAATGCGGGTACGCT...
3010
... GLU THR VAL THR SER GLY THR SER VAL ASN
3020
... GAACCGTTACATCAGGCACGAGCGTGAAC
3040
...
PHE LYS ASN GLY ASN ALA THR ALA THR ...
TTCAAACAACGGCAATGCGGACCAACGCGACC...
3070
... VAL SER LYS ASP ASN GLY ASN ILE ASN VAL
3080
... GTAAAGCAAGATAATGGCAACATCAATGTC
3100
...
LYS TYR ASP VAL ASN VAL GLY ASP GLY LEU ...
AAATACGATGTAAATGTTGGTGACGGCCTG...
3130
3140
3150...

128/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24P

... LYS ILE GLY ASP ASP LYS LYS ILE VAL ALA
... AAGATTGGCGATGACAAAAATCGTTGCA 3180
... 3160 3170

ASP THR THR THR LEU THR VAL THR GLY ...
GACACGACCACTTACTGTAAACAGGTGGT... 3200
... LYS VAL SER VAL PRO ALA GLY ALA ASN SER
... AAGTGCTCTGTTCCCTGCTGGTGCTAATAGT 3240
... 3220 3230

VAL ASN ASN ASN LYS LYS LEU VAL ASN ALA ...
GTTAATAACAATAAGAACTTGTAAATGCA... 3260
... GLU GLY LEU ALA THR ALA LEU ASN ASN LEU
... GAGGGTTTAGCGACTGCTTTAAACAACCTA 3300
... 3280 3290

SER TRP THR ALA LYS ALA ASP LYS TYR ALA ...
AGCTGGACGGCAAAAGCCGATAAATATGCA... 3320
... ASP GLY GLU SER GLU GLY GLU THR ASP GLN
... GATGGCGAGTCAGAGGGCGAAACCGACCAA 3360
... 3340 3350

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24Q

GLU VAL LYS ALA GLY ASP LYS VAL THR PHE ...
GAAGTCAAGCAGGCGACAAAGTAACCTT...
3370 ... LYS ALA GLY LYS ASN LEU LYS VAL LYS GIN
... AAAGCAGGCAAGAACTTAAAGTGAAACAG
... 3400 3410 3420

SER GLU LYS ASP PHE THR TYR SER LEU GIN ...
TCTGAAATAAGACTTTACTTTATTCACCTGCAA...
3430 ... ASP THR LEU THR GLY LEU THR SER ILE THR
... GACACTTTAACAGGCTTACGAGCATTTACT
... 3460 3470 3480

LEU GLY GLY THR ALA ASN GLY ARG ASN ASP ...
TTAGGTGGTACAGCTAATGGCAGAAATGAT...
3490 ... THR GLY THR VAL ILE ASN LYS ASP GLY LEU
... ACGGGAACCGTCATCAACAAGACGGCTTA
... 3520 3530 3540

THR ILE THR LEU ALA ASN GLY ALA ALA ...
ACCATCAGCTGGCAATAATGGTGCTGGGCA...
3550 3560 3570...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24R

... GLY THR ASP ALA SER ASN GLY ASN THR ILE
 ... GGCACAGATGCGTCTTACGGAAACACCATC
 ... 3580 3590 3600

 SER VAL THR LYS ASP GLY ILE SER ALA GLY ...
 AGTGTAAACCAAGACGGCATTAGTGGGGT...
 3620 3630...
 ... ASN LYS GLU ILE THR ASN VAL LYS SER ALA
 ... AATAAGAAATTACCAATGTTAAGAGTGCT
 ... 3640 3650 3660

 LEU LYS THR TYR LYS ASP THR GLN ASN THR ...
 TTAAAAACCTATAAAGATACTCAAAACACT...
 3670 3680 3690...
 ... ALA GLY ALA THR GLN PRO ALA ALA ASN THR
 ... GCAGGTGCAACTCAACCTGCGGCTAATACA
 ... 3700 3710 3720

 ALA GLU VAL ALA LYS GLN ASP LEU VAL ASP ...
 GCTGAAGTAGCCAAACAAGACTTTGGTTGAT...
 3730 3740 3750...
 ... LEU THR LYS PRO ALA THR GLY ALA ALA GLY
 ... TTAACCTAACCTGCGACACAGGTGCGCTGGA
 ... 3760 3770 3780

131/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24S

ASN GLY ALA ASP ALA LYS ALA PRO ASP THR ...
AATGGTGCAGATGCAAAAGCTCCCGATACC... 3800
... THR ALA ALA THR VAL GLY ASP LEU ARG GLY 3810...
... ACAGCTGCAACCGTAGGCGACTTGCGTGGT 3820
... 3830 3840

LEU GLY TRP VAL LEU SER ALA LYS LYS THR ...
TTGGGCTGGGTGCTTTTCAGCTAAGAAACT... 3850
... ALA ASP GLU THR GLN ASP LYS GLU PHE HIS 3860
... GCAGATGAACAACACAGATAAAGAGTTCCAC 3870...
... 3880 3890 3900

ALA ALA VAL LYS ASN ALA ASN GLU VAL GLU ...
GCCGCCGTTAAACACGCAAAATGAAGTTGAG... 3910
... PHE VAL GLY LYS ASN GLY ALA THR VAL SER 3920
... TTCGTGGGTAAACACGGTGCAACCGTGTCCT 3930
... 3940 3950 3960

ALA LYS THR ASP ASN ASN GLY LYS HIS THR ...
GCAAAACCTGATAACAAACGGAAACATACT... 3970
... 3980 3990

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24T

... VAL THR ILE ASP VAL ALA GLU ALA LYS VAL
... GTAACGATTGATGTTGCCAGAACCCAAAGTTT 4020
... 4000

GLY ASP GLY LEU GLU LYS ASP THR ASP GLY ...
GGTGATGGTCTTGAAAGAGATACTGACGGC... 4040
... 4030

... LYS ILE LYS LEU LYS VAL ASP ASN THR ASP
... AAGATTAAACTCAAGTAGATAATACAGAT 4080
... 4060

GLY ASN ASN LEU LEU THR VAL ASP ALA THR ...
GGGAATAATCTATTAAACCGTTGATGCAACA... 4100
... 4090

... LYS GLY ALA SER VAL ALA LYS GLY GLU PHE
... AAGGTGCATCCGTTGCCAAGGGCGAGTTT 4140
... 4120

ASN ALA VAL THR THR ASP ALA THR ALA ...
AATGCCGTAAACAACAGATGCCAAGTACAGCC... 4160
... 4150

... GIN GLY THR ASN ALA ASN GLU ARG GLY LYS
... CAGGCCACAATGCCAATGAGCGCGGTAAA 4200
... 4180

133/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24U

VAL VAL VAL LYS GLY SER ASN GLY ALA THR ...
GTGGTTGTCAAGGGTTCTCAATGGTGCAACT...
4220
... ALA THR GLU THR ASP LYS LYS VAL ALA
... GCTACCGAACTGACAGAAAGTGGCA 4260
... 4240

THR VAL GLY ASP VAL ALA LYS ALA ILE ASN ...
ACTGTTGGCGACGTTGCTAAAGCGATTAC...
4270
... ASP ALA ALA THR PHE VAL LYS VAL GLU ASN
... GACGCAACCTTCGTGAAAGTGGAAAT 4320
... 4300

ASP ASP SER ALA THR ILE ASP SER PRO ...
GACGACAGTGCTACGATTGATGATAGCCCA...
4330
... THR ASP GLY ALA ASN ASP ALA LEU LYS
... ACAGATGATGGCGCAATGATGCTCTCAA 4380
... 4360

ALA GLY ASP THR LEU THR LYS ALA GLY ...
GCAGGCGACACCTTGACCTTAAAGCGGGT...
4390
... 4400

134/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24V

... LYS ASN LEU LYS VAL LYS ARG ASP GLY LYS
... AAAA AACTTAAAGTTAAACGTTGATGGTAAA 4440
... 4420
ASN ILE THR PHE ALA LEU ALA ASN ASP LEU ...
AATATTACTTTTGGCCCTTGCGAACGACCTT...
4450 4460 4470...
... SER VAL LYS SER ALA THR VAL SER ASP LYS
... AGTGTA AAAAGCGCAACCGTTAGCGATAAA 4500
... 4480 4490
LEU SER LEU GLY THR ASN GLY ASN LYS VAL ...
TTATCGCTTGGTACAAACGGGCAATAAGTC... 4510
... 4520 4530...
... ASN ILE THR SER ASP THR LYS GLY LEU ASN
... AATATCACAAGCGCACCAAGGCTTGAAAC 4550
... 4540 4560
PHE ALA LYS ASP SER LYS THR GLY ASP ASP ...
TTCGCTAAAGATAGTAAGACAGCGGATGAT... 4580
4570 4590...
... ALA ASN ILE HIS LEU ASN GLY ILE ALA SER
... GCTAATAATTCACCTTAATAATGGCATTTGCTTCA 4620
... 4600 4610

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24W

```
THR LEU THR ASP THR LEU LEU ASN SER GLY ...  
ACTTTAACTGATACATTGTTAAATAGTGGT...  
4630 ... ALA THR THR ASN LEU GLY ASN GLY ILE  
... GCGACAACCAATTAGGTGGTAATGGTATT  
... 4660 4670 4680  
  
THR ASP ASN GLU LYS LYS ARG ALA ALA SER ...  
ACTGATAACGAGAAATAACGCGCGCGAGC...  
4690 ... VAL LYS ASP VAL LEU ASN ALA GLY TRP ASN  
... GTTAAAGATGCTTGAAATGCCGGGTGGAAAT  
... 4720 4730 4740  
  
VAL ARG GLY VAL LYS PRO ALA SER ALA ASN ...  
GTCGTGGTGTTAAACCGGCATCTGCAAT...  
4750 ... ASN GLN VAL GLU ASN ILE ASP PHE VAL ALA  
... ATCAAGTGGAGAAATATCGACTTTGTAGCCA  
... 4780 4790 4800  
  
THR TYR ASP THR VAL ASP PHE VAL SER GLY ...  
ACCTACGACACAGTGGACTTTGTTAGTGGAA...  
4810 4820 4830
```

136/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24X

... ASP LYS ASP THR THR SER VAL THR VAL GLU
... GATAAAGACACACCGAGTGTAAGTTGAA 4860
... 4840

SER LYS ASP ASN GLY LYS ARG THR GLU VAL ...
AGTAAAGATAATGGCAAGAGAACCGAAGTT... 4880
... 4870

... LYS ILE GLY ALA LYS THR SER VAL ILE LYS
... AAAATCGGTGCGAAGACTTCTGTATCAAA 4920
... 4900

ASP HIS ASN GLY LYS LEU PHE THR GLY LYS ...
GACCACAAACGGCAAACTGTTTACAGGCAAA... 4940
... 4930

... GLU LEU LYS ASP ALA ASN ASN ASN GLY VAL
... GAGCTGAAGGATGCTAACCAATAATGGCGTA 4980
... 4960

THR VAL THR GLU THR ASP GLY LYS ASP GLU ...
ACTGTTACCGAAACCGACGGCAAGACGAG... 5000
... 4990

... GLY ASN GLY LEU VAL THR ALA LYS ALA VAL
... GGTAATGGTTTAGTGACTGCCAAAAGCTGTG 5040
... 5020

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24Y

```
ILE ASP ALA VAL ASN LYS ALA GLY TRP ARG ...
ATTGATGCCCGTGAAATAAGGCTGGTTGGAGA...
5050
... VAL LYS THR THR GLY ALA ASN GLY GLN ASN
... GTTAAACCAACAGGTGCTAATGGTCAGAAAT
... 5080 5090 5100

ASP ASP PHE ALA THR VAL ALA SER GLY THR ...
GATGACTTCGCAACTGTTCGCTCAGGCACA...
5110
... ASN VAL THR PHE ALA ASP GLY ASN GLY THR
... ATGTAACTTTGCTGATGGTAATGGCACACA
... 5140 5150 5160

THR ALA GLU VAL THR LYS ALA ASN ASP GLY ...
ACTGCCGAAGTAACCTAAGCAAAACGACGGT...
5170
... SER ILE THR VAL LYS TYR ASN VAL LYS VAL
... AGTATTACTGTTAATAACAATGTTAAAGTG
... 5200 5210 5220

ALA ASP GLY LEU LYS LEU ASP GLY ASP LYS ...
GCTGATGGCTTAATAACTAGACGGCGGATAAA...
5230 5240 5250...
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24Z

... ILE VAL ALA ASP THR THR VAL LEU THR VAL
... ATCGTTGCAGACACGACCGTACTTACTGTG 5280
... 5260 5270

ALA ASP GLY LYS VAL THR ALA PRO ASN ASN ...
GCAGATGGGTAAGTTACAGCTCCGAATAAT... 5300
... 5290 5310...
... GLY ASP GLY LYS LYS PHE VAL ASP ALA SER
... GCGGATGGTAGAAATTGTGTGATGCAAGT 5340
... 5320 5330

GLY LEU ALA ASP ALA LEU ASN LYS LEU SER ...
GGTTTAGCGGATGCGTTAATAATAATTAAGC... 5360
... 5350 5370...
... TRP THR ALA THR ALA GLY LYS GLU GLY THR
... TGGACGGCAACTGCTGGTAAAGAGGCACT 5400
... 5380 5390

GLY GLU VAL ASP PRO ALA ASN SER ALA GLY ...
GGTGAGTTGATCCTGCAATAATTCAGCAGGG... 5420
... 5410 5430...
... GLN GLU VAL LYS ALA GLY ASP LYS VAL THR
... CAAGAGTCAAGCGGGCGACAAAGTAACC 5460
... 5440 5450

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24A'

PHE LYS ALA GLY ASP ASN LEU LYS ILE LYS ...
T T T A A G C C G G C G A C A A C C T G A A A A T C A A A ...
5470 5480 5490 ...
... GIN SER GLY LYS ASP PHE THR TYR SER LEU
... C A A G C G G C A A A G A C T T T A C C T A C T C G C T G
... 5500 5510 5520 ...

LYS LYS GLU LEU LYS ASP LEU THR SER VAL ...
A A A A A G A G C T G A A A G A C C T G A C C A G C G T A ...
5530 5540 5550 ...
... GLU PHE LYS ASP ALA ASN GLY GLY THR GLY
... G A G T T C A A G A G C G C A A C G G C G G T A C A G G C C
... 5560 5570 5580 ...

SER GLU SER THR LYS ILE THR LYS ASP GLY ...
A G T G A A G C A C C A G A G A T T A C C A A A G A C G G C ...
5590 5600 5610 ...
... LEU THR ILE THR PRO ALA ASN GLY ALA GLY
... T T G A C C A T T A C C C G G C A A C G G T G C G G T
... 5620 5630 5640 ...

ALA ALA GLY ALA ASN THR ALA ASN THR ILE ...
G C G G C A G G T G C A A A C A C T G C A A A C A C C A T T ...
5650 5660 5670 ...

140/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24B'

... SER VAL THR LYS ASP GLY ILE SER ALA GLY
 ... AGCGTAACCAAGATGGCATTAGCGCGGGT 5700
 ... 5680
 ASN LYS ALA VAL THR ASN VAL SER GLY ...
 AATAAGCAGTTACAACGTTGTGAGCGGA... 5710
 ... 5720
 ... LEU LYS LYS PHE GLY ASP GLY HIS THR LEU
 ... CTGAAGAAATTGGTGGTGCATACGTTG 5760
 ... 5740 5750
 ALA ASN GLY THR VAL ALA ASP PHE GLU LYS ...
 GCAATGGCACTGTTGCTGATTTTGAAAG... 5770
 ... 5780
 ... HIS TYR ASP ASN ALA TYR LYS ASP LEU THR
 ... CATTATGACAATGCCCTATAAGACTTTGACC 5820
 ... 5800
 ASN LEU ASP GLU LYS GLY ALA ASP ASN ASN ...
 AATTGGATGAATAAGCGCGCGGATAATAAT... 5830
 ... 5840
 ... PRO THR VAL ALA ASP ASN THR ALA ALA THR
 ... CCGACTGTTGCCGACCAATACCGCTGCAACC 5880
 ... 5860 5870

141/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24C'

VAL GLY ASP LEU ARG GLY LEU GLY TRP VAL ...
GTGGCGGATTTGGCGGCTTGGGCTGGGTC...
5890 ... ILE SER ALA ASP LYS THR THR GLY GLU PRO
... ATTTCTGCGGACAAACCAACCAAGCGGAACCC
... 5920 5930 5940

ASN GLN GLU TYR ASN ALA GLN VAL ARG ASN ...
AATCAGGAATACACGCGCAAGTGGTAC...
5950 ... ALA ASN GLU VAL LYS PHE LYS SER GLY ASN
... GCCAATGAAGTGAAATTCAAGAGCGGCAAC
... 5980 5990 6000

GLY ILE ASN VAL SER GLY LYS THR LEU ASN ...
GGTATCAATGTTTCCGGTAAACATTGAAC...
6010 ... GLY THR ARG VAL ILE THR PHE GLU LEU ALA
... GGTAACGCGGTGATTACCTTTGAATTGGCT
... 6040 6050 6060

LYS GLY GLU VAL VAL LYS SER ASN GLU PHE ...
AAGGCGAAGTGGTTAAATCGAATGAATT...
6070 6080 6090...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24D'

... THR VAL LYS ASN ALA ASP GLY SER GLU THR
... ACCGTTAAGATGCCGATGGTTCGGAAACG 6110 6120
...
ASN LEU VAL LYS VAL GLY ASP MET TYR ...
AACTTGGTTAAAGTTGGCGATATGTATTAC... 6130
... SER LYS GLU ASP ILE ASP PRO ALA THR SER
... AGCAAAGAGGATATTGACCCGGCAACCAGT 6160 6170 6180
...
LYS PRO MET THR GLY LYS THR GLU LYS TYR ...
AAACCGATGACAGGTAAACTGAAATAAT... 6190 6200
... LYS VAL GLU ASN GLY LYS VAL VAL SER ALA
... AAGTTGAAACGGCAAGTCGTTCTGCT 6210... 6220 6230 6240
...
ASN GLY SER LYS THR GLU VAL THR LEU THR ...
AACGGCAGCAAGACCGAAGTTACCCTAACC... 6250 6260
... ASN LYS GLY SER GLY TYR VAL THR GLY ASN
... AACAAAGGTTCCGGCTATGTAAACAGGTAAAC 6270... 6280 6290 6300
...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24E

GIN VAL ALA ASP ALA ILE ALA LYS SER GLY ...
 C A A G T G C C T G A T G C G A T T G C G A A A T C A G G C ...
 6320 ... PHE GLU LEU GLY ILE ALA ASP ALA ALA GLU
 ... T T T G A G C T T G G T T T G C C T G A T G C G G C A G A A
 6340 ...
 6350
 6360
 6370
 6380
 6390
 6400
 6410
 6420
 6430
 6440
 6450
 6460
 6470
 6480
 6490
 6500
 6510

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24F

```

... ASP LYS VAL THR THR THR PHE VAL LYS THR
... GATAAAGTGACCAACACCTTTGTGAAAACC 6540
... 6520
...
ASP VAL GLU LEU PRO LEU THR GIN ILE TYR ...
GATGTGGAAATTGCCCTTTAACGCAAACTCTAC... 6560
6550
... ASN THR ASP ALA ASN GLY ASN LYS ILE VAL
... AATACCGATGCAACGCGTAATAAGATCGTT 6590
... 6580
...
LYS LYS ALA ASP GLY LYS TRP TYR GLU LEU ...
AAAAAGCTGACGGGAAATGGTATGAACTG... 6620
6610
... ASN ALA ASP GLY THR ALA SER ASN LYS GLU
... ATGCTGATGGTACGGCGAGTAACAAAGAA 6640
... 6630
...
VAL THR LEU GLY ASN VAL ASP ALA ASN GLY ...
GTGACACTTGGTAACGTGGGATGCAACCGGT... 6680
6670
... LYS LYS VAL VAL LYS VAL THR GLU ASN GLY
... AAGAAAGTTGTGAAGTAACCGGAAATGGT 6710
... 6700

```

145/204

PCT/CA00/00289

FIG. 24G'

ALA ASP LYS TRP TYR THR ASN ALA ASP ...
GCGGATAAGTGGTATTACACCAATGCTGAC... 6750...
6740 ... GLY ALA ALA ASP LYS THR LYS GLY GLU VAL
... GGTGCTGCGGATAAACCAAGCGGAAGTG 6780
... 6760

SER ASN ASP LYS VAL SER THR ASP GLU LYS ...
AGCAATGATAAGTTTCTACCGATGAAAAA... 6810...
6900 ... HIS VAL VAL ARG LEU ASP PRO ASN ASN GLN
... CACGTTGTCGCCCTTGATCCGAACAATCA 6840
... 6820

SER ASN GLY LYS GLY VAL VAL ILE ASP ASN ...
TCGAACGGCAAGGCGTGTCATTGACAT... 6870...
6860 ... VAL ALA ASN GLY GLU ILE SER ALA THR SER
... GTGGCTAATGGCGAAATTCTCTGCCACTTCC 6900
... 6890

THR ASP ALA ILE ASN GLY SER GLN LEU THR ...
ACCGATGCGGATTACCGAAGTCAGTTGTAT... 6930...
6910

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24H'

... ALA VAL ALA LYS GLY VAL THR ASN LEU ALA
... GCCGTGGCAAAAGGGGTACAAACCTTGCT 6960
... 6940

GLY GIN VAL ASN ASN LEU GLU GLY LYS VAL ...
GGA C A G T G A A T A T C T T G A G G G C A A A G T G ... 6980
6970 ... ASN LYS VAL GLY LYS ARG ALA ASP ALA GLY
... A A T A A A G T G G G C A A A C G T G C A G A T G C A G G T 7020
... 7000 7010

THR ALA SER ALA LEU ALA ALA SER GIN LEU ...
A C A G C A A G T G C A T T A G C G G C T T C A C A G T T A ... 7040
7030 ... PRO GIN ALA THR MET PRO GLY LYS SER MET
... C C A C A A G C C A C T A T G C C A G G T A A A T C A T G 7080
... 7060 7070

VAL ALA ILE ALA GLY SER TYR GIN GLY ...
G T T G C T A T T G C G G G A A G T A G T T A T C A A G G T ... 7100
7090 ... GIN ASN GLY LEU ALA ILE GLY VAL SER ARG
... C A A A A T G G T T A G C C T A T C G G G G T A T C A A G A 7140
... 7120 7130

147/204

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.24'

ILE SER ASP ASN GLY LYS VAL ILE ILE ARG ...
ATTTCGGATAATGGCAAGTGATTATTCGC...
7150 7160 7170...
... LEU SER GLY THR THR ASN SER GIN GLY LYS
... TTGTCAGGCACAACCAATAGTCAAGGTAAA
... 7180 7190 7200

THR GLY VAL ALA ALA GLY VAL GLY TYR GIN ...
ACAGGCGTTGCAGCAGGTGTTGGTTACCAAG...
7210 7220 7230...
... TRP ***
... TGGTAATAGAAATCCGGATCCGC
... 7240 7250

148/204

FIG.25A

NTHi strain 12 hia locus

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

```

      TYR  TYR  HIS  TRP  ***  PRO  THR  PRO  ...
GAATTCATATACCACTGGTAACCAACACCT...
      10      20      30      40      50      60
      ...ALA  THR  PRO  GLU  THR  ALA  GIN  GIN  ILE
      ...GCTGCAACGCCAGAACAGCACACAAATT
      ...
      HIS  TRP  LEU  HIS  GIN  PHE  THR  LYS  ALA  ARG  ...
CACTGGCTACATCAATTACCAAGCTCGC...
      70      80      90      100      110      120
      ...ILE  GLN  TRP  ARG  LYS  THR  HIS  SER  LEU  PHE
      ...ATTCAATGGCGCAAAACCCATTCTCTATTTC
      ...
      PHE  LYS  GLU  LYS  PRO  ASP  TYR  ALA  PHE  VAL  ...
TTTAAGAAACCCGATTATGCTTTGTG...
      130      140      150      160      170      180
      ...LEU  ALA  GLU  ASN  GLY  LYS  VAL  GIN  GLU  ILE
      ...CTGGCAGAAACGGCAAGTGCAAGAAATC
      ...
      LYS  ALA  GLU  TYR  ARG  ARG  ILE  ALA  ASN  GIN  ...
AAGCAGATATCGCCGCAATGCAATCAA...
      190      200      210      220

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.25B

... ILE VAL GLU GLU ALA MET ILE ILE ALA ASN
...ATTGTGGAAGAAGCAATGATATTATGCCAAAC 230 240
... 220

ILE CYS ALA ALA GLN PHE LEU HIS GLU GIN ...
ATCTGCGCGCGCCCAATTTTTACACGAACAG... 260
... 270 ...
...ALA LYS THR GLY ILE PHE ASN ALA HIS SER
...GCAAAACACAGGCATTTTCAACGCCCAACAGC 290 300
... 280

GLY PHE ASP LYS LYS TYR LEU GLU ASN ALA ...
GGTTTTGATAAATACTTAGAAAATGCG... 320
... 330 ...
... HIS HIS PHE LEU MET ALA ASN LEU ALA ASN
...6431.SL (... 340 350 360
...CACCATTTCCTTAATGGCAAAATTAGCCAAAT

GLU GLN ASN GIN THR GLU LEU ALA GLU ARG ...
GAACAATACTCAAACTGAACCTGGCAGAACGT... 380
... 390 ...
... TYR SER VAL GLU ASN LEU ALA THR LEU ASN
...TATTCAGTAGAAAACCTTAGCAACCTTAAC 410 420
... 400

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.25C

GLY TYR CYS GLN MET ARG HIS ASP ILE GLU ...
GGCTATTGCCAAATGCGTCACGATATTGAA ...
430 ... 440 ... 450 ...
... PRO ILE GLU SER ASP TYR LEU GLU LEU ARG
...CCCATCGAAGCGGATTATTAGAACTGCGT
... 460 470 480

LEU ARG ARG TYR LEU THR PHE ALA GLU PHE ...
TTACGCCGTATTTAACCTTCGCCGAATTT ...
490 ... 500 ... 510 ...
... LYS SER GLU LEU ALA PRO HIS PHE GLY LEU
...AATCAGAAATTAGCACCGCACTTTGGTCTTT
... 520 530 540

GLY LEU GLU GLY TYR ALA THR TRP THR SER ...
GGTTAGAGGCTATGCCACTTGGACATCG ...
550 ... 560 ... 570 ...
... PRO ILE ARG LYS TYR SER ASP MET VAL ASN
...CCCATCCGCAATATTCAGATATGGTTAAT
... 580 590 600

HIS ARG LEU ILE LYS ALA VAL LEU ALA LYS ...
...
CATCGCTTAATCAAGCCGTGCTGGCAAAA ...
610 620 630 ...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.25D

```

... GIN PRO TYR GLU LYS PRO GIN ASN ASP VAL
...
...CAGCCTTATGAAAACCAAAATGACGTG
...
...
LEU ALA ARG LEU GIN GLU SER ARG ARG GIN ...
6432.SL (
TTGGCACGTTTGCAAGAGTCTCGCCGCCCAA...
670
... ASN ARG LEU VAL GLU ARG ASP ILE ALA ASP
680
...
...ATCGCCTAGTGGAAACGTGATATTGCCGAT
700
...
TRP LEU TYR CYS ARG TYR LEU ALA ASP LYS ...
730
TTGGCTATTATGCGCGTTATCTTGCTGACAAA...
740
... VAL ALA GLU ASN VAL GLU PHE ASN ALA GLU
...GTTGGCTGAAAATGTGGAAATTTAATGCAGAA
760
...
VAL GIN ASP VAL MET ARG ALA GLY LEU ARG ...
790
GTGCAAGATGTAATGCGTGCAGGCTTACGC...
800
810 ...

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.25E

... VAL GIN LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU
...GTACAACTGCTCGAAATGGTGCAATCGCTA 840
... 820 830 840

PHE ILE PRO ALA ALA THR LEU HIS ASN ASN ...
TTTATTCTCTGCCGCCACGTTGCACAACAAC ...
860 870 ...
... LYS LEU LEU ILE GIN LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU LEU
...AAGAAGAAATACAGCTAACCCCTGACGAA 900
... 880 890 900

LEU ALA LEU LEU TYR ILE LYS GLY GLU ARG THR ...
CTCGCCCTCTATATATAAAGCGCGAACGCACT ...
920 930 ...
... TYR LYS ILE GLY ASP ILE VAL LYS VAL LYS
...TACAAATAGGCGACATTGTGAAAGTGAA 960
... 940 950 960

LEU THR LEU LEU VAL LYS LEU ALA THR ARG SER ...
CTCACAGAAGTGAAAGAAAGCAACTCGCAGT ...
980 990 ...
... ILE VAL GLY GLU ILE LEU GIN *** LEU PRO
...ATTGTGGCGAATACTTCAATAAATTGCC 1020
... 1000 1010 1020

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.25F

PHE GLN TYR VAL THR GLU ASP GLY LYS THR...
G T T C C A A T A T G T T A C G G A G A C G G C A A A C ...
1030 1040 1050 ...
... VAL VAL LYS VAL GLY ASN GLU TYR TYR GLU
...CGTTGTGAAGTGGGCAATGAGTATTACGA
... 1060 1070 1080

ALA LYS GLN ASP GLY SER ALA ASP MET ASP...
A G C C A A G C A G A G A C G G T T C G G C G G A T A T G G A ...
1090 (6295.SL 1100 1110 ...
... LYS LYS VAL LYS ASN GLY GLU LEU VAL LYS
...TAAAAAAGTCAAAAAATGGCGAGCTGGTGA
... 1120 1130 1140

THR LYS VAL LYS LEU VAL SER ALA ASN GLY...
A A C T A A A G T G A A A T T G G T A T C G G C A A A C G G ...
1150 1160 1170 ...
... THR ASN PRO VAL LYS ILE SER ASN VAL ALA
...TACAAATCCGGTGAAAAATCAGCAATGTGTC
... 1180 1190 1200

GLU GLY THR GLU ASP THR ASP ALA VAL SER...
G G A A G G C A C G G A A G A T A C C G A T G C G G T C A G ...
1210 1220 1230 ...

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.25G

... PHE LYS GLN LEU LYS ALA LEU GUN ASN LYS
 ...CTTTAAGCAGTTGAAAGCCCTTGCAAAACAA
 ... 1240 1250 1260

GIN VAL THR LEU SER ALA SER ASN ALA THR...
 ACAGGTACGTTAAGCGGAGCAATGCTTA...
 ... 1270 1280 1290 ...

... ALA ASN GLY GIN SER ASP ALA ASP VAL GLY
 ...TGCCCAATGGCCGGTAGCGATGCCGACGTCGG
 ... 1300 1310 1320

LYS VAL THR GIN THR LEU SER ASN GLY LEU...
 CAGGTAACTCAAACTTTAAGCAATGGTTT...
 ... 1330 1340 1350 ...

... ASN PHE LYS PHE LYS SER THR ASP GLY GLU
 ...GAAATTTTAAATTTAAATCCACAGACGGCGGA
 ... 1360 1370 1380

LEU LEU ASN ILE LYS ALA ASP LYS ASP THR...
 GTTGTGAAACATCAAGCAGACAGGACAC...
 ... 1390 1400 1410 ...

... VAL THR ILE THR ARG ALA SER GLY ALA ASN
 ...GGTTACCATTAACGGGGGCAAGCGGTGCCGAA
 ... 1420 1430 1440

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.25H

```
GLY ALA ALA THR ASP ALA ASP LYS ILE...
TGGTGGCGCGGCTGATGCCGACAGAT...
1460
... LYS VAL ALA SER ASP GLY ILE SER ALA GLY
...TAAAGTGGCTTCAGACGGCATTAGCGCGGG
1480
...
ASN LYS ALA VAL LYS ASN VAL ALA GLY...
TAAATAAGCAGTTAAACGTCGGCGCAGG...
1510
...
1520
... GLU ILE SER ALA THR SER THR ASP ALA ILE
...CGAAATTCCGCCCACTCCACCGATGCCGAT
...
( 6271.SL
1540
1550
1560
ASN GLY SER GLN LEU TYR ALA VAL ALA LYS...
TACGGCAGTCAGTTGTATGCCGTGGCAAA...
1570
1580
... GLY VAL THR ASN LEU ALA GLY GLN VAL ASN
...GGGGGTAAACAACCTTGCTGGACAAGTGAAA
1600
1610
1620
LYS VAL GLY LYS ARG ALA ASP ALA GLY THR...
TAAAGTGGGCAACCGTGCAGATGCCAGGTAC...
1630
1640
1650
156/204
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.25I

```

... ALA SER ALA LEU ALA ALA SER GIN LEU PRO
...AGCAAGTGCATTAGCGGCTTCACAGTTACC 1680
...
1660
...
GLN ALA SER MET PRO GLY LYS SER MET VAL...
ACAAGCCCTCTATGCCGGGTAAATCAATGGT... 1700
...
1690
... SER ILE ALA GLY SER SER TYR GIN GLY GIN
...TTCTATTGCGGGAAGTAGTTATCAAGGTCA 1740
...
1720
...
SER GLY LEU ALA ILE GLY VAL SER ARG ILE...
AGTGGTTTAGCTATCGGGGTATCAAGAAT... 1760
...
1750
... SER ASP ASN GLY LYS LEU ILE ILE ARG LEU
...TCCGATAATGGCAAAATTGATTATTCGCTT 1800
...
1780
...
SER GLY THR THR ASN SER GIN GLY LYS THR...
GTCAGGCACACCAATAAGCCCAAGGTAAAC... 1820
...
1810
... GLY VAL ALA ALA GLY VAL GLY TYR GIN TRP
...AGGCCTTGCAAGCAGGTGTTGGTTACCAAGTG 1860
...
1840
...
*** ***
GTAATAGAAATTC 1870

```

157/204

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

158 / 204

FIG.26A

48	ATG AAC AAA ATT TTT AAC GGT AAT TCG AAT GGT GTG ACT CAA ACT TCG Met Asn Lys Ile Phe Asn Val Ile Thr Asn Val Val Thr Gln Thr Trp 2130 2135 2140
96	GTT GTC GTA TCT CAA CTC ACT CGC ACC CAC ACC AAA TGC GCC TCC GGC Val Val Val Ser Glu Leu Thr Arg Thr His Thr Lys Cys Ala Ser Ala 2145 2150 2155
144	ACC GTG GCG GTT GCG GTA TTG GCA ACC CTG TTG TCC GCA AGC GGT GAG Thr Val Ala Val Ala Val Leu Ala Thr Leu Leu Ser Ala Thr Val Glu 2160 2165 2170 2175
192	GCG AAC AAC AAT ACT CCT GGT ACG AAT AAG TTG AAG GCT TAT GGC GAT Ala Asn Asn Asn Thr Pro Val Thr Asn Lys Leu Lys Ala Tyr Gly Asp 2180 2185 2190
240	GCG AAT TTT AAT TTC ACT AAT AAT TCG ATA CCA GAT CCA GAA AAA CAA Ala Asn Phe Asn Phe Thr Asn Asn Ser Ile Ala Asp Ala Glu Lys Gln 2195 2200 2205
288	GTT CAA GAG GCT TAT AAA GGT TTA TTA AAT CTA AAT GAA AAA AAT GCG Val Gln Glu Ala Tyr Lys Gly Leu Leu Asn Leu Asn Glu Lys Asn Ala 2210 2215 2220

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

159/204

FIG.26B

336	AGT GAT AAA CTG TTG GTG GAG GAC AAT ACT GCG GCG ACC GGA GGC AAT Ser Asp Lys Leu Leu Val Glu Asp Asn Thr Ala Ala Thr Val Gly Asn 2225 2230 2235
384	TTG CGT AAA TTG GGC TGG GTA TTG TCT AGC AAA AAC GGC ACA AGG AAC Leu Arg Lys Leu Gly Trp Val Leu Ser Ser Lys Asn Gly Thr Arg Asn 2240 2245 2250 2255
432	GAG AAA AGC CAA CAA GTC AAA CAT GCG GAT GAA GTG TTG TTT GAA GGC Glu Lys Ser Gln Gln Val Lys His Ala Asp Glu Val Leu Phe Glu Gly 2260 2265 2270
480	AAA GGC GGT GTG CAG GTT ACT TCC ACC TCT GAA AAC GGC AAA CAC ACC Lys Gly Gly Val Gln Val Thr Ser Thr Ser Glu Asn Gly Lys His Thr 2275 2280 2285
528	ATT ACC TTT GCT TTA GCG AAA GAC CTT GGT GTG AAA ACT GCG ACT GTG Ile Thr Phe Ala Leu Ala Lys Asp Leu Gly Val Lys Thr Ala Thr Val 2290 2295 2300
576	AGT GAT ACC TTA AGC ATT GGC GGT GGT GCT GCT GCA GGT GCT ACA ACA Ser Asp Thr Leu Thr Ile Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Thr 2305 2310 2315

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

160/204

FIG.26C

624 ACA CCG AAA GTG AAT GTA ACT AGT ACA ACT GAT GGC TTG AAG TTC GCT
 Thr Pro Lys Val Asn Val Thr Ser Thr Asp Gly Leu Lys Phe Ala
 2320 2325 2330 2335
 672 AAA GAT GCT GCG GGT GCT AAT GGC GAT ACT ACG GTT CAC TTG AAT GGT
 Lys Asp Ala Ala Gly Ala Asn Gly Asp Thr Val His Leu Asn Gly
 2340 2345 2350
 720 ATT GGT TCA ACC TTG ACA GAC ACG CTT GTG GGT TCT CCT ACT CAT
 Ile Gly Ser Thr Leu Thr Asp Thr Leu Val Gly Ser Pro Ala Thr His
 2355 2360 2365
 768 ATT CAC GCA GCA GAT CAA AGT ACG CAT TAC ACT CGT GCA GCA AGT ATC
 Ile Asp Gly Gly Asp Gln Ser Thr His Tyr Thr Arg Ala Ala Ser Ile
 2370 2375 2380
 816 AAG GAT GTC TTG AAT GCG GGT TGG AAT ATC AAG GGT GTT AAA GCT GGC
 Lys Asp Val Leu Asn Ala Gly Thr Asn Ile Lys Gly Val Lys Ala Gly
 2385 2390 2395
 864 TCA ACA ACT GGT CAA TCA GAA AAT GTC GAT TTT GTT CAT ACT TAC GAT
 Ser Thr Thr Gly Gln Ser Glu Asn Val Asp Phe Val His Thr Tyr Asp
 2400 2405 2410 2415

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

161/204

FIG.26D

912 ACT GTT GAG TTC TTG AGT CCG GAT ACA GAG ACC ACG ACT GTT ACT GTA
 Thr Val Glu Phe Leu Ser Ala Asp Thr Glu Thr Thr Thr Val Thr Val
 2420 2425 2430
 960 GAT ACC AAA GAA AAC GGT AAG AGA ACC GAA GTT AAA ATC GGT CCG AAG
 Asp Ser Lys Glu Asn Gly Lys Arg Thr Glu Val Lys Ile Gly Ala Lys
 2435 2440 2445
 1008 ACT TCT GTT ATC AAA GAA AAA GAC GGT AAG TTA TTT ACT GCA AAA GCT
 Thr Ser Val Ile Lys Glu Lys Asp Gly Lys Leu Phe Thr Gly Lys Ala
 2450 2455 2460
 1056 AAC AAA GAG ACA AAT AAA GTT GAT GGT AAC CCG ACT GAA GAT GCA
 Asn Lys Glu Thr Asn Lys Val Asp Gly Ala Asn Ala Thr Glu Asp Ala
 2465 2470 2475
 1104 GAC GAA GGC AAA GGC TTA GTG ACT CCG AAA GAT GTG ATT GAC GCA GTG
 Asp Glu Gly Lys Gly Leu Val Thr Ala Lys Asp Val Ile Asp Ala Val
 2480 2485 2490 2495
 1152 AAT AAG ACT GGT TGG AGA ATT AAA ACA ACC GAT GGT AAT GGT CAA AAT
 Asn Lys Thr Gly Thr Arg Ile Lys Thr Thr Asp Ala Asn Gly Gln Asn
 2500 2505 2510

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

162/204

FIG.26E

1200	GCC GAC TTC GCA ACT GGT GCA TCA GGC ACA AAT GTA ACC TTT GCT AGT Gly Asp Phe Ala Thr Val Ala Ser Gly Thr Asn Val Thr Phe Ala Ser 2515 2520 2525
1248	GGT AAT GGT ACA ACT GCG ACT GTA ACT AAT GGC ACC GAT GGT ATT ACC Gly Asn Gly Thr Thr Ala Thr Val Thr Asn Gly Thr Asp Gly Ile Thr 2530 2535 2540
1296	GGT AAG TAT CAT GCG AAA GTT GGC GAC GGC TTA AAA CTA GAT GGC GAT Val Lys Tyr Asp Ala Lys Val Gly Asp Gly Leu Lys Leu Asp Gly Asp 2545 2550 2555
1344	AAA ATC GCT GCA GAT ACG ACC GCA CTT ACT GTG AAT GAT GGT AAG AAC Lys Ile Ala Ala Asp Thr Thr Ala Leu Thr Val Asn Asp Gly Lys Asn 2560 2565 2570 2575
1392	GCT AAT AAT CCG AAA GGT AAA GTG GCT GAT GGT GCT TCA ACT GAC GAG Ala Asn Asn Pro Lys Gly Lys Val Ala Asp Val Ala Ser Thr Asp Glu 2580 2585 2590
1440	AAG AAA TTG GTT ACA GCA AAA GGT TTA GTA ACA GGC TTA AAC AGT CTA Lys Lys Leu Val Thr Ala Lys Gly Leu Val Thr Ala Leu Asn Ser Leu 2595 2600 2605

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

163/204

FIG.26F

1488 AGC TGG ACT ACA ACT GCT GGT GAG GCG GAC GGT GGT ACG CTT GAT GGA
 Ser Trp Thr Thr Ala Ala Glu Ala Asp Gly Thr Leu Asp Gly
 2610 2615 2620
 1536 AAT GCA AGT GAG CAA GAA GTT AAA GCG GCG GAT AAA GTA ACC TTT AAA
 Asn Ala Ser Glu Gln Glu Val Lys Ala Gly Asp Lys Val Thr Phe Lys
 2625 2630 2635
 1584 GCA GGC AAG AAC TTA AAA GTG AAA CAA GAG GGT GCG AAC TTT ACT TAT
 Ala Gly Lys Asn Leu Lys Val Lys Gln Glu Gly Ala Asn Phe Thr Tyr
 2640 2645 2650 2655
 1632 TCA CTG CAA GAT GCT TTA ACA GGC TTA ACG AGC ATT ACT TTA GGT ACA
 Ser Leu Gln Asp Ala Leu Thr Gly Leu Thr Ser Ile Thr Leu Gly Thr
 2660 2665 2670
 1680 GCA AAT AAT GGT GCG AAA ACT GAA ATC AAC AAA GAC GGC TTA ACC ATC
 Gly Asn Asn Gly Ala Lys Thr Glu Ile Asn Lys Asp Gly Leu Thr Ile
 2675 2680 2685
 1728 ACA CCA CCA AAT GGT GCG GGT GCA AAT AAT GCA AAC ACC ATC AGC GTA
 Thr Pro Ala Asn Gly Ala Gly Ala Asn Asn Ala Asn Thr Ile Ser Val
 2690 2695 2700

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

164/204

FIG.26G

ACC AAA GAC GGC ATT AGT GCG GGC CAG TCG GTT AAA AAC GGT GTG Thr Lys Asp Gly Ile Ser Ala Gly Gly Gln Ser Val Lys Asn Val Val 2705 2710 2715 1776
ACC GCA CTG AAG AAA TTT GGT GAT GCG AAT TTC GAT CCG CTG ACT AGC Ser Gly Leu Lys Lys Phe Gly Asp Ala Asn Phe Asp Pro Leu Thr Ser 2720 2725 2730 1824
TCC GGC GAC AAC TTA ACG AAA CAA AAT GAC GAT GGC TAT AAA GGC TTG Ser Ala Asp Asn Leu Thr Lys Gln Asn Asp Asp Ala Tyr Lys Gly Leu 2740 2745 2750 1872
ACC AAT TTG GAT GAA AAA GGT ACA GAC AAG CAA ACT CCA GTT GTT GGC Thr Asn Leu Asp Glu Lys Lys Gly Thr Asp Lys Gln Thr Pro Val Val Ala 2755 2760 2765 1920
GAC AAT ACC GCG GCA ACC GTG GCG GAT TTG CCG GCG TTG GCG TGG GTG Asp Asn Thr Ala Ala Thr Val Gly Asp Leu Arg Gly Leu Gly Trp Val 2770 2775 2780 1968
AAT TCT GCG GAC AAA ACC ACA GCG GCG TCA ACG GAA TAT CAC GAT CAA Ile Ser Ala Asp Lys Thr Thr Gly Gly Ser Thr Glu Tyr His Asp Gln 2785 2790 2795 2016

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

165/204

FIG.26H

2064	GGT CCG AAT CCG AAC GAA GTG AAA TTC AAA AGC GGC AAC GGT ATC AAT Val Arg Asn Ala Asn Glu Val Lys Phe Lys Ser Gly Asn Gly Ile Asn 2800 2805 2810 2815
2112	GGT TCC GGT AAA ACG GTC AAC GGT AGG CGT GAA ATT ACT TTT GAA TTG Val Ser Gly Lys Thr Val Asn Gly Arg Arg Glu Ile Thr Phe Glu Leu 2820 2825 2830
2160	GCT AAA GGT GAA GTG GTT AAA TCG AAT GAA TTT ACC GTC AAA GAA ACC Ala Lys Gly Glu Val Val Lys Ser Asn Glu Phe Thr Val Lys Glu Thr 2835 2840 2845
2208	AAT GGA AAG GAA ACG ACC CTG GTT AAA GTT GGC GAT AAA TAT TAC AGC Asn Gly Lys Glu Thr Ser Leu Val Lys Val Gly Asp Lys Tyr Tyr Ser 2850 2855 2860
2256	AAA GAG GAT ATT GAC TTA ACA ACA GGT CAG CCT AAA TTA AAA GAT GGC Lys Glu Asp Ile Asp Leu Thr Thr Gly Gln Pro Lys Leu Lys Asp Gly 2865 2870 2875
2304	AAT ACA GTT GGT GCG AAA TAT CAA GAT AAA GGT GGC AAA GTC GTT TCT Asn Thr Val Ala Ala Lys Tyr Gln Asp Lys Gly Gly Lys Val Val Ser 2880 2885 2890 2895

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

166/204

FIG.26I

2352	GTA ACG GAT AAT ACT GAA GGT ACC ATA ACC AAC AAA GGT TCT GGC TAT Val Thr Asp Asn Thr Glu Ala Thr Ile Thr Asn Lys Gly Ser Gly Tyr 2900 2905 2910
2400	GTA ACA GGT AAC CAA GIG GCA GAT GCG ATT GCG AAA TCA GGC TTT GAG Val Thr Gly Asn Gln Val Ala Asp Ala Ile Ala Lys Ser Gly Phe Glu 2915 2920 2925
2448	CTT GGC TTG GGT GAT GAA GCT GAT GCG AAA GCG GCG TTT GAT GAT AAG Leu Gly Leu Ala Asp Glu Ala Asp Ala Lys Arg Ala Phe Asp Asp Lys 2930 2935 2940
2496	ACA AAA GGC TTA TCT GCT GGT ACA ACG GAA ATT GTA AAT GCG CAC GAT Thr Lys Ala Leu Ser Ala Gly Thr Thr Glu Ile Val Asn Ala His Asp 2945 2950 2955
2544	AAA GTC CGT TTT GCT AAT GGT TTA AAT ACC AAA GIG ACG GCG GCA ACG Lys Val Arg Phe Ala Asn Gly Leu Asn Thr Lys Val Ser Ala Ala Thr 2960 2965 2970 2975
2592	GIG GAA ACG ACC GAT CCA AAC GCG GAT AAA GIG ACC ACA ACC TTT GIG Val Glu Ser Thr Asp Ala Asn Gly Asp Lys Val Thr Thr Phe Val 2980 2985 2990

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

167/204

FIG.26J

2640 AAA ACC GAT GTG GAA TTG CCT TTA ACG CAA ATC TAC AAT ACC GAT GCA
Lys Thr Asp Val Glu Leu Pro Leu Thr Gln Ile Tyr Asn Thr Asp Ala
2995 3000 3005

2688 AAC GGT AAG AAA ATC ACT AAA GTT GTC AAA GAT GGG CAA ACT AAA TGG
Asn Gly Lys Lys Ile Thr Lys Val Val Lys Asp Gly Gln Thr Lys Trp
3010 3015 3020

2736 TAT GAA CTG AAT GCT GAC GGT ACG GCT GAT ATG ACC AAA GAA GTT ACC
Tyr Glu Leu Asn Ala Asp Gly Thr Ala Asp Met Thr Lys Glu Val Thr
3025 3030 3035

2784 CTC GGT AAC GTG GAT TCA GAC GGC AAG AAA GTT GTG AAA GAC AAC GAT
Leu Gly Asn Val Asp Ser Asp Gly Lys Lys Val Val Lys Asp Asn Asp
3040 3045 3050 3055

2832 GGC AAG TGG TAT CAC GCC AAA CCT GAC GGT ACT GCG GAT AAA ACC AAA
Gly Lys Trp Tyr His Ala Lys Ala Asp Gly Thr Ala Asp Lys Thr Lys
3060 3065 3070

2880 GGC GAA GTG ACC AAT GAT AAA GTT TCT ACC GAT GAA AAA CAC GTT GTC
Gly Glu Val Ser Asn Asp Lys Val Ser Thr Asp Glu Lys His Val Val
3075 3080 3085

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

168/204

FIG.26K

2928	ACC CTT GAT CCA AAT GAT CAA TCA AAA GGT AAA GGT GTC GTC ATT GAC Ser Leu Asp Pro Asn Asp Gln Ser Lys Gly Val Val Ile Asp 3090 3095 3100
2976	AAT GTG GCT AAT GGC GAT ATT TCT GCC ACT TOC ACC GAT GCG ATT AAC Asn Val Ala Asn Gly Asp Ile Ser Ala Thr Ser Thr Asp Ala Ile Asn 3105 3110 3115
3024	GCA AGT CAG TTG TAT GCT GTG CCA AAA GGG GTA ACA AAC CTT GCT GCA Gly Ser Gln Leu Tyr Ala Val Ala Lys Gly Val Thr Asn Leu Ala Gly 3120 3125 3130 3135
3072	CAA GTG AAT AAT CTT GAG GGC AAA GTG AAT AAA GTG GGC AAA CGT GCA Gln Val Asn Asn Leu Glu Gly Lys Val Asn Lys Val Gly Lys Arg Ala 3140 3145 3150
3120	GAT GCA GGT ACA GCA AGT GCA TTA GCG GCT TCA CAG TTA CCA CAA GGC Asp Ala Gly Thr Ala Ser Ala Leu Ala Ser Gln Leu Pro Gln Ala 3155 3160 3165
3168	ACT ATG CCA GGT AAA TCA ATG GTT GCT ATT GCG GCA AGT AGT TAT CAA Thr Met Pro Gly Lys Ser Met Val Ala Ile Ala Gly Ser Ser Tyr Gln 3170 3175 3180

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

169/204

FIG.26L

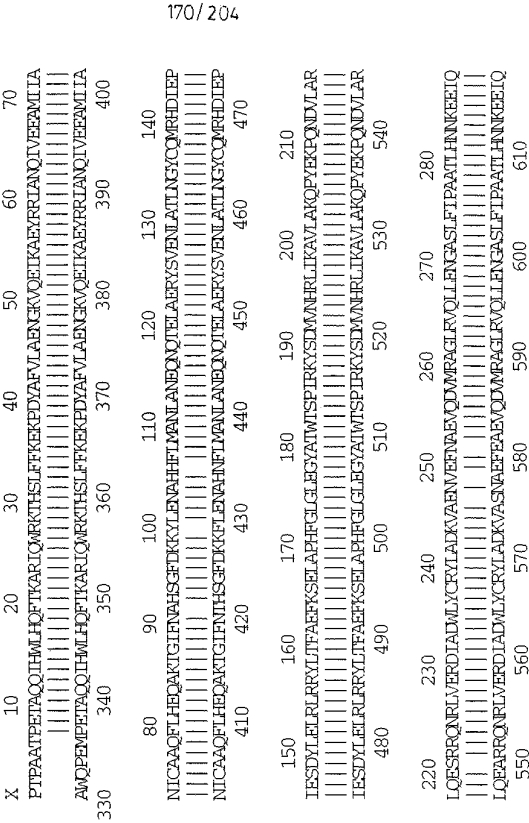
GGT CAA AAT GGT TTA GGT ATC GGG GTA TCA AGA ATT TCC GAT AAT GGC	3216
Gly Gln Asn Gly Leu Ala Ile Gly Val Ser Arg Ile Ser Asp Asn Gly	
3185	3190
AAA GIG ATT ATT GGC TTG TCA GGC ACA ACC AAT AGT CAA GGT AAA ACA	3264
Lys Val Ile Ile Arg Leu Ser Gly Thr Thr Asn Ser Gln Gly Lys Thr	
3200	3205
GGC GGT CCA GCA GGT GGT GGT TAC CAG TGG	3294
Gly Val Ala Ala Gly Val Gly Tyr Gln Trp	
	3220

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

FIG.27A

Alignment of NTHi strain 12 5' ORF with HI1733 from H. influenzae strain Rd



WO 00/55191

PCT/CA00/00289

171/204

FIG.27B

290300310320330

INPEDELALXIKGERTYKTDIVAKVLTEVKERTSIVGEILQ

|||||

INPEDELALXIKGERTYKTDIVAKVLTEVKERTSIVGEILQ

620630640650X

;

#cross-references GB:L42023; TIGR:HI1733

;

#note named as homolog to a protein from Escherichia coli

;

SUMMARY #length 659 #molecular-weight 75782 #checksum 8365

A64139

MFQINPLLAQLKQOIHDSKEQVEGWKSTDKAVGTELCCKTYFTAPPSMKMMHEKKIKATIEKQDKE
QAEPTALTEMLTRETAKVRENKKLQVLVTHESINQFCAQQAQSVKEELQEEIWMVANLKTPLRDO
RFFYATINQLICRADDELAFAMWTLARHDSRYFVKGAEPYEMLDQKIRENITAIHFVITDSINMDD
ALXTEPLAQNSIQIGKIAWADPTAYIALDSQIQEAKQRCFTINLFGFNIMLPRELSELCSLIAN
EIRPALVCYIETDLTGNITAKHFVSAAVQSKAKLANKVSDYLEQADVAQPEMPETAQQIHWLHQT
ARIQARKTHSLFKEKEPDVAFVLAENKQVEIKAEYRRIANQIVVEEAMLIANICAAQFLHEQAKTGIFNT
HSGFDKFLNANFTNANLANEQDTLAEFYSVENLATNGYCCQRRHDIEPIESDYLELRRLYLFPA
EFKSEIADHFCEGLEGVATWSPIRKYSIMWRLIKAVLAQPYEKQDVLARLOEARRQRLVERDI
ADMLNCRVLADKVASAEFEAEVQDMFACLFVQLENCASIFIPANTHNKKEIQINPEDELALXIKGE
RTVKICIMWVKLVEKERTSIVGEILQ

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

172/204

FIG.28A

Alignment of *H. influenzae* Hia/Hsf and *M. catarrhalis* 200 kDa proteins

	10	20	30	40	50	...
MNKIFNVITWVMTQWAVSELTRAHFKRAGATVAAGAVLAVLSATVQA-S						...
.....V...V.....T...C.....V.....L.....N-----						...
.....V...V.....C.....V.....A.....AE.NN-----						...
.....V...V.....C.....V.....A.....AE.NN-----						...
.....V...V.....T.....T.....L...T...TT-----						...
.....V...V.....T...C.....V.....L.....E.NN-----						...
.....N.....V.....T.....ET.....L.F...NATDEEELDFV...						...
.....K.....V.....T.....T.....L.F...NATDEEELDFV...						...
.....H.YK..F.KA.G.FMA.A.YAKS.STGGSSCHTQ.GSVCTLSFAPAAALVIGATLS...						...
.....H.YK..F.KA.G.FMA.A.CAKS.SGGSSSTAQ.GSSPVIRVATALLVIGATIN...						...
** *** **** * ** **** * * * * *						...
.....						...
.....						...
.....						...
.....						...
.....						...
.....						...
.....RTAPVLSHSDKGTGEGEVENSNGIYFNKGVIKA-----						...

33
32
29
K22
M4071
11
K9
HSF

173/204

FIG. 28B

[illegible]

FIG. 28C

[illegible]

33 32 29 K22

FIG. 28D

[illegible]

```

32      ...
29      ...
K22    ...
M407L  ...
11     ...
K9     ...
HSF    ...
API    ...
Rd     ...

...
... NSTD- GUTVKE-ALWEGCI KIDGXKVADITLVTC---
... AENA--IHDAN- IGWRKANSGLAKTIANUFEVTTL
... ETQDCKLTNNIGCWD-NUGLKVKLANU SELEVSTNUL
***** * * * *

```

FIG. 28E

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

GKPAETAKEDKKKUNAGCU/VTLGKLSWKAFAUTD--GALBTSKDSKWAGETVFK...
 GKPAETAKEDKKKUNAGCU/VTLGKLSWKAFAUTD/GALBTSKDSKWAGETVFK...
 GKPAETAKEDKKKUNAGCU/VTLGKLSWKAFAUTD--GALBTSKDSKWAGETVFK...
 GKPAETAKEDKKKUNAGCU/VTLGKLSWKAFAUTD--GALBTSKDSKWAGETVFK...
 NQITVTVKSSSTPAELISGLFIPTQTCGSGTSYVGINSGKFNPAETAAIGT-R...

FIG. 28F

[illegible]

FIG. 28G

KTWNKDELTTPAGNGTGTNTSFTKGIK. NKAL. VASELRAVDA. DJL. .AT.
KTWNKDELTTPAGNGTGTNTSFTKGIK. NKAL. VASELRAVDA. DJL. .AT.
-----UNTI GSGNWOIOWGNGTGKFKJPDJNNVSPRANFGTUTIESELGAD. ***
*** ** * * * * *

.....80	90	100	110	120	
.....D.NKQSVVDGLNNGKTKFNADETATVEMKRL-----					33
.....-----ATTENED. EELEEVQBSV.-----					32
.....E.HVQPA.K.....D.N.S.....N.A.....					29
.....E.HVQPA.K.....D.N.S.....N.A.....					K22
.....AR.F.GA.....DN.N.L..T.DKA.....					M4071
.....AE..VQPA.K.....NQS-D.L..E.N.A.....D.....					11
.....G.H.....N.AN.-L..D.N.A.....D.....					K9
.....RHVEPA.K.....NAN.QP.-T.S.A.....D.....					HSF
.....RHVEPA.K.....NAN.QP.-TDS.A.....D.....					API
.....RHVEPA.K.....NAN.QP.-.....S.A.....D.....					Rd
.....KQAP.LDQK.QVGSVAITINGI.AGNKIS..A.QSSNDA					4223
.....GKQK.P.LDQK.QV.KIT.DSGNNGOKLSMVDATDIDA					LES-1
.....*	***	*	*	*	

130	140	150	160
GWJSTINSKEE-SNQKQDELFEG-KGCVTSBCKHVT			
R-SFKAREG-QGFTIEV			
I..S..G..RN..K..Y..	T..GAA..S.S.KD...	I..	
I..S..G..RN..K..Y..	T..GAA..S.S.KD...	I..	

PCT/CA00/00289

FIG. 28H

```

.L.S. G.RN.K.Q. H. .... - .G. Q. T. .... I.
.L.S. G.RN.K.Q. H. .... -G. Q. T. .... I.
GREN.K.Q. .... K.S.Q. Q. T. .... AI.
G. - .T. -ACAA. .... I. VSAETADGELEXD.
G. - .T. -ACAA. .... I. VSAETADGELEXD.
G. - .T. -ACAA. .... I. VSAETADGELEXD.
G. - .T. -ACAA. .... I. VSAETADGELEXD.
VTIBQL.AKPTLNGAGISVPEISVDAKSN. APY. IGMT. ELSNDTSIKES/KG.
VTIKQL. .... * * * * *

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 281

[illegible]

FIG. 28J

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

33	..	-----
32	..	-----
29	..	-----
K22	..	-----
M4071	..	-----
11	..	-----
K9	..	-----
HSF	...	..STEMRACINQENNDVATVDIAFTDSTGTTVTVTKADG
API	...	..STEMRACINQENNDVATVDIAFTDSTGTTVTVTKADG
R8	...	..STEMRACINQENNDVATVDIAFTDSTGTTVTVTKADG
4223	...	..SINDIITCNLENKNSIGFVSTVNTVDFIDGNITKATVY-DEINQ
LES-1	...	..SICDIIITCNLENKNSIGFVSTVNTVDFIDGNITKATVY-TEINQ

FIG. 28K

[illegible]

PCT/CA00/00289

FIG. 28L

[illegible]

PCT/CA00/00289

FIG. 28M

33
32
29
K22
M4071
11

[illegible]

PCT/CA00/00289

K9
HSF
API
Rd
4223
LES-1

33 32 29 K22

```

...GKRTNWKSA-----LATWKTQNTA
..GKRTNWKSA-----LATWKTQNTA
...
..GKKRTNQSSBTAQSHPAVIGETVLUKIT
..GKKRTNQSSDITQNSHPAVIGETVLUKIT
.. * * ** * ***** * * * *
...
DE-
GATOPANTRFZAKQUULUTYPAITGAAGADAKAPUTTANTVGLREJLAWLSANKTAFE.
[ ]
[ ]
*

```

FIG. 280

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 28P

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

188/204

FIG.28Q

33	-----FALANUWATVSKLSGANKKVDITSANG-----	210	220	230	240	250	...
32	...D--FTYS.KKE.KNLSVEVE...F...N.....	LKTAQGT-NQXEN--VHNGILASTIDPRVQKTAHLKEISDTERN--RAASVCDVIA...					
29	...GKSVT...K.D.TS.K...I.KDIN.....	...L..T.NG....S...--.....T.TLA.T.G.VDTM.DANNH--.....Q...S...					
K22	...GKSVT...K.D.TS.K...I.KDIN.....	...L..T.NG....S...--.....T.TIT.MT.QASNGAVQ--NH--.....A.....					
M4071	...T.EK.....N.....T.....	...L..T.NG....S...--.....T.TIT.MT.QASNGAVQ--NH--.....A.....					
11	...K.G.T...T.TI.GGAAGAT.TPKNVTSTHDG	...PS...--.....T.TIT.TKSNMGVQNH--.....A.....					
K9	...K.SMT...T.TI.GSTTUGSA.TPKNVTSTHAG	...DAA--A.DTT...G...T.TK..SPAT.IDGQOS.HVT--...IK...					
HSF	...KNIT...S.S...T.N.N...TK...	...V...CA.GANGDIT--...TN...Q.TLNGVSKIDENGITADEK...Q...S...					
API	...KNIT...S.S...T.N.N...TK...	...DSKT--DDA--I...T.TLNGATNUGGUTIDEK...K...					
R1	...N.....T.....	...x.DSKT--DDA--I...T.TLNGATNUGGUTIDEK...K...					
4223	...IEVK-DKGLGKVTTLTSTGTGANKFALSNDATGALVKSADIVA--	...P...--.....					
LES-1	...IEVTSKGLGKVTTLTSTGTGANKFALSNDATGALVKSADIVA--						
	...						

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

189/204

FIG.28R

```

-----
...TLSCDIQKAGASQANNSAGYVDADGNKVITDSTNKYQA...
...TLSCDIQKAGASQASASSYVDADGNKVITDSTNKYQV...
* *** ** *** *
...260 270 280 290 300
...GNNIRGAK--TIGG--IVNDVFSVTVFEFAGNANVSITDDN--
...Q.NNNVDFVR.Y.T..N-----A.TAH-
...Q.NNASVDFNAY.T..N-----T.T.N...TAH-
...Q.NNASVDFNAY.T..N-----T.T.N...TAH-
...Q.NNAS-----N...D.VN.L.T.N...TAHN
...K.V.AGSTIT--QOSE...H...L.-DHEITIV.V.S--
...K.V.TGAT--S...R...L...SEEITL.V.S--
...V.V.PASANOQ--E.I..A...D.V.DKOTT...VES--
...V.V.PASANOQ--E.I..A...D.V.DKOTT...VES--
...KNDGTVD.TKEVAKKLVQAQITPDGTLAQMKNKSVI.KEDVN.A.--
...NDKGOVD.NKEVAKKLVQAQITPDGTLAQMKNKSVI.KEDVN.A.--
...
310 320 330 340 350 360 ...
KKTIVVDYTGLEFQVWTEDSKTVKNGEYEAQGSADNDKKV-ENGLAKIKVLVSA...
...G...K.D...NQ...E...
...G...D.K...E...
...G...D.K...E...
...GE...E...
...F...G...K.E.V...

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

33
32
29
K22
M4071
12
11
K9
HSF
API
Rd
4223
LESS-1

FIG. 28S

[illegible]

FIG. 28T

[illegible]

FIG. 28U

..TNNI1NQ5NC5A1PFWTANGKPIN.TDCKPQAKAIGA
* * *

	510	520	530	540	550	560
GTHTD-TLVKSCNVLTAGENIKVQBGSTFTVTILOBLTGVKSIFEDTENCANZSTK						
SKE-			A.K.	A.K.	A.	
ASNE-		E..D.	A.K.	A.K.	A.S.	
ASNE-		E..D.	A.K.	A.K.	A.S.	
-			A.K.	D.	A.	

NPSE-QE.A.	F.K.		A..S.Q.A.	LT.ITLGTGN.	K---	E..
ADE-KE.A.ET.F.K.		A.	S.Q.A.	LT.ITLGTGN.	K---	E..
PANSAGE.A.	F.	I..S.KD.	S.KK.KOLT.	ANG.TOSE		
PANSAGE.A.	F.	I..S.KD.	S.KK.KOLT.	ANG.TOSE		

KYH	570	580	590	ANGP
***				***
ITKUTITPAID-ANGAATPAKIK---VASOIGI				
.....L.G.....TV.....				
.....S.G.....				
.....S.G.....				

33
32
29
K22

FIG. 28V

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

33
32
29
K22
M4071
12
11
K9
HSF
API
Rd
4223
LES-1

```

      *   **   *           *   ****   ***
      670    680    690    700
TELAWTSIAKTTGES-KETSAORFANEKFCSGGIN
.....
      IN..N..H
      IN..N..H
      K.IN..N.
.....
      G.-T.HD
      LD..N.
      PQ..N.
      PQ..N.
.....
.....
.....
.....
      UNV.FUOITHQVDVF.A.UJNFENGTADITSFSA
      *****

```

```

710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
158
```

33
32
29
K22
M4071
12
11
K9
HSF
API
Rd
4223
LES-1

FIG. 28X

[illegible]

[illegible]

33
32
29
K22
M4071
12
11
K9
HSF
API
Rd
4223
LES-1

197 / 204

FIG. 28Z

—

*

[illegible]

33
32
29
K22
M4071
12
11
K9
HSF

PCT/CA00/00289

FIG. 28A'

```

--V
VESTDANGKVTTFVKIDVFLFQINNDANGKI---V
.
.
.
NEQGRFFHNDNQEPVQGRNGIDSSGSKHSVAIGQ-
NEQGRFFHNDNQEPVQGRNGIDSSGSKHSVAIGQ-
.
.
.
* * * * *
* * * * *

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

199 / 204

FIG. 28B'

[illegible]

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

200/204

FIG.28C'

K22
M407L
12
11
K9
HSF
AP1
Rd
4223
TES-1

910 920 930 940 950
AINGSQLVAVAGVITLACVN-----KIGKADAGTASALASQLPQASCKSWSLA...
.....NLEKVN.....T.P.....
.....P.....
.....P.....
.....P.....
.....NLEKVN.....T.P.....A.....
.....NLEKVN.....T.P.....
.....NLEKVN.....T.P.....A.....
.....NLEKVN.....T.P.....A.....
.....ATQSI.NAT.ELDRHQENK.N..IS..M.MSM...YIP.R...TGG...
V.....ATQSI.NAT.ELDRHQENK.N..IS..M.MSM...YIP.R...TGG...
V.....ATQSI.NAT.ELDRHQENK.N..IS..M.MSM...YIP.R...TGG...
***** ** ** * ***** * ***** * ***** *

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

201/204

FIG.28D'

... 960 970 980 990 1000

...GSSYGGSGEIAIGVRSINERKIVIRLSGINSQETGVAAGVGQW*

...N.....*

...N.....*

...N.....*

...N.....*

...L.....*

...N.....*

...N.....*

...N.....*

...N.....*

...IATHN.GAV.V.L.KL...QWFKIN.SADT.HV.A.V.A.PHF*

...IATHN.GAV.V.L.KL...QWFKIN.SADT.HV.A.V.A.PHF*

... ***** ** ***** * * * * *

33

32

29

K22

M4071

12

11

K9

HSF

ADI

Rd

4223

LES-1

FIG.29
Oligonucleotides primers to PCR amplify truncated strain 11 S44 hia gene.

5'

GGGATTCATATCTCCGACGGTTCAGCGGACACATACT

3'

6817.SL

SEQ ID NO:56

SEQ ID NO:55

5'

GGGATTCATATCTCCGACGGTTCAGCGGACACATACT

3'

6818.SL

SEQ ID NO:59

SEQ ID NO:58

SEQ ID NO:57

Construction of JB-2930-3, pBR T7/S44 hia(11)/cer/kanR

PCR amplify Nde-Sty S44 hia(11) clone into pCR II

JB-2910-1-1
KanR
S44 5'hia
AptR
Nde
SlyB

PCR II/S44 5'hia

JB-2917-1
S44 hia(11)
JB-2917-1
AptR
Nde Sty
Pst
RSmBR

PUC T7 V38 hia(11)

V38 hia(11)
IA-46-5
AptR
Nde
T7p
Pst
HXBg
Nde/Sty
Nde

RSmBR

PUC S44 hia(11)

Nde/CAP

FIG. 30A

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

203/204

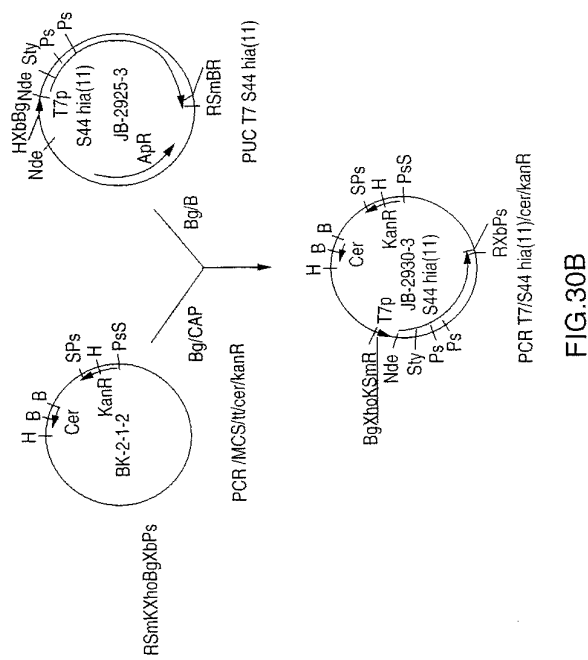


FIG. 30B

WO 00/55191

PCT/CA00/00289

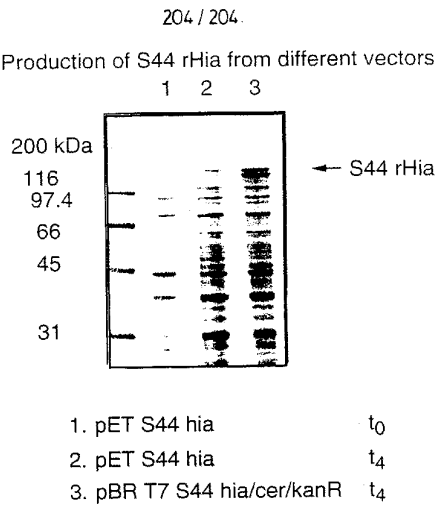


FIG.31

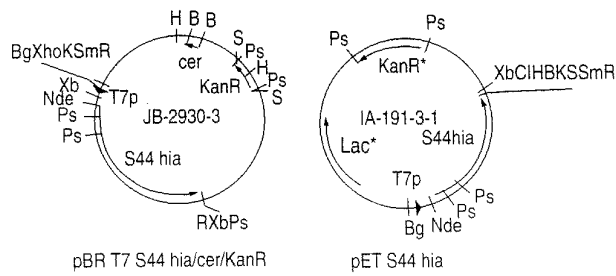


FIG.32

【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 September 2000 (21.09.2000)

PCT

(10) International Publication Number
WO 00/55191 A3

- (51) International Patent Classification⁷: C07K 14/285, M2R 3N7 (CA); KLEIN, Michel, H. [CA/CA]; 16 Munro Boulevard, Willowdale, Ontario M2P 1B9 (CA).
- (21) International Application Number: PCT/CA00/00289 (74) Agent: STEWART, Michael, L.; Sim & McBurney, 6th Floor, 330 University Avenue, Toronto, Ontario M5G 1R7 (CA).
- (22) International Filing Date: 16 March 2000 (16.03.2000) (81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/268,347 16 March 1999 (16.03.1999) US (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 09/268,347 (CIP) Filed on 16 March 1999 (16.03.1999)
- (71) Applicant (for all designated States except US): CON-NAUGHT LABORATORIES LIMITED [CA/CA]; 1755 Steeles Avenue, Toronto, Ontario M2R 3T4 (CA). Published: — with international search report
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): LOOSMORE, Sheena, M. [CA/CA]; 70 Crawford Rose Drive, Aurora, Ontario L4G 4R4 (CA). YANG, Yan-Ping [CA/CA]; Apt. 709, 120 Torresdale Avenue, Willowdale, Ontario (88) Date of publication of the international search report: 2 August 2001
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 00/55191 A3

(54) Title: RECOMBINANT HAEMOPHILUS INFLUENZAE ADHESIN PROTEINS

(57) Abstract: Recombinant production of Hia protein, in full-length and N-terminally truncated forms, of non-typeable strains of *Haemophilus influenzae*, is described. The nucleic acid and deduced amino acid sequences of Hia genes of various strains of non-typeable and type c *Haemophilus influenzae* also are described.

【手続補正書】

【提出日】平成13年6月22日(2001.6.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

インフルエンザ菌（ヘモフィルス・インフルエンジー（*Haemophilus influenzae*））の菌株のインフルエンザ菌アドヘシン（*Hia*）タンパク質をエンコードしている単離され精製された核酸分子であって、

（a）図18、20、21、22、23、24および25に示される配列（配列番号23、27、29、31、33、35、37）からなる群から選択されるDNA配列、または

（b）図18、20、21、22、23、24および25に示される配列（配列番号24、28、30、32、34、36、38）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するインフルエンザ菌アドヘシン（*rHia*）タンパク質をエンコードしているDNA配列を有する単離され精製された核酸分子。

【請求項2】

インフルエンザ菌の菌株のN末端切断型インフルエンザ菌アドヘシン（*Hia*）タンパク質をエンコードしており、

配列番号7と配列番号15

配列番号9と配列番号15

配列番号11と配列番号15

配列番号13と配列番号15

配列番号55と配列番号57

からなる群から選択されるヌクレオチドの1対によって増幅可能な、単離され精製された核酸分子。

【請求項3】

封入体として発現可能なインフルエンザ菌の菌株のN末端切断型インフルエンザ菌アドヘシン（*Hia*）タンパク質をエンコードしており、前記N末端切断型タンパク質がヒトの上皮細胞に結合するための能力を有する、単離され精製された核酸。

【請求項4】

インフルエンザ菌の菌株11のE21、T33、V38およびN52切断部およびインフルエンザ菌の菌株33のV38切断部からなる群から選択される切断型*Hia*タンパク質をエンコードしている、請求項3に記載の核酸分子

【請求項5】

請求項1に記載の前記核酸分子を含む宿主を形質転換するためのベクター。

【請求項6】

請求項2から4に記載の前記核酸分子を含む宿主を形質転換するためのベクター。

【請求項7】

プラスミドベクターである、請求項5または6に記載のベクター。

【請求項8】

前記プラスミドベクターが、

図1A中に示されるDS-2008-2-3

図5A中に示されるDS-2186-1-1

図5A中に示されるDS-2201-1

図5A中に示されるDS-2186-2-1

図5A中に示されるDS-2168-2-6

図32中に示されるIA-191-3-1

からなる群から選択されるプラスミドの同定特性を有する、請求項 7 に記載のベクター。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の完全長のインフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質または請求項 2 から 4 のいずれか一項に記載の N 末端切断型インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質および前記完全長または切断型 H i a タンパク質を発現するために前記核酸分子に作用的に結合しているプロモーターを含む、宿主を形質転換するためのベクター。

【請求項 10】

大腸菌の遺伝子をさらに含む、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 11】

プラスミドベクターである、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 12】

前記プラスミドベクターが、

図 6 A 中に示される B K - 9 6 - 2 - 1 1

図 7 A 中に示される D S - 2 2 4 2 - 1

図 7 A 中に示される D S - 2 2 4 2 - 2

図 8 A 中に示される D S - 2 3 4 0 - 2 - 3

図 9 A 中に示される D S - 2 4 4 7 - 2

図 9 B 中に示される D S - 2 4 4 8 - 1 7

図 3 2 中に示される J B - 2 9 3 0 - 3

からなる群から選択されるプラスミドベクターの同定特性を有する請求項 11 に記載のベクター。

【請求項 13】

請求項 5、6 または 9 に記載のベクターによって形質転換され、ヘモフィルスの分類不能型菌株の防御性インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質を発現する宿主細胞。

【請求項 14】

大腸菌の菌株である、請求項 13 に記載の宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の形質転換された大腸菌またはその免疫原性断片によって産生可能な、インフルエンザ菌の菌株の組換え防御性インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質。

【請求項 16】

(A) インフルエンザ菌の菌株のインフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質をエンコードしている単離され精製された核酸分子であって、

(a) 図 18、20、21、22、23、24 および 25 に示される配列 (配列番号 23、27、29、31、33、35、37) からなる群から選択される DNA 配列、または

(b) 図 18、20、21、22、23、24 および 25 に示される配列 (配列番号 24、28、30、32、34、36、38) からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するインフルエンザ菌アドヘシン (r H i a) タンパク質をエンコードしている DNA 配列を有する単離され精製された核酸分子、

(B) インフルエンザ菌の菌株の N 末端切断型インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質をエンコードしており、

配列番号 7 と配列番号 15

配列番号 9 と配列番号 15

配列番号 11 と配列番号 15

配列番号 13 と配列番号 15

配列番号 55 と配列番号 57

からなる群から選択されるヌクレオチドの 1 対によって増幅可能な、単離され精製された核酸分子、

(C) 封入体として発現可能なインフルエンザ菌の菌株の切断型インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質をエンコードしており、前記 N 末端切断型タンパク質がヒトの

上皮細胞に結合するための能力を有する、単離され精製された核酸分子、

(D) 請求項 5、8 または 9 に記載の発現ベクターによって形質転換された大腸菌によって産生可能な、インフルエンザ菌の菌株の組換え防御性インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質からなる群から選択される少なくとも 1 つの免疫学的に活性のある成分、および薬学的に許容可能なこれらの担体を含む免疫原性組成物。

【請求項 17】

ヘモフィルスに起因する疾患に対して防御するために宿主への *i n v i t r o* 投与用ワクチンとして製剤化される、請求項 16 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

免疫系の特定の細胞または粘膜表面への送達用の標的分子と組み合わせた、請求項 16 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

マイクロ粒子、カプセル、またはリポソーム調製物として製剤化される、請求項 16 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 20】

アジュバントをさらに含む、請求項 16 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 21】

感受性のある宿主に請求項 16 に記載の免疫原性組成物を有効量投与することを含む、ヘモフィルスに起因する疾患に対する防御を誘導するための方法。

【請求項 22】

前記感受性のある宿主がヒトである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

インフルエンザ菌の分類不能型菌株の防御性インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質の産生のための方法であって、

請求項 6 と同様にベクターによって宿主を形質転換すること、
宿主を成長させてエンコードされている切断型 H i a を発現させること、
前記発現した H i a タンパク質を単離および精製することを含む方法。

【請求項 24】

前記宿主細胞が大腸菌である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記エンコードされている切断型 H i a が封入体内で発現される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記発現した H i a の前記単離および精製が、
成長し形質転換された細胞を破壊して上澄みおよび前記封入体を生成すること、
前記封入体を可溶化して組換え H i a の溶液を生成すること、
クロマトグラフィによって細胞の残骸のない組換え H i a の前記溶液を精製すること、および

前記精製された組換え H i a タンパク質を単離することによって実施される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記ヘモフィルスの分類不能型菌株が菌株 11、33、32、29、M4071、K9、K22 および 12 からなる群から選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

前記ベクターが T7 プロモーターを含み、前記大腸菌が誘導量のラクトースの存在下で培養される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

インフルエンザ菌の菌株の N 末端切断型インフルエンザ菌アドヘシン (H i a) タンパク質をエンコードしている核酸分子を増幅および生成する能力がある 1 対のヌクレオチド配列であって、前記ヌクレオチドの対が、

配列番号 7 と配列番号 15
配列番号 9 と配列番号 15
配列番号 11 と配列番号 15
配列番号 13 と配列番号 15
配列番号 55 と配列番号 57

からなる群から選択される 1 対のヌクレオチド配列。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図 1 A】

T7 プロモーターおよび完全長 NTHi 菌株 11 の h i a 遺伝子を含むプラスミド DS-2008-2-3 の制限地図を示す図である。

【図 1 B】

菌株 11 の h i a 遺伝子を PCR 増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。センス鎖 (5038. SL) : 配列番号 1、エンコードされているアミノ酸配列番号 2 ; アンチセンス鎖 (5039. SL) : 配列番号 3、相補配列番号 4、エンコードされているアミノ酸配列番号 5。制限酵素部位は B、BamH I ; Bg、BgI I I ; H、Hind I I I ; N、Nde I ; Ps、Pst I ; Sty、Sty I である。他の略語は T7 p、T7 プロモーター ; ApR、アンピシリン耐性である。

【図 2】

抗ネイティブ Moraxella catarrhalis の高分子量アドヘシン抗体による、完全長 rHia タンパク質の認識のイムノブロットを示す図である。レーン 1、非誘導型 DS-2043-1 ; レーン 2、4 時間かけて誘導された DS-2043-1 ; レーン 3、非誘導型 DS-2043-2 ; レーン 4、4 時間かけて誘導された DS-2043-2 ; レーン 5、分子量マーカー。DS-2043-1 および DS-2043-2 は、BL21 (DE3) 内の pT7hia (11) の独立したクローンである。

【図 3】

菌株 11 の h i a 遺伝子用の T7hia 遺伝子カセットのタンデムコピーを含むプラスミド DS-2092-1 および DS-2092-40 の構築を示す図である。制限酵素部位は B、BamH I ; Bg、BgI I I ; H、Hind I I I ; Ps、Pst I ; Xb、Xba I である。他の略語は CAP、子牛のアルカリホスファターゼ ; T7 p、T7 プロモーター ; ApR、アンピシリン耐性である。

【図 4】

菌株 11 の H i a タンパク質の切断部位 (配列番号 6) を示す図である。

【図 5 A】

菌株 11 からの切断型 h i a 遺伝子を発現するプラスミドの構築を示す図である。制限酵素部位は B、BamH I ; Bg、BgI I I ; H、Hind I I I ; N、Nde I ; Nhe、Nhe I ; Ps、Pst I ; R、EcoR I ; Sty、Sty I ; Xb、Xba I である。他の略語は T7 p、T7 プロモーター ; ApR、アンピシリン耐性 ; KanR、カナマイシン耐性である。

【図 5 B】

切断型遺伝子用に 5' 断片を PCR 増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。E21 切断部 : センス (5524. SL) : 配列番号 7、エンコードされているアミノ酸配列番号 8 ; T33 切断部 : センス (5525. SL) : 配列番号 9、エンコードされているアミノ酸配列番号 10 ; V38 切断部 : センス (5526. SL) : 配列番号 11、エンコードされているアミノ酸配列番号 12 ; N52 切断部 : センス (5527. SL) : 配列番号 13、エンコードされているアミノ酸配列番号 14 ; アンチセンス

(5528. SL) : 配列番号15、相補配列番号16、エンコードされているアミノ酸配列番号17。

【図6A】

NTHi 菌株11および大腸菌のcer遺伝子からのV38hia遺伝子を含むプラスミドBK-96-2-11の構築を示す図である。制限酵素部位はB、BamH I ; Bg、Bgl I I ; K、Kpn I ; N、Nde I ; P、Pst I ; R、EcoR I ; S、Sal I ; Sm、Sma I ; Sty、Sty I ; Xb、Xba I ; Xho、Xho I である。他の略語はT7p、T7プロモーター ; ApR、アンピシリン耐性 ; KanR、カナマイシン耐性 ; CAP、子牛のアルカリホスファターゼ ; tt1、trpAからの転写ターミネーター1 ; tt2、T7遺伝子10からの転写ターミネーター2である。

【図6B】

複数のクローン部位および転写ターミネーターを構築するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。「R」および「Ps」はEcoR I またはPst I の端部とオーバーラップする末端を示すが、これらの部位を再び生成するわけではない。上側鎖（配列番号50）、下側（配列番号51）。

【図7A】

T7プロモーターおよび完全長のNTHi 菌株33のhia遺伝子、大腸菌のcer遺伝子およびカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドDS-2241-1およびDS-2242-2の構築を示す図である。制限酵素部位はA、AlwN I ; B、BamH I ; Bg、Bgl I I ; H、Hind I I I ; K、Kpn I ; N、Nde I ; Ps、Pst I ; R、EcoR I ; S、Sal I ; Sm、Sma I ; ; Xb、Xba I ; Xho、Xho I である。他の略語はT7p、T7プロモーター ; ApR、アンピシリン耐性 ; KanR、カナマイシン耐性 ; tt1、trpAからの転写ターミネーター1 ; tt2、T7遺伝子10からの転写ターミネーター2である。

【図7B】

鎖（配列番号52）、相補鎖（配列番号53）、およびエンコードされているアミノ酸配列（配列番号54）をコードしている菌株33のhia遺伝子の5'末端を生成するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。

【図8A】

T7プロモーターおよび菌株33からのV38遺伝子、大腸菌のcer遺伝子およびカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドDS-2340-2-3の構築を示す図である。制限酵素部位はB、BamH I ; Bg、Bgl I I ; H、Hind I I I ; N、Nde I ; Ps、Pst I ; R、EcoR I ; S、Sal I ; Sn、SnaB I ; ; Xb、Xba I である。他の略語はT7p、T7プロモーター ; ApR、アンピシリン耐性 ; KanR、カナマイシン耐性 ; tt1、trpAからの転写ターミネーター1 ; tt2、T7遺伝子10からの転写ターミネーター2である。

【図8B】

切断型遺伝子用の5'端をPCR増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。センス（6286. SL） : 配列番号60、エンコードされているアミノ酸配列番号61 ; アンチセンス（6287. SL） : 配列番号18、相補配列番号19、エンコードされているアミノ酸配列番号20。

【図9Aおよび9B】

T7のV38hia（11）およびT7のV38hia（33）遺伝子のタンデムコピーをそれぞれ含むプラスミドDS-2447-2およびDS-2448-17の構築を示す図である。制限酵素部位はB、BamH I ; Bg、Bgl I I ; H、Hind I I I ; Ps、Pst I ; R、EcoR I ; S、Sal I ; Xb、Xba I である。他の略語はT7p、T7プロモーター ; ApR、アンピシリン耐性 ; KanR、カナマイシン耐性 ; CAP、子牛のアルカリホスファターゼ ; tt1、trpAからの転写ターミネーター1 ; tt2、T7遺伝子10からの転写ターミネーター2である。

【図 10】

r H i a の発現を示す図である。パネル A：レーン 1、誘導されていない完全長 r H i a (11)；レーン 2、完全長 r H i a (11)；レーン 3、E 2 1 r H i a (11)；レーン 4、T 3 3 r H i a (11)；レーン 5、V 3 8 r H i a (11)；レーン 6、N 5 2 r H i a (11)。パネル B：レーン 1、誘導されていない V 3 8 r H i a (11)；レーン 2、V 3 8 r H i a (11)；レーン 3、V 3 8 r H i a (11) / c e r。

【図 11】

r H i a の精製スキームを示す図である。略語は S P、上澄み；P P T、沈殿；D T T、ジチオスレイトール；O G、オクチルグルコシドであり、(x) は捨てられたことを意味する。

【図 12】

パネル A および B を有し、精製された r H i a の S D S - P A G E 分析を示す図である。パネル A は菌株 11 からの精製された V 3 8 r H i a タンパク質を示し、パネル B は菌株 33 からの V 3 8 r H i a タンパク質を示す。レーン 1、分子量マーカー；レーン 2、全細胞の溶解物；レーン 3、未精製抽出物；レーン 4、精製された r H i a タンパク質。

【図 13】

パネル A、B および C を有し、V 3 8 r H i a (11) の安定性を示す図である。パネル A は、グリセロールなしで 4℃ で保存されたサンプルを示す。パネル B は、20% グリセロールの存在下で 4℃ で保存されたサンプルを示す。パネル C は、20% グリセロールの存在下で -20℃ で保存されたサンプルを示す。レーン 0 は t₀ を示し、レーン 1～8 は 1～8 週間保存されたサンプルを示す。

【図 14】

パネル A および B を有し、C D - 1 マウスの V 3 8 r H i a (11) または V 3 8 r H i a (33) の免疫原性を示す図である。パネル A は単一の免疫化後の応答を示し、パネル B は最初の / 追加の免疫化の応答を示す。

【図 15 A および 15 B】

B A L B / c マウス および モルモットの V 3 8 r H i a (11) の免疫原性を示す図である。図 15 A はマウスにおける抗体の応答を示し、図 15 B はモルモットにおける応答を示す。

【図 16】

チンチラモデルにおける鼻咽頭コロニー形成に対する V 3 8 r H i a (33) の防御能力を示す図である。

【図 17】

追加の h i a 遺伝子を P C R 増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。センス (5040. S L)：配列番号 21、エンコードされているアミノ酸配列番号 22；アンチセンス (5039. S L)：配列番号 3、相補配列番号 4、エンコードされているアミノ酸配列番号 5。

【図 18】

N T H i 菌株 33 からの h i a 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号 23) および演繹アミノ酸配列 (配列番号 24) を示す図である。

【図 19】

N T H i 菌株 32 からの h i a 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号 25) および演繹アミノ酸配列 (配列番号 26) を示す図である。

【図 20】

N T H i 菌株 29 からの h i a 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号 27) および演繹アミノ酸配列 (配列番号 28) を示す図である。

【図 21】

N T H i 菌株 M 4071 からの h i a 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号 29) および演繹アミノ酸配列 (配列番号 30) を示す図である。

【図 22】

NTHi 菌株 K9 からの h i a 遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号 31）および演繹アミノ酸配列（配列番号 32）を示す図である。

【図 23】

NTHi 菌株 K22 からの h i a 遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号 33）および演繹アミノ酸配列（配列番号 34）を示す図である。

【図 24】

c 型菌株 API からの h i a 遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号 35）および演繹アミノ酸配列（配列番号 36）を示す図である。

【図 25】

NTHi 菌株 12 からの h i a 遺伝子座のヌクレオチド配列（配列番号 37）および演繹アミノ酸配列（配列番号 38）を示す図である。上線または下線を引かれた配列は、2つの o r f の接合部を越えて PCR 増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す。センス（6431. SL）：配列番号 39、（6432. SL）配列番号 40；アンチセンス（6295. SL）配列番号 41、（6271. SL）配列番号 42。

【図 26】

米国特許第 5, 646, 259 号において公開されている、NTHi 菌株 11 からの h i a 遺伝子座のヌクレオチド配列（配列番号 43）および演繹アミノ酸配列（配列番号 44）を示す図である。

【図 27】

菌株 12 の h i a 遺伝子座からの上流 O R F（配列番号 45）の配列および b 型インフルエンザウイルス R d から H I 1732 タンパク質（配列番号 46）の一部の整列を示す図である。

【図 28】

H i a（配列番号 24、26、28、34、30、44、32）、H s f（配列番号 47）、および菌株 4223 および L E S-1（配列番号 48、49）からの M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s の高分子量タンパク質（200 kDa）からの一部の配列からのアミノ酸配列の整列を示す図である。配列内の星印はストップコドンを示すが、配列の下部では配列の相同性が示された。ドットは同一の残基を示す。配列の整列は、それぞれのタンパク質のアミノ酸配列を直接比較することによって作製された。

【図 29】

h i a 遺伝子の 5' 端を S44 切断位置で PCR 増幅するために使用されるオリゴヌクレオチドを示す図である。センス（6817. SL）配列番号 55、エンコードされているアミノ酸配列番号 56；アンチセンス（6818. SL）配列番号 57、相補配列番号 58、エンコードされているアミノ酸配列番号 59。

【図 30】

NTHi 菌株 11 からの S44 h i a 遺伝子および大腸菌の c e r 遺伝子および T7 プロモーターを含む、プラスミド JB-2930-3 の構築を示す図である。制限酵素部位は B、B a m H I；B g、B g l I I；K、K p n I；N、N d e I；P、P s t I；R、E c o R I；S、S a l I；S m、S m a I；S t y、S t y I；X b、X b a I；X h o、X h o I である。他の略語は T7 p、T7 プロモーター；A p R、アンピシリン耐性；K a n R、カナマイシン耐性；C A P、子牛のアルカリホスファターゼ；t t 1、t r p A から転写ターミネーター 1；t t 2、T7 遺伝子 10 から転写ターミネーター 2 である。

【図 31】

S44 から r H i a の発現の S D S-P A G E 分析を示す図である。レーン 1、時間 0 での（誘導なしで）p E T S44 ベクターからの発現体；レーン 2、4 時間の誘導後の p E T S44 ベクターからの発現体；レーン 3、4 時間の誘導後の JB-2930-3 からの発現体。

【図 32】

発現試験用に使用された 2 つのベクター、S44 切断型 r H i a の JB-2930-3 お

よび I A - 1 9 1 - 3 - 1 の概略を示す図である。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		I. International Application No. PCT/CA 00/00289
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/285 C12N15/00 A61K38/00		
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 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) STRAND, WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 30519 A (UNIV WASHINGTON ; UNIV ST LOUIS (US); ST GEME JOSEPH W III (US); BA) 3 October 1996 (1996-10-03) abstract example 3 page 82 -page 84	1-27
X	GEME J W S ET AL: "CHARACTERIZATION OF THE GENETIC LOCUS ENCODING HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYPE B SURFACE FIBRILS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, US, WASHINGTON, DC, vol. 178, no. 21, November 1996 (1996-11), pages 6281-6287, XP000863110 ISSN: 0021-9193 the whole document --- -/-	1-27
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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 relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 February 2001		Date of mailing of the international search report 20. 2. 01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Panzica, G

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA 00/00289

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARENKAMP S J ET AL: "IDENTIFICATION OF A SECOND FAMILY OF HIGH-MOLECULAR-WEIGHT ADHESION PROTEINS EXPRESSED BY NON-TYPABLE HAEMOPHILUS INFLUENZAE" MOLECULAR MICROBIOLOGY, GB, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, vol. 19, no. 6, 1996, pages 1215-1223, XP000579265 ISSN: 0950-382X the whole document	1-27
A	ST GEME III J W ET AL: "Prevalence and distribution of the hmw and hia genes and the HMW and Hia adhesins among genetically diverse strains of nontypeable Haemophilus influenzae" INFECTION AND IMMUNITY, US, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, vol. 66, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 364-368, XP002137980 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-27
A	WO 96 02648 A (AMERICAN CYANAMID CO ; BACTEX INC (US); GREEN BRUCE A (US); BRINTON) 1 February 1996 (1996-02-01) the whole document	1-27
A	US 5 843 463 A (KRIVAN HOWARD C ET AL) 1 December 1998 (1998-12-01) the whole document	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		international application No. PCT/CA 00/00289
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.	☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box 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.	☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2.	☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/CA 00 00289

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

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

1. Claims: 1-27 (in part)

An isolated and purified nucleic acid molecule having a sequence as set forth in Seq.Id.No. 23 of the sequence listing, encoding for an aminoacid molecule of an Haemophilus influenzae adhesin having primary structure as set forth in Seq.Id.No.24 of the sequence listing. Vectors for the recombinant production of said adhesin, immunogenic compositions containing the same.

2. Claims: 1-27 (in part)

An isolated and purified nucleic acid molecule having a sequence as set forth in Seq.Id.No. 25 of the sequence listing, encoding for an aminoacid molecule of an Haemophilus influenzae adhesin having primary structure as set forth in Seq.Id.No.26 of the sequence listing. Vectors for the recombinant production of said adhesin, immunogenic compositions containing the same.

3. Claims: 1-27 (in part)

An isolated and purified nucleic acid molecule having a sequence as set forth in Seq.Id.No.27 of the sequence listing, encoding for an aminoacid molecule of an Haemophilus influenzae adhesin having primary structure as set forth in Seq.Id.No.28 of the sequence listing. Vectors for the recombinant production of said adhesin, immunogenic compositions containing the same.

4. Claims: 1-27 (in part)

An isolated and purified nucleic acid molecule having a sequence as set forth in Seq.Id.No.29 of the sequence listing, encoding for an aminoacid molecule of an Haemophilus influenzae adhesin having primary structure as set forth in Seq.Id.No.30 of the sequence listing. Vectors for the recombinant production of said adhesin, immunogenic compositions containing the same.

5. Claims: 1-27 (in part)

An isolated and purified nucleic acid molecule having a sequence as set forth in Seq.Id.No.31 of the sequence listing, encoding for an aminoacid molecule of an Haemophilus influenzae adhesin having primary structure as set forth in Seq.Id.No.32 of the sequence listing. Vectors for the recombinant production of said adhesin, immunogenic

International Application No. PCT/CA 00 00289

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

compositions containing the same.

6. Claims: 1-27 (in part)

An isolated and purified nucleic acid molecule having a sequence as set forth in Seq.Id.No.33 of the sequence listing, encoding for an aminoacid molecule of an Haemophilus influenzae adhesin having primary structure as set forth in Seq.Id.No.34 of the sequence listing. Vectors for the recombinant production of said adhesin, immunogenic compositions containing the same.

7. Claims: 1-27 (in part)

An isolated and purified nucleic acid molecule having a sequence as set forth in Seq.Id.No.35 of the sequence listing, encoding for an aminoacid molecule of an Haemophilus influenzae adhesin having primary structure as set forth in Seq.Id.No.36 of the sequence listing. Vectors for the recombinant production of said adhesin, immunogenic compositions containing the same.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members			I. International Application No. PCT/CA 00/00289	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9630519 A	03-10-1996	US 5646259 A	08-07-1997	
		AU 718392 B	13-04-2000	
		AU 5322896 A	16-10-1996	
		CA 2216292 A	03-10-1996	
		EP 0815236 A	07-01-1998	
		JP 11502713 T	09-03-1999	
WO 9602648 A	01-02-1996	US 5643725 A	01-07-1997	
		US 5834187 A	10-11-1998	
		US 5968769 A	19-10-1999	
		AU 706937 B	01-07-1999	
		AU 3097295 A	16-02-1996	
		CA 2195090 A	01-02-1996	
US 5843463 A	01-12-1998	EP 0771352 A	07-05-1997	
		CA 2138765 A	06-01-1994	
		EP 0647139 A	12-04-1995	
		JP 2805174 B	30-09-1998	
		JP 7509693 T	26-10-1995	
		WO 9400149 A	06-01-1994	
		US 5721115 A	24-02-1998	
		US 5679547 A	21-10-1997	
		AT 176989 T	15-03-1999	
		CA 2098598 A	22-06-1992	
		DE 69130955 D	08-04-1999	
		DE 69130955 T	01-07-1999	
		DK 565590 T	27-09-1999	
		EP 0565590 A	20-10-1993	
		ES 2131066 T	16-07-1999	
JP 6508346 T	22-09-1994			
WO 9210936 A	09-07-1992			

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 31/16	A 6 1 P 31/16	
C 0 7 K 14/195	C 0 7 K 14/195	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
/(C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 R 1:19)	C 1 2 R 1:19	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,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,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ルーズモア、シーナ、エム.

カナダ国 エル４ジー ４アール４ オンタリオ州 オーロラ クロウフォード ローズ ドライブ ７０

(72)発明者 ヤング、ヤン－ピング

カナダ国 エム２アール ３エヌ７ オンタリオ州 ウィロウデイル トーレスデイル アヴェニュー １２０ アパートメント ７０９

(72)発明者 クレイン、マイケル、エイチ.

カナダ国 エム２ピー １ビー９ オンタリオ州 ウィロウデイル モンロー ブールヴァード １６

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 DA06 EA04 GA11 GA19 HA03 HA11
 4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 CD09 CE02 CE06 CE07 CE08 DA01
 DA15
 4B065 AA01Y AA26X AB01 AC14 BA02 BB15 CA24 CA45 CA46
 4C085 AA03 BA55 CC08 DD62 EE06
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA11 DA86 EA29 EA31 EA52 FA74
 GA01 GA22