(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-553854
(P2023-553854A)
(43)公表日　令和5年12月26日(2023.12.26)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/62　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	４Ｂ０６４
Ｃ０７Ｋ　19/00　(2006.01)		Ｃ０７Ｋ	19/00	ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ０７Ｋ　14/245　(2006.01)		Ｃ０７Ｋ	14/245		４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ　15/31　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/31		４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ　15/63　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	４Ｃ０８５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全122頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-533648(P2023-533648)
(86)(22)出願日　令和3年11月30日(2021.11.30)
(85)翻訳文提出日　令和5年7月31日(2023.7.31)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/083659
(87)国際公開番号　WO2022/117595
(87)国際公開日　令和4年6月9日(2022.6.9)
(31)優先権主張番号　20211337.9
(32)優先日　令和2年12月2日(2020.12.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　20214942.3
(32)優先日　令和2年12月17日(2020.12.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　305060279
グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
ベルギー ベー－１３３０ リクセンサール リュ ドランスティテュ ８９
(74)代理人　110002572
弁理士法人平木国際特許事務所
(72)発明者　アダモ，ロベルト
イタリア国 ５３１００ シエナ，ビア フィオレンティーナ １，ジーエスケー ヴァクシンズ エスアールエル
(72)発明者　コッツィ，ロベルタ
イタリア国 ５３１００ シエナ，ビア フィオレンティーナ １，ジーエスケー ヴァクシンズ エスアールエル
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ドナー鎖補完性ＦＩＭＨ

(57)【要約】
本発明は、新規な改変型FimHポリペプチド、それをコードする核酸、および疾患、特に、尿路感染症（UTI）の治療および/または予防でのポリペプチドおよび核酸の使用を目的とする。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
(a) FimH；またはFimHの変異体、断片および/もしくは融合体、ならびに
(b) ドナー鎖補完性アミノ酸配列
を含むかまたはそれからなるアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、(b)は(a)の下流である、上記ポリペプチド。
【請求項２】
アミノ酸配列X-(a)-L-(b)-Yを含むかまたはそれからなるポリペプチドであって、「(a)」はFimHポリペプチド；またはFimHの変異体、断片および/もしくは融合体であり；「L」は任意的な第1のリンカーであり；「(b)」はドナー鎖補完性アミノ酸配列であり、「X」は任意的なN末端アミノ酸配列であり；「Y」は任意的なC末端アミノ酸配列であり、「Y」はFimCもしくはFimHまたはその断片に由来しない、上記ポリペプチド。
【請求項３】
(a)が：
(A) 配列番号1（Genbank登録番号：ELL41155.1（大腸菌J96のFimH））、配列番号2、配列番号100（Genbank登録番号：ABG72591.1（UPEC 536のFimH））、配列番号101、配列番号102（Genbank登録番号：AAN83822.1（CFT073のFimH））、配列番号103、配列番号104（Genbank登録番号：AJE58925.1（大腸菌789のFimH））、配列番号105、配列番号106（Genbank登録番号AAC35864.1、核酸配列AF089840.1に対応する（IHE3034のFimH））、もしくは配列番号107のアミノ酸配列、
(B) 配列番号1（Genbank登録番号：ELL41155.1（大腸菌J96のFimH））、配列番号2 、配列番号100（Genbank登録番号：ABG72591.1（UPEC 536のFimH））、配列番号101、配列番号102（Genbank登録番号：AAN83822.1（CFT073のFimH））、配列番号103、配列番号104（Genbank登録番号：AJE58925.1（大腸菌789のFimH））、配列番号105、配列番号106（Genbank登録番号AAC35864.1、核酸配列AF089840.1に対応する（IHE3034のFimH））、もしくは配列番号107、と比較して1～10箇所の単一アミノ酸変化、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10箇所の単一アミノ酸変化を含むアミノ酸配列、
(C) 配列番号1（Genbank登録番号：ELL41155.1（大腸菌J96のFimH））、配列番号2 、配列番号100（Genbank登録番号：ABG72591.1（UPEC 536のFimH））、配列番号101、配列番号102（Genbank登録番号：AAN83822.1（CFT073のFimH））、配列番号103、配列番号104（Genbank登録番号：AJE58925.1（大腸菌789のFimH））、配列番号105、配列番号106（Genbank登録番号AAC35864.1、核酸配列AF089840.1に対応する（IHE3034のFimH））、もしくは配列番号107、との少なくとも70％の配列同一性、例えば、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％もしくは99％の配列同一性を有するアミノ酸配列、および/または
(D) 配列番号1（Genbank登録番号：ELL41155.1（大腸菌J96のFimH））、配列番号2、配列番号100（Genbank登録番号：ABG72591.1（UPEC 536のFimH））、配列番号101、配列番号102（Genbank登録番号：AAN83822.1（CFT073のFimH））、配列番号103、配列番号104（Genbank登録番号：AJE58925.1（大腸菌789のFimH））、配列番号105、配列番号106（Genbank登録番号AAC35864.1、核酸配列AF089840.1に対応する（IHE3034のFimH））、もしくは配列番号107からの少なくとも10個の連続するアミノ酸、例えば、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、275、280、290もしくは300個の連続するアミノ酸の断片
を含むかまたはそれからなる、請求項1または2に記載のポリペプチド。
【請求項４】
N-グリコシル化またはO-グリコシル化されることが既知であるかまたは予測される1

個以上のアミノ酸が、セリン（S）、アラニン（A）、アスパラギン酸（D）またはグルタミン（Q）を用いて置換される、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチド。
【請求項５】
(a)が、配列番号2と比較して以下のアミノ酸置換のうちの1つ以上：N28S、N91D、N249D、N256D、または配列番号2のそれらの位置に対応する配列番号101、103および105の位置での、例えば、該アミノ酸置換のうちの1、2、3または4つを含む、請求項4に記載のポリペプチド。
【請求項６】
(b)が：
(i) 配列番号3の6～28アミノ酸；またはその断片および/もしくは変異体、あるいは
(ii) 配列番号4の8～36アミノ酸；またはその断片および/もしくは変異体
を含むかまたはそれからなる、請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチド。
【請求項７】
配列番号3の6～28個のアミノ酸が：
(i) 配列番号3のアミノ酸1～28、
(ii) 配列番号3のアミノ酸2～27、
(iii) 配列番号3のアミノ酸3～26、
(iv) 配列番号3のアミノ酸4～25、
(v) 配列番号3のアミノ酸5～24、
(vi) 配列番号3のアミノ酸6～23、
(vii) 配列番号3のアミノ酸7～22、
(viii) 配列番号3のアミノ酸8～21、
(ix) 配列番号3のアミノ酸9～20、
(x) 配列番号3のアミノ酸10～19、
(xi) 配列番号3のアミノ酸11～18、および
(xii) 配列番号3のアミノ酸12～17
からなる群に対応する、請求項6に記載のポリペプチド。
【請求項８】
配列番号4の8～36個のアミノ酸が：
(i) 配列番号4のアミノ酸1～36；またはその断片および/もしくは変異体、
(ii) 配列番号4のアミノ酸2～35；またはその断片および/もしくは変異体、
(iii) 配列番号4のアミノ酸3～34；またはその断片および/もしくは変異体、
(iv) 配列番号4のアミノ酸4～33；またはその断片および/もしくは変異体、
(v) 配列番号4のアミノ酸5～32；またはその断片および/もしくは変異体、
(vi) 配列番号4のアミノ酸6～31；またはその断片および/もしくは変異体、
(vii) 配列番号4のアミノ酸7～30；またはその断片および/もしくは変異体、
(viii) 配列番号4のアミノ酸8～29；またはその断片および/もしくは変異体、
(ix) 配列番号4のアミノ酸9～28；またはその断片および/もしくは変異体、
(x) 配列番号4のアミノ酸10～27；またはその断片および/もしくは変異体、
(xi) 配列番号4のアミノ酸11～26；またはその断片および/もしくは変異体、
(xii) 配列番号4のアミノ酸12～25；またはその断片および/もしくは変異体、
(xiii) 配列番号4のアミノ酸13～24；またはその断片および/もしくは変異体、
(xiv) 配列番号4のアミノ酸14～23；またはその断片および/もしくは変異体、
(xv) 配列番号4のアミノ酸15～24；またはその断片および/もしくは変異体、ならびに
(xvi) 配列番号4のアミノ酸16～23；またはその断片および/もしくは変異体
からなる群に対応する、請求項6に記載のポリペプチド。
【請求項９】
(b)が：
(A) 配列番号5もしくは配列番号6のアミノ酸配列、

(B) 配列番号5もしくは配列番号6と比較して1～10箇所の単一アミノ酸変化、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10箇所の単一アミノ酸変化を含むアミノ酸配列、
(C) 配列番号5からの少なくとも7個の連続するアミノ酸、例えば、配列番号5からの少なくとも8、9、10、11、12、もしくは13個の連続するアミノ酸の断片、または
(D) 配列番号6からの少なくとも7個の連続するアミノ酸、例えば、配列番号6からの少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、もしくは18個の連続するアミノ酸の断片
を含むかまたはそれからなる、請求項1～8のいずれか1項に記載のポリペプチド。
【請求項１０】
(b)が、配列番号5に従うアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、請求項1または2に記載のポリペプチド。
【請求項１１】
(b)が：
(i) (a)のC末端に直接的に連結されるか、または
(ii) 第1のリンカーを介して(a)のC末端に連結される、
請求項1～10のいずれか1項に記載のポリペプチド。
【請求項１２】
(ii) 前記第1のリンカーまたは「L」が、2～20個のアミノ酸、例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸を含むかまたはそれからなる、請求項2または11に記載のポリペプチド。
【請求項１３】
前記第1のリンカーがプロリンによって始まる、請求項2または12に記載のポリペプチド。
【請求項１４】
前記第1のリンカーが極性アミノ酸を含むかまたはそれからなり、例えば、第1のリンカーが完全に極性アミノ酸から構成されるか、または第1のリンカーがプロリンによって始まる場合、残りのアミノ酸が極性である、請求項2、11～13のいずれか1項に記載のポリペプチド。
【請求項１５】
前記第1のリンカーが：
(i) PGDGN［配列番号7］、またはその変異体もしくは融合体、あるいは
(ii) DNKQ［配列番号8］、またはその変異体もしくは融合体
を含むかまたはそれからなる、請求項2、11～14のいずれか1項に記載のポリペプチド。
【請求項１６】
N末端、C末端および/または内部的に、タンパク質精製親和性タグ、例えば、6、7、8、9または10個の連続するヒスチジンを含む、請求項1～15のいずれか1項に記載のポリペプチド。
【請求項１７】
前記ポリペプチドまたは「X」が：
(i) (a)の上流、または
(ii) 該ポリペプチドのN末端
に細胞分泌リーダー配列を含む、請求項1～16のいずれか1項に記載のポリペプチド。
【請求項１８】
前記細胞分泌リーダー配列が：
(i) METDTLLLWVLLLWVPGSTGD［配列番号9］、またはその変異体もしくは融合体、
(ii) METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLAL［配列番号10］、またはその変異体もしくは融合体、
(iii) MRLLAKIICLMLWAICVA［配列番号11］、またはその変異体もしくは融合

体、
(iv) MGWSCIILFLVATATGVHS［配列番号12］、またはその変異体もしくは融合体、
(v) METPAELLFLLLLWLPDTTG［配列番号13］、またはその変異体もしくは融合体、
(vi) METDTLLLWVLLLWVPGSTG［配列番号108］、またはその変異体もしくは融合体、あるいは
(vii) MEFGLSWVFLVAILEGVHC［配列番号14］、またはその変異体もしくは融合体
からなる群より選択される、請求項17に記載のポリペプチド。

【請求項１９】
N末端またはC末端にナノ粒子ドメインを含み、任意により、「X」または「Y」がナノ粒子ドメインを含む、請求項1～18のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項２０】
前記ナノ粒子ドメインが：
(i) フェリチン（例えば、［配列番号15］もしくは［配列番号109］（ヘリコバクター・ピロリ）、［配列番号16］（大腸菌）、または［配列番号149］～［配列番号152］のうちのいずれか1つ（安定化型大腸菌））、またはその変異体および/もしくは断片、
(ii) iMX313（例えば、［配列番号17］）、またはその変異体および/もしくは断片、
(iii) mI3（例えば、［配列番号18］）、またはその変異体および/もしくは断片、
(iv) エンカプスリン（例えば、［配列番号19］）、またはその変異体および/もしくは断片、あるいは
(v) アシネトバクターファージAP205外被タンパク質（NCBI参照配列：NP_085472.1）などの自己アセンブリ性ウイルス外被タンパク質、B型肝炎ウイルスコアタンパク質（HBc）［配列番号110］、もしくはバクテリオファージQβ［配列番号111］、またはその変異体および/もしくは断片
からなる群より選択される、請求項19に記載のポリペプチド。

【請求項２１】
前記ナノ粒子ドメインが：
(i) 前記ポリペプチドに直接的に連結されるか、または
(ii) 第2のリンカーを介して該ポリペプチドに連結される、
請求項19または20に記載のポリペプチド。

【請求項２２】
前記第2のリンカーが、2～20個のアミノ酸、例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸を含むかまたはそれからなる、請求項19～22のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項２３】
前記第2のリンカーが、グリシン（G）および/またはセリン（S）を含むかまたはそれからなる、請求項19～22のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項２４】
前記第2のリンカーが：
(i) GSSGSGSGS［配列番号112］またはその変異体もしくは融合体、
(ii) GGSGS［配列番号113］またはその変異体もしくは融合体、
(iii) GGSまたはその変異体もしくは融合体、
(iv) SGSHHHHHHHHGGS［配列番号114］またはその変異体もしくは融合体、
(v) AKFVAAWTLKAAA［配列番号115］またはその変異体もしくは融合体、
(vi) GGGGSLVPRGSGGGGS［配列番号116］またはその変異体もしくは融合体、
(vii) EAAAKEAAAKEAAAKA［配列番号117］またはその変異体もしくは融合体、

(viii) SGSFVAAWTLKAAAGGS［配列番号118］またはその変異体もしくは融合体、および
(ix) SGSGSGGGGGGS［配列番号119］またはその変異体もしくは融合体
からなる群より選択される、請求項19～23のいずれか1項に記載のポリペプチド。
【請求項２５】
前記ナノ粒子ドメインが：
(i) (a)の上流、
(ii) 前記ポリペプチドのN末端、
(iii) (b)の下流、または
(iv) 該ポリペプチドのC末端
にある、請求項19～24のいずれか1項に記載のポリペプチド。
【請求項２６】
(i) アミノ酸配列配列番号16に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、もしくは99％の配列同一性を有し、かつ配列番号16の残基34にアライメントする位置でのグリシン（G）（T34G突然変異）、配列番号16の残基70にアライメントする位置でのアスパラギン酸（D）（N70D突然変異）、配列番号16の残基72にアライメントする位置でのイソロイシン（I）（V72I突然変異）および配列番号16の残基124にアライメントする位置でのアラニン（A）（S124A突然変異）からなる群より選択される1箇所以上の突然変異を有し；
(ii) アミノ酸配列配列番号16に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有し、かつ配列番号16の残基34にアライメントする位置でのグリシン（G）（T34G突然変異）、配列番号16の残基70にアライメントする位置でのアスパラギン酸（D）（N70D突然変異）、配列番号16の残基72にアライメントする位置でのイソロイシン（I）（V72I突然変異）および配列番号16の残基124にアライメントする位置でのアラニン（A）（S124A突然変異）を有し、任意により、ポリペプチド単量体がアミノ酸配列配列番号149に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；
(iii) アミノ酸配列配列番号16に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有し、かつ配列番号16の残基34にアライメントする位置でのグリシン（G）（T34G突然変異）、配列番号16の残基72にアライメントする位置でのイソロイシン（I）（V72I突然変異）および配列番号16の残基124にアライメントする位置でのアラニン（A）（S124A突然変異）を有し、任意により、ポリペプチド単量体がアミノ酸配列配列番号150に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；
(iv) アミノ酸配列配列番号16に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号16の残基34にアライメントする位置でのグリシン（G）（T34G突然変異）、および配列番号16の残基124にアライメントする位置でのアラニン（A）（S124A突然変異）を有し、任意により、ポリペプチド単量体が、アミノ酸配列配列番号151に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；
(v) アミノ酸配列配列番号16に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有し、かつ配列番号16の残基34にアライメントする位置でのグリシ

ン（G）（T34G突然変異）を有し、任意により、ポリペプチド単量体が、アミノ酸配列配列番号152に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、
アミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、ポリペプチド単量体。
【請求項２７】
配列番号149、配列番号150、配列番号151、および配列番号152からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項26に記載のポリペプチド単量体。
【請求項２８】
請求項26または27に記載のポリペプチド単量体を含む、ナノ粒子。
【請求項２９】
前記ナノ粒子がホモオリゴマーである、請求項29に記載のナノ粒子。
【請求項３０】
前記ナノ粒子の外表面構造または内表面構造が1種以上の抗原および/または免疫刺激剤を担持する、請求項28または29に記載のナノ粒子。
【請求項３１】
前記抗原が、請求項1～18のいずれか1項に記載のポリペプチドを含むかまたはそれからなる、請求項30に記載のナノ粒子。
【請求項３２】
配列番号130または153のアミノ酸配列に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、請求項31に記載のナノ粒子。
【請求項３３】
(i) 配列番号20、またはその変異体および/もしくは断片、
(ii) 配列番号21、またはその変異体および/もしくは断片、
(iii) 配列番号22、またはその変異体および/もしくは断片、
(iv) 配列番号23、またはその変異体および/もしくは断片、
(v) 配列番号24、またはその変異体および/もしくは断片、
(vi) 配列番号25、またはその変異体および/もしくは断片、
(vii) 配列番号26、またはその変異体および/もしくは断片、
(viii) 配列番号27、またはその変異体および/もしくは断片、
(ix) 配列番号28、またはその変異体および/もしくは断片、
(x) 配列番号29、またはその変異体および/もしくは断片、
(xi) 配列番号30、またはその変異体および/もしくは断片、
(xii) 配列番号31、またはその変異体および/もしくは断片、
(xiii) 配列番号32、またはその変異体および/もしくは断片、
(xiv) 配列番号33、またはその変異体および/もしくは断片、
(xv) 配列番号34、またはその変異体および/もしくは断片、
(xvi) 配列番号35、またはその変異体および/もしくは断片、
(xvii) 配列番号36、またはその変異体および/もしくは断片、
(xviii) 配列番号37、またはその変異体および/もしくは断片、
(xix) 配列番号38、またはその変異体および/もしくは断片、
(xx) 配列番号39、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxi) 配列番号40、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxii) 配列番号41、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxiii) 配列番号42、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxiv) 配列番号43、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxv) 配列番号44、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxvi) 配列番号79、またはその変異体および/もしくは断片、

(xxvii) 配列番号80、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxviii) 配列番号81、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxix) 配列番号82、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxx) 配列番号83、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxxi) 配列番号84、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxxii) 配列番号85、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxxiii) 配列番号86、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxxiv) 配列番号87、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxxv) 配列番号88、またはその変異体および/もしくは断片、
(xxxvi) 配列番号89、またはその変異体および/もしくは断片、ならびに
(xxxvii) 配列番号120～124、配列番号129～143および153のうちのいずれか1つまたはその変異体および/もしくは断片
に対応するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、請求項1～32のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項３４】
配列番号123または配列番号124に対して少なくとも70％の配列同一性、例えば、配列番号123または配列番号124に対して80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、請求項1～33のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項３５】
前記ポリペプチドのマンノース結合性が、生来型FimCと複合体化された生来型FimH（FimHC複合体）のものよりも少なくとも20％低く、例えば、少なくとも30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％低い、請求項1～34のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項３６】
FimHが、低親和性コンホメーション、すなわち、緊張（T）状態にある、請求項1～35のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項３７】
前記ポリペプチドにより誘導される自己凝集が、生来型FimHのものよりも少なくとも20％低く、例えば、少なくとも30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％低い、請求項1～36のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項３８】
少なくとも20％まで、例えば、少なくとも30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、または100％まで、細菌接着を阻害することが可能である、請求項1～37のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項３９】
前記ポリペプチドの抗FimH免疫原性が、生来型FimCと複合体化された生来型FimH（特に、高親和性コンホメーションである弛緩（R）状態（上記を参照されたい）にあるFimHを含む）のものよりも少なくとも20％高く、例えば、少なくとも30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、150％、200％、300％、400％または500％高い、請求項1～38のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項４０】
少なくとも2倍まで、例えば、少なくとも3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、または100倍まで、モルモット赤血球の血球凝集を阻害することが可能である、請求項1～39のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項４１】
請求項1～40のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする核酸、例えば、配列番号45～77、90～99のいずれか1つによりコードされるDNAもしくはRNAまたはその変異体および/もしくは断片。

【請求項４２】
選択された原核細胞または真核細胞、例えば、酵母細胞（例えば、サッカロマイセス・セレビシエ、ピキア・パストリス）、昆虫細胞（例えば、ツマジロクサヨトウSf21細胞、またはSf9細胞）、または哺乳動物細胞（Expi293、Expi293GNTI、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、およびヒト胎児腎臓293細胞（HEK293））での発現に対してコドン最適化されている、請求項42に記載の核酸。
【請求項４３】
請求項41または42に記載の核酸を含むベクター。
【請求項４４】
プラスミド、例えば、発現プラスミドである、請求項43に記載のベクター。
【請求項４５】
前記プラスミドが、pCDNA3.1（Life Technologies社）、pCDNA3.4（Life Technologies社）、pFUSE、pBROAD、pSEC、pCMV、pDSG-IBA、およびpHEK293 Ultraからなる群より選択されるか、またはpACYCDuet-1、pTrcHis2A、pET21、pET15TEV、pET22b+、pET303/CT-HIS、PET303/CT、pBAD/Myc-His A、pET303、pET24b(+)の群より選択される、請求項43または44に記載のベクター。
【請求項４６】
ウイルスベクター、例えば、RNAウイルスベクターである、請求項43に記載のベクター。
【請求項４７】
請求項41もしくは42に記載の核酸または請求項43～46のいずれか1項に記載のベクターを含む細胞。
【請求項４８】
N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI（GnTI）活性を有しない、請求項46に記載の細胞。
【請求項４９】
宿主細胞が、Expi293、Expi293GNTI（Life Technologies社）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、NIH-3T3細胞、293-T細胞、Vero細胞、HeLa細胞、PERC.6細胞（ECACC受託番号96022940）、Hep G2細胞、MRC-5（ATCC CCL-171）、WI-38（ATCC CCL-75）、胎児アカゲザル肺細胞（ATCC CL-160）、Madin-Darbyウシ腎臓（「MDBK」）細胞、Madin-Darbyイヌ腎臓（「MDCK」）細胞（例えば、MDCK（NBL2）、ATCC CCL34；またはMDCK 33016、DSM ACC 2219）、BHK21-Fなどのベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、HKCC細胞、およびヒト胎児腎臓293細胞（HEK293）からなる群より選択される、請求項47または48に記載の細胞。
【請求項５０】
宿主細胞が、BL21（DE3）株、HMS174（DE3）株、Origami2（DE3）株、BL21DE3T1r株またはT7shuffle express株由来の大腸菌から選択される、請求項47に記載の細胞。
【請求項５１】
請求項47～50のいずれか1項に記載の細胞を含む細胞培養物。
【請求項５２】
好適な条件下かつ好適な培地中で請求項47～50のいずれか1項に規定される通りの細胞中でタンパク質を発現させ、それによりコードされたポリペプチドを発現させるステップにより、請求項1～40のいずれか1項に規定されるポリペプチドを生成する方法。
【請求項５３】
前記発現されたポリペプチドを培養細胞および/または培養培地から回収するステップ、ならびに任意により該回収されたポリペプチドを精製するステップをさらに含む、請求項52に記載の方法。
【請求項５４】
請求項1～40のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項41もしくは42に記載の核

酸、または請求項43～46のいずれか1項に記載のベクターを含む、医薬組成物。
【請求項５５】
請求項1～40のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項41もしくは42に記載の核酸、または請求項43～46のいずれか1項に記載のベクターを含む、ワクチン。
【請求項５６】
アジュバントをさらに含む、請求項55に記載のワクチン。
【請求項５７】
前記アジュバントが、3D-MPL、QS21およびリポソーム、例えば、コレステロールを含むリポソームのうちのいずれか1つを含む、請求項56に記載のワクチン。
【請求項５８】
前記アジュバントが、3D-MPL、QS21およびコレステロールを含むリポソームを含む、請求項57に記載のワクチン。
【請求項５９】
1または2用量後に保護免疫応答を生起する、請求項55～58のいずれか1項に記載のワクチン。
【請求項６０】
医薬での使用のための、請求項1～40のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項41もしくは42に記載の核酸または請求項43～46のいずれか1項に記載のベクター、または請求項55～59のいずれか1項に記載のワクチン。
【請求項６１】
哺乳動物での免疫応答の生起での使用のための、例えば、1種以上の疾患を治療および/または予防するための、請求項1～40のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項41もしくは42に記載の核酸または請求項43～46のいずれか1項に記載のベクター、または請求項55～59のいずれか1項に記載のワクチン。
【請求項６２】
哺乳動物での免疫応答を生起するための、例えば、1種以上の疾患を治療および/または予防するための、請求項1～40のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項41もしくは42に記載の核酸または請求項43～46のいずれか1項に記載のベクター、または請求項55～59のいずれか1項に記載のワクチンの使用。
【請求項６３】
哺乳動物での免疫応答を生起するための、例えば、1種以上の疾患を治療および/または予防するための医薬の製造のための、請求項1～40のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項41もしくは42に記載の核酸または請求項43～46のいずれか1項に記載のベクター、または請求項55～59のいずれか1項に記載のワクチンの使用。
【請求項６４】
有効量の請求項1～40のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項41もしくは42に記載の核酸または請求項43～46のいずれか1項に記載のベクター、または請求項55～59のいずれか1項に記載のワクチンを哺乳動物に投与するステップを含むかまたはそれからなる、哺乳動物での免疫応答を生起する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
配列表
本出願は、その全体で参照により本明細書中に組み入れられる、ASCIIテキストファイル形式の電子的に提出された配列表（VB67013 FF Seq List_ST25.txt；サイズ：356.838バイト；および作成日：2021年10月27日）を含む。
【０００２】
発明の技術分野
本発明は、新規な改変型FimHポリペプチド、それをコードする核酸、ならびに疾患、特に尿路感染症（UTI）の治療および/または予防でのポリペプチドおよび核酸の使用を

目的とする。

【背景技術】

【０００３】

尿路病原性大腸菌（UPEC）は、すべての尿路感染症（UTI）のうちの約85％の原因である（A. R. Ronald, Urinary tract infection in adults: Research priorities and strategies. Int. J. Antimicrob. Agents 17, 343-348; 2001）。1型線毛の先端局在性アドヘシンであるFimHは、尿路上皮表面上でのマンノシル化受容体への結合性により、UTIの間にUPECが膀胱上皮に定着する（colonize）ことを可能にする（M. A. Mulvey, Induction and evasion of host defences by type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli. Science 282, 1494-1497; 1998）。

【０００４】

FimHは、相可変（phase variable）であり、環境シグナルがその発現に影響を与え、それにより細菌が付着し、かつ排尿により除去されることを回避することを可能にする（Infect. Immun. 1998, 66, 3303）。抗FimH IgGは、マウスおよびサルにおいて膀胱への細菌接着を阻害することが公知であり、保護作用は、尿中の抗FimH IgGの存在に関連付けられた（Langermann S, et al. Science. 1997 Apr 25;276(5312):607-11；Langermann S, et al. J Infect Dis. 2000 Feb;181(2):774-8）。尿生殖路中の血清機能的IgGの浸出が、細菌接着の阻害を担うようである。

【０００５】

FimHタンパク質は、3つのループにより形成されるポケットを介してマンノースに結合するN末端レクチンドメイン（$FimH_L$）、5アミノ酸リンカーおよびFimHを線毛に付着させるC末端ピリン（pilin）ドメイン（$FimH_P$）から構成される。

【０００６】

線毛アセンブリの異なる段階でのFimHの結晶構造は、$FimH_P$が、ペリプラズム中のシャペロンFimCとの、および線毛がアセンブリする時点でのFimGとのドナー鎖補完相互作用を介して安定化される、不完全免疫グロブリン（Ig）様フォールディングにより構成されることを示した。$FimH_P$は単一コンホメーションを採るが、$FimH_L$は、マンノースに対する異なる親和性を有する少なくとも2種類のコンホメーション状態：高親和性コンホメーションである弛緩（R）状態、および低親和性コンホメーションである緊張（T）状態を想定することができる（D. Choudhury, X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic Escherichia coli. Science 285, 1061-1066 (1999)；C.-S. Hung, Structural basis of tropism of Escherichia coli to the bladder during urinary tract infection. Mol. Microbiol. 44, 903-915 (2002)；I. Le Trong, Structural basis for mechanical force regulation of the adhesin FimH via finger trap-like β sheet twisting. Cell 141, 645-655 (2010)；G. Phan, Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC-FimH substrate. Nature 474, 49-53 (2011)；S. Geibel, Structural and energetic basis of folded-protein transport by the FimD usher. Nature 496, 243-246 (2013)）。

【０００７】

FimHがFimCに結合する際には、FimHは、$FimH_L$および$FimH_P$が互いに相互作用せず、かつ$FimH_L$が高親和性マンノース結合性状態にある伸長されたコンホメーションを採る。FimHがFimGに結合する際には、FimHは、$FimH_L$および$FimH_P$が密接に相互作用し、かつ$FimH_L$が低親和性マンノース結合性状態にあるコンパクトなコンホメーションを採る。$FimH_P$は、$FimH_L$の基部との相互作用を通して$FimH_L$がマンノースに結合する能力をアロステリックに低下させることができ；マンノースが$FimH_L$に結合することにより、$FimH_P$と相互作用しない$FimH_L$コンホメーションが誘導される。

【０００８】

以前には、低親和性コンホメーションにある$FimH_L$に対するモノクローナル抗体が、マンノース結合後形態に対するモノクローナル抗体と比較して、膀胱に対する接着の良好

な阻害をもたらすことが報告されている（Tchesnokova et al., 2011, ‘Type 1 Fimbrial Adhesin FimH Elicits an Immune Response That Enhances Cell Adhesion of Escherichia coli’ Infect. Immun. 79(10): 3895-3904）。

【０００９】

その未補完ピリンドメインを伴うFimHは、不安定であり、凝集しやすい。注目すべきことに、FimHは、ペリプラズムタンパク質FimCとの複合体中の抗原として典型的に用いられてきた。FimC成分は、マウスにおいて細菌定着の低減に直接的に寄与しなかったが、FimH安定化に寄与し、このことが、FimHを分解から保護する（Science 1997, 276, 607; FEMS Microbiol. Lett. 2000, 188, 147）。安定なFimHタンパク質を生成するために、FimGドナー鎖ペプチド（FimG残基1～14）がin vitroで付加され、線毛アセンブリシャペロンFimCがFimHから離された（Sauer MM, et al. Nat Commun. 2016 Mar 7;7:10738.）。$FimH_L$の低親和性コンホメーションもまた、マンノースポケットを封鎖するジスルフィド架橋を挿入して得られた（Kisiela DI, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 19;110(47):19089-94）。

【００１０】

FimHC複合体の使用は、顕著な製造負荷を含み、すなわち、その後に一緒に複合体化させなければならない2種類のポリペプチドの製造は、抗原が有効であるためには複合体の安定性が保存中に維持されなければならないので、望ましくない複雑かつ顕著な保存の問題を提示する。ジスルフィド架橋を有する$FimH_L$の免疫原性は、この部分の低い分子量に起因して可変的であり、$FimH_L$ドメイン中のジスルフィド架橋を有する完全FimHは、発現させることが困難であることが証明された。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】A. R. Ronald, Urinary tract infection in adults: Research priorities and strategies. Int. J. Antimicrob. Agents 17, 343-348; 2001

【非特許文献２】M. A. Mulvey, Induction and evasion of host defences by type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli. Science 282, 1494-1497; 1998

【非特許文献３】Infect. Immun. 1998, 66, 3303

【非特許文献４】Langermann S, et al. Science. 1997 Apr 25;276(5312):607-11

【非特許文献５】Langermann S, et al. J Infect Dis. 2000 Feb;181(2):774-8

【非特許文献６】D. Choudhury, X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic Escherichia coli. Science 285, 1061-1066 (1999)

【非特許文献７】C.-S. Hung, Structural basis of tropism of Escherichia coli to the bladder during urinary tract infection. Mol. Microbiol. 44, 903-915 (2002)

【非特許文献８】I. Le Trong, Structural basis for mechanical force regulation of the adhesin FimH via finger trap-like β sheet twisting. Cell 141, 645-655 (2010)

【非特許文献９】G. Phan, Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC-FimH substrate. Nature 474, 49-53 (2011)

【非特許文献１０】S. Geibel, Structural and energetic basis of folded-protein transport by the FimD usher. Nature 496, 243-246 (2013)

【非特許文献１１】Tchesnokova et al., 2011, ‘Type 1 Fimbrial Adhesin FimH Elicits an Immune Response That Enhances Cell Adhesion of Escherichia coli’ Infect. Immun. 79(10): 3895-3904

【非特許文献１２】Science 1997, 276, 607; FEMS Microbiol. Lett. 2000, 1

88, 147
【非特許文献１３】Sauer MM, et al. Nat Commun. 2016 Mar 7;7:10738.
【非特許文献１４】Kisiela DI, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 19;110(47):19089-94
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１２】
したがって、免疫学的に効果的であり、かつ大規模での製造に関して実行可能であるExPEC抗原に対する目立った必要性が残っている。
【課題を解決するための手段】
【００１３】
重要なことに、FimCは、その伸長された結合後様形態にあるFimHを安定化する（Nat. Commun. 2016, 7, 10738）。本発明者らは、驚くべきことに、構造ガイド設計により、FimCの非存在下でのFimHの結合前形態を安定化することおよび/または尿道上皮細胞に対する細菌接着を阻害する生成された抗FimH抗体の能力を改善することが可能であることを見出した。
【００１４】
したがって、本発明の第1の態様は、
(a) FimH；またはFimHの変異体、断片および/もしくは融合体、ならびに
(b) ドナー鎖補完性アミノ酸配列
を含むかまたはそれらからなるアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供し、このとき、(b)は(a)の下流である。
【００１５】
「下流」とは、ポリペプチドの一次アミノ酸配列内で、参照配列に対してそれぞれのポリペプチドのC末端により近接して位置するアミノ酸配列を意味するかまたは含む。
【００１６】
代替的または追加的に、本発明のポリペプチドは、アミノ酸配列X-(a)-L-(b)-Yを含むかまたはそれからなり、このとき、「(a)」はFimHポリペプチド；またはFimHの変異体、断片および/もしくは融合体であり；「L」は任意的な第1のリンカーであり；「(b)」はドナー鎖補完性アミノ酸配列であり、「X」は任意的なN末端アミノ酸配列であり；「Y」は任意的なC末端アミノ酸配列であり、このとき、「Y」はFimCもしくはFimHまたはその断片に由来しない。
【００１７】
「ドナー鎖補完性アミノ酸配列」とは、(a) 高親和性コンホメーションである弛緩（R）状態または(b) 低親和性コンホメーションである緊張（T）状態にFimHを維持することが可能なアミノ酸配列を意味する。1つの好ましい実施形態では、ドナー鎖補完性アミノ酸配列は、低親和性コンホメーション、すなわち緊張（T）状態にFimHを維持することが可能である。
【００１８】
「高親和性コンホメーションである弛緩（R）状態」とは、低親和性コンホメーションよりも高親和性コンホメーションでのFimH（特に、それから本発明のポリペプチドが誘導されたかまたは主に誘導されたFimH、特にFimCと複合体化されている場合）のものに近いマンノース結合親和性、例えば、高親和性コンホメーションでのFimHのマンノース結合親和性の少なくとも51%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%、例えばKisiela DI, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 19;110(47):19089-94に開示される通りのK_d＜1.2μMを有することを意味するかまたは含む。
【００１９】
「低親和性コンホメーションである緊張（T）状態」とは、高親和性コンホメーションよりも低親和性コンホメーションでのFimH（特に、それから本発明のポリペプチドが誘

導されたかまたは主に誘導されたFimH、特にFimCと複合体化されている場合）のものに近いマンノース結合親和性、例えば、高親和性コンホメーションでのFimHのマンノース結合親和性の50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満、例えば、Kisiela DI, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 19;110(47):19089-94に開示される通りのK_d 300μM以上（すなわち、検出可能なマンノース結合親和性を有しない）を有することを意味するかまたは含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドは低親和性コンホメーションにあり、例えば、約100μM、200μM、300μM、400μM、500μM、600μM、700μM、800μM、900μM、もしくは1mMのK_dのマンノース結合親和性を有するか、または検出可能なマンノース結合親和性を有しない。

【００２０】

マンノース結合性は、当技術分野で公知のいずれかの好適な手段を用いて決定することができ、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）を用いて、マンノシル化ウシ血清アルブミン（Man-BSA）およびグルコシル化ウシ血清アルブミン（Glc-BSA）（陰性対照）とのFimH構築物の結合性、結合特異性および結合定数を確認することができ、例えば、参照により本明細書中に組み入れられるRabani et al., 2018, ‘Conformational switch of the bacterial adhesin FimH in the absence of the regulatory domain: Engineering a minimalistic allosteric system’ J. Biol. Chem., 293(5): 1835-1849、およびBouckaert J, et al. Mol Microbiol. 2005 Jan;55(2):441-55を参照されたい。

【００２１】

FimHのコンホメーションもまた、当技術分野で公知のいずれかの好適な手段、例えば、表面プラズモン共鳴を用いて、かつ実施例に記載される通りに、コンホメーション抗体の結合性を測定することによって評価することができる。例示的な抗体は、FimHのマンノース結合性ポケットに異なって重複するエピトープを認識することが可能であり、例えば、マンノース結合性ポケットと重複するエピトープ、例えば、マンノース結合性ポケットの1つのみのループに限定されるエピトープに結合する抗体である。例示的な抗体は、国際公開第2016/183501号、またはKisiela DI, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 19;110(47):19089-94、Kisiela DI, et al. PLoS Pathog. 2015 May 14;11(5):e1004857に開示されるものであり、これらは参照により本明細書中に組み入れられる。一実施形態では、コンホメーション抗体は、配列番号125の可変重鎖（VH）配列および配列番号126の可変軽鎖（VL）配列を有する。一実施形態では、コンホメーション抗体は、配列番号127の可変重鎖（VH）配列および配列番号128の可変軽鎖（VL）配列を有する。

【００２２】

QVQLQQSGAELATPGASVKMSCKASGYTSTNYWIHWVKQRPGQGLEWIGYINPTSGYTEYNQNFKDKATLTAD
KSSSTAYMQLTSLTSEDSAVYYCARGVIRDFWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKG
YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSS [配列番号125] - mAb926のVH

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHNNGNTYLEWYLQSPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKLEIK [配列番号126] - mAb926のVL(κ)

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPRDGDTNYNGKFMDKVTLTAD
KSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCEVGRGFYGMDYWGQGTSVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCL
VKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSS [配列番号127] - mAb475のVH

DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVSNVAWYQQKPGQSPKAMIYSASYRYSGVPGRFTGSGSGTDFTLT
INNVQSEDLATYFCQQNSSFPFTFGGGTKLEIK [配列番号128] - mAb475のVL(κ)

【００２３】

用語「アミノ酸」は、本明細書中で用いる場合、標準的な20種類の遺伝子によりコー

ドされるアミノ酸ならびに「D」形態（天然の「L」形態と比較した場合）にあるそれらの対応する立体異性体、ω-アミノ酸および他の天然に存在するアミノ酸、慣用的でないアミノ酸（例えば、α,α-二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸等）および化学的に誘導体化されたアミノ酸（以下を参照されたい）を含む。

【００２４】

つまり、アミノ酸が、「アラニン」または「Ala」または「A」など、具体的に列挙されている場合、この用語は、別途明記されない限り、L-アラニンおよびD-アラニンの両方を意味する。所望の機能的特性がポリペプチドにより保持される限り、他の慣用的でないアミノ酸もまた、本発明のポリペプチドに対して好適な成分であり得る。示されるペプチドに関して、それぞれのコードされるアミノ酸残基は、適切な場合、慣用のアミノ酸の慣用名に対応する一文字名称により表わされる。

【００２５】

「単離された」とは、本発明の特徴（例えば、ポリペプチド）が、天然に見出されることができるものとは異なる文脈で提供されることを意味する。当業者は、「単離された」が、その天然の状態から「人の手によって」変更されていることを意味し、すなわち、天然に見出される場合、その元の環境から変化しているかもしくは取り出されているか、またはその両方であることを理解するであろう。例えば、生存生物中に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、そのような生存生物中では「単離され」ていないが、その天然の状態の共存物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、この用語が本開示で用いられる場合、「単離され」ている。さらに、形質転換、遺伝子操作またはいずれかの他の組み換え法により生物に導入されているポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、そのような形質転換、遺伝子操作または他の組み換え法が天然に存在する生物からそれ以外は区別できない生物を生成する場合を除いて、生存または非生存であり得る当該生物中にまだ存在する場合でさえも、「単離された」と理解されるであろう。

【００２６】

「ポリペプチド」とは、ポリペプチドおよびタンパク質を意味するかまたは含む。

【００２７】

ポリペプチドの「変異体」は、保存的または非保存的のいずれかである挿入、欠失および/または置換を含む。特に、変異体ポリペプチドは、天然に存在しない変異体（すなわち、天然に存在しないかまたは存在することが知られていない）であり得る。変異体は、参照配列との少なくとも50％の配列同一性、例えば、少なくとも60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％または99.5％を有することができる。

【００２８】

「配列同一性」または「同一性」は、パラメータギャップオープンペナルティ＝12およびギャップ伸長ペナルティ＝1を含むアフィンギャップ検索を用いて、MPSRCHプログラム（Oxford Molecular社）に実装される通りのSmith Waterman相同性検索アルゴリズムにより、またはデフォルトパラメータ（例えば、EBLOSUM62スコア付けマトリックスを用いる、ギャップオープニングペナルティ＝10.0、およびギャップ伸長ペナルティ＝0.5を含む）を用いて、Needleman-Wunsch包括アライメントアルゴリズム（例えば、Rubin (2000) Pediatric. Clin. North Am. 47:269-285を参照されたい）により、決定することができる。このアルゴリズムは、EMBOSSパッケージ中のneedleツールに便利に実装されている。別途特定しない限り、本出願が特定の参照配列に対する配列同一性を参照する場合、同一性は、その参照配列の全長にわたって算出されることが意図される。あるいは、パーセント同一性は、当技術分野で周知の方法により、例えば、包括アライメントオプション、スコア付けマトリックスBLOSUM62、オープニングギャップペナルティ－14、伸長ギャップペナルティ－4を用いて、ExPASy施設ウェブサイトwww.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.htmlでLALIGNプログラム（Huang and Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357、その開示が参照により本明細書中に組み入れられる）を用いて、決定することができる。あるいは、2つ

のポリペプチド間のパーセント配列同一性は、好適なコンピュータプログラム、例えば、AlignX、Vector NTI Advance 10（Invitrogen社から）またはGAPプログラム（University of Wisconsin Genetic Computing Groupから）を用いて、決定することができる。

【００２９】

パーセント同一性は、その配列がアライメントされるポリマー（例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド）に関して算出されることが理解されるであろう。

【００３０】

断片および変異体は、当技術分野で周知のタンパク質操作および部位特異的突然変異誘発の方法を用いて作製することができる（例えば、その開示が参照により本明細書中に組み入れられる、Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edition, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい）。

【００３１】

本発明のポリペプチド、またはその断片、変異体もしくは融合体は、修飾または誘導体化されている1個以上のアミノ酸を含むことができることが、当業者により理解されるであろう。

【００３２】

1個以上のアミノ酸の化学的誘導体は、官能性側基との反応により達成することができる。そのような誘導体化された分子としては、例えば、遊離アミノ基が誘導体化されて、アミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボキシベンゾキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基またはホルミル基を形成する分子が挙げられる。遊離カルボキシル基は、誘導体化されて、塩、メチルおよびエチルエステルまたは他の種類のエステルおよびヒドラジドを形成することができる。遊離ヒドロキシル基は、誘導体化されて、O-アシルまたはO-アルキル誘導体を形成することができる。20種類の標準的なアミノ酸の天然に存在するアミノ酸誘導体を含むペプチドもまた、化学的誘導体に含められる。例えば、4-ヒドロキシプロリンはプロリンを置換することができ；5-ヒドロキシリジンはリジンを置換することができ；3-メチルヒスチジンはヒスチジンを置換することができ；ホモセリンはセリンを置換することができ、オルニチンはリジンを置換することができる。誘導体としては、必要な活性が維持される限り、1箇所以上の付加または欠失を含むペプチドも挙げられる。他の含められる修飾は、アミド化、アミノ末端アシル化（例えば、アセチル化またはチオグリコール酸アミド化）、末端カルボキシルアミド化（例えば、アンモニアまたはメチルアミンを用いる）、および同様の末端修飾である。

【００３３】

ペプチドミメティクス化合物もまた有用であり得ることが、当業者によりさらに理解されるであろう。つまり、「ポリペプチド」とは、エンドリシン活性を示すペプチドミメティクス化合物を含む。用語「ペプチドミメティクス」とは、治療剤としての特定のポリペプチドのコンホメーションおよび望ましい特徴を模倣する化合物を意味する。

【００３４】

例えば、本明細書中に記載されるポリペプチドとしては、アミノ酸残基がペプチド（-CO-NH-）結合により連結されている分子のみならず、ペプチド結合が逆転している分子も挙げられる。そのようなretro-inversoペプチドミメティクスは、例えば、Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237（その開示が参照により本明細書中に組み入れられる）に記載されるものなどの、当技術分野で公知の方法を用いて作製することができる。CO-NHペプチド結合の代わりにNH-CO結合を含むそのようなretro-inverseペプチドは、タンパク質分解に対してはるかに抵抗性が高い。あるいは、本発明のポリペプチドは、1個以上のアミノ酸残基が、慣用のアミド結合の代わりに-γ（CH_2NH）-結合により連結されるペプチドミメティクス化合物であり得る。

【００３５】

ポリペプチドは、例えば、アミド化により、末端タンパク質分解性（exoproteolytic）消化への感受性を低減するのを助けるために、そのN末端またはC末端において都合良

くブロックされ得ることが理解されるであろう。

【００３６】

本明細書中で議論される通り、D-アミノ酸およびN-メチルアミノ酸などの様々な非コードまたは修飾アミノ酸を用いて、本発明のポリペプチドを修飾することができる。加えて、推定上の生体活性コンホメーションを、環化などの共有的修飾により、またはラクタム、ジスルフィドもしくは他の種類の架橋の組み込みにより、安定化させることができる。ジスルフィド、スルフィドおよびアルキレン架橋をはじめとする、環状ホモデティック（homodetic）ペプチドおよび環状ヘテロデティック（heterodetic）ペプチドの合成の方法が、米国特許第5,643,872号に開示される。環化方法の他の例は、米国特許第6,008,058号に議論および開示され、本文書中の関連する開示は、参照により本明細書中に組み入れられる。環状安定化ペプチドミメティクス化合物の合成に対するさらなるアプローチは、閉環メタセシス（RCM）である。

【００３７】

ポリペプチドの「融合体」は、いずれかの他のポリペプチドに融合されているポリペプチドを含む。例えば、ポリペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列に内部的にかつ/またはNおよび/もしくはC末端に挿入される1個以上の追加のアミノ酸を含むことができる。

【００３８】

つまり、本明細書中で用いる場合、一実施形態では、本発明の第1の態様のポリペプチドは、それに対して異なる供給源由来（例えば、本発明の第1の態様のポリペプチドとは異なる供給源由来）の酵素ドメインが融合されている本発明のポリペプチドを含む。好適な酵素ドメインの例としては、L-アラノイル-D-グルタミン酸エンドペプチダーゼ；D-グルタミル-m-DAPエンドペプチダーゼ；ペプチド間架橋特異的エンドペプチダーゼ；N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ（＝ムラモイルヒドロラーゼ）；N-アセチル-β-D-ムラミダーゼ（＝リゾチーム）；溶解性トランスグリコシラーゼが挙げられる。また、他の供給源由来のN-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼも利用することができる（その開示が参照により本明細書中に組み入れられる、Loessner, 2005, Current Opinion in Microbiology 8: 480-487を参照されたい）。

【００３９】

例えば、当該ポリペプチドは、当該ポリペプチドの精製を促進するために、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）またはプロテインAなどのポリペプチドに融合させることができる。そのようなGST融合体の例は、当業者に周知である。同様に、当該ポリペプチドは、His6などのオリゴヒスチジンタグに、または周知のMycタグエピトープなどの抗体により認識されるエピトープに融合させることができる。当該ポリペプチドのいずれかの断片、変異体または誘導体への融合体もまた、本発明の範囲内に含められる。望ましい特性、例えば、抗原性活性を保持する融合体（またはその変異体もしくは誘導体）が好ましいことが理解されるであろう。融合体が本明細書中に記載される方法での使用に対して好適なものである場合も特に好ましい。

【００４０】

例えば、融合体は、本発明の当該ポリペプチドに対して望ましい特徴を付与するさらなる一部分を含むことができ；例えば、一部分は、ポリペプチドの検出もしくは単離、ポリペプチドの細胞取り込みの促進、または細胞からのタンパク質の分泌への指向で有用であり得る。一部分は、例えば、当業者に周知である通り、ビオチン部分、放射活性部分、蛍光部分、例えば、小分子蛍光団または緑色蛍光タンパク質（GFP）蛍光団であり得る。部分は、当業者に公知である通り、免疫原性タグ、例えば、Mycタグであり得るか、または当業者に公知である通り、ポリペプチドの細胞取り込みを促進することが可能な親油性分子もしくはポリペプチドドメインであり得る。

【００４１】

本発明のポリペプチドとしてはまた、本明細書中に記載されるポリペプチドの製薬上許容される酸または塩基付加塩も挙げられることが、当業者により理解されるであろう。本

発明において有用な上述の塩基化合物の製薬上許容される酸付加塩を調製するために用いられる酸は、無毒酸付加塩、すなわち、とりわけ、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、過リン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、クエン酸塩、クエン酸塩（acid citrate）、酒石酸塩、酒石酸水素塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、サッカラート、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩およびパモ酸［すなわち、1,1'-メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸)］塩などの製薬上許容されるアニオンを含有する塩を形成するものである。

【００４２】

製薬上許容される塩基付加塩もまた、ポリペプチドの製薬上許容される塩形態を生成するために用いることができる。元来酸性である本発明の化合物の製薬上許容される塩基塩を調製するために試薬として用いることができる化学的塩基は、そのような化合物を用いて無毒塩基塩を形成するものである。そのような無毒塩基塩としては、限定するものではないが、とりわけ、アルカリ金属カチオン（例えば、カリウムおよびナトリウム）およびアルカリ土類金属カチオン（例えば、カルシウムおよびマグネシウム）などのそのような製薬上許容されるカチオンから誘導されるもの、アンモニウムまたはN-メチルグルカミン-(メグルミン)などの水溶性アミン付加塩、ならびに低級アルカノールアンモニウムおよび製薬上許容される有機アミンの他の塩基塩が挙げられる。

【００４３】

ポリペプチド、またはその断片、変異体、融合体もしくは誘導体はまた、保存のために凍結乾燥し、使用前に好適な担体中に再調製することもできる。いずれかの好適な凍結乾燥法（例えば、噴霧乾燥、ケーキ乾燥）および/または再調製技術を利用することができる。凍結乾燥および再調製は様々な程度の活性喪失をもたらし得ること、ならびに使用レベルは相殺するために上方調整しなければならない場合があることが、当業者により理解されるであろう。好ましくは、凍結乾燥（凍結・乾燥）ポリペプチドは、再水和される際に、その活性（凍結乾燥前）のうち、約20％以下、または約25％以下、または約30％以下、または約35％以下、または約40％以下、または約45％以下、または約50％以下を失う。

【００４４】

本発明のポリペプチドは、好ましくは、精製された形態または実質的に精製された形態で提供され、すなわち、他のポリペプチド、特に他の大腸菌または宿主細胞ポリペプチドを実質的に含まず（例えば、天然に存在するポリペプチドを含まず）、かつ一般的に少なくとも約50％純粋（重量基準）、例えば重量基準で少なくとも70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％、99.5％または100％純粋（すなわち、組成物のうち50％未満が他の発現されるポリペプチドから構成される）である。つまり、組成物中の抗原は、抗原分子が発現される生物全体から分離される。

【００４５】

(a)のFimHは、いずれかの大腸菌またはクレブシエラ・ニューモニエ（Klebsiella pneumoniae）細菌種のもの（またはその変異体、断片および/もしくは融合体）であり得るが、代替的または追加的に、(a)は：

(A) 配列番号1（Genbank登録番号ELL41155.1（大腸菌J96のFimH））、配列番号2、配列番号100（Genbank登録番号ABG72591.1（UPEC 536のFimH））、配列番号101、配列番号102（Genbank登録番号AAN83822.1（CFT073のFimH））、配列番号103、配列番号104（Genbank登録番号AJE58925.1（大腸菌789のFimH））、配列番号105、配列番号106（Genbank登録番号AAC35864.1、核酸配列AF089840.1に対応する（IHE3034のFimH））、もしくは配列番号107のアミノ酸配列、

(B) 配列番号1（Genbank登録番号ELL41155.1（大腸菌J96のFimH））、配列番号2、配列番号100（Genbank登録番号ABG72591.1（UPEC 536のFimH））、配列番号101、配列番号102（Genbank登録番号AAN83822.1（CFT073のFimH）

）、配列番号103、配列番号104（Genbank登録番号AJE58925.1（大腸菌789のFimH））、配列番号105、配列番号106（Genbank登録番号AAC35864.1、核酸配列AF089840.1に対応する（IHE3034のFimH））、もしくは配列番号107と比較して1～10箇所の単一アミノ酸変化、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10箇所の単一アミノ酸変化を含むアミノ酸配列、

(C) 配列番号1（Genbank登録番号ELL41155.1（大腸菌J96のFimH））、配列番号2、配列番号100（Genbank登録番号ABG72591.1（UPEC 536のFimH））、配列番号101、配列番号102（Genbank登録番号AAN83822.1（CFT073のFimH））、配列番号103、配列番号104（Genbank登録番号AJE58925.1（大腸菌789のFimH））、配列番号105、配列番号106（Genbank登録番号AAC35864.1、核酸配列AF089840.1に対応する（IHE3034のFimH））、もしくは配列番号107との少なくとも70%の配列同一性、例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、および/または

(D) 配列番号1（Genbank登録番号ELL41155.1（大腸菌J96のFimH））、配列番号2、配列番号100（Genbank登録番号ABG72591.1（UPEC 536のFimH））、配列番号101、配列番号102（Genbank登録番号AAN83822.1（CFT073のFimH））、配列番号103、配列番号104（Genbank登録番号AJE58925.1（大腸菌789のFimH））、配列番号105、配列番号106（Genbank登録番号AAC35864.1、核酸配列AF089840.1に対応する（IHE3034のFimH））、もしくは配列番号107からの少なくとも10個の連続するアミノ酸、例えば、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、275、280、290もしくは300個の連続するアミノ酸の断片

を含むかまたはそれからなる。

【００４６】

MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETI
TDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSL
IAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLS
GTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSI
IGVTFVYQ

[配列番号1] - GenBank：ELL41155.1（下線部はシグナルペプチド）

【００４７】

FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSG
TVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVW
NIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQ
GVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ

[配列番号2] - GenBank：ELL41155.1マイナス21aaシグナルペプチド

【００４８】

MIVMKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYP
ETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKA
GSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGY
YLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNV
QSIIGVTFVYQ

[配列番号100] - Genbank登録番号ABG72591.1（UPEC 536のFimH）（下線部は

シグナルペプチド）

【００４９】

FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSG
TVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVW
NIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQ
GVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ

[配列番号１０１] - Genbank登録番号ABG72591.1（UPEC 536のFimH）マイナスシグナルペプチド

【００５０】

MIVMKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYP
ETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKA
GSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDASARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGY

YLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNV
QSIIGVTFVYQ

[配列番号１０２] - Genbank登録番号AAN83822.1（CFT073のFimH）（下線部はシグナルペプチド）

【００５１】

FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSG
TVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVW
NIYANNDVVVPTGGCDASARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQ
GVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ

[配列番号１０３] - Genbank登録番号AAN83822.1（CFT073のFimH）マイナスシグナルペプチド

【００５２】

MIVMKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYP
ETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKA
GSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGY
YLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNV
QSIIGVTFVYQ

[配列番号１０４] Genbank登録番号AJE58925.1（大腸菌789のFimH）（下線部はシグナルペプチド）

【００５３】

FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSG
TVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVW
NIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQ
GVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ

[配列番号１０５] Genbank登録番号AJE58925.1（大腸菌789のFimH）マイナスシグナルペプチド

【００５４】

MKRVITLFAVLLMGWSVNAWSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETI
TDYVTLQRGAAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSL
IAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLS
GTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSI
IGVTFVYQ

[配列番号106] Genbank登録番号AAC35864.1、（IHE3034のFimH）、（下線部はシグナルペプチド）

【００５５】

FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGAAYGGVLSSFSG
TVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVW
NIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQ
GVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQ

[配列番号107] Genbank登録番号AAC35864.1、（IHE3034のFimH）、マイナスシグナルペプチド

【００５６】

代替的または追加的に、ポリペプチドは、配列番号1（Genbank登録番号ELL41155.1（大腸菌J96のFimH））、配列番号2、配列番号100（Genbank登録番号ABG72591.1（UPEC 536のFimH））、配列番号101、配列番号102（Genbank登録番号AAN83822.1（CFT073のFimH））、配列番号103、配列番号104（Genbank登録番号AJE58925.1（大腸菌789のFimH））、配列番号105、または配列番号106（Genbank登録番号AAC35864.1、核酸配列AF089840.1に対応する（IHE3034のFimH））、配列番号107からなる群より選択されるポリペプチドに対する特異的免疫応答を誘導することが可能な断片、変異体、融合体および/または誘導体である。

【００５７】

「特異的免疫応答」とは、特定されるアミノ酸配列に結合することが可能な抗体を生成する（例えば、その放出を刺激する）被験体体内での免疫応答を誘導する能力を意味するかまたは含む。抗体が、in vivoで、すなわち、被験体身体上またはその内側にアミノ酸配列またはポリペプチドが存在する生理的条件下で結合することが可能であることが好ましい。そのような結合特異性は、例えば、ELISA、免疫組織化学、免疫沈降、ウエスタンブロットおよび本発明のポリペプチドを発現するトランスフェクションされた細胞を用いるフローサイトメトリーなどの、当技術分野で周知の方法により決定することができる。

【００５８】

代替的または追加的に、免疫応答は、免疫活性化応答、例えば、保護免疫応答である。ポリペプチドは、in vitro保護免疫応答および/または被験体に投与される場合にin vivo保護免疫応答を生起することが可能であり得る。

【００５９】

共刺激性シグナルの存在下では、T細胞は、特異的表現型サブタイプへと分化する。これらのサブタイプのうちの数種類が、天然の炎症性シグナルの抑制または終結に関与する。「免疫活性化応答」とは、炎症もしくは炎症性シグナルの抑制または終結をもたらさず、かつ、好ましくは、炎症もしくは炎症性シグナル（例えば、サイトカイン）の活性化または強化をもたらす、被験体での免疫応答を誘導するかまたは誘導することが可能なポリペプチドを意味し、かつ/または含む。

【００６０】

in vivo保護免疫応答は、哺乳動物において生起されることができる。代替的または追加的に、哺乳動物は、アルマジロ（dasypus novemcinctus）、ヒヒ（papio anubi

s；papio cynocephalus）、ラクダ（camelus bactrianus、camelus dromedarius、camelus ferus）、ネコ（felis catus）、イヌ（canis lupus familiaris）、ウマ（equus ferus caballus）、フェレット（mustela putorius furo）、ヤギ（capra aegagrus hircus）、モルモット（cavia porcellus）、ゴールデンハムスター（mesocricetus auratus）、カンガルー（macropus rufus）、ラマ（lama glama）、マウス（mus musculus）、ブタ（sus scrofa domesticus）、ウサギ（oryctolagus cuniculus）、ラット（rattus norvegicus）、アカゲザル（macaca mulatta）、ヒツジ（ovis aries）、非ヒト霊長類、およびヒト（Homo sapiens）からなる群より選択される。

【００６１】

代替的または追加的に、$FimH_L$の柔軟性を低減させ、かつマンノース結合性を低減させるために、$FimH_L$を$FimH_p$へと連結するリンカーの2個のグリシン残基を欠失させることができる。例えば、配列番号1と比較してポリペプチド部分(a)のグリシン残基196および197、配列番号1と比較してポリペプチド部分(a)のグリシン残基180および181、配列番号100と比較してポリペプチド部分(a)のグリシン残基183および184、配列番号102と比較してポリペプチド部分(a)のグリシン残基183および184、配列番号104と比較してポリペプチド部分(a)のグリシン残基183および184が：

(i) 存在するか；または

(ii) 欠失される。

【００６２】

代替的または追加的に、N-グリコシル化またはO-グリコシル化されることが既知であるかまたは予測されるポリペプチドの1個以上のアミノ酸が、グリコシル化を受けないかまたは受けにくいアミノ酸、例えば、セリン（S）、アスパラギン酸（D）、アラニン（A）またはグルタミン（Q）を用いて置換される。代替的または追加的に、ポリペプチド部分(a)のみが、N-および/またはO-グリコシル化を低減または消失させるためのアミノ酸置換を含む。

【００６３】

N-および/またはO-グリコシル化は、当技術分野で公知のいずれかの好適な手段を用いて、例えば、デフォルト設定を使用するNetNGlyc 1.0およびNetOGlyc 4.0サーバ（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/およびhttp://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/でアクセス可能）を用いて、決定することができる。

【００６４】

代替的または追加的に、ポリペプチド部分(a)は、配列番号2と比較して以下のアミノ酸置換のうちの1つ以上を含む：N28S、N91D、N249D、N256D、または配列番号2のこれらの位置に対応する配列番号101、103および105の位置、例えば、アミノ酸置換のうちの1、2、3または4つ。

【００６５】

代替的または追加的に、ドナー鎖補完性アミノ酸配列(b)は、

(i) 配列番号3の6～28個のアミノ酸；またはその断片および/もしくは変異体、あるいは

(ii) 配列番号4の8～36個のアミノ酸；またはその断片および/もしくは変異体

を含むかまたはそれからなる。

【００６６】

ASATIQA<u>ADVTITVNGKVVAK</u>PCTVSTT

[配列番号3] - FimGドナー鎖および隣接領域（下線部はドナー鎖）

PSMDKSKLT<u>ENTLQLAIISRIKLYYRP</u>AKLALPPDQ

[配列番号4] - FimCドナー鎖および隣接領域（下線部はドナー鎖）

【００６７】

代替的または追加的に、部分(b)は、配列番号3の6～28個のアミノ酸（またはその断片および/もしくは変異体）を含むかまたはそれからなり、これらのアミノ酸は：

(i) 配列番号3のアミノ酸1～28；またはその断片および/もしくは変異体、
(ii) 配列番号3のアミノ酸2～27；またはその断片および/もしくは変異体、
(iii) 配列番号3のアミノ酸3～26；またはその断片および/もしくは変異体、
(iv) 配列番号3のアミノ酸4～25；またはその断片および/もしくは変異体、
(v) 配列番号3のアミノ酸5～24；またはその断片および/もしくは変異体、
(vi) 配列番号3のアミノ酸6～23；またはその断片および/もしくは変異体、
(vii) 配列番号3のアミノ酸7～22；またはその断片および/もしくは変異体、
(viii) 配列番号3のアミノ酸8～21；またはその断片および/もしくは変異体、
(ix) 配列番号3のアミノ酸9～20；またはその断片および/もしくは変異体、
(x) 配列番号3のアミノ酸10～19；またはその断片および/もしくは変異体、
(xi) 配列番号3のアミノ酸11～18；またはその断片および/もしくは変異体、ならびに
(xii) 配列番号3のアミノ酸12～17；またはその断片および/もしくは変異体
からなる群より選択される。

【００６８】

代替的または追加的に、部分(b)は、配列番号4の8～36個のアミノ酸（またはその断片および/もしくは変異体）を含むかまたはそれからなり、これらのアミノ酸は：
(i) 配列番号4のアミノ酸1～36；またはその断片および/もしくは変異体、
(ii) 配列番号4のアミノ酸2～35；またはその断片および/もしくは変異体、
(iii) 配列番号4のアミノ酸3～34；またはその断片および/もしくは変異体、
(iv) 配列番号4のアミノ酸4～33；またはその断片および/もしくは変異体、
(v) 配列番号4のアミノ酸5～32；またはその断片および/もしくは変異体、
(vi) 配列番号4のアミノ酸6～31；またはその断片および/もしくは変異体、
(vii) 配列番号4のアミノ酸7～30；またはその断片および/もしくは変異体、
(viii) 配列番号4のアミノ酸8～29；またはその断片および/もしくは変異体、
(ix) 配列番号4のアミノ酸9～28；またはその断片および/もしくは変異体、
(x) 配列番号4のアミノ酸10～27；またはその断片および/もしくは変異体、
(xi) 配列番号4のアミノ酸11～26；またはその断片および/もしくは変異体、
(xii) 配列番号4のアミノ酸12～25；またはその断片および/もしくは変異体、
(xiii) 配列番号4のアミノ酸13～24；またはその断片および/もしくは変異体、
(xiv) 配列番号4のアミノ酸14～23；またはその断片および/もしくは変異体、
(xv) 配列番号4のアミノ酸15～24；またはその断片および/もしくは変異体、ならびに
(xvi) 配列番号4のアミノ酸16～23；またはその断片および/もしくは変異体
からなる群より選択される。

【００６９】

代替的または追加的に、ドナー鎖補完性アミノ酸配列(b)は：
(A) 配列番号5もしくは配列番号6のアミノ酸配列、
(B) 配列番号5もしくは配列番号6と比較して1～10箇所の単一アミノ酸変化、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10箇所の単一アミノ酸変化を含むアミノ酸配列、
(C) 配列番号5からの少なくとも7個の連続するアミノ酸、例えば、配列番号5からの少なくとも8、9、10、11、12、もしくは13個の連続するアミノ酸の断片、および/または
(D) 配列番号6からの少なくとも7個の連続するアミノ酸、例えば、配列番号6からの少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、もしくは18個の連続するアミノ酸の断片
を含むかまたはそれからなる。

【００７０】

ADVTITVNGKVVAK [配列番号5] - FimGドナー鎖

ＥＮＴＬＱＬＡＩＩＳＲＩＫＬＹＹＲＰ［配列番号６］－ＦｉｍＣドナー鎖

【００７１】

１つの好ましい実施形態では、ドナー鎖補完性アミノ酸配列(ｂ)は、配列番号５を含むかまたはそれからなる。代替的または追加的に、ドナー鎖補完性アミノ酸配列(ｂ)は、配列番号６を含むかまたはそれからなる。

【００７２】

代替的または追加的に、ドナー鎖補完性アミノ酸配列(ｂ)は：

(ｉ) (ａ)のＣ末端に直接的に連結されるか、または

(ｉｉ) 第１のリンカーを介して(ａ)のＣ末端に連結される。

【００７３】

代替的または追加的に、第１のリンカー（または「Ｌ」）は、２～２０個のアミノ酸、例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０個のアミノ酸を含むかまたはそれからなる。代替的または追加的に、第１のリンカーは、プロリンによって始まる。好ましい実施形態では、第１のリンカーは、プロリンによって始まる。代替的または追加的に、第１のリンカーは極性アミノ酸を含むかまたはそれからなり、例えば、第１のリンカーは完全に極性アミノ酸から構成されるか、または第１のリンカーがプロリンによって始まる場合、残りのアミノ酸が極性である。代替的または追加的に、第１のリンカーは：

(ｉ) ＰＧＤＧＮ［配列番号７］、またはその変異体もしくは融合体、あるいは

(ｉｉ) ＤＮＫＱ［配列番号８］、またはその変異体もしくは融合体

を含むかまたはそれからなる。

【００７４】

１つの好ましい実施形態では、第１のリンカー（または「Ｌ」）は、配列番号７を含むかまたはそれからなる。

【００７５】

代替的または追加的に、ポリペプチドは、Ｎ末端、Ｃ末端および/または内部的に、タンパク質精製親和性タグ、例えば、６、７、８、９または１０個の連続するヒスチジンを含む。

【００７６】

代替的または追加的に、「Ｘ」は、細胞分泌リーダー配列を含む。代替的または追加的に、ポリペプチドは：

(ｉ) (ａ)の上流、または

(ｉｉ) ポリペプチドのＮ末端

に細胞分泌リーダー配列を含む。

【００７７】

代替的または追加的に、細胞分泌リーダー配列は、

(ｉ) ＭＥＴＤＴＬＬＬＷＶＬＬＬＷＶＰＧＳＴＧＤ［配列番号９］、またはその変異体もしくは融合体、

(ｉｉ) ＭＥＴＤＴＬＬＬＷＶＬＬＬＷＶＰＧＳＴＧＤＡＡＱＰＡＲＲＡＲＲＴＫＬＡＬ［配列番号１０］、またはその変異体もしくは融合体、

(ｉｉｉ) ＭＲＬＬＡＫＩＩＣＬＭＬＷＡＩＣＶＡ［配列番号１１］、またはその変異体もしくは融合体、

(ｉｖ) ＭＧＷＳＣＩＩＬＦＬＶＡＴＡＴＧＶＨＳ［配列番号１２］、またはその変異体もしくは融合体、

(ｖ) ＭＥＴＰＡＥＬＬＦＬＬＬＬＷＬＰＤＴＴＧ［配列番号１３］、またはその変異体もしくは融合体、

(ｖｉ) ＭＥＴＤＴＬＬＬＷＶＬＬＬＷＶＰＧＳＴＧ［配列番号１０８］、またはその変異体もしくは融合体、あるいは

(ｖｉｉ) ＭＥＦＧＬＳＷＶＦＬＶＡＩＬＥＧＶＨＣ［配列番号１４］、またはその変異体もしくは融合体

からなる群より選択される。

【００７８】

代替的または追加的に、「X」は、特にポリペプチドが大腸菌宿主細胞中で発現される場合、メチオニン（M）残基である。

【００７９】

代替的または追加的に、ポリペプチドは、N末端またはC末端にナノ粒子ドメインを含む。つまり、一実施形態では、「X」がナノ粒子ドメインを含むか、または「Y」がナノ粒子ドメインを含む。「ナノ粒子ドメイン」とは、タンパク質複合体、特に、球状タンパク質複合体を形成する自己アセンブリが可能であるアミノ酸配列を意味するかまたは含む。「自己アセンブリ」とは、同じタイプのナノ粒子ドメインとのアセンブリを意味するかまたは含む（例えば、ナノ粒子ドメインがフェリチンドメインである場合、他のフェリチンドメインとアセンブリして、球状タンパク質複合体などのタンパク質複合体を形成することが可能である）。特に、本発明のナノ粒子ドメインは、本発明のポリペプチドの一部分を形成する場合、自己アセンブリが可能である。

【００８０】

代替的または追加的に、ナノ粒子ドメインは：

(a) フェリチン（例えば、［配列番号15］もしくは［配列番号109］（ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）、［配列番号16］（大腸菌）、または［配列番号149］～［配列番号152］のうちのいずれか1つ（安定化型大腸菌））、またはその変異体および/もしくは断片、

(b) iMX313（例えば、［配列番号17］）、またはその変異体および/もしくは断片、

(c) mI3（例えば、［配列番号18］）、またはその変異体および/もしくは断片、

(d) エンカプスリン（例えば、［配列番号19］）、またはその変異体および/もしくは断片、あるいは

(e) アシネトバクターファージAP205外被タンパク質（NCBI参照配列：NP_085472.1）などの自己アセンブリ性ウイルス外被タンパク質、B型肝炎ウイルスコアタンパク質（HBc）［配列番号110］、もしくはバクテリオファージQβ［配列番号111］、またはその変異体および/もしくは断片

からなる群より選択される。

【００８１】

DIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [配列番号15] - H.ピロリ フェリチン

DIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS [配列番号109] - H.ピロリ フェリチン（末端Sを含む）

LKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHTFEGAAAFLRRHAQEEMTHMQRLFDYLTDTGNLPRINTVESPFAEYSSLDELFQETYKHEQLITQKINELAHAAMTNQDYPTFNFLQWYVSEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKELSTLDTQN [配列番号16] - 大腸菌フェリチン

KKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKEG [配列番号 17] iMX313

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSV
EQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKG
PFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTE [配列番号 **18**] mi3

MEFLKRSFAPLTEKQWQEIDNRAREIFKTQLYGRKFVDVEGPYGWEYAAHPLGEVEVLSDENEVVKWGLRKSL
PLIELRATFTLDLWELDNLERGKPNVDLSSLEETVRKVAEFEDEVIFRGCEKSGVKGLLSFEERKIECGSTPK
DLLEAIVRALSIFSKDGIEGPYTLVINTDRWINFLKEEAGHYPLEKRVEECLRGGKIITTPRIEDALVVSERG
GDFKLILGQDLSIGYEDREKDAVRLFITETFTFQVVNPEALILLKF [配列番号19] - エンカプスリン

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMTLATWVG
NNLEDASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETT
VV [配列番号 110] HBC

MAKLETVTLGNIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVPALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPT
ACTANGSCDPSVTRQAYADVTFSFTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY [配列番号111] - Qβ

LKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHGFEGAAAFLRRHAQEEMTHMQRLFDYLTDTGNLPRIDTIP
SPFAEYSSLDELFQETYKHEQLITQKINELAHAAMTNQDYPTFNFLQWYVAEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKS
GEGLYFIDKELSTLDTQN [配列番号149] - 1EUM_0_5 - 安定化型大腸菌フェリチン

LKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHGFEGAAAFLRRHAQEEMTHMQRLFDYLTDTGNLPRINTIP
SPFAEYSSLDELFQETYKHEQLITQKINELAHAAMTNQDYPTFNFLQWYVAEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKS
GEGLYFIDKELSTLDTQN [配列番号150] - 1EUM_2 - 安定化型大腸菌フェリチン

LKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHGFEGAAAFLRRHAQEEMTHMQRLFDYLTDTGNLPRINTVP
SPFAEYSSLDELFQETYKHEQLITQKINELAHAAMTNQDYPTFNFLQWYVAEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKS
GEGLYFIDKELSTLDTQN [配列番号151] - 1EUM_2_5 - 安定化型大腸菌フェリチン

LKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHGFEGAAAFLRRHAQEEMTHMQRLFDYLTDTGNLPRINTVE
SPFAEYSSLDELFQETYKHEQLITQKINELAHAAMTNQDYPTFNFLQWYVSEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKS
GEGLYFIDKELSTLDTQN [配列番号152] - 1EUM_6- 安定化型大腸菌フェリチン

【００８２】

代替的または追加的に、ナノ粒子ドメインは：

(i) ポリペプチドに直接的に連結されるか、または

(ii) 第2のリンカーを介してポリペプチドに連結される。

【００８３】

代替的または追加的に、第2のリンカーは、2～20個のアミノ酸、例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸を含むかまたはそれからなる。代替的または追加的に、第2のリンカーは、グリシン（G）および/もしくはセリン（S）を含むかまたはそれからなるか、あるいは少なくとも50%のグリシン（G）および/もしくはセリン（S）、例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%または95%のグリシン（G）および/もしくはセリン（S）を含む。

【００８４】

代替的または追加的に、第2のリンカーは：

(a) GSSGSGSGS［配列番号112］またはその変異体もしくは融合体、

(b) GGSGS［配列番号113］またはその変異体もしくは融合体、

(c) GGSまたはその変異体もしくは融合体、

(d) SGSHHHHHHHHGGS［配列番号114］またはその変異体もしくは融合体、

(e) AKFVAAWTLKAAA［配列番号115］またはその変異体もしくは融合体、

(f) GGGGSLVPRGSGGGGS［配列番号116］またはその変異体もしくは融合体、

(g) EAAAKEAAAKEAAAKA［配列番号117］またはその変異体もしくは融合体、
(h) SGSFVAAWTLKAAAGGS［配列番号118］またはその変異体もしくは融合体、および
(i) SGSGSGGGGGGS［配列番号119］またはその変異体もしくは融合体
からなる群より選択される。

【００８５】

汎HLA DR結合性エピトープ（PADRE）としても知られるリンカーAKFVAAWTLKAAA［配列番号115］は、その開示が参照により本明細書中に組み入れられる“Linear PADRE T Helper Epitope and Carbohydrate B Cell Epitope Conjugates Induce Specific High Titer IgG Antibody Responses” 10.4049/jimmunol.164.3.1625に開示される通り、合成および組み換えワクチンの開発中の使用に対して好適である担体エピトープとして提案されてきた、抗原特異的$CD4^+$T細胞を活性化するペプチドである。リンカーGGGGSLVPRGSGGGGS［配列番号116］およびEAAAKEAAAKEAAAKA［配列番号117］は、αヘリックスへとフォールディングすることができない剛性リンカーである。

【００８６】

代替的または追加的に、ナノ粒子ドメインは：
(a) (a)の上流、
(b) ポリペプチドのN末端、
(c) (b)の下流、または
(d) ポリペプチドのC末端
にある。

【００８７】

さらなる態様では、ナノ粒子（すなわち、タンパク質ナノ粒子）へと自己アセンブリすることが可能な、設計されたde novoポリペプチド単量体（およびそれをコードする核酸分子）が提供される。そのようなポリペプチド単量体およびタンパク質ナノ粒子を製造または使用するための宿主細胞、ベクターまたは構築物、および方法もまた提供される。本発明はさらに、少なくとも1種のそのようなポリペプチド単量体を含むかまたはそれからなる表面構造を有し、かつ任意により1種以上の抗原分子を担持するナノ粒子（NP）に関する。

【００８８】

本発明のポリペプチド単量体は、その野生型対応物単量体（すなわち、大腸菌細菌フェリチン［配列番号16］）と比較した場合に突然変異され、それにより、その野生型対応物単量体と比較した場合にkcal/molでの改善された熱安定性またはフォールディング安定性などの増加した安定性を有することができ、それにより、これが、その野生型対応物ナノ粒子と比較した場合にkcal/molでの改善された熱安定性またはフォールディング安定性を有する自己アセンブリされたナノ粒子を形成することができる。

【００８９】

「増加した安定性」とは、分子が、同等または同じ条件（例えば、温度および/またはpH）下で対照分子またはその野生型対応物と比較した場合に、アンフォールディングの低い割合、減少したミスフォールディング、低減したタンパク質ドメイン移動、低減したタンパク質ドメイン転位、増加した半減期（in vitroまたはin vivo）、増加した保存寿命、上昇した融解温度（Tm）（分子が2つ以上を有する場合、少なくとも1つの融解温度の上昇を意味する）、低いフォールディング自由エネルギー値（kcal/mol）、低い結合自由エネルギー値（巨大分子を形成するために他のサブユニットに結合するサブユニットの場合の通り）、またはそれらの組み合わせを有することを意味する。例の明確性のために、分子の安定性が1箇所以上の突然変異（「安定化突然変異」、1箇所以上のアミノ酸突然変異など）を介して増加する場合、「対照分子」またはその「野生型対応物」とは、1箇所以上の安定化突然変異を含まない分子を意味する。本発明に関して、単量体またはナノ粒子は、同等（または同じ）条件下でその野生型対応物分子と比較した場合に、増

加した安定性（例えば、増加した熱安定性および/または増加したフォールディング安定性および/または増加した結合安定性）を有すると記載することができる。本明細書中で用いる場合、「条件」は、実験条件および生理的条件を含む。例えば、米国特許出願公開第2011/0229507号；アジュバントを介して増加した安定性を議論し、変化したpH、水和、および温度条件での抗原安定性を評価する、Clapp et al., 2011 J. Pharm. Sci. 100(2): 388-401；およびRossi et al., 2016 Infect. Immun. 84(6): 1735-1742を参照されたい。明確性のために、「安定性」は、特定の温度でのアンフォールディングに対する分子の耐性を意味し、かつ通常は分子の融解温度、具体的には分子の融解温度の増加（二量体または三量体などのオリゴマータンパク質に対して2種類以上の融解温度があり得る）により当技術分野で通常伝えられる「熱安定性」として特定され、Kumar et al. 2000 Prot. Eng. Des. Sel. “Factors enhancing protein thermostability” 13(3): 179-191；およびMiotto et al. 2018 bioRxiv doi: 10.1101/354266 “Insights on protein thermal stability: a graph representation of molecule interactions”を参照されたい。文脈が必要とする場合、2種類以上の分子（それぞれが1箇所以上の安定化突然変異を含む2種類以上の改変型分子など）の熱安定性を比較することができ、一方が他方よりも熱安定性である（すなわち、他方と比較した場合に強化または増加した熱安定性を有する）と言うことができる。本明細書中では、安定性、特に熱安定性は、in silico突然変異体タンパク質の相対的熱安定性と対照またはその野生型対応物（すなわち、非安定化突然変異体）タンパク質のものとの間のコンピュータにより決定される差異である、デルタ安定性（dStabilityまたはdS）スコア付け法により提供することができる。dStabilityを決定する方法は公知であり（国際公開第2020/079586号（PCT/IB2019/058777）、MALITO et al.）、Molecular Operating Environment（MOE）ソフトウェア（参照：Molecular Operating Environment（MOE）ソフトウェア；Chemical Computing Group社、WorldWideWeb(www).chemcomp.comで利用可能）などのツールの使用を含むことができる。dSは、kcal/molにより測定される。より低いdS値がより高いタンパク質安定性を示し、より高いdS値がより低いタンパク質安定性を示す。本発明の突然変異体ポリペプチドが、同じかまたは同等の実験条件下で非突然変異体ポリペプチドと比較した場合に、より高い相対的熱安定性（kcal/mol）を有することを特定することができる。本発明の突然変異体ポリペプチドは、同じかまたは同等の実験条件下で非突然変異体ポリペプチドよりも低いdS値を有することをさらに特定することができる。同じかまたは同等の実験条件下で非突然変異体ポリペプチドと比較した場合により低いdS値を有する突然変異体ポリペプチドは、非突然変異体ポリペプチドよりも安定であることが、本発明から理解されるであろう。安定性強化は、Bruylants et al. 2005 Curr. Med. Chem. 12: 2011-2020およびCalorimetry Sciences社の「Characterizing Protein stability by DSC」（Life Sciences Application Note、Doc. No. 20211021306、2006年2月）に議論される通りの示差走査熱量測定（DSC）を用いて、または示差走査蛍光測定（DSF）により、評価することができる。（熱）安定性の増加は、DSCまたはDSFにより評価される通りの、温度遷移中点（T_m）の少なくとも約2℃の上昇として特徴付けることができる。例えば、Thomas et al., 2013 Hum. Vaccin. Immunother. 9(4): 744-752を参照されたい。熱安定性の「顕著な」増加、または強化は、複合体の計算上のTm（例えば、国際公開第2020/079586号（PCT/IB2019/058777）、MALITO et al.のExample 4.7に提供されるプロトコールにより算出される）での少なくとも5℃の上昇として定義される。明確性のために、本明細書中では、「安定性」は、分子のフォールディング自由エネルギー（モル当たりのキロカロリー（kcal/mol）で報告される）を意味し、かつ様々な公知の技術を用いて決定することができる（本明細書中の実施例セクションならびに、例えば、Zhang et al. 2012 Bioinformatics 28(5): 664-671を参照されたい）、「フォールディング安定性」として特定することができる。文脈が必要とする場合、2種類以上の分子のフォールディング安定性を比較することができ、より低いフォールディング自由エネルギー値（kcal/mol）を有するので、一方が他方よ

りも安定であると言うことができる。本発明の単量体またはナノ粒子が、同じかまたは同等の条件（例えば、実験条件）下で対照分子またはその野生型対応物と比較した場合に、より高い/増加したフォールディング安定性を有することを特定することができる。フォールディング安定性の「顕著な」増加、または強化は、同等または同じ条件での比較分子のフォールディング自由エネルギー変化値（kcal/mol）よりも少なくとも100kcal/mol低いフォールディング自由エネルギー変化値として定義される。

【００９０】

一実施形態では、本発明のポリペプチド単量体は、アミノ酸配列配列番号16に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号16の残基34にアライメントする位置でのグリシン（G）（T34G突然変異）、配列番号16の残基70にアライメントする位置でのアスパラギン酸（D）（N70D突然変異）、配列番号16の残基72にアライメントする位置でのイソロイシン（I）（V72I突然変異）および配列番号16の残基124にアライメントする位置でのアラニン（A）（S124A突然変異）からなる群より選択される1箇所以上の突然変異を有する。

【００９１】

1つの好ましい実施形態では、ポリペプチド単量体は、アミノ酸配列配列番号16に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号16の残基34にアライメントする位置でのグリシン（G）（T34G突然変異）、配列番号16の残基70にアライメントする位置でのアスパラギン酸（D）（N70D突然変異）、配列番号16の残基72にアライメントする位置でのイソロイシン（I）（V72I突然変異）および配列番号16の残基124にアライメントする位置でのアラニン（A）（S124A突然変異）を有する。一実施形態では、ポリペプチド単量体は、アミノ酸配列配列番号149に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、ポリペプチド単量体は、配列番号149のアミノ酸配列を含む。

【００９２】

一実施形態では、ポリペプチド単量体は、アミノ酸配列配列番号16に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号16の残基34にアライメントする位置でのグリシン（G）（T34G突然変異）、配列番号16の残基72にアライメントする位置でのイソロイシン（I）（V72I突然変異）および配列番号16の残基124にアライメントする位置でのアラニン（A）（S124A突然変異）を有する。一実施形態では、ポリペプチド単量体は、アミノ酸配列配列番号150に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、ポリペプチド単量体は、配列番号150のアミノ酸配列を含む。

【００９３】

一実施形態では、ポリペプチド単量体は、アミノ酸配列配列番号16に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号16の残基34にアライメントする位置でのグリシン（G）（T34G突然変異）、および配列番号16の残基124にアライメントする位置でのアラニン（A）（S124A突然変異）を有する。一実施形態では、ポリペプチド単量体は、アミノ酸配列配列番号151に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、ポリペプチド単量体は、配列番号151のアミノ酸配

列を含む。

【００９４】

一実施形態では、ポリペプチド単量体は、アミノ酸配列配列番号16に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号16の残基34にアライメントする位置でのグリシン（G）（T34G突然変異）を有する。一実施形態では、ポリペプチド単量体は、アミノ酸配列配列番号152に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、ポリペプチド単量体は、配列番号152のアミノ酸配列を含む。

【００９５】

本発明の設計されたde novoポリペプチド単量体は、概ね球形のナノ粒子（例えば、約5nm～約30nm、好ましくは約15～20nmの外表面構造直径を有する）への自己アセンブリが可能である。したがって、本発明のポリペプチド単量体は、自己アセンブリしたタンパク質ナノ粒子を提供するために用いることができ、任意により、このとき、自己アセンブリしたタンパク質ナノ粒子は、少なくとも1種の抗原分子、少なくとも1種の免疫刺激剤分子、または少なくとも1種の抗原分子および少なくとも1種の免疫刺激剤分子を担持（例えば、提示）する。一実施形態では、本発明のナノ粒子（例えば、本発明の概ね球形のナノ粒子）は、24個の単量体サブユニットからなり（例えば、少なくとも1個の単量体サブユニットが本発明のポリペプチド単量体である場合）、かつ8面体対称である基礎形状を有する。

【００９６】

ナノ粒子（天然に存在するおよび組み換えナノ粒子、例えば、コンピュータにより設計されたナノ粒子）、その製造方法、および、例えば、1種以上の抗原または免疫刺激剤の足場（または「担体」）としてのその使用（すなわち、「製薬上許容されるナノ粒子」）が、当技術分野で公知である。

【００９７】

当技術分野により認識されるであろう通り（例えば、Ueda et al. 2020 eLife 9: e57659；Pan et al. 2020 Adv. Mater. 32:2002940を参照されたい）、本発明のタンパク質ナノ粒子は、それにより抗原、免疫刺激剤、複数コピーの同じ抗原、複数コピーの同じ免疫刺激剤、2種類以上の抗原の混合物（例えば、2、3、4、または5種類の抗原；すなわち、二価、三価、四価、または五価抗原）、2種類以上の免疫刺激剤の混合物（例えば、2、3、4、または5種類の免疫刺激剤；すなわち、二価、三価、四価、または五価免疫刺激剤）、または1種類以上の抗原と1種類以上の免疫刺激剤との混合物を担持（ナノ粒子の外表面構造へのコンジュゲート化、すなわち、連結、付着、連係、融合、結合またはライゲーションを介して）する、「足場」として用いることができる。

【００９８】

特定の実施形態では、ポリペプチド単量体の自己アセンブリは、ナノ粒子の外側/外表面にそのN末端およびナノ粒子の内側/コア/内表面にそのC末端を配置する。これにより、ポリペプチド単量体のN末端に連結される抗原または免疫刺激剤が、アセンブリしたナノ粒子の外表面に提示される。他の実施形態では、ポリペプチド単量体の自己アセンブリは、ナノ粒子の外側/外表面にそのC末端およびナノ粒子の内側/コア/内表面にそのN末端を配置する。これにより、ポリペプチド単量体のC末端に連結される抗原または免疫刺激剤が、アセンブリしたナノ粒子の外表面に提示される。特定の他の実施形態では、抗原または免疫刺激剤がポリペプチド単量体のN末端に連結され、かつ抗原または免疫刺激剤（同じかまたは異なる抗原および/または免疫刺激剤）がそのポリペプチド単量体のC末端に連結され、それにより抗原または免疫刺激剤が外表面上に提示され、かつアセンブリしたナノ粒子の内表面上に担持される。

【００９９】

したがって、本発明の実施形態は、1種以上の分子（例えば、分子が、ナノ粒子単量体のうちの1種以上（例えば、全部）と比較した場合に異種である場合）を担持するナノ粒子を提供し、任意により、このとき、1種以上の分子はナノ粒子の外表面上に提示される。当該1種以上の提示された分子（例えば、抗原および/または免疫刺激剤）がタンパク質である（例えば、すべてタンパク質である）場合、それらは、ポリペプチド単量体の一部分として（すなわち、融合タンパク質単量体として）発現されることができ、それにより、ナノ粒子の自己アセンブリが、ナノ粒子外表面上でのタンパク質の提示をもたらす。あるいは、タンパク質提示分子は、例えば、本明細書中で議論される通りおよび当技術分野で公知の通りに、化学的または生物学的コンジュゲート化により、アセンブリしたナノ粒子に連結することができる。本発明のさらなる実施形態では、提示分子は、多糖またはオリゴ糖（細菌莢膜多糖など）であり；糖が、ナノ粒子に連結されて、「糖コンジュゲート」を提供することができる。Polonskaya et al. 2017 J. Clin. Invest. 127(4): 1492-1504；Pan et al. 2020 Adv. Mater. 32:2002940を参照されたい。

【０１００】

一実施形態では、抗原は、(a) FimH；またはFimHの変異体、断片および/もしくは融合体、ならびに(b) ドナー鎖補完性アミノ酸配列を含むかまたはそれらからなるアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、このとき、(b)は(a)の下流であるか、または本明細書中に別途記載される通りである。一実施形態では、抗原は、アミノ酸配列配列番号124に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。一実施形態では、抗原は、配列番号124のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【０１０１】

一実施形態では、アミノ酸配列配列番号130または153に対して少なくとも80％の配列同一性、例えば、少なくとも85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、または99％の配列同一性を有するアミノ酸配列のナノ粒子。一実施形態では、ナノ粒子は、配列番号130または153のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【０１０２】

したがって、本発明の特定の実施形態は、ナノ粒子へと自己アセンブリすることが可能であるポリペプチド（すなわち、ポリペプチド単量体）ならびにそのようなポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。本明細書中のアミノ酸配列は、タグ（例えば、ヒスチジン（例えば、6×Hisタグ）、エンテロキナーゼタグ、またはmycタグなどの精製タグ）、およびポリペプチド単量体とナノ粒子により担持される1種以上の分子（例えば、抗原）との間のリンカーを含むか、またはさらに含むことができる。さらに、本明細書中の核酸配列は、タグおよび/またはリンカーを含むアミノ酸配列をコードすることができる。

【０１０３】

代替的または追加的に、ポリペプチドは、FimHポリペプチドのN末端にフェニルアラニン（Phe、F）残基を含む。代替的または追加的に、ポリペプチドがC末端またはN末端にナノ粒子ドメインを含む場合、ポリペプチドは、成熟ポリペプチドの、すなわち、存在する場合、リーダー配列の切断または除去後のN末端に、フェニルアラニン（Phe、F）またはアスパラギン酸（Asp、D）残基を含む。C末端またはN末端にナノ粒子ドメインを含む成熟ポリペプチドのN末端でのアスパラギン酸（Asp、D）残基の存在は、哺乳動物宿主細胞により発現される場合、ポリペプチドの改善された分泌に関連付けられる。

【０１０４】

代替的または追加的に、ポリペプチドは：

(a) 配列番号20、またはその変異体および/もしくは断片、

(b) 配列番号21、またはその変異体および/もしくは断片、

(c) 配列番号22、またはその変異体および/もしくは断片、

(d) 配列番号23、またはその変異体および/もしくは断片、
(e) 配列番号24、またはその変異体および/もしくは断片、
(f) 配列番号25、またはその変異体および/もしくは断片、
(g) 配列番号26、またはその変異体および/もしくは断片、
(h) 配列番号27、またはその変異体および/もしくは断片、
(i) 配列番号28、またはその変異体および/もしくは断片、
(j) 配列番号29、またはその変異体および/もしくは断片、
(k) 配列番号30、またはその変異体および/もしくは断片、
(l) 配列番号31、またはその変異体および/もしくは断片、
(m) 配列番号32、またはその変異体および/もしくは断片、
(n) 配列番号33、またはその変異体および/もしくは断片、
(o) 配列番号34、またはその変異体および/もしくは断片、
(p) 配列番号35、またはその変異体および/もしくは断片、
(q) 配列番号36、またはその変異体および/もしくは断片、
(r) 配列番号37、またはその変異体および/もしくは断片、
(s) 配列番号38、またはその変異体および/もしくは断片、
(t) 配列番号39、またはその変異体および/もしくは断片、
(u) 配列番号40、またはその変異体および/もしくは断片、
(v) 配列番号41、またはその変異体および/もしくは断片、
(w) 配列番号42、またはその変異体および/もしくは断片、
(x) 配列番号43、またはその変異体および/もしくは断片、
(y) 配列番号44、またはその変異体および/もしくは断片、
(z) 配列番号79、またはその変異体および/もしくは断片、
(aa) 配列番号80、またはその変異体および/もしくは断片、
(bb) 配列番号81、またはその変異体および/もしくは断片、
(cc) 配列番号82、またはその変異体および/もしくは断片、
(dd) 配列番号83、またはその変異体および/もしくは断片、
(ee) 配列番号84、またはその変異体および/もしくは断片、
(ff) 配列番号85、またはその変異体および/もしくは断片、
(gg) 配列番号86、またはその変異体および/もしくは断片、
(hh) 配列番号87、またはその変異体および/もしくは断片、
(ii) 配列番号88、またはその変異体および/もしくは断片、
(jj) 配列番号89、またはその変異体および/もしくは断片、
(kk) 配列番号120～124、配列番号129～143および153のうちのいずれか1つまたはその変異体および/もしくは断片
に対応するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【0105】

1つの好ましい実施形態では、ポリペプチドは、配列番号123または配列番号124に対応するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号123または配列番号124に対して少なくとも70%の配列同一性、例えば、配列番号123または配列番号124に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

【0106】

代替的または追加的に、ポリペプチドのマンノース結合性は、生来型FimCと複合体化された生来型FimH（FimHC複合体）のものよりも少なくとも20%低く、例えば、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%低い。

【0107】

マンノース結合性は、当技術分野で公知のいずれかの好適な手段を用いて決定することができ、例えば、表面プラズモン共鳴を、Man-BSAおよびGlc-BSA（陰性対照）とのFi

mH構築物の結合性、結合特異性および結合定数を確認するために用いることができ、例えば、参照により本明細書中に組み入れられるRabani et al., 2018, ‘Conformational switch of the bacterial adhesin FimH in the absence of the regulatory domain: Engineering a minimalistic allosteric system’ J. Biol. Chem., 293(5):1835-1849を参照されたい。

【０１０８】

「生来型FimH」とは、野生型FimH、特に本発明のポリペプチドのドメイン(a)がそこから誘導された野生型FimH（任意により、生来型N末端分泌配列が除去されている）を意味するかまたは含む。代替的または追加的に、大腸菌J96 FimH（例えば、配列番号1または配列番号2）、大腸菌UPEC 536のFimH（例えば、配列番号100または配列番号101）、大腸菌CFT073のFimH（例えば、配列番号102または配列番号103）、大腸菌789のFimH（例えば、配列番号104または配列番号105）、大腸菌IHE3034のFimH（例えば、配列番号106または配列番号107）を意味するかまたは含む。特に、高親和性コンホメーションである弛緩（R）状態（上記を参照されたい）のFimHを含む。

【０１０９】

「生来型FimC」とは、野生型FimC（任意により、生来型N末端分泌配列が除去されている）を意味するかまたは含む。代替的または追加的に、大腸菌J96 FimC、UPEC 536のFimC、大腸菌CFT073のFimC、大腸菌789のFimC、大腸菌IHE3034のFimCを意味するかまたは含む。

【０１１０】

「生来型FimCと複合体化されたFimH」および「FimHC複合体」とは、本明細書の実施例セクション中に教示される様式および/または条件で、(a) D. Choudhury, X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic Escherichia coli. Science 285, 1061-1066 (1999)、(b) C.-S. Hung, Structural basis of tropism of Escherichia coli to the bladder during urinary tract infection. Mol. Microbiol. 44, 903-915 (2002)、(c) I. Le Trong, Structural basis for mechanical force regulation of the adhesin FimH via finger trap-like β sheet twisting. Cell 141, 645-655 (2010)、(d) G. Phan, Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC-FimH substrate. Nature 474, 49-53 (2011)、もしくは(e) S. Geibel, Structural and energetic basis of folded-protein transport by the FimD usher. Nature 496, 243-246 (2013)に教示される様式および/または条件で、FimHおよびFimCを天然に発現する細菌のペリプラズム中に見られる通りのFimCに結合したFimHを意味するかまたは含む。

【０１１１】

代替的または追加的に、ポリペプチドの抗FimH免疫原性は、生来型FimCと複合体化された生来型FimH（特に、高親和性コンホメーションである弛緩（R）状態（上記を参照されたい）のFimHを含む）のものよりも少なくとも20％高く、例えば、少なくとも30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、150％、200％、300％、400％または500％高い。免疫原性は、当技術分野で公知のいずれかの好適な手段、例えば、ELISAまたはLuminexにより決定することができる（実施例セクションを参照されたい）。

【０１１２】

代替的または追加的に、ポリペプチドにより誘導される自己凝集は、生来型FimHのものよりも少なくとも20％低く、例えば、少なくとも30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％低い。

【０１１３】

「ポリペプチドにより誘導される自己凝集が生来型FimHのものよりも少なくともX％低い」（このとき、「X」は20～100の数字である）とは、生来型FimHの代わりに細菌により発現される場合に、ポリペプチドが、同等の生来型FimHを発現するそれ以外は同

等の細菌よりも少なくともX％少ない細菌自己凝集を誘導することを意味するかまたは含む。「同等の生来型FimH」とは、試験で用いられる細菌に対して生来型のFimH、そこから本発明のポリペプチドが誘導された生来型FimH、および/またはそれに対して本発明のポリペプチドが最も高い配列同一性を有する生来型FimHを意味するかまたは含む。自己凝集を測定するための当技術分野で公知のいずれかの好適な手段を用いることができるが、一実施形態では、用いられる方法は、参照により本明細書中に組み入れられるSchembri, Christiansen and Klemm, 2001, ‘FimH-mediated autoaggregation of Escherichia coli’ Molecular Microbiology, 41(6), 1419-1430；または参照により本明細書中に組み入れられるThomas et al., 2002, ‘Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force’ Cell, 109(7):913-23；または参照により本明細書中に組み入れられるHartman et al., 2012, ‘Inhibition of bacterial adhesion to live human cells: Activity and cytotoxicity of synthetic mannosides’ FEBS Letters, 586(10): 1459-1465；または参照により本明細書中に組み入れられるFalk et al., 1995, ‘Chapter 9: Bacterial Adhesion and Colonization Assays’ Meth. Cell, Biol., 45:165-192；または参照により本明細書中に組み入れられるZanaboni et al., 2016, ‘A novel high-throughput assay to quantify the vaccine-induced inhibition of Bordetella pertussis adhesion to airway epithelia’ BMC Microbiol., 16:a215に記載されるものである。代替的または追加的に、細菌接着は、（簡潔には）以下の通りのBAIアッセイを用いて測定される：mCherry蛍光マーカーを発現するように遺伝子操作されたUPEC株を、FimH誘導体に対する特異的血清または陽性/陰性対照の存在下で、96ウェルプレート中でSV-HUC-1の単層と共に30分間インキュベートする。接着後、細胞を十分に洗浄し、未結合細菌を除去して、ホルムアルデヒドを用いて固定する。最後に、接着した細菌に伴う特異的蛍光シグナルを、自動化ハイコンテントスクリーニング顕微鏡（Opera Phenix）を用いて記録し、Harmonyソフトウェアを用いて定量化する。

【０１１４】

代替的または追加的に、ポリペプチドは、少なくとも20％まで、例えば、少なくとも30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％まで、または100％まで、細菌接着を阻害することが可能である。

【０１１５】

「細菌接着を阻害する」とは、細菌運動性を介して代わりに、または上記の（例えば、BAIアッセイを用いて）および/もしくは本明細書の実施例セクション中に記載される細菌接着アッセイを介して測定される接着を意味するかまたは含む。

【０１１６】

代替的または追加的に、ポリペプチドは、少なくとも2倍まで、例えば、少なくとも3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、または100倍まで、モルモット赤血球の血球凝集を阻害することが可能である。

【０１１７】

「血球凝集を阻害する」とは、Hultgren et al, Infect Immun 1986, 54, 613-620およびJarvis C et al, ChemMedChem 2016, 11, 367-373および/または実施例セクションに記載される血球凝集阻害アッセイ（HAI）により測定される通りの血球凝集の阻害を意味するかまたは含む。

【０１１８】

代替的または追加的に、ポリペプチドは可溶性であり、このことは、ポリペプチド（例えば、混合物中に存在し、かつ/または細胞により発現される）のうちの少なくとも50％w/wが可溶性形態にあり、例えば、ポリペプチドのうちの少なくとも60％、70％、80％、90％、95％または100％が可溶性形態にあることを意味するかまたは含む。

【０１１９】

本発明の第2の態様は、第1の態様に従うポリペプチドをコードする核酸、例えば、DN

AまたはRNAを提供する。

【０１２０】

代替的または追加的に、核酸は、選択された原核細胞または真核細胞、例えば、酵母細胞（例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）、ピキア・パストリス（Pichia pastoris））、昆虫細胞（例えば、ツマジロクサヨトウ（Spodoptera frugiperda）Sf21細胞、またはSf9細胞）、または哺乳動物細胞（Expi293、Expi293GNTI（Life Technologies社）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、およびヒト胎児腎臓293細胞（HEK293））での発現に対してコドン最適化されている。「コドン最適化された」は、核酸の翻訳効率および/または半減期を増加させることができるコドン使用頻度に関しての改変が意図される。多数の生物に対するコドン使用頻度/最適化表が周知であり、かつ公衆に利用可能である（例えば、Athey et al. 2017 BMC Bioinf. 18:391により提供される通り）。コドン最適化は、当技術分野で公知のいずれかの好適な手段、例えば、GeneArt社により提供される方法を用いて行なうことができる。

【０１２１】

代替的または追加的に、核酸は：

(1) 配列番号45、またはその変異体および/もしくは断片、
(2) 配列番号46、またはその変異体および/もしくは断片、
(3) 配列番号47、またはその変異体および/もしくは断片、
(4) 配列番号48、またはその変異体および/もしくは断片、
(5) 配列番号49、またはその変異体および/もしくは断片、
(6) 配列番号50、またはその変異体および/もしくは断片、
(7) 配列番号51、またはその変異体および/もしくは断片、
(8) 配列番号52、またはその変異体および/もしくは断片、
(9) 配列番号53、またはその変異体および/もしくは断片、
(10) 配列番号54、またはその変異体および/もしくは断片、
(11) 配列番号55、またはその変異体および/もしくは断片、
(12) 配列番号56、またはその変異体および/もしくは断片、
(13) 配列番号57、またはその変異体および/もしくは断片、
(14) 配列番号58、またはその変異体および/もしくは断片、
(15) 配列番号59、またはその変異体および/もしくは断片、
(16) 配列番号60、またはその変異体および/もしくは断片、
(17) 配列番号61、またはその変異体および/もしくは断片、
(18) 配列番号62、またはその変異体および/もしくは断片、
(19) 配列番号63、またはその変異体および/もしくは断片、
(20) 配列番号64、またはその変異体および/もしくは断片、
(21) 配列番号65、またはその変異体および/もしくは断片、
(22) 配列番号66、またはその変異体および/もしくは断片、
(23) 配列番号67、またはその変異体および/もしくは断片、
(24) 配列番号68、またはその変異体および/もしくは断片、
(25) 配列番号69、またはその変異体および/もしくは断片、
(26) 配列番号70、またはその変異体および/もしくは断片、
(27) 配列番号71、またはその変異体および/もしくは断片、
(28) 配列番号72、またはその変異体および/もしくは断片、
(29) 配列番号73、またはその変異体および/もしくは断片、
(30) 配列番号74、またはその変異体および/もしくは断片、
(31) 配列番号75、またはその変異体および/もしくは断片、
(32) 配列番号76、またはその変異体および/もしくは断片、
(33) 配列番号77、またはその変異体および/もしくは断片、
(34) 配列番号90、またはその変異体および/もしくは断片、

(35)配列番号91、またはその変異体および/もしくは断片、
(36)配列番号92、またはその変異体および/もしくは断片、
(37)配列番号93、またはその変異体および/もしくは断片、
(38)配列番号94、またはその変異体および/もしくは断片、
(39)配列番号95、またはその変異体および/もしくは断片、
(40)配列番号96、またはその変異体および/もしくは断片、
(41)配列番号97、またはその変異体および/もしくは断片、
(42)配列番号98、またはその変異体および/もしくは断片、ならびに
(43)配列番号99、またはその変異体および/もしくは断片
に対応する核酸配列を含むかまたはそれからなる。

【0122】
当業者は、本発明の核酸がRNAである場合、本発明の核酸配列（例えば、配列番号45～99）中のTはUによって置き換えられることを直ちに理解するであろう。

【0123】
本発明の第3の態様は、第2の態様の核酸を含むベクターを提供する。代替的または追加的に、ベクターは、プラスミド、例えば、発現プラスミドである。代替的または追加的に、プラスミドは、pCDNA3.1（Life Technologies社）、pCDNA3.4（Life Technologies社）、pFUSE、pBROAD、pSEC、pCMV、pDSG-IBA、およびpHEK293 Ultra等からなる群より選択される。代替的または追加的に、プラスミドは、細菌宿主細胞での発現に対して好適であり、かつpACYCDuet-1、pTrcHis2A、pET21、pET15 TEV、pET22b+、pET303/CT-HIS、PET303/CT、pBAD/Myc-His A、pET303、pET24b(+)等からなる群より選択される。

【0124】
代替的または追加的に、ベクターは、ウイルスベクター、例えば、RNAウイルスベクターである。代替的または追加的に、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、およびCHADからなる群より選択される。

【0125】
本発明の第4の態様は、第2の態様の核酸または第4の態様のベクターを含む細胞、例えば、宿主細胞を提供する。

【0126】
好適な哺乳動物宿主細胞は、当技術分野で公知である。代替的または追加的に、細胞は、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI（GnTI）活性を有しない。代替的または追加的に、細胞は、Expi293、Expi293GNTI（Life Technologies社）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、NIH-3T3細胞、293-T細胞、Vero細胞、HeLa細胞、PERC.6細胞（ECACC受託番号96022940）、Hep G2細胞、MRC-5（ATCC CCL-171）、WI-38（ATCC CCL-75）、胎児アカゲザル肺細胞（ATCC CL-160）、Madin-Darbyウシ腎臓（「MDBK」）細胞、Madin-Darbyイヌ腎臓（「MDCK」）細胞（例えば、MDCK（NBL2）、ATCC CCL34；またはMDCK 33016、DSM ACC 2219）、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、例えば、BHK21-F、HKCC細胞、ヒト胎児腎臓293細胞（HEK293）からなる群より選択される。

【0127】
好適な細菌宿主細胞は、当技術分野で公知である。例示的な細菌宿主細胞としては、以下のものおよびその誘導体のうちのいずれかが挙げられる：BL21（DE3）株、HMS174（DE3）株、Origami2（DE3）株、BL21DE3T1r株またはT7shuffle express株由来の大腸菌。

【0128】
本発明の第5の態様は、第4の態様において規定される通りの細胞中でタンパク質を発現させることにより、第1の態様において規定されるポリペプチドを生成する方法を提供する。

【0129】

本発明の第6の態様は、第1の態様において規定されるポリペプチド、第2の態様において規定される核酸、および/または第3の態様において規定されるベクターを含むワクチンを提供する。代替的または追加的に、ワクチンは、アジュバントを含む。

【０１３０】

一実施形態では、本発明のワクチンは、第1の態様において規定されるポリペプチドならびに3D-MPL、QS21およびリポソーム、例えば、コレステロールを含むリポソームのうちのいずれか1種を含むアジュバントを含む。一実施形態では、本発明のワクチンは、第1の態様において規定されるポリペプチドならびに3D-MPL、QS21およびコレステロールを含むリポソームを含むアジュバントを含む。

【０１３１】

本発明者らは、驚くべきことに、3D-MPL、QS21およびコレステロールを含むリポソームを含むアジュバント、例えば、AS01アジュバントを含むワクチンが、改善された免疫応答を生起し得ることを見出した。「改善された免疫応答」とは、参照またはワクチンを用いて免疫化されたマウスなどの動物の血清中および/または尿中のIgGのレベルと比較して、当該ワクチンを用いて免疫化されたマウスなどの動物の血清中および/または尿中の免疫グロブリンG（IgG）の増加したレベルを意味するかまたは含む。「血清中および/または尿中のIgGの増加したレベル」とは、少なくとも2倍まで、例えば、少なくとも3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、または50倍までの細胞を意味するかまたは含む。当該参照または対照ワクチンは、3D-MPL、QS21およびコレステロールを含むリポソームを含むアジュバントを含まず；例えば、当該参照または対照ワクチンは、PHADアジュバントを含む。

【０１３２】

本発明者らはまた、驚くべきことに、第1の態様において規定されるポリペプチドならびに3D-MPL、QS21およびコレステロールを含むリポソームを含むアジュバント、例えば、AS01アジュバントを含むワクチンが、1回または2回の用量後に保護免疫応答を生起することが可能であることも見出した。

【０１３３】

免疫原性組成物（例えば、ワクチン）は、製薬上許容されるであろう。免疫原性組成物は、通常、抗原に加えて成分を含み、例えば、典型的には、1種以上の医薬担体、賦形剤および/またはアジュバントを含む。担体および賦形剤の詳細な議論は、参照により本明細書中に組み入れられるCurrent Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30において利用可能である。ワクチンアジュバントの詳細な議論は、参照により本明細書中に組み入れられるVaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)；およびVaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series), ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Haganにおいて利用可能である。

【０１３４】

組成物は、一般的に、水性形態で哺乳動物に投与されるであろう。しかしながら、投与前に、組成物は非水性形態であったことができる。例えば、一部のワクチンは水性形態で製造され、続いて充填および分配され、水性形態で投与もされるが、他のワクチンは、製造中に凍結乾燥され、かつ使用時に水性形態へと再調製される。つまり、本発明の組成物は、乾燥、例えば凍結乾燥製剤であり得る。組成物は、チオマーサルまたは2-フェノキシエタノールなどの保存料を含むことができる。しかしながら、ワクチンが、水銀物質を実質的に含まない（すなわち、5μg/mL未満）、例えば、チオマーサル不含であるべきであることが好ましい。水銀を含有しないワクチンがより好ましい。保存料不含ワクチンが特に好ましい。熱安定性を改善するために、組成物は、温度保護剤を含むことができる。

【０１３５】

張性を制御するために、ナトリウム塩などの生理的塩を含めることが好ましい。塩化ナ

トリウム（NaCl）が好ましく、1～20mg/mL、例えば、約10±2mg/mL NaClで存在し得る。存在し得る他の塩としては、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、無水リン酸二ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム等が挙げられる。

【０１３６】

組成物は、一般的に、200mOsm/kg～400mOsm/kg、好ましくは240～360mOsm/kgの浸透圧を有し、より好ましくは290～310mOsm/kgの範囲内に入るであろう。

【０１３７】

組成物は、1種以上の緩衝剤を含むことができる。典型的な緩衝剤としては、リン酸緩衝剤；Tris緩衝剤；ホウ酸緩衝剤；コハク酸緩衝剤；ヒスチジン緩衝剤（特に水酸化アルミニウムアジュバントと共に）；またはクエン酸緩衝剤が挙げられる。緩衝剤は、典型的には、5～20mM範囲で含められるであろう。

【０１３８】

組成物のpHは、一般的には5.0～8.1、より典型的には6.0～8.0、例えば、6.5～7.5、または7.0～7.8であろう。

【０１３９】

組成物は、好ましくは無菌である。組成物は、好ましくは非パイロジェニックであり、例えば、用量当たり1EU（エンドトキシン単位、標準的尺度）未満、好ましくは用量当たり0.1EU未満を含有する。組成物は、好ましくはグルテン不含である。

【０１４０】

組成物は、単回免疫化のための材料を含むことができるか、または複数回免疫化のための材料を含むことができる（すなわち、「複数用量」キット）。保存料の含有が、複数用量設定では好ましい。複数用量組成物中に保存料を含めることの代替として（またはそれに加えて）、組成物は、材料の取り出しのための無菌アダプタを有する容器中に入れることができる。

【０１４１】

ヒトワクチンは、典型的には約0.5mLの投与量体積で投与されるが、半分の用量（すなわち、約0.25mL）を、小児に投与することができる。

【０１４２】

本発明の免疫原性組成物はまた、1種以上の免疫調節剤を含むことができる。好ましくは、免疫調節剤のうちの1種以上が、1種以上のアジュバントを含む。

【０１４３】

アジュバント

本発明のワクチンおよび免疫原性組成物はまた、抗原に加えてアジュバントも含むことができる。アジュバントは、抗原に対する免疫応答を強化および調節するために、ワクチン中で用いられる。本明細書中に記載されるアジュバントは、本明細書中に記載される抗原のうちのいずれかと組み合わせることができる。

【０１４４】

アジュバントは、当業者に公知のいずれかのアジュバントであり得るが、アジュバントとしては（限定するものではないが）、水中油型エマルジョン（例えば、MF59またはAS03）、リポソーム、サポニン、TLR2アゴニスト、TLR3アゴニスト、TLR4アゴニスト、TLR5アゴニスト、TLR6アゴニスト、TLR7アゴニスト、TLR8アゴニスト、TLR9アゴニスト、アルミニウム塩、ナノ粒子、微粒子、免疫刺激性複合体（ISCOM）、フッ化カルシウムおよび有機複合化合物またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【０１４５】

水中油型エマルジョン

本発明の実施形態では、水中油型エマルジョンを含む本発明での使用のためのワクチンまたは免疫原性組成物が提供される。本発明の水中油型エマルジョンは、代謝可能な油および乳化剤を含む。いずれかの水中油型組成物をヒト投与に対して好適にするために、エマルジョン系の油相は、代謝可能な油を含まなければならない。代謝可能な油との用語の意味は、当技術分野で周知である。代謝可能とは、「代謝により変換されることが可能で

ある」と定義することができる（Dorland's Illustrated Medical Dictionary、W.B. Sanders Company、第25版、1974）。特に好適な代謝可能な油はスクアレンである。スクアレン（2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサエン）は、サメ肝油中に多量に、かつオリーブ油、コムギ胚種油、米ヌカ油、および酵母中に比較的少量で見出される不飽和油であり、本発明の水中油型エマルジョン中での使用に対して特に好ましい油である。スクアレンは、コレステロールの生合成の中間体であることを理由に、代謝可能な油である（Merck index、第10版、項目番号8619）。一部の実施形態では、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物が水中油型エマルジョンを含む場合、代謝可能な油は、組成物の総体積の0.5%～10%(v/v)の量でワクチンまたは免疫原性組成物中に存在する。水中油型エマルジョンは、乳化剤をさらに含む。乳化剤は、好適には、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（POLYSORBATE 80）であり得る。さらに、当該乳化剤は、好適には、組成物の総体積の0.125%～4%(v/v)の量でワクチンまたは免疫原性組成物中に存在する。水中油型エマルジョンは、任意により、トコールを含むことができる。トコールは、当技術分野で周知であり、かつ欧州特許第0382271号B1に記載されている。好適には、トコールは、α-トコフェロールコハク酸エステル（ビタミンEコハク酸エステルとしても知られる）などのα-トコフェロールまたはその誘導体であり得る。当該トコールは、好適には、免疫原性組成物の総体積の0.25%～10%(v/v)の量でアジュバント組成物中に存在する。水中油型エマルジョンはまた、任意により、トリオレイン酸ソルビタン（SPAN 85）を含むこともできる。

【０１４６】

水中油型エマルジョンを製造する方法は、当業者に周知である。一般的に、方法は、油相（任意によりトコールを含む）をPBS/TWEEN（登録商標）80溶液などの界面活性剤と混合するステップ、および続いて、ホモジナイザーを用いる均質化を含み；混合物をシリンジ針に2回通すステップを含む方法が、少量の液体を均質化するために好適であることが、当業者には明らかであろう。同様に、マイクロフルイダイザー中での乳化プロセス（例えば、M110Sマイクロ流体機器、最大50回の通過、6barの最大圧力入力（約850barの出力圧力）で2分間にわたって）は、より少量または多量のエマルジョンを生成するために当業者により適応されることができるであろう。適応化は、調製物が必要な直径の油滴を伴って達成されるまで、得られるエマルジョンの測定を含む慣用の実験により達成することができるであろう。

【０１４７】

水中油型エマルジョンでは、油および乳化剤は、水性担体中にあるべきである。水性担体は、例えば、リン酸緩衝生理食塩液またはクエン酸塩であり得る。特に、本発明で用いられる水中油型エマルジョン系は、ミクロン未満の範囲の小型油滴サイズを有する。好適には、液滴サイズは、直径120～750nmの範囲内、より詳細には120～600nmのサイズであろう。さらにより詳細には、水中油型エマルジョンは、強度基準でそのうちの少なくとも70%が直径500nm未満、より詳細には強度基準で少なくとも80%が直径300nm未満、より詳細には強度基準で少なくとも90%が直径120～200nmの範囲内にある油滴を含有する。

【０１４８】

本発明に従う油滴サイズ、すなわち、直径は、強度により与えられる。強度により油滴サイズの直径を決定するいくつかの方法がある。強度は、サイジング機器を用いて、好適にはMalvern Zetasizer 4000または好ましくはMalvern Zetasizer 3000HSなどの動的光散乱により測定される。第1の可能性は、動的光散乱（PCS-光子相関分光法）により、z平均直径ZADを決定することであり；この方法は、追加的に多分散指数（PDI）を与え、ZADおよびPDIの両方が、キュムラントアルゴリズムを用いて算出される。これらの値は、粒子屈折率の知識を必要としない。第2の手段は、Contin、またはNNLS、または自動の「Malvern」のもの（サイジング機器により提供されるデフォルトアルゴリズム）のいずれかである、別のアルゴリズムにより、全粒径分布を決定することにより、油滴の直径を算出することである。大抵の場合、複合組成の粒子屈折率は未知である

ので、強度分布および、必要であれば、この分布に由来する強度平均のみが考慮される。

【０１４９】

ＩＳＣＯＭ

本発明の一部の実施形態では、ＩＳＣＯＭを含む本発明のワクチンまたは免疫原性組成物が提供される。ＩＳＣＯＭは、当技術分野で周知である（Ｋｅｒｓｔｅｎ & Ｃｒｏｍｍｅｌｉｎ，１９９５，Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ １２４１：１１７-１３８を参照されたい）。ＩＳＣＯＭは、サポニン、コレステロールおよびリン脂質を含み、かつ典型的には約４０ｎｍのサイズのオープンケージ様構造を形成する。ＩＳＣＯＭは、サポニン、コレステロールおよびさらなるリン脂質の相互作用から生じる。ＩＳＣＯＭの調製のための典型的な反応混合物は、５ｍｇ/ｍＬサポニンならびにコレステロールおよびリン脂質に関してそれぞれ１ｍｇ/ｍＬである。ＩＳＣＯＭでの使用に対して好適なリン脂質としては、限定するものではないが、ホスホコリン（ジデカノイル-Ｌ-α-ホスファチジルコリン［ＤＤＰＣ］、ジラウロイルホスファチジルコリン［ＤＬＰＣ］、ジミリストイルホスファチジルコリン［ＤＭＰＣ］、ジパルミトイルホスファチジルコリン［ＤＰＰＣ］、ジステアロイルホスファチジルコリン［ＤＳＰＣ］、ジオレオイルホスファチジルコリン［ＤＯＰＣ］、１-パルミトイル,２-オレオイルホスファチジルコリン［ＰＯＰＣ］、ジエライドイルホスファチジルコリン［ＤＥＰＣ］）、ホスホグリセロール（１,２-ジミリストイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスホグリセロール［ＤＭＰＧ］、１,２-ジパルミトイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスホグリセロール［ＤＰＰＧ］、１,２-ジステアロイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスホグリセロール［ＤＳＰＧ］、１-パルミトイル-２-オレオイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスホグリセロール［ＰＯＰＧ］）、ホスファチジン酸（１,２-ジミリストイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスファチジン酸［ＤＭＰＡ］、ジパルミトイルホスファチジン酸［ＤＰＰＡ］、ジステアロイル-ホスファチジン酸［ＤＳＰＡ］）、ホスホエタノールアミン（１,２-ジミリストイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスホエタノールアミン［ＤＭＰＥ］、１,２-ジパルミトイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスホエタノールアミン［ＤＰＰＥ］、１,２-ジステアロイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスホエタノールアミン［ＤＳＰＥ］、１,２-ジオレオイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスホエタノールアミン［ＤＯＰＥ］）、ホスホセリン、ポリエチレングリコール［ＰＥＧ］リン脂質（ｍＰＥＧ-リン脂質、ポリグリセリン-リン脂質、官能化リン脂質、末端活性化リン脂質）が挙げられる。特定の実施形態では、ＩＳＣＯＭは、１-パルミトイル-２-オレオイル-グリセロ-３-ホスホエタノールアミンを含む。さらなる特定の実施形態では、高精製ホスファチジルコリンが用いられ、かつホスファチジルコリン（卵由来）、水添ホスファチジルコリン（卵由来）、ホスファチジルコリン（ダイズ由来）、水添ホスファチジルコリン（ダイズ由来）からなる群より選択することができる。さらなる特定の実施形態では、ＩＳＣＯＭは、ホスファチジルエタノールアミン［ＰＯＰＥ］またはその誘導体を含む。多数のサポニンが、ＩＳＣＯＭでの使用に対して好適である。個々のサポニンのアジュバントおよび溶血活性は、当技術分野で広範囲にわたって研究されてきた。例えば、Ｑｕｉｌ Ａ（南アフリカの樹木キラヤ・サポナリア・モリナ（Ｑｕｉｌｌａｊａ Ｓａｐｏｎａｒｉａ Ｍｏｌｉｎａ）の樹皮から誘導される）、およびその画分が、米国特許第５,０５７,５４０号および“Ｓａｐｏｎｉｎｓ ａｓ ｖａｃｃｉｎｅ ａｄｊｕｖａｎｔｓ”，Ｋｅｎｓｉｌ，Ｃ．Ｒ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒ．Ｄｒｕｇ．Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔ．，１９９６，１２（１-２）：１-５５；および欧州特許第０３６２２７９号Ｂ１に記載されている。Ｑｕｉｌ Ａの画分を含むＩＳＣＯＭが、ワクチンの製造で用いられてきた（欧州特許第０１０９９４２号Ｂ１）。これらの構造は、アジュバント活性を有することが報告されている（欧州特許第ＥＰ０１０９９４２号Ｂ１；国際公開第９６/１１７１１号）。ＱｕｉｌＡの画分、ＱｕｉｌＡの誘導体および/またはその組み合わせが、ＩＳＣＯＭでの使用に対して好適なサポニン調製物である。溶血性サポニンＱＳ２１およびＱＳ１７（Ｑｕｉｌ ＡのＨＰＬＣ精製画分）は、強力なアジュバントとして記載されており、それらの製造方法が、米国特許第５,０５７,５４０号および欧州特許第０３６２２７９号Ｂ１に開示されている。全身性ワクチンに対する強力なアジュバントとして作用するＱＳ７（Ｑｕｉｌ-Ａの非溶血性画分）の使用もまた、これらの参考文献中に記載される。ＱＳ２１の使用が、Ｋｅｎｓｉｌ ｅｔ ａｌ.（１９９１．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ｖｏｌ １４６，４３１-４３７）にさらに記載されている。ＱＳ２１とポリソルベートまたはシクロデキストリンとの組み合わせは公知である（国際公開第９９/１０００８号）。 ＱＳ２１およびＱＳ７などのＱｕｉｌＡの画分を含む微粒子状ア

ジュバントシステムが、国際公開第96/33739号および同第96/11711号に記載され、これらは本明細書中に組み入れられる。QH-A、QH-B、QH-Cと表示される他の特定のQuilA画分、ならびにQH-703と表示されるQH-AおよびQH-Cの混合物が、ISCOMの形態で国際公開第96/011711号に開示され、本明細書中に組み入れられる。

【０１５０】

微粒子

本発明の一部の実施形態では、微粒子を含む本発明のワクチンまたは免疫原性組成物が提供される。微粒子、微粒子を含む組成物、および微粒子を生成する方法は当技術分野で周知である（Singh et al.［2007 Expert Rev. Vaccines 6(5): 797-808］および国際公開第98/033487号を参照されたい）。本明細書中で用いる場合、用語「微粒子」とは、様々な分子量、およびPLGなどのコポリマーの場合は様々なラクチド：グリコリド比を有するポリマー材料から誘導される、直径または長さ約10nm～約10,000μmの粒子を意味する。特に、微粒子は、投与デバイスおよび/または被験体の毛細血管を塞ぐことなく、被験体への非経口投与を可能にする直径のものであろう。微粒子はまた、マイクロスフェアとしても公知である。微粒子サイズは、光子相関分光法、レーザー回折法および/または走査型電子顕微鏡観察などの、当技術分野で周知の技術により、容易に決定される。本明細書中での使用のための微粒子は、滅菌可能、無毒かつ生分解性である材料から形成されるであろう。そのような材料としては、限定するものではないが、ポリ(a-ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステル、ポリ無水物が挙げられる。

【０１５１】

リポソーム

本発明の一部の実施形態では、リポソームを含む本発明のワクチンまたは免疫原性組成物が提供される。用語「リポソーム」とは、一般的に、水性内部を封入する単層または多層（特に、形成される脂質膜の数に応じて、2、3、4、5、6、7、8、9、または10層）脂質構造を意味する。リポソームおよびリポソーム製剤は、当技術分野で周知である。リポソームを形成することが可能な脂質としては、脂肪および脂肪様特性を有するすべての物質が挙げられる。リポソーム中の脂質を構成し得る脂質は、グリセリド、グリセロリン脂質、グリセロホスフィノ脂質、グリセロホスホノ脂質、スルホ脂質、スフィンゴ脂質、リン脂質、イソプレノリド、ステロイド、ステアリン、ステロール、アルケオ脂質（archeolipid）、合成カチオン性脂質および炭水化物含有脂質から構成される群から選択することができる。リポソームサイズは、リン脂質組成およびそれらの調製のために用いられる方法に応じて、30nmから数μmまで変わり得る。本発明の特定の実施形態では、リポソームサイズは、50nm～500nm、さらなる実施形態では、50nm～200nmの範囲内であろう。動的レーザー光散乱は、当業者に周知のリポソームのサイズを測定するために用いられる方法である。リポソームは、好適には室温で非結晶性である、中性脂質、例えば、ホスファチジルコリン、例えば、卵黄ホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）またはジラウリルホスファチジルコリンを好適に含有する。特定の実施形態では、本発明のリポソームは、DOPCを含有する。リポソームはまた、飽和脂質から構成されるリポソームに関してリポソーム-サポニン構造の安定性を増加させる荷電脂質も含有することができる。これらの場合、荷電脂質の量は、好適には、1～20%(w/w)、好ましくは5～10%である。ステロールのリン脂質に対する比率は、1～50%(mol/mol)、好適には20～25%(mol/mol)である。

【０１５２】

サポニン

本発明の一部の実施形態では、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物は、サポニンを含む。本発明での使用に対して特に好適なサポニンは、Quil Aおよびその誘導体である。Quil Aは、南アフリカの樹木キラヤ・サポナリア・モリナから単離されるサポニン調製物であり、アジュバント活性を有することが、1974年にDalsgaardら（“Saponin adjuvants”, Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Ve

rlag, Berlin, p243-254）により最初に記載された。Quil Aに伴う毒性を有さずにアジュバント活性を保持するQuil Aの精製画分、例えば、QS7およびQS21（QA7およびQA21としても知られる）がHPLCにより単離されている（EP0362278）。QS-21は、キラヤ・サポナリア・モリナの樹皮から誘導される天然サポニンであり、$CD8^+$細胞傷害性T細胞（CTL）、Th1細胞および優勢IgG2a抗体応答を誘導し、かつ本発明の文脈での特定のサポニンである。本発明の免疫原性組成物内のサポニンアジュバントは特に、QS-7またはQS-21、好適にはQS-21などのQuil Aの免疫学的に活性な画分である。特定の実施形態では、本発明のワクチンおよび/または免疫原性組成物は、実質的に純粋な形態で、免疫学的に活性なサポニン画分を含有する。特に、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物は、実質的に純粋な形態でQS21を含有し、すなわち、QS21は、少なくとも75%、80%、85%、90%純粋、例えば、少なくとも95%純粋、または少なくとも98%純粋である。

【0153】

特定の実施形態では、QS21は、例えば、コレステロールなどの外因性ステロールと共に提供される。好適なステロールとしては、β-シトステロール、スティグマステロール、エルゴステロール、エルゴカルシフェロールおよびコレステロールが挙げられる。さらなる特定の実施形態では、アジュバント組成物は、ステロールとしてコレステロールを含む。これらのステロールは当技術分野で周知であり、例えば、コレステロールは、動物脂肪中に見出される天然に存在するステロールとしてMerck Index、第11版、第341頁に開示されている。

【0154】

一実施形態では、サポニンを含む本発明のリポソームは、好適には室温で非結晶性である、中性脂質、例えば、ホスファチジルコリン、例えば、卵黄ホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）またはジラウリルホスファチジルコリンを好適に含有する。リポソームはまた、飽和脂質から構成されるリポソームに関するリポソーム-QS21構造の安定性を増加させる荷電脂質も含有することができる。これらの場合、荷電脂質の量は、好適には、1～20%(w/w)、特に5～10%である。ステロールのリン脂質に対する比率は、1～50%(mol/mol)、好適には20～25%(mol/mol)である。

【0155】

活性サポニン画分がQS21である場合、QS21：ステロールの比率は、典型的には1：100～1：1（w/w）、好適には1：10～1：1（w/w）、好ましくは1：5～1：1（w/w）程度であろう。好適には、過剰なステロールが存在し、QS21：ステロールの比率は、少なくとも1：2（w/w）である。一実施形態では、QS21：ステロールの比率は、1：5（w/w）である。ステロールは、好適にはコレステロールである。

【0156】

他の有用なサポニンは、セイヨウトチノキ（Aesculus hippocastanum）またはジオフィラ・ストルシウム（Gyophilla struthium）から誘導される。文献中に記載されてきた他のサポニンとしては、マロニエ、ラテン語名：エスクルス・ヒッポカスタヌム（Aesculus hippocastanum）の種子中に存在するサポニンの混合物として、Merck index（第12版：項目3737）に記載されてきたエスシン（Escin）が挙げられる。クロマトグラフィーおよび精製による（Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)）、およびイオン交換樹脂による（Erbring et al.、米国特許第3,238,190号）、その単離が記載される。エスシンの画分が精製され、生物学的に活性であることが示されている（Yoshikawa et al., 1996, Chem Pharm Bull (Tokyo), 44(8): 1454-1464）。ジプソフィラ・ストルシウム（Gypsophilla struthium）由来のサポアルビン（Sapoalbin）（R. Vochten et al., 1968, J. Pharm. Belg. 42: p213-226）もまた、例えば、ISCOM生成に関連して記載されている。

【0157】

QS21などのサポニンは、アジュバント組成物のヒト用量当たり1～100μgの量で用いることができる。QS21は、約50μg、例えば、40～60μg、好適には45～55μgま

たは49～51μgまたは50μgのレベルで用いることができる。さらなる実施形態では、アジュバント組成物のヒト用量は、約25μg、例えば、20～30μg、好適には21～29μgまたは22～28μgまたは28～27μgまたは24～26μg、または25μgのレベルでQS21を含む。

【0158】

TLR4アゴニスト

一部の実施形態では、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物は、TLR4アゴニストを含む。「TLRアゴニスト」とは、直接リガンドとしてまたは内因性もしくは外因性リガンドの生成を介して間接的に、TLRシグナル伝達経路を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能である成分を意味する（Sabroe et al, 2003, JI p1630-5）。TLR4アゴニストは、TLR-4シグナル伝達経路を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能である。TLR4アゴニストの好適な例は、リポ多糖、好適にはリピドAの無毒誘導体、特にモノホスホリルリピドAまたはより詳細には3-脱アシル化モノホスホリルリピドA（3D-MPL）である。

【0159】

3D-MPLは、名称MPLの下にGlaxoSmithKline Biologicals社により販売され、かつ本文書全体を通してMPLまたは3D-MPLと称される。例えば、米国特許第4,436,727号；同第4,877,611号；同第4,866,034号および同第4,912,094号を参照されたい。3D-MPLは、IFN-γ（Th1）表現型を有するCD4^{+}T細胞応答を主に促進する。3D-MPLは、英国特許出願公開第2 220 211号Aに開示される方法に従って生成することができる。化学的には、3D-MPLは、4、5または6個のアシル化鎖を有する3-脱アシル化モノホスホリルリピドAの混合物である。本発明の組成物では、小粒子3D-MPLを、水性アジュバント組成物を調製するために用いることができる。小粒子3D-MPLは、0.22μmフィルターを通して滅菌ろ過することができる粒径を有する。そのような調製物は、国際公開第94/21292号に記載されている。好ましくは、粉末化3D-MPLが、本発明の水性アジュバント組成物を調製するために用いられる。

【0160】

用いることができる他のTLR-4アゴニストは、国際公開第98/50399号または米国特許第6,303,347号（AGPの調製のためのプロセスもまた開示される）に開示されるものなどのアルキルグルコサミニドホスフェート（AGP）、好適にはRC527もしくはRC529または米国特許第6,764,840号に開示される通りのAGPの製薬上許容される塩である。

【0161】

他の好適なTLR-4アゴニストは、国際公開第03/011223号の第4～5頁または国際公開第03/099195号の第3～4頁に開示されるcompound I、compound IIおよびcompound III、特にER803022、ER803058、ER803732、ER804053、ER804057m ER804058、ER804059、ER804442、ER804680およびER804764として国際公開第03/011223号に開示される化合物など、国際公開第03/011223号および同第03/099195号に記載される通りである。例えば、1つの好適なTLR-4アゴニストはER804057である。

【0162】

3D-MPLなどのリポ多糖などのTLR-4アゴニストは、アジュバント組成物のヒト用量当たり1～100μgの量で用いることができる。3D-MPLは、ヒト用量当たり約50μg、例えば、40～60μg、好適には45～55μgまたは49～51μgまたは50μgのレベルで用いることができる。さらなる実施形態では、アジュバント組成物のヒト用量は、約25μg、例えば、20～30μg、好適には21～29μgまたは22～28μgまたは28～27μgまたは24～26μg、または25μgのレベルで3D-MPLを含む。

【0163】

リピドAの合成誘導体は公知であり、限定するものではないが、以下のものを含むTLR4アゴニストであると考えられる：

OM174（2-デオキシ-6-o-[2-デオキシ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラ-デカノイルアミノ]-4-o-ホスホノ-β-D-グルコピラノシル]-2-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]-α-D-グルコピラノシルジヒドロゲンホスフェート）、（国際公開第95/14026号）
OM294 DP (3S, 9 R) -3--[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9(R)-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1,10-ビス(ジヒドロゲノホスフェート)（国際公開第99/64301号および同第00/0462号）
OM197 MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1-ジヒドロゲノホスフェート10-(6-アミノヘキサノエート)（国際公開第01/46127号）
PHAD（リン酸化ヘキサアシル二糖）。

【０１６４】

TLR-4を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能である他の好適なTLR-4リガンド（Sabroe et al, JI 2003 p1630-5）は、例えば、グラム陰性細菌由来のリポ多糖およびその誘導体、またはその断片、特にLPSの無毒誘導体（3D-MPLなど）である。他の好適なTLRアゴニストは：熱ショックタンパク質（HSP）10、60、65、70、75もしくは90；界面活性剤タンパク質A、ヒアルロナンオリゴ糖、ヘパラン硫酸断片、フィブロネクチン断片、フィブリノゲンペプチドおよびb-ディフェンシン-2、ムラミルジペプチド（MDP）または呼吸器合胞体ウイルス（RSV）のFタンパク質である。一実施形態では、TLRアゴニストは、HSP60、70または90である。

【０１６５】

TLRアゴニスト

TLR4アゴニストではなく、TLR分子の他の天然または合成アゴニストを、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物中で用いることができる。これらとしては、限定するものではないが、TLR2、TLR3、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8およびTLR9に対するアゴニストが挙げられる。

【０１６６】

本発明の一実施形態では、TLR-1を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストが用いられる（Sabroe et al, JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-1を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストは：三アシル化リポペプチド（LP）；フェノール可溶性モジュリン；結核菌（Mycobacterium tuberculosis）LP；細菌リポタンパク質のアセチル化アミノ末端およびボレリア・ブルグドルフェリ（Borrelia burgdorferi）由来のOspA LPを模倣する、S-(2,3-ビス(パルミトイルオキシ)-(2-RS)-プロピル)-N-パルミトイル-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH、トリヒドロクロリド（Pam3Cys）LPから選択される。

【０１６７】

さらなる実施形態では、TLR-2を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストが用いられる（Sabroe et al, JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-2を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストは、リポタンパク質、ペプチドグリカン、結核菌、B.ブルグドルフェリ、T.パリドゥム（T. pallidum）由来の細菌リポペプチド、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）をはじめとする生物種由来のペプチドグリカン、リポタイコ酸、マンヌロン酸、ナイセリア属ポリン（porin）、細菌線毛、エルシニア属毒性因子、CMVビリオン、麻疹血球凝集素、および酵母由来のザイモサンのうちの1種以上である。

【０１６８】

さらなる実施形態では、TLR-3を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストが用いられる（Sabroe et al, JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-3を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストは、二

本鎖RNA（dsRNA）、またはポリイノシン酸-ポリシチジル酸（Poly IC）、ウイルス感染に関連する分子核酸パターンである。

【０１６９】

代替的な実施形態では、TLR-5を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストが用いられる（Sabroe et al, JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-5を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストは、細菌フラジェリンである。当該TLR-5アゴニストはフラジェリンであり得るか、またはTLR-5アゴニスト活性を保持するフラジェリンの断片であり得る。フラジェリンとしては、H.ピロリ、ネズミチフス菌（S. typhimurium）、コレラ菌（V. cholera）、セラチア菌（S. marcescens）、フレキシネル赤痢菌（S. flexneri）、梅毒トレポネーマ（T. pallidum）、L.ニューモフィラ（L. pneumophilia）、B.ブルグドルフェリ；C.ディフィシレ（C. difficile）、R.メリロティ（R. meliloti）、A.ツメファシエンス（A. tumefaciens）；R.ルピネ（R. lupine）；B.クラリゲイアエ（B. clarridgeiae）、P.ミラビリス（P. mirabilis）、枯草菌（B. subtilis）、L.モノサイトゲネス（L. moncytogenes）、緑膿菌（P. aeruginosa）および大腸菌からなる群より選択されるポリペプチドが挙げられる。

【０１７０】

特定の実施形態では、フラジェリンは、ネズミチフス菌フラジェリンB（Genbank登録番号AF045151）、ネズミチフス菌フラジェリンBの断片、大腸菌FliC（Genbank登録番号AB028476）；大腸菌FliCの断片；ネズミチフス菌フラジェリンFliC（ATCC14028）およびネズミチフス菌フラジェリンFliCの断片からなる群より選択される。

【０１７１】

さらなる特定の実施形態では、当該TLR-5アゴニストは、国際公開第09/156405号に記載される通りの切断型フラジェリン、すなわち、超可変ドメインが欠失されているものである。本実施形態の一態様では、当該TLR-5アゴニストは、$FliC_{\Delta 174\text{-}400}$；$FliC_{\Delta 161\text{-}405}$および$FliC_{\Delta 138\text{-}405}$からなる群より選択される。

【０１７２】

さらなる特定の実施形態では、当該TLR-5アゴニストは、国際公開第09/128950号に記載される通りのフラジェリンである。さらなる実施形態では、TLR-6を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストが用いられる（Sabroe et al, JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-6を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストは、ミコバクテリア属リポタンパク質、二アシル化LP、およびフェノール可溶性モジュリンである。さらなるTLR6アゴニストは、国際公開第03/043572号に記載されている。

【０１７３】

さらなる実施形態では、TLR-7を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストが用いられる（Sabroe et al, JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-7を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストは、一本鎖RNA（ssRNA）、ロキソリビン、N7およびC8位でのグアノシンアナログ、またはイミダゾキノリン化合物、もしくはその誘導体である。特定の実施形態では、TLRアゴニストはイミキモドである。さらなるTLR7アゴニストは、国際公開第02/085905号に記載されている。

【０１７４】

さらなる実施形態では、TLR-8を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストが用いられる（Sabroe et al, JI 2003 p1630-5）。好適には、TLR-8を介したシグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストは、一本鎖RNA（ssRNA）、抗ウイルス活性を有するイミダゾキノリン分子、例えば、レシキモド（R848）であり；レシキモドはまた、TLR-7による認識も可能である。用いることができる他のTLR-8アゴニストとしては、国際公開第04/071459号に記載されるものが挙げられる。

【０１７５】
さらなる実施形態では、CpGモチーフを含むものなどの、シグナル伝達応答を引き起こすことが可能であるTLRアゴニストが用いられる。用語「免疫刺激性オリゴヌクレオチド」は、免疫系の成分を活性化することが可能なオリゴヌクレオチドを意味するために本明細書中で用いられる。一実施形態では、免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、1個以上の非メチル化シトシン-グアノシン（CpG）モチーフを含む。さらなる実施形態では、免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、1個以上の非メチル化チミジン-グアノシン（TG）モチーフを含むか、またはTリッチであり得る。Tリッチとは、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド組成が、50、60、70または80％超のチミジンを含むことを意味する。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは免疫刺激性オリゴヌクレオチドでなく、かつ非メチル化CpGモチーフを含まない。さらなる実施形態では、免疫刺激性オリゴヌクレオチドはTリッチでなく、かつ/または非メチル化TGモチーフを含まない。
【０１７６】
オリゴヌクレオチドは、in vitroおよび/またはin vivo安定性を改善するために修飾することができる。例えば、一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート骨格、すなわち、ヌクレオチド間連結を含むために修飾される。ジホスホロチオエート、ホスホロアミダートおよびメチルホスホネート修飾をはじめとする他の好適な修飾ならびにオリゴヌクレオチドに対する代替的なヌクレオチド間連結は、当業者に周知であり、かつ本発明により包含される。
【０１７７】
別の実施形態では、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物は、TLR-1アゴニスト、TLR-2アゴニスト、TLR-3アゴニスト、TLR-4アゴニスト、TLR-5アゴニスト、TLR-6アゴニスト、TLR-7アゴニスト、TLR-8アゴニスト、TLR-9アゴニスト、またはそれらの組み合わせからなる群より選択される免疫刺激剤をさらに含む。
【０１７８】
カルシウム複合材料
一部の実施形態では、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物は、Ca、F、およびZを含むフッ化カルシウム複合材料を含む。「Z」とは、本明細書中で用いる場合、有機分子を意味する。本明細書中で用いる場合、「複合材料」は、乾燥している場合には固体として存在し、かつ純水中で不溶性であるか、または難溶性である材料である。一部の態様では、Zは、イオン化された場合にアニオンを形成する官能基を含む。そのような官能基としては、限定するものではないが、ヒドロキシル、ヒドロキシレート（hydroxylate）、ヒドロキソ、オキソ、N-ヒドロキシレート、ヒドロキサメート（hydroaxamate）、N-オキシド、重炭酸塩、炭酸塩、カルボン酸塩、脂肪酸、チオレート、有機リン酸塩、リン酸二水素塩（dihydrogenophosphate）、リン酸一水素塩（monohydrogenophosphate）、リン酸のモノエステル、リン酸のジエステル、リン脂質のエステル、ホスホオロチオエート、硫酸塩、硫酸水素塩、エノラート、アスコルビン酸塩、ホスホアスコルビン酸塩、フェノラート、およびイミン-オレート（imine-olate）からなる群より選択される1種以上の官能基が挙げられる。
【０１７９】
一部の態様では、本明細書中に記載されるフッ化カルシウム複合材料はZを含み、Zは、カルシウムに対する親和性を保有し、かつカルシウムおよびフッ素と共に水不溶性複合材料を形成するアニオン性有機分子である。さらなる態様では、本明細書中に記載されるフッ化カルシウム複合材料はZを含み、Zは、ヒドロキシル、ヒドロキシレート、ヒドロキソ、オキソ、N-ヒドロキシレート、ヒドロキサメート（hydroaxamate）、N-オキシド、重炭酸塩、炭酸塩、カルボン酸塩およびジカルボン酸塩、カルボン酸の塩、QS21の塩、キラヤ・サポナリアの樹皮の抽出物、免疫学的に活性なサポニンの抽出物、飽和または不飽和脂肪酸の塩、オレイン酸の塩、アミノ酸の塩、チオレート、チオ乳酸塩、チオール化合物の塩、システインの塩、N-アセチル-システインの塩、L-2-オキソ-4-チアゾリジンカルボキシレート、リン酸塩、リン酸二水素塩、リン酸一水素塩、リン酸の塩、リン

酸のモノエステルおよびその塩、リン酸のジエステルおよびその塩、3-O-デスアシル-4'-モノホスホリルリピドAのエステル、3D-MLAのエステル、MPL、リン脂質のエステル、DOPC、ジオレオイルホスファチジン酸（dioleolyphosphatidic）誘導体、CpGモチーフ由来のリン酸塩、CpGファミリー由来のホスホロチオエート、硫酸塩、硫酸水素塩、硫酸の塩、エノラート、アスコルビン酸塩、ホスホアスコルビン酸塩、フェノラート、α-トコフェロール、イミン-オレート（imine-olate）、シトシン、メチルシトシン、ウラシル、チミン、バルビツール酸、ヒポキサンチン、イノシン、グアニン、グアノシン、8-オキソ-アデニン、キサンチン、尿酸、プテロイン酸、プテロイルグルタミン酸、葉酸、リボフラビン、およびルミフラビンからなる群より選択される化学的分類のメンバーを含むとして分類することができる。さらなる態様では、本明細書中に記載されるフッ化カルシウム複合材料はZを含み、Zは、N-アセチルシステイン；チオ乳酸塩；アジピン酸塩；炭酸塩；葉酸；グルタチオン；および尿酸からなる群より選択される。一部の態様では、本明細書中のフッ化カルシウム複合材料はZを含み、Zは、N-アセチルシステイン；アジピン酸塩；炭酸塩；および葉酸からなる群より選択される。さらなる態様では、本明細書中のフッ化カルシウム複合材料はZを含み、ZはN-アセチルシステインであり、かつ複合材料は、51％Ca、48％F、1％以下のN-アセチルシステイン（w/w）から、37％Ca、26％F、および37％N-アセチルシステイン（w/w）までを含む。さらなる態様では、本明細書中のフッ化カルシウム複合材料はZを含み、Zはチオ乳酸塩であり、かつ複合材料は、51％Ca、48％F、1％以下のチオ乳酸塩（w/w）から、42％Ca、30％F、28％チオ乳酸塩（w/w）までを含む。さらなる態様では、本明細書中のフッ化カルシウム複合材料はZを含み、Zはアジピン酸塩であり、かつ複合材料は、51％Ca、48％F、1％以下のアジピン酸塩（w/w）から、38％Ca、27％F、35％アジピン酸塩（w/w）までを含む。さらなる態様では、本明細書中のフッ化カルシウム複合材料はZを含み、Zは炭酸塩であり、かつ複合材料は、51％Ca、48％F、1％以下の炭酸塩（w/w）から、48％Ca、34％F、18％炭酸塩（w/w）までを含む。さらなる態様では、本明細書中のフッ化カルシウム複合材料はZを含み、Zは葉酸であり、かつ複合材料は、51％Ca、48％F、1％以下の葉酸（w/w）から、22％Ca、16％F、62％葉酸（w/w）までを含む。さらなる態様では、本明細書中のフッ化カルシウム複合材料はZを含み、Zはグルタチオンであり、かつ複合材料は、51％Ca、48％F、1％以下のグルタチオン（w/w）から、28％Ca、20％F、52％グルタチオン（w/w）までを含む。さらなる態様では、本明細書中のフッ化カルシウム複合材料はZを含み、Zは尿酸であり、かつ複合材料は、51％Ca、48％F、1％以下の尿酸（w/w）から、36％Ca、26％F、38％尿酸（w/w）までを含む。

【０１８０】

アルミニウム塩

一実施形態では、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物は、アルミニウム塩を含む。好適なアルミニウム塩アジュバントは当業者に周知であり、限定するものではないが、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウムまたはそれらの組み合わせが挙げられる。好適なアルミニウム塩アジュバントとしては、限定するものではないが、REHYDRAGEL HS、ALHYDROGEL 85、REHYDRAGEL PM、REHYDRAGEL AB、REHYDRAGEL HPA、REHYDRAGEL LV、ALHYDROGELまたはそれらの組み合わせが挙げられる。

【０１８１】

特に、アルミニウム塩は、2.5～3.5、2.6～3.4、2.7～3.3または2.9～3.2、2.5～3.7、2.6～3.6、2.7～3.5、または2.8～3.4タンパク質（BSA）/mLアルミニウム塩のタンパク質吸着能を有し得る。本発明の特定の実施形態では、アルミニウム塩は、2.9～3.2mg BSA/mgアルミニウム塩のタンパク質吸着能を有する。アルミニウム塩のタンパク質吸着能は、当業者に公知のいずれかの手段により測定することができる。アルミニウム塩のタンパク質吸着能は、国際公開第12/136823号のExample 1に記載される通りの方法（BSAを利用する）またはその変法を用いて測定することができる。

【０１８２】

本明細書中に記載されるアルミニウム塩（すなわち、本明細書中に記載されるタンパク質吸着能を有する）は、X線回折により測定される場合に2.8～5.7nm、例えば、X線回折により測定される場合に2.9～5.6nm、2.8～3.5nm、2.9～3.4nmまたは3.4～5.6nmまたは3.3～5.7nmの結晶サイズを有し得る。X線回折は、当業者に周知である。本発明の特定の実施形態では、結晶サイズは、国際公開第12/136823号のExample 1に記載される方法またはその変法を用いて測定される。

【０１８３】

本明細書中に記載されるポリペプチドおよび/または核酸は、いずれかの投与経路により、例えば、経口的、鼻内的、舌下的、静脈内的、筋内的、皮内的（例えば、マイクロプロジェクションを用いる皮膚パッチ剤）または経皮的（例えば、軟膏剤またはクリーム剤）に、被験体に投与することができる。

【０１８４】

本発明の第7の態様は、医薬での使用のための、第1の態様において規定されるポリペプチド、第2の態様において規定される核酸、第3の態様において規定されるベクター、および/または第6の態様のワクチンを提供する。

【０１８５】

第8の態様は、哺乳動物での免疫応答の生起での使用のための、例えば、1種以上の疾患を治療および/または予防するための、第1の態様において規定されるポリペプチド、第2の態様において規定される核酸、第3の態様において規定されるベクター、および/または第6の態様のワクチンを提供する。

【０１８６】

第9の態様は、哺乳動物での免疫応答を生起するための、例えば、1種以上の疾患を治療および/または予防するための、第1の態様において規定されるポリペプチド、第2の態様において規定される核酸、第3の態様において規定されるベクター、および/または第6の態様のワクチンの使用を提供する。

【０１８７】

第10の態様は、哺乳動物での免疫応答を生起するための、例えば、1種以上の疾患を治療および/または予防するための医薬の製造のための、第1の態様において規定されるポリペプチド、第2の態様において規定される核酸、第3の態様において規定されるベクター、および/または第6の態様のワクチンの使用を提供する。

【０１８８】

第11の態様は、有効量の第1の態様において規定されるポリペプチド、第2の態様において規定される核酸、第3の態様において規定されるベクター、および/または第6の態様のワクチンを哺乳動物に投与するステップを含むかまたはそれからなる、哺乳動物での免疫応答を生起する方法を提供する。

【０１８９】

第7～第11の態様のうちのいずれか1つの使用または方法であって、1種以上の疾患は、尿路感染症（UTI）である。代替的または追加的に、UTIは、エシェリキア属およびクレブシエラ属からなる群より選択される属の1種以上の細菌により引き起こされる。代替的または追加的に、1種以上の細菌は、大腸菌およびクレブシエラ・ニューモニエからなる群より選択される。代替的または追加的に、大腸菌は、尿路病原性大腸菌（UPEC）である。代替的または追加的に、1種以上の細菌は、大腸菌J96、大腸菌UPEC 536、大腸菌CFT073、大腸菌UMN026、大腸菌クローンDi14、大腸菌クローンDi2、大腸菌CFT073；大腸菌IA139、大腸菌536、大腸菌NA114、および大腸菌UTI89からなる群より選択される。代替的または追加的に、1種以上の細菌は、以下のK.ニューモニエ菌株からなる群より選択される：C3091、3824、3857、3858、3859、3860、3861、3928、3950、3951、4041、4121、4133、sp3、sp7、sp10、sp13、sp14、sp15、sp19、sp20、sp22、sp25、sp28、sp29、sp30、sp31、sp32、sp33、sp34、sp37、sp39、sp41、cas119、cas120、cas121、cas122、cas123、cas124、cas125、cas126、cas127、cas128、cas663、cas664、cas665、cas66

6、cas667、cas668、cas669、cas670、cas671、cas672、cas673、cas674、cas675、cas676、cas677、cas678、cas679、cas680、cas681、cas682、Kp342およびMGH78578。

【０１９０】

本発明の特定の態様を具現化する好ましい非限定的な例が、以下の表および図面を参照して、ここで記載される。

【図面の簡単な説明】

【０１９１】

【図１Ａ】FimH構築物の模式的表示を示す図である。(A) 安定化型FimHの構造（PDB：4XO9）。FimGFimGドナー鎖（青色、矢印によって示される）により安定化されたFimHの漫画的表示。ドメインFimH$_L$は黄色（上側部分）であり、FimH$_P$は赤色（下側部分）である。ドメイン間のグリシン天然リンカーは、緑色の棒で表わされる。

【図１Ｂ】FimH構築物の模式的表示を示す図である。(B) FimH_DG_PGDGN_フェリチンの構造。フェリチン（赤色）に融合されたFimH_DG_PGDGN（明青色）のアミノ酸配列。SGS-8H-GSG-により構成されるリンカーが、FimHをフェリチン分子へと連結している。哺乳動物細胞での発現および培地中への分泌のためのIgKリーダー配列は黄色であり、それに追加のN末端荷電残基が続く。Rosetta共通ソフトウェアを用いて取得された3D構造のモデル。フェリチン表面上に提示されるFimH_DGの漫画的表示。24個のFimHサブユニットが存在し、黄色/青色に着色され、フェリチンは赤色に着色されている。

【図２Ａ－１】FimHナノ粒子の大腸菌発現が封入体形成をもたらすことを示す図である。(A) FimH_DG_(GSG4)-フェリチン、FimHL cys-cys_Qβ、FimHL cys-cys_mI3およびFimHL-NOcys-MI3の加熱および還元サンプルでの大腸菌細胞質発現のSDS-PAGE分析。構築物が発現されるが、不溶性画分（尿素8M、U8M）中のみで検出することができ、かつ可溶性画分（sol）では検出できない。タンパク質は、不溶性に起因して総溶解物画分（Tot）中では検出できず；不溶性物質の蓄積を、ゲルの上部で検出することができる。FimHL-Nocys-MI3の加熱および還元サンプルでの大腸菌細胞質発現の抗Hisウエスタンブロッティング。可溶性画分ではかすかなバンドのみしか検出できないので、FimHLドメイン中の内部ジスルフィド架橋の突然変異は、溶解度を改善しなかった。

【図２Ａ－２】FimHナノ粒子の大腸菌発現が封入体形成をもたらすことを示す図である。(A) FimH_DG_(GSG4)-フェリチン、FimHL cys-cys_Qβ、FimHL cys-cys_mI3およびFimHL-NOcys-MI3の加熱および還元サンプルでの大腸菌細胞質発現のSDS-PAGE分析。構築物が発現されるが、不溶性画分（尿素8M、U8M）中のみで検出することができ、かつ可溶性画分（sol）では検出できない。タンパク質は、不溶性に起因して総溶解物画分（Tot）中では検出できず；不溶性物質の蓄積を、ゲルの上部で検出することができる。FimHL-Nocys-MI3の加熱および還元サンプルでの大腸菌細胞質発現の抗Hisウエスタンブロッティング。可溶性画分ではかすかなバンドのみしか検出できないので、FimHLドメイン中の内部ジスルフィド架橋の突然変異は、溶解度を改善しなかった。

【図２Ａ－３】FimHナノ粒子の大腸菌発現が封入体形成をもたらすことを示す図である。(A) FimH_DG_(GSG4)-フェリチン、FimHL cys-cys_Qβ、FimHL cys-cys_mI3およびFimHL-NOcys-MI3の加熱および還元サンプルでの大腸菌細胞質発現のSDS-PAGE分析。構築物が発現されるが、不溶性画分（尿素8M、U8M）中のみで検出することができ、かつ可溶性画分（sol）では検出できない。タンパク質は、不溶性に起因して総溶解物画分（Tot）中では検出できず；不溶性物質の蓄積を、ゲルの上部で検出することができる。FimHL-Nocys-MI3の加熱および還元サンプルでの大腸菌細胞質発現の抗Hisウエスタンブロッティング。可溶性画分ではかすかなバンドのみしか検出できないので、FimHLドメイン中の内部ジスルフィド架橋の突然変異は、溶解度を改善しなかった。

【図２Ｂ】FimHナノ粒子の大腸菌発現が封入体形成をもたらすことを示す図である。(B) FimHL-MI3の大腸菌ペリプラズム発現および細胞質FimHL-フェリチンのSDS-PAGE分析。FimHL-MI3およびフェリチン融合体に対応するバンドは、総溶解物中および不溶

性画分（U8M）中で検出された。
【図３】NetNGly予測ソフトウェアを用いるN-グリコシル化FimH部位の予測を示す図である。
【図４】哺乳動物細胞での安定化型FimH構築物（FimH_ΔGG_PGDGN_DG: 930SI；FimH_DNKQ_DG: 931SI；FimH_PGDGN_DG: 932SI）およびFimHC複合体の発現を示す図である。
【図５】N末端の追加アミノ酸を含む哺乳動物発現構築物のウエスタンブロット分析を示す図である。(A) 図5A：FIMHナノ粒子に対応するバンドは、トランスフェクション3日間後および6日間後のFIMH_DG_PGDGN-フェリチン（995SI）に関してのみ検出された。(B) 図5B：536株由来のFimHの漫画的表示であり、J96と比較して3個の異なる残基が強調され、棒により表わされる。(C) 図5C：J96株由来のFIMH_DG_PGDGN_IMX313およびFIMH_DG_PGDGN_フェリチンのPNGアーゼ処理。処理後、正しいMWでのFIMH_DG_PGDGN_IMX313のシフトが得られ、哺乳動物細胞ではタンパク質がグリコシル化されることを示唆した。J96株由来のFIMH_DG_PGDGN_フェリチンは、未処理および処理済みPNGアーゼサンプルの両方で検出されず、このタンパク質が分解することを示唆した。
【図６－１】MS-Specペプチドマッピングを示す図である。
【図６－２】MS-Specペプチドマッピングを示す図である。
【図６－３】MS-Specペプチドマッピングを示す図である。
【図６－４】MS-Specペプチドマッピングを示す図である。
【図７】ウエスタンブロットによる追加のN末端アミノ酸を含まない候補の発現を示す図である。
【図８Ａ】N末端に追加のAAを含むかまたは含まない候補のクライオEM NS-EM（ネガティブ染色）を示す図である。
【図８Ｂ】N末端に追加のAAを含むかまたは含まない候補のクライオEM NS-EM（ネガティブ染色）を示す図である。
【図８Ｃ】N末端に追加のAAを含むかまたは含まない候補のクライオEM NS-EM（ネガティブ染色）を示す図である。
【図８Ｄ】N末端に追加のAAを含むかまたは含まない候補のクライオEM NS-EM（ネガティブ染色）を示す図である。
【図９】N末端に追加のAAを含まない候補のクライオEM NS-EM（ネガティブ染色）を示す図である。(A) 図9A：追加のアミノ酸を含まない1095SI FIMHL-フェリチン（536株）のネガティブ染色顕微鏡像。(B) 図9B：追加のアミノ酸を含まないFIMHL-MI3（J96株）のネガティブ染色顕微鏡像。(C) 図9C：追加のアミノ酸を含まない1184SI FIMH_DG_PGDGN_536-エンカプスリンのネガティブ染色顕微鏡像。
【図１０】3Dマップが、3回転軸上に3つの「アンカー様」付属物の存在を示すことを示す図である。
【図１１】ELISAアッセイによるIgG力価測定を示す図である。マウス血清を、ワクチン接種21日間後（用量I後、緑色）、35日間後（用量II後、青色）、および45日間後（用量III後、赤色）で試験した。大腸菌により産生されたFimHLを、ELISAプレートコーティングとして用いた。
【図１２】SV-HUC細胞に対する細菌阻害アッセイ（BAI）を示す図である。顕微鏡観察分析（OPERA Phenix）およびSV-HUC（ATCC）細胞により測定される細菌接着を用いた。接着性細菌の蛍光体積（volume）または面積（μm3または2）を読み出し値として用いた。組み換えタンパク質FimHC、FimHL-cys（大腸菌から精製された）に対して生起された血清のプールを、対照として用いた。ExPIGnti発現哺乳動物系から精製した組み換えタンパク質FimH_PGDGN_DG（932SI）、FimH_DNKQ_DG（931SI）、FimH_DNKQ_DG_Deglyc（951SI）およびFimH_PGDGN_DG-フェリチン（995SI）に対して生起された血清のプールを、SV-HUC細胞に対する細菌結合性を阻害するそれらの能力を測定するために用いた。AS01に対して生起された血清のプールを、陰性

対照として用いた。
【図１３】SDS-PAGE、SE-UPLCおよびRP-UPLCによる精製FimH_PGDGN_DGの生化学的特性決定を示す図である。
【図１４】SDS-PAGE、SE-UPLCおよびRP-UPLCによる精製FimH_DNKQ_DGの生化学的特性決定を示す図である。
【図１５】SDS-PAGE、SE-UPLCおよびRP-UPLCによる精製FimH_DNKQ_DG_脱グリコシル化の生化学的特性決定を示す図である。
【図１６－１】N末端に追加のAAを含む精製FIMH_DG_PGDGN_フェリチン（UPEC 536株由来の配列）の生化学的特性決定を示す図である。
【図１６－２】N末端に追加のAAを含む精製FIMH_DG_PGDGN_フェリチン（UPEC 536株由来の配列）の生化学的特性決定を示す図である。
【図１６－３】N末端に追加のAAを含む精製FIMH_DG_PGDGN_フェリチン（UPEC 536株由来の配列）の生化学的特性決定を示す図である。
【図１７】FimH特異的総IgG（ELISA）を示す図である。図17A：MPL用量の関数としてプロットされた用量3後でのマウス血清中の抗FimH IgG力価。図17B：1回目、2回目および3回目ワクチン用量後に測定されたマウス尿中の抗FimH IgG力価。免疫前血清を、陰性対照として用いた。FimHCを、1.6μgのタンパク質含有量を用いて、アジュバントと組み合わせて免疫化した。
【図１８Ａ】FimH特異的総IgG（ELISA）：血清および尿中での細菌と哺乳動物発現系との比較を示す図である。(A) 抗体力価は対数正規型（lognormally）に分布すると仮定し、幾何平均力価（GMT）およびその両側95％CIを計算した。群の比較のために、ANOVAモデルを、群、時点およびそれらの相互作用を固定因子として、ならびに時点に関する反復提示を用いて、log10力価に対してフィッティングした。分散の不均一性を、群間で考慮した。幾何平均比率およびそれらの95％CIをこのモデルから誘導した。各製剤に対する抗体応答を、ELISAプレートコーティングのために用いたFimHDGに対して評価した。すべての統計解析は、SAS 9.4を用いて行なった。
【図１８Ｂ】FimH特異的総IgG（ELISA）：血清および尿中での細菌と哺乳動物発現系との比較を示す図である。(B) FimH特異的総尿中IgG。
【図１９】FimH特異的総IgGを示す図である。用量I後ELISA結果：抗体力価は対数正規型に分布すると仮定し、幾何平均力価（GMT）およびその両側95％CIを計算した。群の比較のために、ANOVAモデルを、群、時点およびそれらの相互作用を固定因子として、ならびに時点に関する反復提示を用いて、log10力価に対してフィッティングした。分散の不均一性を、群間で考慮した。幾何平均比率およびそれらの95％CIをこのモデルから誘導した。各製剤に対する抗体応答を、ELISAプレートコーティングのために用いたFimHDGに対して評価した。すべての統計解析は、SAS 9.4を用いて行なった。
【図２０】FimH-DGが機能的免疫応答を生起することを示す図である。FimHCとの比較での選択された構築物の細菌阻害アッセイ。相対効力は、実施例中に報告される通りに算出される。
【図２１】細菌阻害アッセイ（BAI）を用いる、ExPEC接着を阻害するFimHDG抗体の抗体能力を示す図である。すべての候補を、AS01と共に製剤化した。
【図２２】FimHサンプルおよびmAb926相互作用のSPR分析（センソグラム）を示す図である。FimH候補とmAb926との相互作用を研究するために、SPR分析を行なって、相互作用の進行を示す時間（横座標）に対する応答（縦座標）のプロットを表わすセンソグラムを得た。応答は共鳴単位（RU）で測定し、これはセンサーチップ表面上の分子の濃度に直接的に比例する。各センソグラムは、相互作用の結合相および解離相に対応する2つの部分から構成される。結合は、生体分子相互作用中の第1相であり、その間に、拡散に起因してアナライトとリガンドとが衝突し、かつ衝突が正しい方向および十分なエネルギーを有する場合、結合が生じる。解離は、リガンド-アナライト複合体が解離する相であり；解離のプロフィールは、複合体安定性についての情報を与えることができ；解離が緩慢である場合、複合体安定性がより高く、逆もまた同じである。

【図２３Ａ】哺乳動物細胞でのタグなしFimHDGを発現する培養上清のSDS-PAGE分析を示す図である。Expi293細胞およびExpiCHO細胞由来の精製されたタグなしFimHDGのSDS-PAGE分析およびSEC-UPLC分析。
【図２３Ｂ】C末端Hisタグを含むFimHDGと比較したExpi293およびExpiCHO細胞から精製されたタグなしFimHDGについて取得されたナノDSFプロフィールおよび融解温度値を示す図である。
【図２３Ｃ－１】FimHDG Hisと比較したタグなしFimHDGに対するmAb926および475のSPR結合性分析を示す図である。FimHDG Hisと比較したタグなしFimHDGに対するマンノース結合性のSPR分析。
【図２３Ｃ－２】FimHDG Hisと比較したタグなしFimHDGに対するmAb926および475のSPR結合性分析を示す図である。FimHDG Hisと比較したタグなしFimHDGに対するマンノース結合性のSPR分析。
【図２３Ｃ－３】FimHDG Hisと比較したタグなしFimHDGに対するmAb926および475のSPR結合性分析を示す図である。FimHDG Hisと比較したタグなしFimHDGに対するマンノース結合性のSPR分析。
【図２３Ｄ】異なるリンカーを含み、かつ最初のAsp残基を含むかまたは含まないFimHDG-フェリチン構築物の上清のSDS-PAGE分析を示す図である。抗FimH特異的マウス血清を用いる哺乳動物細胞由来のペレットのウエスタンブロッティング分析。
【図２４】増加した親和性または安定性（グラフの左下）を有する安定化突然変異を導入するための、8面体大腸菌ナノ粒子（PDB 1EUM）中の対称性単量体（他の23本の鎖と比較して）のPROSSに基づく計算を示す図である。
【図２５Ａ】WT大腸菌フェリチンおよび異なる突然変異体の総（T）および可溶性（S）抽出物のSDS-PAGE分析を示す図である。
【図２５Ｂ】突然変異体0.5のSECプロフィールを示す図である。すべての構築物は、デッドボリューム中に強いピーク（矢印）を伴うプロフィールを有し、これはナノ粒子の形成と合致する。
【図２６】大腸菌フェリチンWTおよび異なる突然変異体（0.5、2、2.5、6）のNS-EM（ネガティブ染色）分析を示す図である。
【図２７】熱プロフィールを伴うフェリチン構築物の示差走査蛍光測定分析を示す図である。左側のグラフは、温度に対する蛍光強度の導関数を示す。右側の表上の丸印は、最高T_mを有する突然変異体（0.5）を示す。
【図２８】FimHの異なるナノ粒子構築物を発現する上清の抗His抗体を用いたウエスタンブロッティング分析を左側に示す図である。星印は、大腸菌ナノ粒子FimHDG-フェリチン（突然変異体0.5）を示す。右側では、TEM分析が、正しく形成されたフェリチンナノ粒子の存在を示す。
【発明を実施するための形態】
【実施例】
【０１９２】
本発明者らは、FimGドナー鎖ペプチド［配列番号5］が4または5残基のリンカー（DNKQ［配列番号8］またはPGDGN［配列番号7］）を介してFimHpのC末端に遺伝子的に融合された、全長FimHの安定な（FimCの非存在下で）未複合体化変異体を設計し、アセンブリされた線毛中のFimHの構造的および機能的特性を有する「FimH_DG」タンパク質を得た。リンカーは、高度に極性の荷電残基を選択するか（DNKQ）またはリンカーの最初の残基として二次構造中の折り返しを支持しかつ正しいタンパク質構造を促進することが予測されるプロリン残基を挿入する（PGDGNリンカー）ことにより設計した。加えて、$FimH_L$の柔軟性をさらに低減させ、かつマンノース結合性を低減させるために、$FimH_L$をFimHpへと連結するリンカー中に存在する2個のグリシンが欠失された構築物（図1A）。
【０１９３】
さらに、FimHに関するナノ粒子設計を用いて、安定化型FimHの複数コピーを曝露さ

せ、かつ1～2用量ワクチンの実現手段としてその免疫原性をさらに増大することができる。

【０１９４】

ウイルス様粒子（VLP）およびタンパク質ナノ粒子（NP）は、効果的なBおよびT細胞応答を誘導する潜在能力を有する他の抗原に対する提示プラットフォームである。それらは、非常に対称的な安定かつ組織化された構造へと自己アセンブリする内因的な能力を有する。数種類のキメラVLP/NPが、全世界で前臨床および臨床研究において調査中である。特にフェリチン足場がウイルス血球凝集素へと遺伝子的に融合されて、季節性インフルエンザワクチンと比較して、1用量ではアジュバントの存在下でより免疫原性であった粒子が得られた（Nature 2013, 49, 104）。同じアプローチが、多数の他の抗原に関する前臨床研究で用いられてきた（Chen Y, et al. Vaccine. 2020 Jul 31;38(35):5647-5652）。課題は、対象となる抗原を提示する正しくアセンブリされた粒子を遺伝子操作することだけではなく、それを製造可能かつ拡張可能に得ることである。FimH候補を提示する自己アセンブリ性NPおよびVLPの可能性を調査するために、様々なキメラが遺伝子融合を介して設計され、試験されてきた。

【０１９５】

ヘリコバクター・ピロリ フェリチンナノ粒子は、24個のサブユニットから構成され、合計で8種類の所望の抗原の三量体が、フェリチンナノ粒子の非常に対称的な8面体ケージ構造中に提示されることができる（図1B）。近年、テルモトガ・マリティマ（Thermotoga maritima）2-ケト-3-デオキシ-ホスホグルコネート（KDPG）アルドラーゼに基づく60merのNPであるタンパク質i301ナノケージが、コンピュータ上で設計されている（Hsia Y, et al. Nature. 2016 Jul 7;535(7610):136-9.）。i301安定性は、2箇所のシステインを突然変異させることにより（mI3）（Bruun TUJ, et al. ACS Nano. 2018 Sep 25;12(9):8855-8866）、およびタンパク質のN末端へとSpyCatcherを融合させることにより、さらに改善された。

【０１９６】

本発明者らは、フェリチン、mI3またはエンカプスリンをFimH_DG_PGDGN安定化型抗原またはFIMHLおよびFIMHLCys抗原へと遺伝子的に融合するための組み換えプラスミドを構築した。提示される抗原とNPとを分離するために、2つの配列間にリンカーを追加した。

【０１９７】

試験されたリンカーは、GlyおよびSer残基の繰り返しを含むが、タンパク質精製を可能にするために、内部的な8×Hisタグも含むことができるであろう。FimH NPの大腸菌細胞質腔でのタンパク質発現および溶解度を増加させるために、内部S_S架橋が突然変異されたFIMHL構築物（C24SC65S）もまた、フェリチンおよびmI3と融合させ、発現および溶解度に関して試験した。

【０１９８】

材料および方法

クローニングおよび大腸菌発現

FimH-NP細菌構築物は、DNA鎖としてGeneart社により合成され、Takara infusionクローニングキットを用いてpET15-tev、pET21またはpET22（表1を参照されたい）へと直接的にクローニングされた。他の構築物は、Geneart社から合成遺伝子として購入し、対象となるタンパク質を、発現ベクター（Life Technologies社からのpTRC-HIS2A）へと直接的にクローニングした。すべての合成遺伝子は、大腸菌発現に対して最適化し、かつタンパク質アフィニティ精製を可能にするためにN末端、C末端または内部HISタグを含めた。タンパク質を、HTMC培地およびIPTG誘導を用いて20℃で24時間、BL21DE3T1r（NEB社）またはT7shuffle express中で発現させた。

【０１９９】

ペレット回収後、25℃で1時間、溶解バッファーcell lytic express（Merk社）またはB-Per溶液（Pierce社）中に再懸濁した。遠心分離後、目視できる封入体（IB）ペ

レットが存在し、これを尿素8M（U8M）中に再溶解させた。タンパク質発現および溶解度を、可溶性画分（S）および不溶性画分（IB）から回収したサンプルのSDS-PAGEにより評価した。

【０２００】

哺乳動物細胞中での組み換えタンパク質産生

FimH-NP哺乳動物構築物（表2を参照されたい）は、pCDNA3.1またはpCDNA3.4（Life Technologies社）ベクター中の合成遺伝子としてGeneart社により合成された。すべての配列は、哺乳動物細胞での発現に対してコドン最適化され、細胞培地への分泌のためにN末端リーダー配列を含んだ。この配列は、IgKネズミリーダー配列METDTLLLWVLLLWVPGSTGD［配列番号9］、またはIgKネズミリーダー配列およびそれに続く15個の追加の荷電残基AAQPARRARRTKLAL［配列番号78］である（図1B）。

【０２０１】

組み換えFimH-NPを生成するために、発現ベクターを、製造業者（Life Technologies社）の説明書に従ってExpi293GNTI細胞へとトランスフェクションした。Expi293F GnTI細胞株は、遺伝子操作型Expi293F細胞から誘導され、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI（GnTI）活性を有さず、したがって、複雑なN-グリカンを欠き、均一にグリコシル化された組み換えタンパク質をもたらす。

【０２０２】

簡潔には、30μgのpCDNA-FimH-NP発現ベクターを、ExpiFectamine 293試薬を用いて、75×10^{6}個のExpi293F細胞を含む30mL培養へとトランスフェクションした。細胞を、37℃、120rpm、8％CO_2でインキュベートし、24時間後、ExpiFectamine 293トランスフェクションエンハンサー1および2を添加した。細胞を、37℃で144時間、さらにインキュベートした。培養物のアリコートを24時間毎に回収し、SDS-PAGEおよびウエスタンブロット（WB）によりNA発現について分析した。トランスフェクションの72時間および144時間後、細胞培養物を1000rpmで7分間遠心分離し、上清を回収し、プールし、遠心分離により清澄化し、0.22μmフィルターを通してろ過し、精製まで－20℃で保存した。

【０２０３】

PNGアーゼFプロテオミクスグレード（P7367、sigma社）を、製造業者のプロトコールに従って用い、哺乳動物発現された抗原のグリコシル化を調べた。

【０２０４】

1：1000に希釈したsigma社からの抗his-HRP抗体、または細菌FimHL-cys精製タンパク質を用いてマウスで生起された抗FimHL-cys抗体、および二次抗マウスHRP抗体と共に、標準的なプロトコールを用いて、ウエスタンブロッティングを行なった。

【０２０５】

Ni^{2+}を用いるアフィニティクロマトグラフィーを、培養上清からNPを精製するために用いた。対象となる画分をプールし、100kDaカットオフスピン濃縮器（Millipore Amicon Ultra）を用いて濃縮し；ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を、タンパク質純度を調べるために用いた。組み換えFimH-NPおよびFimH-DG抗原を、PBSバッファーを用いて平衡化した分取サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により精製した。

【０２０６】

すべての回収された画分を、SDS-PAGEによりFimH-NPまたはFimH-DGタンパク質含有量について調べ、関心を持たれる画分をプールし、22μmでろ過し、アリコートに分け、－20℃で保存した。

【０２０７】

タンパク質サイズおよび純度を評価するために、分析的SEC-HPLCおよび逆相RP-UPLCを行なった。さらに、分子量およびナノ粒子アセンブリをさらに決定するために、FimH-NPを動的光散乱により分析し、タンパク質配列同一性を、LC-MSにより評価した。

【０２０８】

免疫化

群当たり12頭のCD1マウス（雌性）を、ASO1を用いてアジュバント化された哺乳動物または細菌系で発現された15マイクログラムの候補を用いて免疫化した。すべてのマウスに、200μL（PBS希釈）の抗原混合物またはアジュバント単独を皮下注入（SC）により3回接種した。ワクチン接種後0日間（免疫化前）、21日間（用量I後）、35日間（用量II後）、および45または49日間（用量III後）で尾静脈を介して血液を採取した。

【０２０９】

FimH特異的抗体の分析

血清FimH特異的IgGを、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）により測定した。簡潔には、96ウェルマイクロタイタープレートを、96ウェルNunc Maxsorpプレートの各ウェルへと100μL抗原（1μg/mL）を用いてコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。250μLの（PVP）飽和バッファーを各ウェルに添加し、プレートを37℃で2時間インキュベートした。PBTを用いてウェルを3回洗浄した。次に、100μLの希釈血清を各ウェルに添加し、プレートを37℃で2時間インキュベートした。PBTを用いてウェルを3回洗浄した。希釈バッファー中に1：2000で希釈された100μLのアルカリホスファターゼコンジュゲート化二次抗体血清を各ウェルに添加し、プレートを37℃で90分間インキュベートした。

【０２１０】

PBTバッファーを用いてウェルを3回洗浄した。100μLの基質p-ニトロフェニルホスフェートを各ウェルに添加し、プレートを30分間室温にした。100μL 4N NaOHを各ウェルに添加し、OD 405/620～630nmを追跡した。抗体力価を、マルチモードマイクロプレートリーダーを用いて0.4ODの吸光度を与える血清の希釈として定量化した。

【０２１１】

BAIアッセイ

細菌（UTI89 wt_mCherryクローン2）を、3継代の静置液体培養：FimH発現を誘導するための生育条件で培養した。選択された条件：0.012OD/mLの細菌密度および30分間のインキュベーション時間を用いて、BAIアッセイを行なった。細菌接着を、顕微鏡分析（OPERA Phenix）により測定した。SV-HUC（ATCC）細胞を、SV-HUC完全培地：10%FBSおよび抗生物質を添加したF12K（Thermo Scientific社）中で培養した。感染前培地：抗生物質不含完全培地。

【０２１２】

試験された血清 (熱不活性化):

血清 ID
抗 FimHL-cys
抗 AS01
FimH_PGDGN_DG (哺乳動物)
FimH_DNKQ_DG (哺乳動物)
FimH_DNKQ_DG Deglyc (哺乳動物)
FimH_PGDGN_DG Fer, 15ug (哺乳動物)
FimH_PGDGN_DG Fer, 3ug (哺乳動物)

【０２１３】

３×T75フラスコのSV-HUC細胞（３×10^6細胞/mL、９５％生存率（vitality））をトリプシン処理した（３７℃で×５分間）。細胞を９６ウェルプレート中に播種し、３.５×10^4細胞/ウェル（VF＝２００μL/ウェル）を含む６０ウェル/プレートを播種し、３７℃、５％CO_2でインキュベートした。細菌調製物は、３継代の静置液体培養中に構成され：UTI ８９株をプレートから２０mL LB（１２５mLフラスコ）中に接種し、静置条件、３７℃で一晩インキュベートした。この希釈/インキュベーション経過を、３回繰り返した。

【０２１４】

SV-HUC細胞の培地を、抗生物質不含感染前培地（２００μL/ウェル）を用いて交換した。

【０２１５】

血清の２×溶液を、以下に示される通りにF１２K培地またはF１２K＋１０％FBSを用いてU底９６ウェルプレート中に調製し、連続希釈によってさらに希釈した。

【０２１６】

１mLの第３継代細菌培養物UTI ８９ mcherryクローン２を単一試験管に移し、室温で５分間、４５００×gで遠心分離した。PBSを用いて細菌を洗浄し、ペレット化した。最後に、細菌ペレットを、感染培地を用いて０.５ OD６００/mLで再懸濁した。

【０２１７】

感染を、以下の通りに行なった：各プレート中で、培地を抜き取り、５０μL/サンプルの２×血清/マンノース（２０％D-(+)-マンノース）溶液または感染培地（陽性＆陰性対照）を添加し、続いて５０μL/サンプルの２×接種物または感染培地（陰性対照）を添加した。プレートを３０分間ンキュベートし、１５％～０.０６％の血清希釈を添加した。プレートを３７℃、５％CO_2で３０分間インキュベートし、培地を除去し、PBSを用いてプレートウェルを３回洗浄した。４％ホルムアルデヒド（２００μL/ウェル）溶液を用いて細菌を固定した。２０分間のインキュベーション後、固定溶液を除去し、PBS（２００μL/ウェル）を用いてサンプルを３回洗浄した。DAPI（６２２４８、ThermoScientific社）溶液をPBS中に１：５０００希釈し、１００μLを各ウェルに添加した。サンプルを室温（暗所）で１０分間インキュベートした。DAPI溶液を除去し、PBSを各ウェルに添加した（２００μL/ウェル）。サンプルを４℃で暗所にて保存し、OPERA Phenixを用いる撮像前に３時間RT

にした。全ウェル領域を、Alexafluor488設定を用いて10×空気対物レンズによって取得した。各視野について、Zスタック（4枚）を取得した。Harmonyソフトウェアを用いてデータを分析した。合計細菌蛍光面積（単一オブジェクト≦100μm^2）を、接着の値として算出した。

【０２１８】

結果

単量体抗原として安定化されたFimHならびにFimH安定化型ナノ粒子は、哺乳動物発現系で可溶性タンパク質として分泌され、IMACにより容易に精製することができる

最初の試みとして、数種類のFimH NP構築物を作製し、様々な条件で試験した。それぞれpETベクターおよびpTrcHis2AベクターのT7およびpTacプロモーターを用いて、大腸菌での候補抗原の溶解度を試験した。さらに、細胞質およびペリプラズム発現の両方を試験し、ならびに異なる大腸菌株をT7 Shuffle expressとして細胞質腔へのジスルフィド架橋形成に対して最適化した。FimH NPの大腸菌細胞質腔でのタンパク質発現および溶解度を増加させるために、内部S_S架橋を突然変異させたFimHL構築物もまた、フェリチンおよびmI3へと融合させ、発現および溶解度について試験した。

【０２１９】

しかしながら、構築物のうちのいずれも、可溶性タンパク質発現をもたらさず、このことは、大腸菌発現系は、FimHナノ粒子を取得するために最適でない可能性があることを示唆した。可溶性画分では、ウエスタンブロッティング分析によりかすかなバンドしか検出されなかったので、FimHLドメイン中の内部ジスルフィド架橋の突然変異は、溶解度を顕著に改善しなかった。

【０２２０】

大腸菌は、低コスト発酵および容易なプロセスに関して非常に好ましい原核細胞発現系である。しかしながら、大腸菌によるタンパク質の産生は、不溶性かつ不活性であり、in vitroでの複雑な再フォールディングプロセスを必要とする場合がある、封入体として主に発現される組み換えタンパク質を生じ得る（図2）。

【０２２１】

大腸菌での不溶性の課題を解決するために、本発明者らは、哺乳動物EXPI293F発現系に切り替えることを決断した。最初に、FimH配列を、グリコシル化を担う可能性があるN-およびO-グリコシル化部位について解析した。図3は、推定上のN-グリコシル化部位の位置を報告する。O-グリコシル化部位は検出されなかった（データは示していない）。

【０２２２】

哺乳動物細胞で細菌タンパク質を発現させ、大腸菌系と比較してこの系で生じるグリコシル化を可能な限り低減するために、本発明者らは、Expi293F GnTIと称される遺伝子的に突然変異されたEXPI293F細胞株（Thermofisher社）を用いた。この細胞株は、遺伝子操作型Expi293F細胞から誘導されるが、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI（GnTI）活性を有さず、したがって、複雑なN-グリカンを欠き、均一にグリコシル化された組み換えタンパク質をもたらす。

【０２２３】

分泌ネズミIg-κ鎖リーダー配列を含む536株および/またはJ96株からの大腸菌由来のFimGドナー鎖（FimH-DG）によって安定化された全長FimHタンパク質（＋単独またはタンパク質NP（フェリチン、mI3、IMX313、エンカプスリンおよびHBc）に融合されたFimH$_L$ドメイン（構築物のうちの一部；表1）のN末端での追加のアミノ酸）を用いて、EXPI293 GNTI細胞をトランスフェクションした。分泌された組み換えタンパク質の蓄積は、WBおよびSDS-PAGEによりトランスフェクション72時間後および144時間後での培養上清中のそれらの発現を測定することにより、特性決定した。両方の分析が、FimH可溶性発現は数種類の構築物に関して高レベルで得ることができたが、他のものでは得られなかったことを明らかにした。C末端6×Hisタグまたは内部8×Hisタグを含む発現された可溶性FimH-DG安定化型タンパク質およびFimH-NPを、イオン金属固相

化クロマトグラフィーおよび分取SECクロマトグラフィーを用いて、72時間および144時間のプールされた培養培地から精製した。哺乳動物発現系で産生されたタンパク質のSDS-PAGE分析は、それらが対応する細菌タンパク質と比較して高いMWで泳動されることを明らかにし、このことは、それらがグリコシル化されたことを示唆した。結果として、N末端に追加のアミノ酸を含む、N-グリコシル化に関与する推定上の残基を欠損する2種類の構築物FimH_DNKQ_DG_deglycおよびFimH_PGDGN_DG_deglycを突然変異させ、以下の突然変異N28S、N91D、N249D、N256Dを生成した（表1）。

【０２２４】

N末端の追加のアミノ酸を含む哺乳動物発現構築物の上清のウエスタンブロット分析は、FimH_DNKQ_DG、FimH_PGDGN_DGおよびFimHC複合体に対応する発現バンドを明らかにした。対照的に、FimH_ΔGG_PGDGN_DG（FimHLとFimHPとを連結するGly残基（reside）の欠失）は、トランスフェクションの3日間後および6日間後に検出されなかった（図4）。精製された生成物のタンパク質特性決定を、図13～16に報告する。

【０２２５】

N末端の追加AAを含む構築物FimH_PGDGN_DG_フェリチン（536株；995SI）を成功裏に発現させ、精製した。対照的に、すべてN末端の追加のアミノ酸を含む、すべてのFimH非FimGドナー鎖安定化型構築物(936SI)-FimH-IMX313 j96；(935SI)-FimH_mi3 j96；(929SI)-FimHL-HIS-mI3 j96は、培養上清中で検出されなかった。

【０２２６】

J96株由来のFimH_DG_PGDGN_IMX313およびFimH_DG_PGDGN_フェリチンのPNGアーゼ処理は、処理済みサンプル中の正しいMWでのFimH_DG_PGDGN_IMX313のシフトを明らかにし、このことは、タンパク質が、哺乳動物細胞中でグリコシル化されたことを示唆する。J96株由来のFIMH_DG_PGDGN_フェリチンは、未処理および処理済みPNGアーゼサンプルの両方で検出されず、このことは、このタンパク質が分解されたことを示唆した。FimH_PGDGN_DG_フェリチン（J96株）（1000SI）は、分解に起因して、サンプル回収直後にタンパク質が検出された場合でさえも、3日間および6日間からの回収された上清から精製されず、この構築物は取得されなかった（図5A～5C）。

【０２２７】

加えて、図3で報告される予測上のN-グリコシル化部位を、セリンまたはアスパラギン酸に突然変異させた。得られたFimH_DNKQ_DGDeglyc候補は、WT配列と比較して高いペプチドマッピング網羅率を示した。この結果は、考えられるグリコシル化が、これらの特異的な突然変異されたアミノ酸に対応して起こり得ることを示す（図6）。

【０２２８】

さらに、追加のN末端アミノ酸を除去して（短リーダー）、図7に報告される代表的な構築物を発現させた。FimH-DG_PDGDN_フェリチン（536株、追加のN末端AA）は、RP-UPLCにより88％の純度を有して取得された。（998SI）FimH_PGDGN_DG-HIS-IMX313 j96もまた、十分に発現され、かつ成功裏に精製された。

【０２２９】

すべてのこれらの構築物を、細胞培地中で分泌された可溶性タンパク質として発現させ、以前に記載された通りにさらに精製した。細菌安定化型タンパク質を用いて生起された抗FimHL-cys抗体を用いる上清のウエスタンブロッティング分析は、すべての哺乳動物発現された試験されたNPを認識した（図7）。

【０２３０】

FimH-Npが正しくアセンブリされたことを確認するために、精製されたタンパク質を、分析的SE-HPLCおよびDLS分析により調べた。SE-HPLCでは、それらは単一の大きな鈍い（not-sharp）ピークで溶出された。フェリチンの溶出体積（Ev）の比較に基づいて、NPを、分子量（MW）標準のEvと共に同じ条件で実行し、算出されたFimH-DG-PGDGN-フェリチンNPの計算上のMWは、DLS解析により確認される通り、24サブユニ

ットにより構成されるNPと一致する。

【０２３１】

構築物FimH-DG_PDGDN_フェリチンSL（５３６株またはJ９６株由来の配列、追加のN末端AAを欠損する）は、RP-HPLCにより推定される最終純度を有して高度に発現された。

【０２３２】

FimHL-NP構築物はまた、成功裏に精製され、生化学的特性決定は、（１０９５SI）FimHL-HIS-Fer ５３６に関して24サブユニットおよび（１０９６SI）FimHL-HIS-Mi3 J９６に関して60サブユニットにより構成されるNPの形成を確認した。

【０２３３】

生成されたFIMH-DG NPの可視化

哺乳動物発現系で生成された組み換えFimH-DG_PDGDN_フェリチン追加AA（図９A～９B）融合タンパク質FIMH_DG_PGDGN-HIS-フェリチン５３６短リーダーおよびFimH_PGDGN_DG_HIS-フェリチン（Ferritn）j９６が安定で正しくアセンブリされたNPを形成することの追加の確認は、ネガティブ染色電子顕微鏡観察TEMを用いて精製タンパク質を可視化することにより得られた。図８Bに示される通り、N末端の追加AAを含む（９９５SI）FimH_PGDGN_DG_フェリチン５３６サンプルは、スパイクにより装飾された8面体粒子の異なる方向を向いた均一な集団として見えた。裸のフェリチン粒子は１３nmの直径を示したが、スパイク付きフェリチンは３０～３２nmの直径を提示した。直径の差異（８.５nm）は、FimHの長さに対応する（FimHモデルに対して算出される）。また、（１１４２SI）FimH_DG_PGDGN-HIS-フェリチン５３６は正しくフォールディングし、FimH三量体の8個のスパイクにより装飾される。サンプル中には裸のフェリチン粒子は存在しなかった。粒子は、３０～３２nmの直径を示した。（１０４２SI）FimH_PGDGN_DG_HIS-フェリチン（Ferritn）j９６サンプルは、個別または凝集したタンパク質を含むNPの混合集団を提示し、正しくフォールディングしたスパイク付きNPは8個のスパイクを提示し、複数のスパイクを有するフォールディングしたNPおよび正しくフォールディングしていないNPの存在を伴った。裸のフェリチン粒子は検出されなかった（図８D）。

【０２３４】

（１０９５SI）FimHL-HIS-Fer ５３６および（１０９６SI）FimHL(J９６)-mI３-hisのクライオEM NS-EM（ネガティブ染色）は、哺乳動物系で発現されたNPが完全にアセンブリされたことを示した。FimHL-HIS-Mi３ J９６（１０９６SI）は、わずかな凝集物を伴って、４０nmの高度に対称的かつスパイクにより装飾された２０面体形状を有する正しくフォールディングされたナノ粒子を提示した（図９Aおよび図９B）。加えて、両方ともN末端の短リーダーを有する１１８５SIおよび１１８４SI FIMH_DG_PGDGN_５３６-エンカプスリンは、正しくアセンブリした（図９CおよびD）。IMX３１３に融合された安定化型FimHを含む構築物（１０４３SI）FimH_DG_PGDGN_IMX３１３_HIS J９６および（９９８SI）FimH_PGDGN_DG-HIS-IMX３１３ j９６もまた、成功裏に精製され、生化学的特性決定は、高分子量（HMW）分子種の形成を確認した。しかしながら、これらの構築物のTEM分析は、凝集したタンパク質の存在しか示さなかった（データは示していない）。

【０２３５】

組み換えFimH-DG-フェリチンNPの3D再構築での構造的特徴

（９９５SI）FimH_PGDGN_DG_フェリチン（５３６株由来のFimH配列）のアセンブリされた8面体粒子の三次元構造を生成するために、単一粒子再構築法をTEM画像に適用した。単一ボックスに入れたFimH-DG_PDGDN_フェリチンナノ粒子（ボックスサイズ６４×６４ピクセル）を、シグナル-ノイズ比を増加させるために最初にバンドパスフィルターにかけ、続いて、回転および平行移動によりアライメントし、最後に中心に置いて、分類のためのMSAを行なった。図１０Aは、最も存在量が多い2Dクラス平均であるFimH-DG_PDGDN_フェリチンの選択を示し、これは炭素フィルム支持体上の粒子の様々な方向の代表である。作成された可溶性FimH-DG_PDGDN_フェリチンの3D-EM構造（図１０B）は、この構造が、3回転軸上の3つの「アンカー様」付属物の存在を伴う高度に対称的

な8面体ケージ構造から構成されることを確認した。

【０２３６】

FIMH-DG安定化型タンパク質およびFIMH-DG_PGDGN-フェリチンNPはマウスにおいて非常に免疫原性が高い

哺乳動物系で発現された候補（FimH_PGDGN_DG、FimH_DNKQ_DG、FimH_DNKQ_DGDeglycおよびFimH_PGDGN_DG_フェリチン）の免疫原性を評価するために、免疫化マウスからの単一血清を、コーティングとして大腸菌で発現されたFimHレクチンドメイン（FimHL）を用いるELISAアッセイにより分析した。全体として、すべての候補がIgG応答を生起した。FimH_PGDGN_DGおよびFimH_PGDGN_DG_フェリチンは同様のIgG力価を示したが、しかしながら、NP候補は、用量II後ではより均一かつコンパクトな応答を示した。この結果は、NPが、組み換えタンパク質として発現された候補と比較して、早期の効果的な応答を生成したことを示唆した。2種類の異なる用量（15μgおよび3μg）で免疫化されたFimH_PGDGN_DG_フェリチンは、総IgG応答に関して、低い方の用量（3μg）が高い方の（15μg）用量と同等であったことを示し、このことは、組み換えFimH_DG_PGDGNタンパク質を担持するフェリチンナノ粒子が、3μgの試験された低い方の用量でさえも、良好な免疫原性を有したことを示した。加えて、フェリチン形態は、ナノ粒子ドメインを欠損する、それ以外は対応するFimH構築物をはじめとする他の候補と比較した場合に、第2用量でのあまり散在しない免疫応答をもたらした（図11）。

【０２３７】

FimH-DG安定化型候補（哺乳動物系で生成された）は組み換え（細菌生成）形態に対して細菌接着を阻害する比較的強い能力を示す

FimH安定化型候補に対して生起された血清がヒト膀胱細胞の細菌接着を妨げる能力を、in vitro細菌阻害アッセイを用いて試験した。ワクチン候補FimH_PGDGN_DGおよびFimH_PGDGN_DG_フェリチンに対する抗体は、尿路上皮細胞に対する細菌接着の阻害において、FimH_DNKQ_DGまたは細菌生成FimHL-cys候補よりも効果的であった。これらの結果は、哺乳動物系へと発現されたFimHに基づく安定化型ワクチン候補が、さらなるワクチン開発に対する大きな可能性を有することを示す。さらに、FimH安定化のために用いられたリンカーは、生成された抗体の機能性に対して重要な役割を果たし（図12）、PGDGNリンカーを有する構築物は、細菌接着の阻害に関して改善された結果と関連付けられた。

【０２３８】

結論

本発明者らの研究は、ドナー鎖戦略を用いて安定化された新規FimH候補を調査した。ワクチン候補を、単一組み換えタンパク質として生成させるか、またはFimHサブユニットを担持するナノ粒子へとアセンブリさせた。大腸菌での発現は不溶性産物を生じたので、可溶性抗原発現は、EXPI293-GNTI細胞の一時的トランスフェクションを通じて、哺乳動物発現系を用いることにより達成されている。本発明者らの知識では、この発現系の使用は、細菌タンパク質を生成するために以前に用いられたことはない。大腸菌から発現されるFimHはすべての試験された条件で不溶性であったので、この場合、哺乳動物発現系は、タンパク質溶解度を改善した。この発現系は、すべて可溶性形態での安定化型FimH_DG抗原、ならびに異なるFIMHナノ粒子（FimHL-mI3、FimHL-フェリチンおよびFimHH_DG_PGDGN-フェリチン）を生成することを可能にしている。対照的に、未安定化FimHがNPに融合された場合、発現は検出されず、このことは、FimG補完性鎖を通じた安定化が、哺乳動物細胞で全長単離FimHタンパク質を生成させ、かつフェリチンNP上に抗原を提示させるために必須であることを実証した。FimHLとFimHPとの間の天然リンカーである2個のグリシン残基の欠失は、追加のN末端AAを含むFimH_ΔGG_PGDGN_DGの発現をもたらさず、このことは、この欠失が、タンパク質安定性に対して有害であったことを示唆した。

【０２３９】

細菌不溶性タンパク質および対応する哺乳動物発現タンパク質のMWのSDS-PAGE比較は、それらが異なる分子量を有することを示し、このことは、哺乳動物タンパク質が、PNGアーゼ処理により確認される通り、グリコシル化されることを示唆する。リーダー配列（単独または追加のアミノ酸を含むIgKネズミリーダー配列）を含むすべての構築物が、発現培地へのFimH構築物の分泌で上首尾であった。しかしながら、追加のアミノ酸を含む構築物のうちのいずれも、より均一なナノ粒子を生じず（図7および図9）、裸のフェリチンNPは観察されなかった。

【０２４０】

構造データは、すべてのナノ粒子が正しくアセンブリされ、かつFimHスパイクがフェリチン（24スパイク）およびmI3ナノ粒子（60スパイク）の表面上に検出されたことを確認した。

【０２４１】

本発明者らのデータは、哺乳動物系へと発現されたFimH安定化型候補が免疫原性であり、かつ生起される抗体が尿路上皮細胞への細菌接着を阻害できたことを示唆した。

【０２４２】

AS01アジュバントの作用：FimHCおよびFimH-DGに対する改善

体液性応答に対するPHADおよびAS01アジュバント系の寄与を評価するために、FimHCタンパク質複合体をモデル抗原として用い、Langermann S, et al. Science. 1997 Apr 25;276(5312):607-11に記載される通りに発現させた。ワクチン接種後に生起されるIgG抗体を測定し、相対力価を、PHADおよびAS01製剤中に含まれるMPL量の関数としてプロットした。全体として、AS01は、マウス血清（3用量後）および尿（2および3用量後）でPHADよりも高い総IgG応答を誘導した。さらに、5μg MPLで用いられたAS01Bは、12.5μg MPLを含有するPHADと比較して、同じIgGレベルを示した（図17Aおよび図17B）。

【０２４３】

改善された抗原設計およびアジュバント化製剤は2用量（3ではなく）後に機能的免疫応答を生起する

FimHC複合体およびFimH安定化型hisタグ付き形態（FimHDG、すなわち、FimH-PGDGN-DG（DGはFimG由来のドナー鎖補完性ペプチド表わす）、FimHDG-フェリチン、すなわち、FimH-PGDGN-DG-リンカー（Hisタグを含む）-フェリチン（H.ピロリ由来））の免疫応答を評価するために、PHADまたはAS01を用いてアジュバント化された異なる抗原用量（0.55μgまたは1.6μg）を、マウス免疫化のために用いた。FimHC複合体を、Langermann S, et al. Science. 1997 Apr 25;276(5312):607-11に記載される通りに発現させた。タンパク質を、細菌または哺乳動物系で発現させた。免疫化されたマウスの血清中および尿中のFimH特異的総IgG力価（ELISAにより測定される）を、2回目および3回目のワクチン注入後に測定した。AS01を用いて製剤化された異なる形態のFimHDGに対して生起された2用量後および3用量後の血清のIgG力価を決定した（図18A）。IgG値を、同じAS01アジュバントおよびPHAD（AS01中に存在するものと同等のMPL量を含む）と組み合わせて用いられたFimHCを用いるワクチン接種により誘導されたものと比較した。図18Aに示される通り、0.55μgの抗原用量では、2回目および3回目投与後に、FimHCに関して、PHADよりもAS01を用いて抗体応答の明らかな増強が見られた。また、細菌系から発現および精製されたFimHDG-Hisタグの比較的良好な免疫応答が、PHADを用いてアジュバント化されたFimHC標準と比較して観察された。

【０２４４】

最後に、哺乳動物細胞中で精製された両方の安定化型FimH候補（FimHDG-Hisタグ哺乳動物およびFimHDG-Hisタグフェリチン）が、大腸菌で発現されたFimHDGよりも高い応答を示した。1.6および0.55μgの両方の哺乳動物FimHDG構築物がIgGレベルを誘導し、これは2回目および3回目の免疫化後にプラトーに達した。さらに、2回目投与でのFimHDGは、両方の試験されたタンパク質用量でFimHC-PHADの3用量と比較して

高い応答を生起した（それぞれ9.7および3の幾何平均比）（図18A）。FimHDGに対する抗体応答を、第1、第2および第3用量後に、比較的高いタンパク質用量を用いる免疫化群により回収された尿中で評価した。試験された血清中で観察された通り、より高いIgG力価が、哺乳動物FimHDG製剤を用いてワクチン接種されたマウスに関して測定された（図18B）。

【０２４５】

選択された免疫化群に関して、用量I後での総IgG応答も決定した。用量I後では、FimHDG-フェリチンナノ粒子は、フェリチンを含まないFimHDGよりも2倍高いGMTを誘導した（いずれのAg用量でも）が、ばらつきは2用量後および3用量後でのものよりも高かった（1を含む大きな95％CIをもたらす）。

【０２４６】

細菌由来抗原と比較した場合に、ASO1を用いてアジュバント化された哺乳動物形態は、用量IおよびII後に比較的高いIgG応答を誘導したが（観察されたGMRは7.1～60.8の範囲であり、1を超える95％CIのすべての下限を伴う）、応答は、第3用量後に同様であった（1.5倍付近の観察されたGMR）（図19）。

【０２４７】

相対効力に関する構築物（哺乳動物/細菌）の異なるリンカーの比較

異なるリンカーの影響を調べるために、細菌および哺乳動物系の両方で発現させたFimHDGを、尿路上皮細胞に対する接着の細菌阻害（BAI）に関して、FimHCと比較した。図20は、すべてのFimHDG構築物が、発現に対して用いられた発現系（細菌または哺乳動物）からは独立して、FimHCよりも機能的であったことを示した。興味深いことに、PGDGNリンカーを保有するFimHDG構築物は、DNKQ構築物と比較してより効果的であった。これらのデータは、リンカーが、異なるコンホメーションでFimHを安定化し、結果として、異なる機能的抗体応答を生起することができることを示唆する。BAIアッセイは、複数希釈アッセイとして着想されてきており、試験されるサンプルは、血清の参照プールと共に、用量応答曲線を推定するために、異なる濃度でプレートされる。力価計算の前に、0％と100％との間でシグナルが標準化される。力価は、対応する用量応答曲線を比較して、参照プールに対する試験サンプルの相対効力（RP）として表わされる。詳細には、RPは、対数スケールでの希釈を考慮し、かつ4パラメータロジスティック（4PL）拘束モデル（欧州薬局方第5.3章に記載される）をフィッティングして計算され、このとき、標準および試験サンプル傾斜因子である上側漸近線および下側漸近線は、等しいものと拘束される。RPは、参照とサンプルとのEC_{50}の間の比率として計算される。EC_{50}は、4PL拘束変曲点から算出され、逆変換される（antilog）。モデルは、参照およびサンプルの曲線が、同じ傾斜因子（平行性）ならびに極値部分で同じ最大および最小応答レベル（直線性）を有することを必要とする。平行性および直線性の仮定の好適性は、平行性からの逸脱を試験するためのP値、直線性からの逸脱を試験するためのP値および参照とサンプルとの間の傾斜比を判断して、各セッションに関して評価される。

【０２４８】

FimH-DGはBAI、HAIおよびコンホメーションmAb結合性に関して機能的免疫応答を生起する

さらに、細菌阻害アッセイ（BAI）を用いて、ExPEC接着を阻害する抗FimHDG抗体の抗体能力を評価した。抗体機能性に対するデータは、細菌および哺乳動物FimHDG構築物の両方に対して生起された血清が、FimHC標準血清よりも高い、細菌接着を阻害する能力を示したことを明らかにした。試験された候補の中では、FimHDG-フェリチンが、同類のFimHDG構築物と比較して少なくとも10倍高い機能性を示した（図21）。同様の結果が、HAIアッセイを行なって得られた。

【０２４９】

FimHC複合体を、Langermann S, et al. Science. 1997 Apr 25;276(5312):607-11に記載される通りに発現させた。「FimHDG」とはFimH-PGDGN-DGを意味し、DGはFimG由来のドナー鎖補完性ペプチドを表わし、「FimHDG-フェリチン」とはFi

mH-PGDGN-DG-リンカー（Hisタグを含む）-フェリチン（H.ピロリ由来）を意味する。BAIアッセイおよび相対効力算出を、前の実施例に記載される通りに行なった。

【０２５０】

FimHDGおよびmAb962結合性

FimHDG（すなわち、FimH-PGDGN-DG、DGはFimG由来のドナー鎖補完性ペプチドを表わす）とmAb926（Dagmara I. Kisiela et al (2015)）との相互作用を研究するために、SPR分析を行なった。細菌または哺乳動物系から取得されたFimHDG単量体形態（すなわち、FimH-PGDGN-DG、DGはFimG由来のドナー鎖補完性ペプチドを表わす）は、結合および解離プロフィールでの若干の差異を伴って、mAbに対する類似の結合性を示した。FimHDG-フェリチン（FimH-PGDGN-DG-リンカー（Hisタグを含む）-フェリチン（H.ピロリ由来））は、おそらくは増加したアビディティを伴うマルチマー化作用に起因して、単量体形態と比較して安定な相互作用をもたらした。対照的に、FimHDGと比較してFimHCとのmAb926の低い相互作用は、FimHDGが、予期される通りに結合前コンホメーションで安定化されたことを示唆した。実際に、mAb926は、顕著に低減されたマンノース結合能を伴う、FimH安定化型レクチンドメインに対して生成された（結合前コンホメーション）（Dagmara I. Kisiela et al., (2013)）が、FimCはFimHをその伸長された結合後様形態で安定化する（Sauer et al., (2016), Nature Communications volume 7, Article number: 10738）（図22）。FimHC複合体は、Langermann S, et al. Science. 1997 Apr 25;276(5312):607-11に記載される通りに発現させた。

【０２５１】

新規リンカーの評価

哺乳動物細胞での組み換えタンパク質生成

内部またはC末端反復His残基を含まないFimHDG（すなわち、FimH-PGDGN-DG、DGはFimG由来のドナー鎖補完性ペプチドを表わす）ならびにFimHDGナノ粒子を生成させるために、FimH_DG遺伝子とナノ粒子（NP）単量体との間を空ける異なるリンカーを挿入して、新規構築物を設計した。FimH-NP哺乳動物構築物は、pCDNA3.4（LifeTechnologies社）ベクター中の合成遺伝子として、Geneart社またはTwist社により合成された。すべての配列は、哺乳動物細胞での発現に対してコドン最適化され、かつ細胞培地への分泌のためにN末端リーダー配列を含んだ。この配列は、IgKネズミリーダー配列METDTLLLWVLLLWVPGSTG、またはIgKネズミリーダー配列および、効果的なタンパク質分泌へのこの残基の寄与を評価するための、それに続くアスパラギン酸残基METDTLLLWVLLLWVPGSTGDである。組み換えFimH-NPを生成させるために、発現ベクターを、製造業者（Life Technologies社）の説明書に従って、Expi293細胞および/またはExpiCHO細胞へとトランスフェクションし、トランスフェクションの5日間後に培養上清を回収した。タンパク質精製は、イオン交換クロマトグラフィーおよびそれに続く分取SEC精製ステップにより達成した。

【０２５２】

ナノDSF分析

FimHDG構築物の蛍光モニタリングアンフォールディングを評価するために、ナノDSF分析を行なった。サンプルを、三重反復でナノDSFグレード標準キャピラリーへと手動でロードし、Prometheus NT.48ナノDSFデバイスに移した。内因性トリプトファン蛍光測定のために、280nmの励起波長を用い、トリプトファン蛍光の発光は、330nm、350nm、およびそれらの比率（350nm/330nm）で測定した。Prometheus PR. Controlソフトウェア（NanoTemper Technologies社）を用いてデータを解析し、温度に対して蛍光比率を用いてプロットした。

【０２５３】

SPR分析

FimHDG構築物を、ランニングバッファーHBS-EP+（0.01M HEPES、0.15M NaCl、0.003M EDTAおよび0.05％v/v界面活性剤P20）を用いて希釈し、Ni^{2+}イオンの

0.5mM溶液を注入することにより予め活性化し、かつ3mM EDTAを用いて洗浄したセンサーチップNTAの表面上に捕捉した。mAbを、二次抗マウスIgG Fcを用いてコーティングしたCM5センサーの表面上に、20μg/mLの濃度で捕捉した。50nMの固定濃度の各サンプルを、180秒間にわたってセンサーチップの表面上に注入した。解離を、600秒間にわたって追跡した。最後に、10mMグリシン-HCl pH1.7を用いてセンサーチップを再生した。実験は、Biacore T200機器（GE Healthcare社）を用いて行ない、Biacore T200評価ソフトウェア3.0（GE Healthcare社）を用いて解析した。

【０２５４】

結果：

単独およびタンパク質NP（フェリチン）に融合された、分泌ネズミIg-κ鎖リーダー配列を含む全長FimH-DG安定化型タグなしタンパク質を、EXPI293およびExpiCHO細胞をトランスフェクションするために用いた。分泌された組み換えタンパク質の蓄積を、SDS-PAGEによりトランスフェクション5日間後に培養上清中のその発現を測定することにより特性決定した。解析により、FimHDG可溶性発現が、Expi293細胞およびExpiCHOにおいて、タグなし構築物に関して高レベルで取得できたことが明らかになった（図A）。タンパク質を培養上清からさらに精製し、以前に精製されたHisタグ付きFimHDGおよび細菌再フォールディングFimHDGと比較して、生化学的に特性決定した。タグなしFimHDGは、EXpi293およびExpiCHO細胞の両方から、SDS-PAGEおよびSE-UPLCでの良好な純度レベルを伴って取得された。タンパク質は、細菌細胞と比較して、哺乳動物細胞で生じるグリコシル化に起因して、理論上のもの（31kDa）よりもSDS-PAGEで高い分子量（42kDa付近）を有して移動する（図23A）。

【０２５５】

タグなし精製FimDGのフォールディングをナノDSFにより分析し、融解温度を取得して、FimHDG-HISについて取得されたものと比較した。FimH-DGは、レクチン（Tm1）およびピリン（Tm2）ドメインと比較して、2温度遷移を伴って、ナノDSFでの良好な熱安定性を示したが、HisタグFimHDF分子は、おそらくは異なるフォールディングに起因して、1遷移しか示さない。さらに、タグなしタンパク質は、Hisタグ分子に対してピリンドメイン遷移のより高い安定性（より高い融解温度値）を示した（図23B）。タグなしFimHDGと比較したHisタグ付き構築物でのこの異なるフォールディングは、おそらく、N末端アスパラギン酸残基およびC末端Hisタグの両方の非存在に起因する。

【０２５６】

哺乳動物生成FimHDGタグなし構築物のSPR分析（図23C）は、mAb926が、hisタグFimHDGタンパク質と比較して、結合プロフィールでの差異を伴って構築物に結合できることを示す。さらに、タグなしFimHDGタンパク質は、Hisタグ付きFimHDGとは異なり、mAb VH_475およびマンノースとの弱い相互作用を示し、このことは、Hisタグ付きタンパク質と比較してタグなし構築物に関して観察される異なるフォールディングと合致する。

【０２５７】

タグなしFimHDG-フェリチンNPの生成のために、FimHDG分子とナノ粒子単量体配列とを隔てるために、Hisタグを異なるリンカーによって置き換えた。設計および試験されたリンカーは、グリシンおよびセリンのような柔軟な残基からつくられ、それにより、連結されたタンパク質ドメインは、互いに対して自由に動くことができる。本発明者らは、異なる長さのリンカーを試験し、比較的長いリンカーは、2つの隣接するドメインが互いに立体的に干渉しないことを確実にし得るが、分解に対してより感受性であり得るであろう。汎HLA DR結合性エピトープ（PADRE）としても知られるリンカーAKFVAAWTLKAAAは、抗原特異的$CD4^+$T細胞を活性化するペプチドであり、合成および組み換えワクチンの開発での使用に対して好適な担体エピトープとして提案されてきた。リンカーGGGGSLVPRGSGGGGSおよびEAAAKEAAAKEAAAKAは剛性リンカーである。Glu-Lys塩架橋により安定化されたリンカーAEAAAKEAAAKEAAAKAは、αヘリックス構造を形成する（Marqusee & Baldwin, 1987）。タグなしFimHDGとHisタグ付きFimH

DGとは、最初のアスパラギン酸残基についても異なるので、リンカーのうちの一部を、N末端アスパラギン酸残基の非存在下および存在下でも試験した。異なる構築物をコードするプラスミドを、Expi293トランスフェクションのために用いた。トランスフェクションの5日間後、N末端アスパラギン酸残基（D）によって始まる構築物（タグなしまたはhisタグ付き）のみが、SDS-PAGEにより視認できる上清中の分泌タンパク質のバンドを示す（図23D）。構築物FimHDG_HIS_フェリチン1619SIおよび1042SIは、最初のアスパラギン酸残基以外は同じ配列を有するが、構築物1042SIのみが分泌され、EXPIの培養上清中に存在し、このことは、効率的なFimHDG-フェリチンナノ粒子分泌を達成するための、FimHDGのN末端でのこの残基の重要性を確認する。試験した異なるリンカーの中では、最初のアスパラギン酸残基を有する、大腸菌J96株および536株由来の構築物FimHDG-フェリチンタグなし1623SIおよび1627SIのみが、分泌をもたらした。最初のAsp残基の非存在下でのタグなしFimHDG-フェリチン1433SIの発現も評価するために、ウエスタンブロッティング分析を行ない、タンパク質がペレット画分中に発現され、培養上清中のみに存在しなかったことを確認した。

【０２５８】

大腸菌フェリチンin silico安定性研究

材料および方法

大腸菌フェリチンの配列および構造に基づく設計に対する進化的制約

本研究の目標は、自己アセンブリ性タンパク質ナノ粒子などの対称系の設計を行なうことであった。このアプローチは、計算物理学に基づくアルゴリズムおよび進化バイオインフォマティクスの組み合わせを用いて、安定化突然変異を導入した。この目的を達成するために、熱力学設計のためにRosettaスイート（Alford RF, et al. J Chem Theory Comput. 2017 Jun 13;13(6):3031-3048）、および突然変異空間を限定するために非冗長性進化的ホモログ（PSI-BLAST、Altschul SF, et al. Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-402）を用いて、コンセンサス配列設計を、大腸菌フェリチンの非対称単位または単量体に対して行なった（PDB：1EUM WorldWideWeb(www).rcsb.org/structure/1EUM）。幾何学的界面でのタンパク質サブユニットのエネルギー論を最適化するために、設計されたモデルは、対称的フレームワーク内に拘束された（DiMaio F, et al PLoS One. 2011;6(6):e20450）。続いてこの対称ベースのパイプラインを、構造バイオインフォマティクスツールであるPROSS（Goldenzweig A, et al. Mol Cell. 2016 Jul 21;63(2):337-346）の改変バージョンに実装し、in silico安定化型配列のリストを得た（配列番号149～152および図24）。

【０２５９】

タンパク質発現および精製

大腸菌安定化型フェリチンの様々な突然変異体および野生型フェリチンをコードする遺伝子を、pET15TEVベクターへとクローニングし、これらの遺伝子は、N末端6×HisタグおよびTEV切断部位を含んだ。様々な構築物をコードするプラスミドを、大腸菌BL21 DE3t1rコンピテントセルへと形質転換した。タンパク質発現のために、細胞をHTMC ON中20℃で生育させ、1mM IPTGを用いて20℃で24時間誘導した。CeLytic^{TM} Express（Sigma Aldrich社）を用いる化学的溶解により可溶性タンパク質を抽出し、ニッケルキレートカラムにより精製し、続いて、Superdex 200(登録商標)Increase 10/300 GLカラム（Cytiva社）を用いる分取サイズ排除クロマトグラフィーを行ない、SDS-PAGEにより純度を確認した（図25）。

【０２６０】

透過型電子顕微鏡観察（TEM）分析

ネガティブ染色のために、5μLのサンプル（20ng/マイクロリットルに希釈）を、グロー放電銅300平方メッシュグリッド上に30秒間ロードした。過剰量を除去した後、グリッドを、Nano-Wステイン（Ted Pella社）を用いて30秒間ネガティブ染色した。Tecnai G2 spiritを用いてサンプルを分析し、Veleta CCDを用いて画像を取得した（図26）。

【０２６１】
ThermoFluorアッセイ
ThermoFluorアッセイは、タンパク質の安定性を評価するための、迅速な温度に基づくアッセイである。この方法では、各サンプルを、追加の４μLのSYPRO Orange色素１０００×（Molecular Probes社）と共に、0.2mg/mLの最終濃度まで希釈し、バッファー溶液を用いて40μLの最終体積とする。このミックスを、96ウェル薄壁PCRプレート（Bio-Rad社）のウェルへとピペッティングし、対照サンプルには水を加えた。各サンプルを、三重反復で分析した。各1℃ステップで蛍光測定を行ないながら、1分間当たり1℃のスキャン速度増分を用いて、25℃から100℃まで上げることにより、各タンパク質の融点（T_m）を決定した。アンフォールディングプロフィールおよび融解温度を、定量的PCR熱サイクラー（Stratagene社）によりモニタリングした。すべてのDSF実験は、三重反復で行なった。蛍光強度の導関数を温度の関数としてプロットし、報告されるT_mは、GraphPad Prismソフトウェアを用いて決定されるS字曲線の変曲点である（図27）。
【０２６２】
結果
in silico安定化型大腸菌フェリチンナノ粒子の組み換え生成
大腸菌安定化型特異的抗原（FimHDG、すなわち、FimH-PGDGN-DG、DGはFimG由来のドナー鎖補完性ペプチドを表わす）を提示する大腸菌由来の安定化型ナノ粒子を取得するために、FimHの反復提示のための生来型フェリチン足場を選択し、コンピュータ上で最適化した。Rosettaに基づく設計アプローチは、8面体対称を維持し、対称系中の単量体と23本の他の鎖との間の界面に着目した（図24）。大腸菌特異的抗原（FimH）を提示する、大腸菌由来の安定化型フェリチンを有するこの戦略は、抗原の反復提示のために生来型足場を用いることにより、生物種または属特異的設計を維持するための合理的アプローチである。
【０２６３】
大腸菌WTフェリチンおよびPROSSにより作成されたすべてのin silico安定化型配列の代表である突然変異体のうちの4種類（配列番号149～152）は、大腸菌細胞株中で組み換えHisタグ付きタンパク質として生成される場合に、高度に発現されかつ可溶性であった（図25）。構築物は、アフィニティ精製ステップ、およびそれに続く分取サイズ排除クロマトグラフィーを用いて、成功裏に精製された。高分子量画分に対応するピークをすべての構築物に関して回収し、電子顕微鏡観察を用いてさらに分析し、均一かつ十分に構造化したナノ粒子の適正な形成を評価した。TEM分析から、不均一な形態を有した突然変異体2.5を除いて、すべてのサンプルが正しくフォールディングされたフェリチンナノ粒子を生じた（図26）。
【０２６４】
最も安定な大腸菌フェリチンナノ粒子を特定するために、疎水性残基に結合し、かつタンパク質アンフォールディング中のそれらの曝露を検出するSypro Orangeを用いて、示差走査蛍光測定（DSF）により、組み換えフェリチン構築物（WT、0.5、2、6）の熱安定性を評価した。フェリチンタンパク質は、タンパク質ナノケージに関して予期される通り、非常に高い熱安定性を示し、最初のアンフォールディング遷移は74℃～76℃付近で検出された。このDSF分析は、大腸菌突然変異体（0.5）タンパク質が、熱アンフォールディングでの最も高いシフトを示すことを実証し、このことが、安定性でのこの増加に基づいて、FimHDG抗原と融合される対象である好ましい構築物としてのこの突然変異体の選択につながった。
【０２６５】
FimHDG抗原を提示する大腸菌安定化型フェリチンの哺乳動物生成
安定化型および生来型フェリチンナノ粒子をFimHDG抗原（すなわち、FimH-PGDGN-DG、DGはFimG由来のドナー鎖補完性ペプチドを表わす）の提示に対する足場として用いることができるか否かを試験するために、H.ピロリ フェリチンに対する代替物とし

て、FimHDG（分泌配列Igkを含む）の配列を、安定化型フェリチン（突然変異体0.5）の遺伝子に遺伝子的に融合させた。哺乳動物細胞培養上清中の組み換え分泌ナノ粒子のアフィニティ精製を可能にするために、反復ヒスチジン配列を含むリンカーにより、2つの分子を隔てた。この構築物をExpi293 Gnti細胞のトランスフェクションのために用い、分泌された組み換えタンパク質の蓄積を、抗His抗体を用いるウエスタンブロッティング分析により、トランスフェクション5日間後の培養上清中での発現を評価することにより特性決定した。分析により、FimHDG-フェリチン（突然変異体0.5）ナノ粒子が、細胞上清中に成功裏に分泌されることが明らかになった。精製されたFimHDG-フェリチン（突然変異体0.5）ナノ粒子を、透過型電子顕微鏡観察により可視化し、フェリチン安定化型ナノ粒子の正しい形態および20nm付近のサイズを有するFimHDG抗原の表面提示を確認した（図28）。

【０２６６】

このデータは、FimHDGを提示する安定化型大腸菌フェリチンナノ粒子を哺乳動物細胞中で上首尾に生成させることができることを示し、このことは、標的病原体に対して両方とも生来型である抗原および足場を用いてナノ粒子を設計することが可能であることを示す。

【０２６７】

【表１Ａ】

表1(A): 細菌で試験されたFimH-NP

RIMSコード	タンパク質名	ベクター名	予測されるAA配列	タグ
1097SI	FIMH_DG_PGDGN_HIS-フェリチン536	pTrcHis2A	MFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSHHHHHHHHGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [配列番号 20]	内部-His
1064SI	LS-FIMHL-IMX313-HIS	pET21	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAFacktangtaipigggsanvyvnlapvvnvgqnlvvdlstqifchndypetitdyvtlqrgsayggvlsnfsgtvkysgssypfpttsetprvvynsrtdkpwpvalyltpvssaggvaikagsliavlilrqtnnynsddfqfvwniyanndvvvptggSSGSGSGSKKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKEGGGSGSHHHHHHHH [配列番号 21]	C-His
955SI	FIMHL-S24S65-IMX313	pTrcHis2A	MfaSktangtaipigggsanvyvnlapvvnvgqnlvvdlstqifShndypetitdyvtlqrgsayggvlsnfsgtvkysgssypfpttsetprvvynsrtdkpwpvalyltpvssaggvaikagsliavlilrqtnnynsddfqfvwniyanndvvvptggSSGSGSGSKKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKEGGGSGSHHHHHH [配列番号 22]	C-His
954SI	FIMHL-S24S65-foldon-フェリチン	pTrcHis2A	MFASKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFSHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGSGHHHHHHGSGDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [配列番号 23]	内部
940SI	FIMHL-S24S65-Mi3	pTrcHis2A	MFASKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFSHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGSGGSGGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTEGSGSGSGSGSHHHHHH [配列番号 24]	C-His
939SI	FIMHL-mI3	pTrcHis2A	MFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSR	C-His

			TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNI YANNDVVVPTGGSGGSGGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKAL AVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVE SGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLF PGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGV GSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTEGSGSGSGSGSHHHHHH [配列番号 **25**]	
913SI	FimHL-NOCYS-MI3	pET21	MfaSktangtaipigggsanvyvnlapavnvgqnlvvdlstqifShndypetitdyvtlqr gsayggvlsnfsgtvkysgssypfpttsetprvvynsrtdkpwpvalyltpvssaggvaika gsliavlilrqtnnynsddfqfvwniyanndvvvptggGGSGGSGGSGGSMKMEE LFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFL KEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYM PGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPT GGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCT EGSGSGSGSGSHHHHHH [配列番号 **26**]	C-His
904SI	FimHΔGG_PGDGN_DG_mi3	pET21	Mfacktangtaipigggsanvyvnlapvvnvgqnlvvdlstqifchndypetitdyvtlqr gsayggvlsnfsgtvkysgssypfpttsetprvvynsrtdkpwpvalyltpvssaggvaika gsliavlilrqtnnynsddfqfvwniyanndvvvptcdvsardvtvtlpdypgsvpipltvy caksqnlgyylsgttadagnsiftntasfspaqgvgvqltrngtiipanntvslgavgtsavsl gltanyartggqvtagnvqsiigvtfvyqPGDGNADVTITVNGKVVAKGSGGGG MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEITFTVPDADT VIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKE KGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPN VKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVE KIRGCTEGSGSGSGSGSHHHHHH [配列番号 **27**]	C-His
888SI	FimHL-GSG4-フェリチン	pET15 TEV	MGSSHHHHHHENLYFQGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNV GQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGS SYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILR QTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGSGGGGDIIKLLNEQVNKEMN SSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPV QLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFL QWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [配列番号 **28**]	N-His
887SI	pelBLS-FimHL-mI3	pET22	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAFacktangtaipigggsanvyvnlapvvnvgq nlvvdlstqifchndypetitdyvtlqrgsayggvlsnfsgtvkysgssypfpttsetprvvy nsrtdkpwpvalyltpvssaggvaikagsliavlilrqtnnynsddfqfvwniyanndvvv ptggGSGMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAK**K**KALAVF**L**GGVHLIEITFT VPDADTVIKELSFLKE**M**GAIIGAGTVTSVEQ**A**RKAVESGAEFIVSPHLDEE ISQF**A**KEKGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKA MKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKGTP**V**EV**A** EKAKAFVEKIRGCTEGSGSGSGS**HHHHHH** [配列番号 **29**]	C-His
837SI	FimH_DG_	pET15 TEV	MGSSHHHHHHENLYFQGDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPL TVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIP	N-His

	フェリチン(GSGGGG)		ANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGSGGGGDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [配列番号 **30**]	
836SI	FimHL-C-C-MI3	pET21	MfacktangtaipigggsanvyvnlapvCnvgqnCvvdlstqifchndypetitdyvtlqrgsayggvlsnfsgtvkysgssypfpttsetprvvynsrtdkpwpvalyltpvssaggvaikagsliavlilrqtnnynsddfqfvwniyanndvvvptggGGSGGSGGSGGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTEGSGSGSGSGSHHHHHH [配列番号 **31**]	C-His
835SI	FimHL-C-C-qβ	pET21	MfacktangtaipigggsanvyvnlapvCnvgqnCvvdlstqifchndypetitdyvtlqrgsayggvlsnfsgtvkysgssypfpttsetprvvynsrtdkpwpvalyltpvssaggvaikagsliavlilrqtnnynsddfqfvwniyanndvvvptgg**GGSGGSGGSGGS**AKLETVTLGNIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVPALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQAYADVTFSFTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY [配列番号 **32**]	タグなし

【０２６８】

【表１Ｂ】

表1(B): 大腸菌で単一組み換えタンパク質として発現されるFimH

RIMSコード	タンパク質名	ベクター名	予測されるAA配列	タグ
1023SI	FimH_DNKQ_DG citopl pET22b+	pET22b+	MFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHND YPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSR TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNI YANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYL SGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSA VSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQDNKQADVTITVNGKVV AKGSGHHHHHH [配列番号 **120]**	C-His
1024SI	FimH_PGDGN_DG citopl pET22b+	pET22b+	MFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHND YPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSR TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNI YANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYL SGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSA VSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKV VAKGSGHHHHHH [配列番号 **121]**	C-His
1025SI	FimH_DGG_PGDGN_DG citopl	pET22b+	MFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHND YPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSR TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNI YANNDVVVPTCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGT	C-His
	pET22b+		TADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSL GLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAK GSGHHHHHH [配列番号 **122]**	
1122SI	FimH_PGDGN_DG citopl PET24 タグなし	pET24b(+)	MFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHND YPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSR TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNI YANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYL SGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSA VSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKV VAK [配列番号 **123]**	タグなし
	FimH_PGDGN_DG citopl タグなし Metなし		FACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYP ETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTD KPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYA NNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSG TTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVS LGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVA K [配列番号 **124]**	タグなし

【０２６９】
【表２】

表2: 単一組み換えタンパク質およびナノ粒子として哺乳動物発現されるFimH:

RIMS コード	タンパク質名		予測されるAA配列	発現	タグ
1096 SI	FIMHL-HIS-Mi3 J96	短リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLA PVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFS GTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGGSGSHH HHHHHHGGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGV HLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAE FIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPG EVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGV GSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTE [配列番号 **33**]	あり	内部 HIS
1095 SI	FIMHL-HIS-Fer 536	短リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLA PAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFS GTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGGSGSHH HHHHHHGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAG LFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKA YEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDIL DKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [配列番号 **34**]	あり	内部 HIS

1043 SI	FIMH_DG_PGDGN_IMX313_HISJ96	短リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGSSGSGSGSKKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQGGLSKEGGGSGSHHHHHH [配列番号 35]	あり	C-His
1042 SI	FimH_PGDGN_DG_HIS-フェリチンj96	短リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSHHHHHHHHHHGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [配列番号 36]	あり	内部HIS
1142 SI	FIMH_DG_PGDGN-HIS-フェリチン536	短リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSHHHHHHHHHHGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [配列番号 37]	あり	内部HIS
1000 SI	FimH_PGDGN_DG-HIS-フェリチンJ96	追加AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSHHHHHHHHGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [配列番号 38]	なし	内部HIS

999SI	FimH_PGDGN_DG-HIS-MI3 j96	追加AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSHHHHHHHHGGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTE [配列番号 **39]**	なし	内部HIS
998SI	FimH_PGDGN_DG-HIS-IMX313 j96	追加AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGSSGSGSGSKKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKEGGGSGSHHHHHH [配列番号 **40]**	あり	C_his
995SI	FimH_PGDGN_DG_フェリチン(536)	追加AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSHHHHHHHHGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK [配列番号 **41]**	あり	内部HIS
936SI	FimH-IMX313 j96	追加AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLALfacktangtaipigggsanvyvnlapvvnvgqnlvvdlstqifchndypetitdyvtlqrgsayggvlsnfsgtvkysgssypfpttsetprvvynsrtdkpwpvalyltpvssaggvaikagsliavlilrqtnnynsddfqfvwniyanndvvvptcdvsardvtvtlpdypgsvpipltvycaksqnlgyylsgttadagnsiftntasfspaqgvgvqltrngtiipanntvslgavgtsavslgltanyartggqvtagnvqsiigvtfvyqGSSGSGSGSKKQGDADVCGEVAYIQSVVSDCHVPTAELRTLLEIRKLFLEIQKLKVELQGLSKEGGGSGSHHHHHH [配列番号 **42]**	なし	C-His

935SI	FimH_mi3 j96	追加AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLALfacktangtaipigggsanvyvnlapvvnvgqnlvvdlstqifchndypetitdyvtlqrgsayggvlsnfsgtvkysgssypfpttsetprvvynsrtdkpwpvalyltpvssaggvaikagsliavlilrqtnnynsddfqfvwniyanndvvvptcdvsardvtvtlpdypgsvpipltvycaksqnlgyylsgttadagnsiftntasfspaqgvgvqltrngtiipanntvslgavgtsavslgltanyartggqvtagnvqsiigvtfvyqGSGGGGMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTEGSGSGSGSGSHHHHHHHH [配列番号 43]	なし	C-His
929SI	FIMHL-HIS-mI3 j96	追加AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGSGGHHHHHHHHGSGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTE [配列番号 44]	なし	内部HIS
951SI	FimH_DNKQ_DG_deglyc	追加AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLALFACKTASGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSDFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRDGTIIPADNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQDNKQADVTITVNGKVVAKGSGHHHHHH* [配列番号 79]	あり	C-His
932SI	FimH_PGDGN_DG	追加AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGSGHHHHHH* [配列番号 80]	あり	C-His
931SI	FimH_DNKQ_DG	追加AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLALFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTS	あり	C-His

			AVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQDNKQADVTITVNG KVVAKGSGHHHHHH*[配列番号 **81]**		
930SI	FimH_ ΔGG_ PGDGN _DG	追加 AA	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLALFACKTANGTA IPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTL QRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPV ALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANN DVVVPTCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTA DAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVS LGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKV VAKGSGHHHHHH*[配列番号 **82]**	なし	C-His
989SI	FimH_DGG_sl	短リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLA PVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFS GTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTCDVSARDV TVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSP AQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQV TAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGSGHHHHHH* **[配列番号 **83]**	あり	C-His
988SI	FimH_PGDGN_sl	短リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLA PVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFS GTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSAR DVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASF SPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGG QVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGSGHHHHH H*[配列番号 **84]**	あり	C-His
987SI	FimH_DNKQ_sl	短リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLA PVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFS GTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSAR DVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASF SPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGG QVTAGNVQSIIGVTFVYQDNKQADVTITVNGKVVAKGSGHHHHHH *[配列番号 **85]**	あり	C-His
1183SI	FIMH_DG_PGDGN_536-MI3	短リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLA PAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFS GTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSAR DVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASF	あり	内部HIS

			SPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGG QVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSHHHHH HHHGGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLIEI TFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQARKAVESGAEFIVSP HLDEEISQFAKEKGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVG PQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALV KGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTE*[配列番号 86]		
1184 SI	FIMH_D G_PGD GN_536 - エンカプス リン	短 リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLA PAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFS GTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSAR DVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASF SPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGG QVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSHHHHH HHHGGSMEFLKRSFAPLTEKQWQEIDNRAREIFKTQLYGRKFVDVE GPYGWEYAAHPLGEVEVLSDENEVVKWGLRKSLPLIELRATFTLDLW ELDNLERGKPNVDLSSLEETVRKVAEFEDEVIFRGCEKSGVKGLLSFEE RKIECGSTPKDLLEAIVRALSIFSKDGIEGPYTLVINTDRWINFLKEEAG HYPLEKRVEECLRGGKIITTPRIEDALVVSERGGDFKLILGQDLSIGYED REKDAVRLFITETFTFQVVNPEALILLKF*[配列番号 87]	あり	内部 HIS
1127 SI	HBcFIM HLJ96	短 リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIR DLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGS NLEDPGSGGGGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNL VVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSY PFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGGSGGASRELVVSYVNV NMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPIL STLPETTVVGSGGGGHHHHHH*[配列番号 88]	なし	C- His
1126 SI	HBcFIM HDGJ96	短 リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIR DLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGS NLEDPGSGGGGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNL VVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSY PFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLIL RQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYP GSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGV QLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQ SIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGSGGGGASRELVVSYVNV NMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPIL STLPETTVVGSGGGGHHHHHH[配列番号 89]	なし	C- His
	D_FimH DG_Fer _GSG4	GSGG GGG リンカー	**M**ETDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLA PVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFS GTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSAR DVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASF		

			SPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGG QVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGSGGGGDII KLLNEQVNKE**M**NSSNLY**M**S**M**SSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYE HAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESIN NIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHG LYLADQYVKGIAKSRK--[配列番号 **129]**		
	D_FimH DG_Fer 0.5_degl yc_ タグなし	大腸菌 フェリチン 0.5 タグなし	**M**ETDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTAQGTAIPIGGGSANVYVNLA PVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSQFS GTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSAR DVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASF SPAQGVGVQLTRQGTIIPAQNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGG QVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGSGGGGGG **M**LKPE**M**IEKLNEQ**M**NLELYSSLLYQQ**M**SAWCSYHGFEGAAAFLRR HAQEE**M**TH**M**QRLFDYLTDTGNLPRIDTIPSPFAEYSSLDELFQETYKH EQLITQKINELAHAA**M**TNQDYPTFNFLQWYVAEQHEEEKLFKSIIDKL SLAGKSGEGLYFIDKELSTLDTQN----[配列番号 **130]**		
	FimHDG _deglyc _タグなし	グリコシル化を回避するための N-->Q 突然変異	**M**ETDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTAQGTAIPIGGGSANVYVNLAP VVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSQFSG TVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK AGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARD VTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFS PAQGVGVQLTRQGTIIPAQNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ VTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAK----[配列番号 **131]**		
	D_FimH DG_degl yc_ タグなし	最初の D; グリコシル化を回避するための N-->Q 突然変異	**M**ETDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTAQGTAIPIGGGSANVYVNLA PVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSQFS GTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSAR DVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASF SPAQGVGVQLTRQGTIIPAQNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGG QVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAK----[配列番号 **132]**		
	FimHDG _N7Q_ タグなし		**M**ETDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTAQGTAIPIGGGSANVYVNLAP VVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSG TVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK AGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARD VTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFS PAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ VTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAK----[配列番号 **133]**		

	D_FimHDG_Fer_deglyc_タグなし	グリコシル化を回避するためのN-->Q突然変異	**M**ETDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTAQGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSQFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRQGTIIPAQNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSGSGGGGGGSDIIKLLNEQVNKE**M**QSSNLY**M**S**M**SSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK----[配列番号 **134]**		
	FimH_PGDGN_DG_GGS4-フェリチンj96	タグなし FimHDG	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGGSGSGGSGGSGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS* **[配列番号 135]**		
1397SI	FimH_PGDGN_DG j96	タグなし FimHDG	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAK **[配列番号 136]**		
	FIMHDG_PADRE-エンカプスリン536	リンカーPADRE	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSGTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARDVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFSPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKFVAAWTLKAAAMEFLKRSFAPLTEKQWQEIDNRAREIFKTQLYGRKFVDVEGPYGWEYAAHPLGEVEVLSDENEVVKWGLRKSLPLIELRATFTLDLWELDNLERGKPNVDLSSLEETVRKVAEFEDEVIFRGCEKSGVKGLLSFEERKIECGSTPKDLLEAIVRALSIFSKDGIEGPYTLVINTDRWINFLKEEAGHYPLEKRVEECLRGGKIITTPRIEDALVVSERGGDFKLILGQDLSIGYEDREKDAVRLFITETFTFQVVNPEALILLKF-[配列番号 **137]**		

	FIMH_NOD-フェリチン_J96	GSおよびHを含む混合リンカー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAP VVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSG TVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK AGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARD VTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFS PAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ VTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSHHHGSGG GGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDH AAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQ HISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIG NENHGLYLADQYVKGIAKSRK [配列番号 138]		
	FIMH_DG_NOALFA-フェリチン_J96	剛性リンカー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAP VVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSG TVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK AGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARD VTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFS PAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ VTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGGGGSLVPRG SGGGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLF DHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEH EQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIE LIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS-- [配列番号 139]		
	FIMH_NOD_S_HIS_フェリチン_J96	HISリンカー--末端SRKS	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAP VVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSG TVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK AGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARD VTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFS PAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ VTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSHHHHHH HHGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFD HAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHE QHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELI GNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS--[配列番号 140]		
	FIMH_DG_PGDGN-PADRE-フェリチン536		METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAP AVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSG TVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK AGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARD VTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFS PAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ VTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSFVAAWTL KAAAGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFL FDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYE HEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKI ELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS- [配列番号 141]		

	fimh-DG_フェリチンa-リンカーアルファ	剛性リンカー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAP VVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSG TVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK AGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARD VTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFS PAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ VTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKAEAAAKEAAA KEAAAKADIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFL FDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYE HEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKI ELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS-- [配列番号 **142]**		
	FIMH-PADRE-フェリチン536_スペースなし	リンカーPADRE	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAP AVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFSG TVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK AGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARD VTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFS PAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ VTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKFVAAWTLKAA ADIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAE EYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISE SINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNEN HGLYLADQYVKGIAKSRKS--**[配列番号 143]**		
	FIMH_DG_GSG4-フェリチン_J96		METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLA PVVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFS GTVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSAR DVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASF SPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGG QVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSGSGGGG GGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHA AEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHI SESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGN ENHGLYLADQYVKGIAKSRK-- [配列番号 **144]**		
	FIMH_DG_PDGN-SGS_PADRE-フェリチンJ96		METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAP VVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSG TVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK AGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARD VTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFS PAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ VTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSFVAAWTL KAAAGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFL FDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYE HEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKI ELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS- **[配列番号 145]**		

	fimh-フェリチンa-リンカーNONa	剛性リンカー	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAP VVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSG TVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK AGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARD VTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFS PAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ VTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGGGGSLVPRG SGGGGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLF DHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEH EQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIE LIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS--[配列番号 **146]**		
	FIMH-フェリチンj96_スペースなし	リンカーPADRE	METDTLLLWVLLLWVPGSTGFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAP VVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSG TVKYSGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK AGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSARD VTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASFS PAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQ VTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKFVAAWTLKAA ADIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAE EYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISE SINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNEN HGLYLADQYVKGIAKSRKS--[配列番号 **147]**		
	FIMH_DG_PDGN-GGS4-フェリチン536	N末端Dを含む	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLA PAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFS GTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSAR DVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASF SPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGG QVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKGGSGGSGGS GGSDIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHA AEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHI SESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGN ENHGLYLADQYVKGIAKSRK-[配列番号 **148]**		
	大腸菌フェリチン安定化型0.5へのFimH_DGの融合体		METDTLLLWVLLLWVPGSTGDFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLA PAVNVGQNLVVDLSTQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSSFS GTVKYNGSSYPFPTTSETPRVVYNSRTDKPWPVALYLTPVSSAGGVAI KAGSLIAVLILRQTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCDVSAR DVTVTLPDYPGSVPIPLTVYCAKSQNLGYYLSGTTADAGNSIFTNTASF SPAQGVGVQLTRNGTIIPANNTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGG QVTAGNVQSIIGVTFVYQPGDGNADVTITVNGKVVAKSGSHHHHH HHHGGSMLKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHGFEGA AAFLRRHAQEEMTHMQRLFDYLTDTGNLPRIDTIPSPFAEYSSLDELF QETYKHEQLITQKINELAHAAMTNQDYPTFNFLQWYVAEQHEEEKL FKSIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKELSTLDTQN -[配列番号 **153]**		

【０２７０】

【表３】

表3 - 構築物核酸配列

FIMH_DG_536-1EUM_0_5	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGCTCTACAGGCGATTTTGC CTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGG CTCCTGCCGTGAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGAC TACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAG CTTTAGCGGCACCGTGAAGTACAACGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAG TGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCC GGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACA ACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGG ATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCT GACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGAACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGC AACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAA CGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGG CCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGG TGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATCACCATCACCACGGCGGCTCTATGCTGAAGCCCGAGATG ATCGAGAAGCTGAACGAGCAGATGAACCTGGAACTGTACAGCTCCCTGCTGTACCAGCAGATGAGCG CCTGGTGTAGCTATCACGGATTTGAGGGCGCTGCCGCCTTTCTGAGAAGGCACGCCCAAGAGGAAAT GACCCACATGCAGCGGCTGTTCGACTACCTGACCGATACCGGCAATCTGCCCAGAATCGACACAATCC CATCTCCATTCGCCGAGTACAGCAGCCTGGACGAGCTGTTCCAAGAAACCTACAAGCACGAGCAGCTG ATCACCCAGAAGATCAACGAACTGGCCCATGCCGCCATGACCAACCAGGACTACCCTACCTTCAACTTC CTGCAGTGGTACGTGGCCGAGCAGCACGAGGAAGAGAAGCTGTTCAAGAGCATCATCGACAAGCTGA GCCTGGCCGGAAAGTCTGGCGAGGGCCTGTACTTTATCGACAAAGAGCTGAGCACACTGGATACCCA GAACTGA **[配列番号 45]**
FIMH_DG_PGDGN_536-MI3	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGCTCTACAGGCGATTTTGC CTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGG CTCCTGCCGTGAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGAC TACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAG CTTTAGCGGCACCGTGAAGTACAACGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAG TGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCC GGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACA ACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGG ATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCT GACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGAACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGC AACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAA CGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGG CCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGG TGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCATGAAGATGGAAGAACT GTTCAAGAAGCACAAGATCGTCGCCGTGCTGCGGGCCAATTCTGTGGAAGAGGCCAAAAAAAAGGCC CTGGCCGTGTTTCTTGGCGGAGTGCACCTGATCGAGATCACCTTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGT GATCAAAGAGCTGAGCTTCCTGAAAGAGATGGGCGCCATCATCGGAGCCGGCACAGTGACATCTGTT GAGCAGGCCAGAAAGGCCGTGGAATCTGGCGCCGAGTTTATCGTGTCCCCTCACCTGGATGAGGAAA TCAGCCAGTTCGCCAAAGAAAAGGGCGTGTTCTACATGCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCTGGTC

	AAAGCCATGAAGCTGGGCCACACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGCGAAGTCGTGGGCCCTCAGTTCGT GAAAGCTATGAAGGGCCCATTTCCAAACGTGAAGTTCGTGCCCACTGGCGGCGTGAACCTGGATAAT GTGTGCGAGTGGTTCAAGGCTGGCGTGCTGGCTGTTGGAGTTGGCTCTGCTCTGGTCAAGGGCACAC CTGTGGAAGTGGCTGAGAAGGCCAAGGCCTTCGTGGAAAAGATCAGAGGCTGCACCGAGTGA **[配列番号 46]**
FIMH_DG_PGDGN_536-エンカプスリン	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGCTCTACAGGCGATTTTGC CTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGG CTCCTGCCGTGAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGAC TACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAG CTTTAGCGGCACCGTGAAGTACAACGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAG TGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCC GGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACA ACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGG ATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCT GACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGAACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGC AACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAA CGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGG CCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGG TGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCATGGAATTTCTGAAGAG AAGCTTCGCCCCACTGACCGAGAAGCAGTGGCAAGAGATCGACAACCGGGCCAGAGAGATCTTCAAG ACCCAGCTGTACGGCCGGAAGTTCGTGGATGTGGAAGGCCCTTATGGCTGGGAGTATGCCGCTCATC CTCTGGGCGAAGTGGAAGTGCTGAGCGACGAGAATGAGGTCGTGAAGTGGGGCCTGAGAAAGAGCC TGCCTCTGATCGAGCTGAGAGCCACCTTCACACTGGACCTGTGGGAACTCGACAACCTGGAAAGGGG CAAGCCCAATGTGGACCTGAGCAGCCTGGAAGAGACAGTGCGGAAGGTGGCCGAGTTCGAGGACGA AGTGATCTTCAGAGGCTGCGAGAAGTCTGGCGTGAAGGGCCTGCTGAGCTTCGAGGAACGGAAGATC GAGTGTGGCAGCACCCCTAAGGATCTGCTGGAAGCCATCGTGCGGGCCCTGAGCATCTTCTCTAAGGA TGGCATCGAGGGCCCCTACACACTGGTCATCAACACCGACCGGTGGATCAACTTCCTGAAAGAGGAA GCCGGCCACTATCCTCTGGAAAAGCGCGTGGAAGAGTGCCTGAGAGGCGGCAAGATCATCACAACCC CTAGAATCGAGGACGCCCTGGTGGTTTCTGAGAGAGGCGGAGACTTCAAGCTGATCCTTGGCCAGGA CCTGTCCATCGGCTACGAGGACAGAGAAAAAGACGCCGTGCGGCTGTTCATCACCGAAACCTTCACCT TCCAAGTGGTCAACCCCGAGGCTCTGATTCTGCTGAAGTTCTGA **[配列番号 47]**
HBcFIMHLJ96	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACCGGCGACGACAT CGACCCCTACAAAGAGTTTGGCGCCAGCGTCGAGCTGCTGAGCTTCCTGCCTAGCGACTTCTTCCCTTC CATCCGGGATCTGCTGGATACCGCTAGCGCCCTGTATAGAGAGGCCCTGGAAAGCCCTGAGCACTGCT CTCCACATCACACAGCCCTGAGACAGGCCATCCTGTGTTGGGGCGAACTGATGAATCTGGCCACCTGG GTCGGAAGCAACCTGGAAGATCCTGGTTCTGGCGGCGGAGGCTTTGCCTGTAAAACAGCCAATGGCA CCGCCATTCCTATCGGAGGCGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGC CAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGA CTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGT ACAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACC GACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCTGGCGGAGTGGCCATCAAGGC CGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCG TGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGAGGATCTGGCGGAGCTTCTAG

	AGAACTGGTCGTGTCCTACGTGAACGTGAACATGGGCCTGAAGATCCGGCAGCTGCTCTGGTTTCACA TCAGCTGTCTGACCTTCGGCCGGGAAACCGTGCTGGAATACCTGGTGTCCTTCGGCGTGTGGATCAGA ACCCCTCCTGCCTATAGACCTCCTAACGCTCCCATCCTGAGCACACTGCCTGAGACAACAGTTGTTGGA AGCGGAGGCGGAGGCCACCACCATCACCATCAT [配列番号 **48]**
HBcFIM HDGJ96	ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGCAGCACCGGCGACGACA TCGACCCCTACAAGGAGTTCGGCGCCAGCGTGGAGCTGCTGAGCTTCCTGCCCAGCGACTTCTTCCCC AGCATCCGGGACCTGCTGGACACCGCCAGCGCCCTGTACCGGGAGGCCCTGGAGAGCCCCGAGCACT GCAGCCCCCACCACACCGCCCTGCGGCAGGCCATCCTGTGCTGGGGCGAGCTGATGAACCTGGCCAC CTGGGTGGGCAGCAACCTGGAGGACCCCGGCAGCGGCGGCGGCGGCTTCGCCTGCAAGACCGCCAA CGGCACCGCCATCCCCATCGGCGGCGGCAGCGCCAACGTGTACGTGAACCTGGCCCCCGTGGTGAAC GTGGGCCAGAACCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTCTGCCACAACGACTACCCCGAGACCAT CACCGACTACGTGACCCTGCAGCGGGGCAGCGCCTACGGCGGCGTGCTGAGCAACTTCAGCGGCACC GTGAAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCCTTCCCCACCACCAGCGAGACCCCCCGGGTGGTGTACAACA GCCGGACCGACAAGCCCTGGCCCGTGGCCCTGTACCTGACCCCCGTGAGCAGCGCCGGCGGCGTGGC CATCAAGGCCGGCAGCCTGATCGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACT TCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCCACCGGCGGCTGCGACGTGAG CGCCCGGGACGTGACCGTGACCCTGCCCGACTACCCCGGCAGCGTGCCCATCCCCCTGACCGTGTACT GCGCCAAGAGCCAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACCACCGCCGACGCCGGCAACAGCATCTT CACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCCGCCCAGGGCGTGGGCGTGCAGCTGACCCGGAACGGCACCATC ATCCCCGCCAACAACACCGTGAGCCTGGGCGCCGTGGGCACCAGCGCCGTGAGCCTGGGCCTGACCG CCAACTACGCCCGGACCGGCGGCCAGGTGACCGCCGGCAACGTGCAGAGCATCATCGGCGTGACCTT CGTGTACCAGCCCGGCGACGGCAACGCCGACGTGACCATCACCGTGAACGGCAAGGTGGTGGCCAA GGGCAGCGGCGGCGGCGGCGCCAGCCGGGAGCTGGTGGTGAGCTACGTGAACGTGAACATGGGCCT GAAGATCCGGCAGCTGCTGTGGTTCCACATCAGCTGCCTGACCTTCGGCCGGGAGACCGTGCTGGAG TACCTGGTGAGCTTCGGCGTGTGGATCCGGACCCCCCCCGCCTACCGGCCCCCCAACGCCCCCATCCTG AGCACCCTGCCCGAGACCACCGTGGTGGGCAGCGGCGGCGGCGGCCACCACCACCACCACCAC [配列番号 **49]**
FIMHL- HIS-Mi3 J96	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGCTCTACAGGCGATTTTGC CTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTG GCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGA CTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGC AATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAG AGTGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTG CCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTAC AACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAAGCG GCAGCCACCACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCATGAAGATGGAAGAACTGTTCAAGAAGCA CAAGATCGTCGCCGTGCTGCGGGCCAATTCTGTGGAAGAGGCCAAAAAAAAAGGCCCTGGCCGTGTTT CTTGGCGGAGTGCACCTGATCGAGATCACCTTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGTGATCAAAGAGCT GAGCTTCCTGAAAGAGATGGGCGCCATCATCGGAGCCGGAACCGTGACATCTGTTGAGCAGGCCAGA AAGGCCGTGGAATCTGGCGCCGAGTTTATCGTGTCCCCTCACCTGGATGAGGAAATCAGCCAGTTCGC CAAAGAAAAGGGCGTGTTCTACATGCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCTGGTCAAAGCCATGAAG CTGGGCCACACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGCGAAGTCGTGGGCCCTCAGTTCGTGAAAGCTATGAA GGGCCCATTTCCAAACGTGAAGTTCGTGCCCACTGGCGGCGTCAACCTGGATAATGTGTGCGAGTGGT

	TCAAGGCTGGCGTGCTGGCTGTTGGAGTGGGATCTGCTCTGGTCAAGGGCACACCTGTGGAAGTGGC TGAGAAGGCCAAGGCCTTCGTGGAAAAGATCAGAGGCTGCACCGAGTGA [配列番号 **50**]
FIMHL-HIS-Fer536	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGCTCTACAGGCGATTTTGC CTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGG CTCCTGCCGTGAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGAC TACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAG CTTTAGCGGCACCGTGAAGTACAACGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAG TGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCC GGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACA ACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAAGCGG CAGCCACCACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCGACATCATCAAGCTGCTGAACGAGCAAGTGA ACAAAGAGATGAACAGCAGCAACCTGTACATGAGCATGAGCAGCTGGTGCTACACACACAGCCTGGA TGGCGCCGGACTGTTCCTGTTTGATCATGCCGCCGAGGAATACGAGCACGCCAAGAAGCTGATCATCT TCCTGAACGAGAACAACGTGCCCGTGCAGCTGACATCTATCAGCGCCCCTGAGCACAAGTTCGAGGGC CTGACACAGATCTTCCAGAAGGCCTACGAACACGAGCAGCACATCAGCGAGAGCATCAACAACATCGT GGACCACGCCATCAAGAGCAAGGATCACGCCACCTTCAACTTTCTGCAGTGGTACGTGGCCGAACAGC ACGAGGAAGAGGTGCTGTTCAAGGACATCCTGGACAAGATCGAGCTGATCGGCAACGAGAACCACG GCCTGTACCTGGCCGATCAGTATGTGAAGGGAATCGCCAAGAGCCGGAAGTGA [配列番号 **51**]
FIMH_DG_PGDGN_IMX313_HISJ96	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACAGGGGATTTTGC CTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTG GCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGA CTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGC AATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAG AGTGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTG CCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTAC AACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCG GATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTC TGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGC AACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAA CGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGG CCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGG TGGCCAAGGGCAGCTCAGGCTCTGGCTCTGGATCTAAAAAACAGGGCGACGCCGATGTGTGTGGCGA GGTGGCATATATCCAGAGCGTGGTGTCCGATTGTCACGTGCCAACCGCCGAGCTGAGAACCCTGCTG GAAATCCGGAAGCTGTTCCTCGAAATTCAGAAGCTGAAGGTCGAGCTGCAGGGCCTGTCTAAAGAAG GCGGAGGAAGCGGATCTCACCACCACCATCACCACTGATGA [配列番号 **52**]
FimH_PGDGN_DG_HIS-フェリチンj96	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACAGGGGATTTTGC CTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTG GCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGA CTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGC AATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAG AGTGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTG CCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTAC AACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCG

	GATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTC TGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGC AACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAA CGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGG CCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGG TGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCATGAAGATGGAAGAACT GTTCAAGAAGCACAAGATCGTCGCCGTGCTGCGGGCCAATTCTGTGGAAGAGGCCAAAAAAAAGGCC CTGGCCGTGTTTCTTGGCGGAGTGCACCTGATCGAGATCACCTTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGT GATCAAAGAGCTGAGCTTCCTGAAAGAGATGGGCGCCATCATCGGAGCCGGAACCGTGACATCTGTT GAGCAGGCCAGAAAGGCCGTGGAATCTGGCGCCGAGTTTATCGTGTCCCCTCACCTGGATGAGGAAA TCAGCCAGTTCGCCAAAGAAAAGGGCGTGTTCTACATGCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCTGGTC AAAGCCATGAAGCTGGGCCACACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGCGAAGTCGTGGGCCCTCAGTTCGT GAAAGCTATGAAGGGCCCATTTCCAAACGTGAAGTTCGTGCCCACTGGCGGCGTCAACCTGGATAATG TGTGCGAGTGGTTCAAGGCTGGCGTGCTGGCTGTTGGAGTTGGCTCTGCTCTGGTCAAGGGCACACCT GTGGAAGTGGCTGAGAAGGCCAAGGCCTTCGTGGAAAAGATCAGAGGCTGCACCGAGTGATGA **[配列番号 53]**
FIMH_DG_PGDGN-HIS-フェリチン536	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACAGGGGATGTTTG CCTGCAAGACCGCCAATGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTG GCTCCTGCCGTGAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGA CTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTA GCTTTAGCGGCACCGTGAAGTACAACGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGA GTGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGC CGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACA ACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGG ATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCT GACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGC AACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAA CGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGG CCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGG TGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCGACATCATCAAGCTGCTG AACGAGCAAGTGAACAAAGAGATGAACAGCAGCAACCTGTACATGAGCATGAGCAGCTGGTGCTACA CACACAGCCTGGATGGCGCCGGACTGTTCCTGTTTGATCATGCCGCCGAGGAATACGAGCACGCCAA GAAGCTGATCATCTTCCTGAACGAGAACAACGTGCCCGTCCAGCTGACATCTATCAGCGCCCCTGAGC ACAAGTTCGAGGGCCTGACACAGATCTTCCAGAAGGCCTACGAACACGAGCAGCACATCAGCGAGAG CATCAACAACATCGTGGACCACGCCATCAAGAGCAAGGATCACGCCACCTTCAACTTTCTGCAGTGGT ACGTGGCCGAACAGCACGAGGAAGAGGTGCTGTTCAAGGACATCCTGGACAAGATCGAGCTGATCG GCAACGAGAACCACGGCCTGTACCTGGCCGATCAGTATGTGAAGGGAATCGCCAAGAGCCGCAAGTG A **[配列番号 54]**
FimH_PGDGN_DG-HIS-	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACAGGGGATGCCGC TCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAAAGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACA GCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCA GAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACT

フェリチン J96	ACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTAC AGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACCG ACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCC GGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCGT GTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGAT GTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCT CAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACACCGC CAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACA ATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCAACTATGCCAGA ACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACCTTCGTGTATCAGCCTG GCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACC ACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCGACATCATCAAGCTGCTGAACGAGCAAGTGAACAAAGA GATGAACAGCAGCAACCTGTACATGAGCATGAGCAGCTGGTGCTACACACACAGCCTGGATGGCGCC GGACTGTTCCTGTTTGATCATGCCGCCGAGGAATACGAGCACGCCAAGAAGCTGATCATCTTCCTGAA CGAGAACAACGTGCCCGTCCAGCTGACATCTATCAGCGCCCCTGAGCACAAGTTCGAGGGCCTGACAC AGATCTTCCAGAAGGCCTACGAACACGAGCAGCACATCAGCGAGAGCATCAACAACATCGTGGACCA CGCCATCAAGAGCAAGGATCACGCCACCTTCAACTTTCTGCAGTGGTACGTGGCCGAACAGCACGAG GAAGAGGTGCTGTTCAAGGACATCCTGGACAAGATCGAGCTGATCGGCAACGAGAACCACGGCCTGT ACCTGGCCGATCAGTATGTGAAGGGAATCGCCAAGAGCCGCAAGTGA **[配列番号 55]**
FimH_PGDGN_DG-HIS-MI3 j96	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACAGGGGATGCCGC TCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAAAGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACA GCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCA GAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACT ACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTAC AGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACCG ACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCC GGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCGT GTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGAT GTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCT CAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACACCGC CAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACA ATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCAACTATGCCAGA ACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACCTTCGTGTATCAGCCTG GCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACC ACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCATGAAGATGGAAGAACTGTTCAAGAAGCACAAGATCGT CGCCGTGCTGCGGGCCAATTCTGTGGAAGAGGCCAAAAAAAAGGCCCTGGCCGTGTTTCTTGGCGGA GTGCACCTGATCGAGATCACCTTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGTGATCAAAGAGCTGAGCTTCCT GAAAGAGATGGGCGCCATCATCGGAGCCGGAACCGTGACATCTGTTGAGCAGGCCAGAAAGGCCGT GGAATCTGGCGCCGAGTTTATCGTGTCCCCTCACCTGGATGAGGAAATCAGCCAGTTCGCCAAAGAAA AGGGCGTGTTCTACATGCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCTGGTCAAAGCCATGAAGCTGGGCCA CACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGCGAAGTCGTGGGCCCTCAGTTCGTGAAAGCTATGAAGGGCCCAT TTCCAAACGTGAAGTTCGTGCCCACTGGCGGCGTCAACCTGGATAATGTGTGCGAGTGGTTCAAGGCT GGCGTGCTGGCTGTTGGAGTTGGCTCTGCTCTGGTCAAGGGCACACCTGTGGAAGTGGCTGAGAAGG CCAAGGCCTTCGTGGAAAAGATCAGAGGCTGCACCGAGTGATGA **[配列番号 56]**

FimH_PGDGN_DG-HIS-IMX313j96	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACAGGGGATGCCGC TCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAAAGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACA GCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCA GAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACT ACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTAC AGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACCG ACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCC GGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCGT GTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGAT GTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCT CAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACACCGC CAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACA ATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCAACTATGCCAGA ACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACCTTCGTGTATCAGCCTG GCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAGGGCAGCTCAGGCT CTGGCTCTGGATCTAAAAAACAGGGCGACGCCGATGTGTGTGGCGAGGTGGCATATATCCAGAGCGT GGTGTCCGATTGTCACGTGCCAACCGCCGAGCTGAGAACCCTGCTGGAAATCCGGAAGCTGTTCCTCG AAATTCAGAAGCTGAAGGTCGAGCTGCAGGGCCTGTCTAAAGAAGGCGGAGGAAGCGGATCTCACC ACCACCATCACCACTGATGAC **[配列番号 57]**
FimH_PGDGN_DG_フェリチン(536)	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACAGGGGATGCCGC TCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAAAGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACA GCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGGCTCCTGCCGTGAACGTGGGCCA GAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACT ACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAGCTTTAGCGGCACCGTGAAGTAC AACGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACCG ACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCC GGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCGT GTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGAT GTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCT CAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACACCGC CAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACA ATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGGCCTGACAGCCAACTATGCCAGA ACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACCTTCGTGTATCAGCCTG GCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAGAGCGGAAGCCACC ACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCGACATCATCAAGCTGCTGAACGAGCAAGTGAACAAAGA GATGAACAGCAGCAACCTGTACATGAGCATGAGCAGCTGGTGCTACACACACAGCCTGGATGGCGCC GGACTGTTCCTGTTTGATCATGCCGCCGAGGAATACGAGCACGCCAAGAAGCTGATCATCTTCCTGAA CGAGAACAACGTGCCCGTCCAGCTGACATCTATCAGCGCCCCTGAGCACAAGTTCGAGGGCCTGACAC AGATCTTCCAGAAGGCCTACGAACACGAGCAGCACATCAGCGAGAGCATCAACAACATCGTGGACCA CGCCATCAAGAGCAAGGATCACGCCACCTTCAACTTTCTGCAGTGGTACGTGGCCGAACAGCACGAG GAAGAGGTGCTGTTCAAGGACATCCTGGACAAGATCGAGCTGATCGGCAACGAGAACCACGGCCTGT ACCTGGCCGATCAGTATGTGAAGGGAATCGCCAAGAGCCGCAAGTGA **[配列番号 58]**

FimH-IMX313 j96	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACAGGGGATGCCGC TCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAAAGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACA GCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCA GAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACT ACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTAC AGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACCG ACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCC GGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCGT GTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCCACCTGTGATGTGTCCGCTAGAGATGTGACA GTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAAC CTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTT CAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCG TGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACATCTGCAGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGC GGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACATTCGTGTATCAGGGCAGCTCTG GCAGCGGCTCTGGATCTAAAAAACAGGGCGACGCCGATGTGTGTGGCGAGGTGGCATATATCCAGAG CGTGGTGTCCGATTGTCACGTGCCAACCGCCGAGCTGAGAACCCTGCTGGAAATCCGGAAGCTGTTCC TCGAAATTCAGAAGCTGAAGGTCGAGCTGCAGGGCCTGTCTAAAGAAGGCGGAGGAAGCGGATCTC ACCACCACCATCACCACTGA **[配列番号 59]**
FimH_mi3 j96	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACAGGGGATGCCGC TCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAAAGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACA GCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCA GAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACT ACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTAC AGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACCG ACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCC GGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCGT GTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCCACCTGTGATGTGTCCGCTAGAGATGTGACA GTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAAC CTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTT CAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCG TGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACATCTGCAGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGC GGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACCTTCGTGTACCAAGGATCTGGCG GAGGCGGCATGAAGATGGAAGAACTGTTCAAGAAACACAAGATCGTGGCCGTGCTGCGGGCCAATTC TGTGGAAGAGGCCAAAAAAAAGGCCCTGGCCGTGTTTCTCGGAGGCGTGCACCTGATCGAGATCACC TTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGTGATCAAAGAGCTGAGCTTCCTGAAAGAGATGGGCGCCATCAT CGGAGCCGGAACCGTGACATCTGTTGAGCAGGCCAGAAAGGCCGTGGAATCTGGCGCCGAGTTTATC GTGTCCCCTCACCTGGATGAGGAAATCAGCCAGTTCGCCAAAGAAAAGGGCGTGTTCTACATGCCCGG CGTGATGACACCTACAGAGCTGGTCAAAGCCATGAAGCTGGGCCACACCATCCTGAAGCTGTTTCCAG GCGAAGTCGTGGGCCCTCAGTTCGTGAAAGCTATGAAGGGCCCATTTCCAAACGTGAAGTTCGTGCCC ACTGGCGGAGTGAATCTGGACAACGTGTGCGAGTGGTTCAAGGCTGGCGTGCTGGCTGTTGGAGTTG GCTCTGCTCTGGTCAAGGGCACACCTGTGGAAGTGGCTGAGAAGGCCAAGGCCTTCGTGGAAAAGAT CAGAGGCTGTACCGAAGGCAGCGGCTCTGGAAGCGGATCTGGATCTCACCACCATCATCACCATCACC ACTGA **[配列番号 60]**

FIMHL-HIS-mI3j96	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACAGGGGATGCCGC TCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAAAGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACA GCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCA GAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACT ACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTAC AGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACCG ACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCC GGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCGT GTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGATCTGGCGGACACCACCATCATCACC ATCACCACGGCAGCGGCTCCATGAAGATGGAAGAACTGTTCAAGAAGCACAAGATCGTCGCCGTGCT GCGGGCCAATTCTGTGGAAGAGGCCAAAAAAAAGGCCCTGGCCGTGTTTCTTGGCGGAGTGCACCTG ATCGAGATCACCTTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGTGATCAAAGAGCTGAGCTTCCTGAAAGAGAT GGGCGCCATCATCGGAGCCGGAACCGTGACATCTGTTGAGCAGGCCAGAAAGGCCGTGGAATCTGGC GCCGAGTTTATCGTGTCCCCTCACCTGGATGAGGAAATCAGCCAGTTCGCCAAAGAAAAGGGCGTGTT CTACATGCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCTGGTCAAAGCCATGAAGCTGGGCCACACCATCCTGA AGCTGTTTCCAGGCGAAGTCGTGGGCCCTCAGTTCGTGAAAGCTATGAAGGGCCCATTTCCAAACGTG AAGTTCGTGCCCACTGGCGGCGTCAACCTGGATAATGTGTGCGAGTGGTTCAAGGCTGGCGTGCTGG CTGTTGGAGTGGGATCTGCTCTGGTCAAGGGCACACCTGTGGAAGTGGCTGAGAAGGCCAAGGCCTT CGTGGAAAAGATCAGAGGCTGCACCGAGTGA **[配列番号 61]**
FIMH_DG_PGDGN_HIS-フェリチン536	ATGTTTGCATGTAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGT TAATCTGGCACCGGCAGTTAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCCA TAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCT GAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGAAATATAACGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACAC CGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGC AGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAA CTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGT GGTTGTGATGTTAGCGCACGTGATGTTACCGTTACACTGCCGGATTATCCTGGTAGCGTTCCGATTCCG CTGACCGTTTATTGTGCAAAAAGCCAGAACCTGGGTTATTATCTGAGCGGCACCACCGCAGATGCAGG TAATAGCATTTTTACCAATACCGCCAGCTTTAGTCCGGCACAAGGTGTTGGTGTTCAGCTGACCCGTAA TGGCACCATTATTCCGGCAAATAATACCGTTAGCCTGGGTGCAGTTGGCACCAGCGCAGTGAGCCTGG GTCTGACCGCCAATTATGCACGTACCGGTGGTCAGGTTACCGCAGGTAATGTTCAGAGCATTATTGGT GTTACCTTTGTGTATCAGCCTGGTGATGGTAATGCAGATGTGACCATTACCGTGAATGGTAAAGTTGTT GCCAAAAGCGGTAGTCATCATCACCACCATCATCATCACGGTGGTAGCGATATCATCAAACTGCTGAA TGAACAGGTGAACAAAGAAATGAATAGCAGCAACCTGTATATGAGCATGAGCAGCTGGTGTTATACC CATAGCCTGGATGGTGCAGGTCTGTTTCTGTTTGATCATGCAGCCGAAGAATATGAGCACGCAAAAAA ACTGATCATCTTCCTGAATGAAAATAATGTTCCGGTGCAGCTGACCAGCATTAGCGCTCCGGAACATA AATTTGAAGGTCTGACACAGATTTTTCAGAAAGCCTATGAACATGAACAGCACATTAGCGAAAGCATT AACAACATTGTGGATCACGCCATCAAAAGCAAAGATCATGCAACCTTTAACTTTCTGCAGTGGTATGTT GCAGAACAGCATGAAGAAGAAGTGCTGTTTAAAGACATCCTGGATAAAATTGAACTGATCGGCAACG AAAATCATGGTCTGTATCTGGCAGATCAGTATGTTAAAGGTATTGCGAAAAGCCGCAAATAA **[配列番号 62]**
LS-FIMHL-	ATGAAGTATCTGCTGCCGACCGCAGCAGCGGGTCTGCTGCTGCTGGCAGCACAGCCTGCAATGGCATT TGCATGTAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGTTAATC TGGCACCGGTTGTTAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCCATAATG

IMX313-HIS	ATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCTGAGC AATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCG TGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTGAGCAGTG CCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAACTAT AACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGT AGCAGCGGTAGCGGTTCAGGTAGCAAAAAACAGGGTGATGCAGATGTTTGTGGTGAAGTTGCATATA TTCAGAGCGTTGTTAGCGATTGTCATGTTCCGACAGCAGAACTGCGTACCCTGCTGGAAATTCGTAAA CTGTTTCTGGAAATCCAGAAGCTGAAAGTTGAACTGCAGGGTCTGAGCAAAGAAGGTGGCGGAAGCG GTAGCCATCACCATCACCATCACTGA **[配列番号 63]**
FIMHL-S24S65-IMX313	ATGTTTGCAAGCAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGT TAATCTGGCACCGGTTGTTAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTAGCCA TAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCT GAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACAC CGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGC AGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAA CTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGT GGTAGTAGCGGTAGTGGTAGCGGTTCAAAAAAACAGGGTGATGCAGATGTTTGTGGTGAAGTTGCAT ATATTCAGAGCGTTGTTAGCGATTGTCATGTGCCGACCGCAGAACTGCGTACCCTGCTGGAAATTCGT AAACTGTTTCTGGAAATCCAGAAGCTGAAAGTTGAACTGCAGGGTCTGAGTAAAGAAGGTGGTGGTA GTGGTAGCCATCACCATCATCATCACTAATAA **[配列番号 64]**
FIMHL-S24S65-foldon-フェリチン	ATGTTTGCAAGCAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGT TAATCTGGCACCGGCAGTTAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTAGCCA TAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCT GAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGAAATATAACGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACAC CGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGC AGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAA CTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGT TCAGGTTATATTCCGGAAGCACCGCGTGATGGTCAGGCATATGTTCGTAAAGATGGTGAATGGGTTCT GCTGAGCACCTTTTTAGGTAGCGGTCATCATCACCATCATCATGGTAGCGGTGATATCATTAAACTGCT GAATGAACAGGTGAACAAAGAGATGAATAGCAGCAATCTGTATATGAGCATGAGCAGCTGGTGTTAT ACCCATAGCCTGGATGGTGCAGGTCTGTTTCTGTTTGATCATGCAGCCGAAGAATATGAGCACGCAAA AAAACTGATCATCTTCCTGAATGAAAATAATGTTCCGGTTCAGCTGACCAGCATTAGCGCTCCGGAACA TAAATTTGAAGGTCTGACACAGATTTTTCAGAAAGCCTATGAACATGAACAGCACATTAGCGAAAGCA TTAACAACATTGTGGATCACGCCATCAAAAGCAAAGATCATGCAACCTTTAACTTTCTGCAGTGGTATG TTGCAGAACAGCATGAAGAAGAAGTGCTGTTTAAAGACATCCTGGATAAAATTGAACTGATCGGCAAC GAAAATCATGGTCTGTATCTGGCAGATCAGTATGTTAAAGGTATTGCCAAAAGCCGCAAGTAATAA **[配列番号 65]**
FIMHL-S24S65-Mi3	ATGTTTGCAAGCAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGT TAATCTGGCACCGGCAGTTAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTAGCCA TAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCT GAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGAAATATAACGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACAC CGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGC AGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAA CTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGT

	GGTAGTGGTGGTTCAGGTGGTAGCATGAAAATGGAAGAACTGTTCAAAAAGCACAAAATTGTTGCCG TTCTGCGTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCAAAAAAGAAAGCACTGGCCGTTTTTTTAGGTGGTGTGCAT CTGATTGAAATCACCTTTACCGTTCCGGATGCAGATACCGTTATTAAAGAACTGAGCTTTCTGAAAGAA ATGGGTGCAATTATTGGTGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAGGCACGTAAAGCAGTTGAAAGCG GTGCAGAATTTATTGTTAGTCCGCATCTGGATGAAGAAATTAGCCAGTTTGCAAAAGAAAAGGGCGTG TTTTATATGCCTGGTGTTATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAAACTGGGTCATACCATCCTG AAACTGTTTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGTGAAAGCCATGAAAGGTCCTTTTCCGAACGTT AAATTTGTGCCGACAGGTGGCGTGAATCTGGATAATGTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGTTCTGGC CGTTGGTGTTGGTAGTGCCCTGGTGAAAGGTACACCGGTTGAAGTTGCAGAAAAAGCAAAAGCCTTT GTGGAAAAAATTCGTGGTTGTACCGAAGGTAGCGGTAGCGGTTCAGGTAGTGGTAGCCATCACCATC ATCATCACTAATAA **[配列番号 66]**
FIMHL-mI3	ATGTTTGCATGTAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGT TAATCTGGCACCGGCAGTTAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCCA TAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCT GAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGAAATATAACGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACAC CGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGC AGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAA CTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGT GGTAGTGGTGGTTCAGGTGGTAGCATGAAAATGGAAGAACTGTTCAAAAAGCACAAAATTGTTGCCG TTCTGCGTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCAAAAAAGAAAGCACTGGCCGTTTTTTTAGGTGGTGTGCAT CTGATTGAAATCACCTTTACCGTTCCGGATGCAGATACCGTTATTAAAGAACTGAGCTTTCTGAAAGAA ATGGGTGCAATTATTGGTGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAGGCACGTAAAGCAGTTGAAAGCG GTGCAGAATTTATTGTTAGTCCGCATCTGGATGAAGAAATTAGCCAGTTTGCAAAAGAAAAGGGCGTG TTTTATATGCCTGGTGTTATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAAACTGGGTCATACCATCCTG AAACTGTTTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGTGAAAGCCATGAAAGGTCCTTTTCCGAACGTT AAATTTGTGCCGACAGGTGGCGTGAATCTGGATAATGTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGTTCTGGC CGTTGGTGTTGGTAGTGCCCTGGTGAAAGGTACACCGGTTGAAGTTGCAGAAAAAGCAAAAGCCTTT GTGGAAAAAATTCGTGGTTGTACCGAAGGTAGCGGTAGCGGTTCAGGTAGTGGTAGCCATCACCATC ATCATCACTAATAA **[配列番号 67]**
FimHL-NOCYS-MI3	ATGTTCGCAAGCAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGT TAATCTGGCACCGGCAGTTAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTAGCCA TAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCT GAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACAC CGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGC AGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAA CTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGT GGTGGTGGCAGTGGTGGTTCAGGCGGTAGCGGTGGTAGCATGAAAATGGAAGAACTGTTCAAAAAG CACAAAATTGTTGCCGTTCTGCGTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCAAAAAAGAAAGCACTGGCCGTTTT TTTAGGTGGTGTGCATCTGATTGAAATCACCTTTACCGTTCCGGATGCAGATACCGTTATTAAAGAACT GAGCTTTCTGAAAGAAATGGGTGCAATTATTGGTGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAGGCACGT AAAGCAGTTGAAAGCGGTGCAGAATTTATTGTTAGTCCGCATCTGGATGAAGAAATTAGCCAGTTTGC AAAAGAAAAGGGCGTGTTTTATATGCCTGGTGTTATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAAAC TGGGTCATACCATCCTGAAACTGTTTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGTGAAAGCCATGAAA GGTCCTTTTCCGAACGTTAAATTTGTGCCGACAGGTGGCGTGAATCTGGATAATGTTTGTGAATGGTTT

	AAAGCCGGTGTTCTGGCAGTTGGTGTTGGTAGTGCCCTGGTGAAAGGTACACCGGTTGAAGTTGCAG AAAAAGCAAAAGCCTTTGTGGAAAAAATTCGTGGTTGTACCGAAGGTAGCGGTAGTGGTAGCGGTTC AGGTAGCCATCACCATCACCATCACTGA **[配列番号 68]**
FimHΔ GG_P GDGN_ DG_mi3	ATGTTCGCCTGCAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGT TAATCTGGCACCGGTTGTTAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCCA TAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCT GAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACAC CGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTGAGC AGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAA CTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCTGT GATGTTAGCGCACGTGATGTTACCGTTACACTGCCGGATTATCCTGGTAGCGTTCCGATTCCGCTGACC GTTTATTGTGCAAAAAGCCAGAACCTGGGTTATTATCTGAGCGGCACCACCGCAGATGCAGGTAATAG CATTTTTACCAATACCGCAAGCTTTAGTCCGGCACAAGGTGTTGGTGTTCAGCTGACCCGTAATGGCAC CATTATTCCGGCAAATAATACCGTTAGCCTGGGTGCAGTTGGCACCAGCGCAGTGAGCCTGGGTCTGA CCGCCAATTATGCACGTACCGGTGGTCAGGTTACCGCAGGTAATGTTCAGAGCATTATTGGTGTTACCT TTGTGTATCAGCCTGGTGATGGTAATGCAGATGTGACCATTACCGTGAATGGTAAAGTTGTTGCAAAA GGTAGCGGTGGTGGTGGCATGAAAATGGAAGAACTGTTCAAAAAACACAAGATTGTTGCCGTTCTGC GTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCAAAAAAGAAAGCACTGGCCGTTTTTTTAGGTGGTGTGCATCTGATT GAAATCACCTTTACCGTTCCGGATGCAGATACCGTTATTAAAGAACTGAGCTTTCTGAAAGAAATGGG TGCAATTATTGGCGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAGGCACGTAAAGCAGTTGAAAGCGGTGCA GAATTTATTGTTAGTCCGCATCTGGATGAAGAAATTAGCCAGTTTGCAAAAGAAAAGGGCGTGTTTTA TATGCCTGGTGTTATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAAACTGGGTCATACCATCCTGAAAC TGTTTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGTGAAAGCCATGAAAGGTCCTTTTCCGAACGTTAAAT TTGTGCCGACCGGTGGCGTGAATCTGGATAATGTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGTTCTGGCAGTT GGTGTTGGTAGTGCCCTGGTGAAAGGTACACCGGTTGAAGTTGCAGAAAAAGCAAAAGCCTTTGTGG AAAAAATTCGTGGTTGTACCGAAGGTAGTGGTAGCGGCAGCGGTAGCGGTTCACATCACCATCACCAT CACTGA **[配列番号 69]**
FimHL- GSG4- フェリチン	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACGAACTGTACTTCCAGGGCTTTGCATGTAAAACCGCAAAT GGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGCAGTTAATGT TGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCCATAATGATTATCCGGAAACCATCAC CGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCTGAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGA AATATAACGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTTGTGTATAATAGCCGT ACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGCAGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAA AGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTT TGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTAGCGGTGGTGGTGGCGATATTA TCAAACTGCTGAATGAACAGGTGAACAAAGAAATGAATAGCAGCAACCTGTATATGAGCATGAGCAG CTGGTGTTATACCCATAGCCTGGATGGTGCAGGTCTGTTTCTGTTTGATCATGCAGCCGAAGAATATGA GCACGCAAAAAAACTGATCATCTTCCTGAATGAAAATAATGTTCCGGTGCAGCTGACCAGCATTAGCG CTCCGGAACATAAATTTGAAGGTCTGACACAGATTTTTCAGAAAGCCTATGAACATGAACAGCACATT AGCGAAAGCATTAACAACATTGTGGATCACGCCATCAAAAGCAAAGATCATGCAACCTTTAACTTTCTG CAGTGGTATGTTGCAGAACAGCATGAAGAAGAAGTGCTGTTTAAAGACATCCTGGATAAAATTGAACT GATCGGCAATGAAAATCACGGTCTGTATCTGGCAGATCAGTATGTTAAAGGTATTGCCAAAAGCCGCA AATAA **[配列番号 70]**

pelBLS-FimHL-mI3	ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCCGGCGATGGCCTTT GCATGTAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCT GGCACCGGTTGTTAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCCATAATGA TTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCTGAGCA ATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGT GTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTGAGCAGTGC CGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAACTATA ACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTG GTTCAGGTATGAAAATGGAAGAACTGTTCAAAAAGCACAAGATTGTTGCCGTTCTGCGTGCAAATAGC GTTGAAGAAGCAAAAAAGAAAGCACTGGCCGTTTTTTTAGGTGGTGTGCATCTGATTGAAATCACCTT TACCGTTCCGGATGCAGATACCGTTATTAAAGAACTGAGCTTTCTGAAAGAAATGGGTGCAATTATTG GCGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAGGCACGTAAAGCAGTTGAAAGCGGTGCAGAATTTATTGT TAGTCCGCATCTGGATGAAGAAATTAGCCAGTTTGCAAAAGAAAAGGGCGTGTTTTATATGCCTGGTG TTATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAAACTGGGTCATACCATCCTGAAACTGTTTCCGGGT GAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGTGAAAGCCATGAAAGGTCCTTTTCCGAACGTTAAATTTGTGCCGAC AGGTGGCGTGAATCTGGATAATGTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGTTCTGGCAGTTGGTGTTGGTA GTGCCCTGGTGAAAGGTACACCGGTTGAAGTTGCAGAAAAAGCAAAAGCCTTTGTGGAAAAAATTCG TGGTTGTACCGAAGGTAGTGGTAGCGGTTCAGGTAGCCACCACCACCACCACTGA **[配列番号 71]**
FimH_DG_フェリチン(GSGGGG)	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACGAACTGTACTTCCAGGGCTTTGCATGTAAAACCGCAAAT GGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGCAGTTAATGT TGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCCATAATGATTATCCGGAAACCATCAC CGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCTGAGCAGCTTTAGCGGCACCGTGA AATATAACGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTTGTGTATAATAGCCGT ACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTTAGCAGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAA AGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTT TGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTTGTGATGTTAGCGCACGTG ATGTTACCGTTACACTGCCGGATTATCCTGGTAGCGTTCCGATTCCGCTGACCGTTTATTGTGCAAAAA GCCAGAACCTGGGTTATTATCTGAGCGGCACCACCGCAGATGCAGGTAATAGCATTTTTACCAATACC GCAAGCTTTAGTCCGGCACAAGGTGTTGGTGTTCAGCTGACCCGTAATGGCACCATTATTCCGGCAAA TAATACCGTTAGCCTGGGTGCAGTTGGCACCAGCGCAGTGAGCCTGGGTCTGACCGCCAATTATGCAC GTACCGGTGGTCAGGTTACCGCAGGTAATGTTCAGAGCATTATTGGTGTTACCTTTGTGTATCAGCCTG GTGATGGTAATGCAGATGTGACCATTACCGTGAATGGTAAAGTTGTTGCAAAAGGTAGCGGTGGTGG TGGCGATATTATCAAACTGCTGAATGAACAGGTGAACAAAGAAATGAATAGCAGCAACCTGTATATGA GCATGAGCAGCTGGTGTTATACCCATAGCCTGGATGGTGCAGGTCTGTTTCTGTTTGATCATGCAGCC GAAGAATATGAGCACGCAAAAAAACTGATCATCTTCCTGAATGAAAATAATGTTCCGGTGCAGCTGAC CAGCATTAGCGCTCCGGAACATAAATTTGAAGGTCTGACACAGATTTTTCAGAAAGCCTATGAACATG AACAGCACATTAGCGAAAGCATTAACAACATTGTGGATCACGCCATCAAAAGCAAAGATCATGCAACC TTTAACTTTCTGCAGTGGTATGTTGCAGAACAGCATGAAGAAGAAGTGCTGTTTAAAGACATCCTGGA TAAAATTGAACTGATCGGCAATGAAAATCACGGTCTGTATCTGGCAGATCAGTATGTTAAAGGTATTG CCAAAAGCCGCAAATAA **[配列番号 72]**
FimHL-C-C-MI3	ATGTTCGCCTGCAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGT TAATCTGGCACCGGTTTGTAATGTTGGTCAGAATTGTGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCCA TAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCT

	GAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACAC CGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTGAGC AGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAA CTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGT GGTGGTGGCAGTGGTGGTTCAGGCGGTAGCGGTGGTAGCATGAAAATGGAAGAACTGTTCAAAAAG CACAAAATTGTTGCCGTTCTGCGTGCAAATAGCGTTGAAGAAGCAAAAAAGAAAGCACTGGCCGTTTT TTTAGGTGGTGTGCATCTGATTGAAATCACCTTTACCGTTCCGGATGCAGATACCGTTATTAAAGAACT GAGCTTTCTGAAAGAAATGGGTGCAATTATTGGTGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAGGCACGT AAAGCAGTTGAAAGCGGTGCAGAATTTATTGTTAGTCCGCATCTGGATGAAGAAATTAGCCAGTTTGC AAAAGAAAAGGGCGTGTTTTATATGCCTGGTGTTATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAAAC TGGGTCATACCATCCTGAAACTGTTTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGTGAAAGCCATGAAA GGTCCTTTTCCGAACGTTAAATTTGTGCCGACAGGTGGCGTGAATCTGGATAATGTTTGTGAATGGTTT AAAGCCGGTGTTCTGGCAGTTGGTGTTGGTAGTGCCCTGGTGAAAGGTACACCGGTTGAAGTTGCAG AAAAAGCAAAAGCCTTTGTGGAAAAAATTCGTGGTTGTACCGAAGGTAGCGGTAGTGGTAGCGGTTC AGGTAGCCATCACCATCACCATCACTGA **[配列番号 73]**
FimHL-C-C-qβ	ATGTTCGCCTGCAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGT TAATCTGGCACCGGTTTGTAATGTTGGTCAGAATTGTGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCCA TAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCT GAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACAC CGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTGAGC AGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAA CTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGT GGTGGTGGCAGTGGTGGTTCAGGCGGTAGCGGTGGCAGCGCCAAACTGGAAACCGTTACACTGGGT AATATTGGTAAAGATGGTAAACAGACCCTGGTTCTGAATCCGCGTGGTGTTAATCCGACCAATGGTGT TGCCAGCCTGAGCCAGGCAGGCGCAGTTCCGGCACTGGAAAAACGTGTTACCGTTAGCGTTAGCCAG CCGAGCCGTAATCGTAAAAACTATAAAGTTCAGGTGAAAATCCAGAATCCGACCGCATGTACCGCCAA TGGTAGCTGTGATCCGAGCGTTACCCGTCAGGCATATGCAGATGTTACCTTTAGTTTTACCCAGTATAG CACCGATGAAGAACGTGCATTTGTTCGTACCGAACTGGCAGCACTGCTGGCAAGTCCGCTGCTGATTG ATGCAATTGATCAGCTGA **[配列番号 74]**
HBcAgNC_fimHLsplitted	ATGGATATCGATCCGTATAAAGAATTTGGTGCAAGCGTTGAACTGCTGAGCTTTCTGCCGAGCGATTTT TTTCCGAGCATTCGTGATCTGCTGGATACCGCAAGCGCACTGTATCGTGAAGCACTGGAAAGTCCGGA ACATTGTAGTCCGCATCATACCGCACTGCGTCAGGCAATTCTGTGTTGGGGTGAACTGATGAATCTGG CAACCTGGGTTGGTAGCAATCTGGAAGATCCGTAGAAGGAGATATACATATGTTTGCATGTAAAACCG CAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGTTAATCTGGCACCGGTTGTT AATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCCATAATGATTATCCGGAAACC ATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCTGAGCAATTTTAGCGGCACC GTGAAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACACCGCGTGTTGTGTATAATAG CCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCGCTGTATCTGACACCGGTGAGCAGTGCCGGTGGTGTTGCAA TTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAACTATAACTCCGATGATTTTC AGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGTGGTGGTTCAGGTGCCAGC CGTGAACTGGTTGTTAGCTATGTTAATGTGAATATGGGCCTGAAAATTCGTCAGCTGCTGTGGTTTCAT ATTTCATGTCTGACCTTTGGTCGTGAAACCGTTCTGGAATATCTGGTTAGCTTTGGTGTTTGGATTCGTA CCCCTCCGGCATATCGTCCGCCTAATGCACCGATTCTGAGTACCCTGCCGGAAACAACCGTTGTTTGAG GATCC **[配列番号 75]**

HBcAgNC_fimHL-LS	ATGAAATATCTGCTGCCGACCGCAGCAGCGGGTCTGCTGCTGCTGGCAGCACAGCCTGCAATGGCAG GTCATCATCACCATCATCATAGCGGTGGTATGGATATTGATCCGTATAAAGAATTTGGTGCCAGCGTTG AACTGCTGAGCTTTCTGCCGAGCGATTTTTTTCCGAGCATTCGTGATCTGCTGGATACCGCAAGCGCAC TGTATCGTGAAGCACTGGAAAGTCCGGAACATTGTAGTCCGCATCATACCGCACTGCGTCAGGCAATT CTGTGTTGGGGTGAACTGATGAATCTGGCAACCTGGGTTGGTAGCAATCTGGAAGATCCGTAGAAGG AGATATACATATGAAATACCTGTTACCGACAGCCGCAGCAGGCCTGTTACTGTTAGCAGCCCAGCCAG CCATGGCATTTGCATGTAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTT TATGTTAATCTGGCACCGGTTGTTAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTT TGCCATAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGT GTTCTGAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGA AACACCGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCGCTGTATCTGACACCGG TGAGCAGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACC AATAACTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGA CCGGTGGTGGTTCAGGTGCAAGCCGTGAACTGGTTGTTAGCTATGTTAATGTGAATATGGGCCTGAAA ATTCGTCAGCTGCTGTGGTTTCATATTTCATGTCTGACCTTTGGTCGTGAAACCGTTCTGGAATATCTGG TTAGCTTTGGTGTTTGGATTCGTACCCCTCCGGCATATCGTCCGCCTAATGCACCGATTCTGAGTACCCT GCCGGAAACAACCGTTGTTTGACTCGAG **[配列番号 76]**
FIMHL-MI3	ATGTTCGCCTGCAAAACCGCAAATGGCACCGCAATTCCGATTGGTGGTGGTAGCGCAAATGTTTATGT TAATCTGGCACCGGTTGTTAATGTTGGTCAGAATCTGGTTGTTGATCTGAGCACCCAGATTTTTTGCCA TAATGATTATCCGGAAACCATCACCGATTATGTTACCCTGCAGCGTGGTAGTGCATATGGTGGTGTTCT GAGCAATTTTAGCGGCACCGTGAAATATAGCGGTAGCAGCTATCCGTTTCCGACCACCAGTGAAACAC CGCGTGTTGTGTATAATAGCCGTACCGATAAACCGTGGCCTGTTGCACTGTATCTGACACCGGTGAGC AGTGCCGGTGGTGTTGCAATTAAAGCAGGTAGCCTGATTGCAGTTCTGATTCTGCGTCAGACCAATAA CTATAACTCCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAACATCTATGCCAATAATGATGTTGTTGTTCCGACCGGT AGCGGTGGTGGTGGCATGAAAATGGAAGAACTGTTCAAAAAACACAAGATTGTTGCCGTTCTGCGTG CAAATAGCGTTGAAGAAGCAAAAAAGAAAGCACTGGCCGTTTTTTTAGGTGGTGTGCATCTGATTGAA ATCACCTTTACCGTTCCGGATGCAGATACCGTTATTAAAGAACTGAGCTTTCTGAAAGAAATGGGTGC AATTATTGGCGCAGGCACCGTTACCAGCGTTGAACAGGCACGTAAAGCAGTTGAAAGCGGTGCAGAA TTTATTGTTAGTCCGCATCTGGATGAAGAAATTAGCCAGTTTGCAAAAGAAAAGGGCGTGTTTTATAT GCCTGGTGTTATGACCCCGACCGAACTGGTTAAAGCAATGAAACTGGGTCATACCATCCTGAAACTGT TTCCGGGTGAAGTTGTTGGTCCGCAGTTTGTGAAAGCCATGAAAGGTCCTTTTCCGAACGTTAAATTTG TGCCGACCGGTGGCGTGAATCTGGATAATGTTTGTGAATGGTTTAAAGCCGGTGTTCTGGCAGTTGGT GTTGGTAGTGCCCTGGTGAAAGGTACACCGGTTGAAGTTGCAGAAAAAGCAAAAGCCTTTGTGGAAA AAATTCGTGGTTGTACCGAAGGTAGTGGTAGCGGCAGCGGTAGCGGTTCACATCACCATCACCATCAC TGA **[配列番号 77]**
FimH_DNKQ_DG_deglyc	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACAGGGGATGCCGC TCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAAAGCTGGCCCTGTTTGCCTGTAAAACCGCCAGCGGCACA GCCATTCCTATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCA GAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACT ACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCGATTTTTCCGGCACAGTGAAGTA CAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACC GACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGC CGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCG TGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGA

	TGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTC TCAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACACCG CCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCAGAGATGGCACAATCATCCCCGCCGAC AATACCGTGTCTCTGGGCGCTGTTGGCACATCTGCAGTTTCTCTGGGCCTGACCGCCAACTATGCCAGA ACAGGTGGACAAGTGACCGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACATTCGTGTATCAGGACA ACAAGCAGGCCGACGTGACCATCACCGTGAATGGCAAAGTGGTGGCCAAAGGCTCTGGCCATCACCA CCACCATCACTG **[配列番号 90]**
FimH_P GDGN_ DG	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAGGATCTACAGGGGATGCCG CTCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAAAGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACA GCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCA GAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACT ACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTAC AGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACCG ACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCC GGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCGT GTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGAT GTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCT CAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACACCGC CAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACA ATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCAACTATGCCAGA ACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACATTCGTGTATCAGGACA ACAAGCAGGCCGACGTGACCATCACCGTGAATGGCAAAGTGGTGGCCAAAGGCTCTGGCCAT **[配列番号 91]**
FimH_D NKQ_D G	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAGGATCTACAGGGGATGCCG CTCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAAAGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACA GCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCA GAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACT ACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTAC AGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACCG ACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCC GGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCGT GTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGATGTGATGTGTCCGCCAGAGAT GTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCT CAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACACCGC CAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACA ATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCAACTATGCCAGA ACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACCTTCGTGTATCAGCCTG GCGACGGAAATGCCGACGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAAGGCTCTGGACACCA CCACCATCACCACTG **[配列番号 92]**
FimH_ ΔGG_ PGDGN _DG	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAGGATCTACAGGGGATGCCG CTCAACCTGCTCGGAGAGCCAGAAGAACAAAGCTGGCCCTGTTTGCCTGCAAGACCGCCAATGGCACA GCCATTCCTATTGGCGGCGGAAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCA GAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGACT ACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGTAC

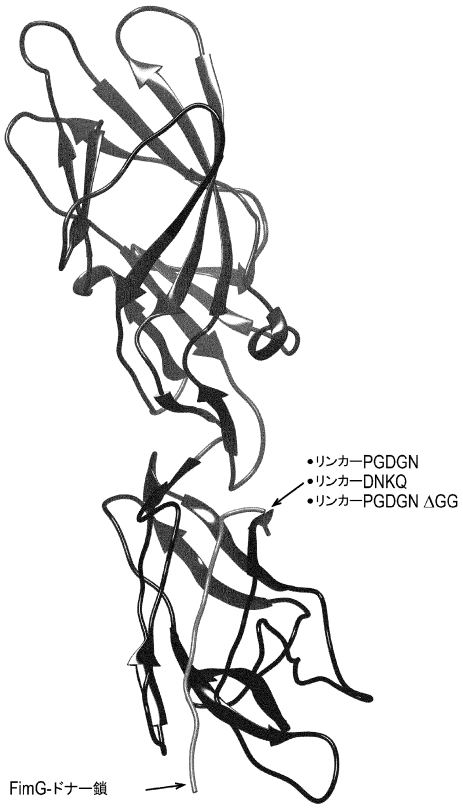
	AGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACCG ACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCC GGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCGT GTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCCACCTGTGATGTGTCCGCTAGAGATGTGACA GTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGTGTACTGCGCCAAGTCTCAGAAC CTGGGCTACTACCTGAGCGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTT CAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAACGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCG TGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACATCTGCTGTTTCTCTGGGCCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGC GGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACG GAAATGCCGACGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCAAAGGCTCTGGACACCACCACCA TCACCACTG **[配列番号 93]**
FimH_DGG_sl	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAGGCTCTACAGGCGATTTTGC CTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTG GCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGA CTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGC AATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAG AGTGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTG CCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTAC AACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCCACCTGTGA TGTGTCCGCTAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCTGACCGT GTACTGCGCCAAGAGCCAGAACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGCAACAGC ATCTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAACGGAAC AATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACATCTGCTGTTTCTCTGGGCCTGAC CGCCAATTATGCCAGAACAGGCGGACAAGTGACCGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGCGTGACC TTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGGTGGCCA AAGGCTCTGGACACCACCACCATCACCACTGA **[配列番号 94]**
FimH_PGDGN_sl	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAGGCTCTACAGGCGATTTTGC CTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTG GCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGA CTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGC AATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAG AGTGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTG CCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTAC AACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCG GATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTC TGACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGAACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGC AACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAA CGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTTTCTCTGGG CCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGG TGGCCAAAGGCTCTGGACACCACCACCATCACCACTGACTCGAG **[配列番号 95]**

FimH_DNKQ_sl	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTTTTGTGGGTGCCAGGCTCTACAGGCGATTTTGC CTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTGAACCTG GCTCCTGTGGTCAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGA CTACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGC AATTTTTCCGGCACAGTGAAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAG AGTGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTG CCGGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTAC AACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCG GATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTC TGACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGAACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGC AACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAA CGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTTTCTCTGGG CCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACATTCGTGTATCAGGACAACAAGCAGGCCGACGTGACCATCACCGTGAATGGCAAAGTGGTGG CCAAAGGCTCTGGCCATCACCACCACCATCACTGACTCGAG **[配列番号 96]**
FIMH_DG_PGDGN_536-MI3	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGCTCTACAGGCGATTTTGC CTGCAAGACCGCCAACGGCACAGCCATTCCTATTGGCGGAGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGG CTCCTGCCGTGAACGTGGGCCAGAATCTGGTGGTGGATCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGAC TACCCCGAGACAATCACCGACTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGTCTAG CTTTAGCGGCACCGTGAAGTACAACGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAG TGGTGTACAACAGCAGAACCGACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCC GGCGGAGTGGCCATTAAGGCCGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACA ACAGCGACGACTTCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGG ATGTGATGTGTCCGCCAGAGATGTGACAGTGACCCTGCCTGATTACCCCGGCTCTGTGCCTATTCCTCT GACCGTGTACTGCGCCAAGAGCCAGAACCTGGGCTACTACCTGTCTGGCACAACAGCCGATGCCGGC AACAGCATCTTTACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCTGCTCAAGGTGTTGGAGTGCAGCTGACCCGGAA CGGAACAATCATCCCCGCCAACAATACCGTGTCTCTGGGAGCTGTGGGCACCTCTGCTGTGTCTCTTGG CCTGACAGCCAACTATGCCAGAACAGGCGGACAAGTGACAGCCGGCAATGTGCAGTCTATCATCGGC GTGACCTTCGTGTATCAGCCTGGCGACGGAAACGCCGATGTGACCATCACAGTGAATGGCAAGGTGG TGGCCAAGAGCGGAAGCCACCACCATCATCACCATCACCACGGCGGCAGCATGAAGATGGAAGAACT GTTCAAGAAGCACAAGATCGTCGCCGTGCTGCGGGCCAATTCTGTGGAAGAGGCCAAAAAAAAGGCC CTGGCCGTGTTTCTTGGCGGAGTGCACCTGATCGAGATCACCTTTACCGTGCCTGACGCCGACACCGT GATCAAAGAGCTGAGCTTCCTGAAAGAGATGGGCGCCATCATCGGAGCCGGCACAGTGACATCTGTT GAGCAGGCCAGAAAGGCCGTGGAATCTGGCGCCGAGTTTATCGTGTCCCCTCACCTGGATGAGGAAA TCAGCCAGTTCGCCAAAGAAAAGGGCGTGTTCTACATGCCCGGCGTGATGACACCTACAGAGCTGGTC AAAGCCATGAAGCTGGGCCACACCATCCTGAAGCTGTTTCCAGGCGAAGTCGTGGGCCCTCAGTTCGT GAAAGCTATGAAGGGCCCATTTCCAAACGTGAAGTTCGTGCCCACTGGCGGCGTGAACCTGGATAAT GTGTGCGAGTGGTTCAAGGCTGGCGTGCTGGCTGTTGGAGTTGGCTCTGCTCTGGTCAAGGGCACAC CTGTGGAAGTGGCTGAGAAGGCCAAGGCCTTCGTGGAAAAGATCAGAGGCTGCACCGAGTGA **[配列番号 97]**
HBcFIMHLJ96	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGTTGCTCTGGGTTCCAGGATCTACCGGCGACGACAT CGACCCCTACAAAGAGTTTGGCGCCAGCGTCGAGCTGCTGAGCTTCCTGCCTAGCGACTTCTTCCCTTC CATCCGGGATCTGCTGGATACCGCTAGCGCCCTGTATAGAGAGGCCCTGGAAAGCCCTGAGCACTGCT CTCCACATCACACAGCCCTGAGACAGGCCATCCTGTGTTGGGGCGAACTGATGAATCTGGCCACCTGG

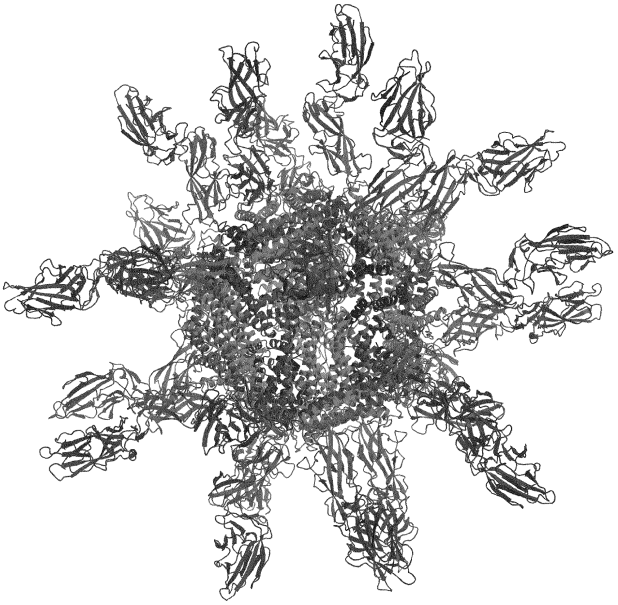
	GTCGGAAGCAACCTGGAAGATCCTGGTTCTGGCGGCGGAGGCTTTGCCTGTAAAACAGCCAATGGCA CCGCCATTCCTATCGGAGGCGGCAGCGCCAATGTGTACGTTAACCTGGCTCCTGTGGTCAACGTGGGC CAGAATCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTTTGCCACAACGACTACCCCGAGACAATCACCGA CTACGTGACACTGCAGAGAGGCTCTGCTTACGGCGGCGTGCTGAGCAATTTTTCCGGCACAGTGAAGT ACAGCGGCAGCAGCTACCCATTTCCTACCACCAGCGAGACACCCAGAGTGGTGTACAACAGCAGAACC GACAAGCCCTGGCCTGTGGCTCTGTACCTGACACCTGTTAGTTCTGCTGGCGGAGTGGCCATCAAGGC CGGATCTCTGATTGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACTTCCAGTTCG TGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCTACAGGCGGAGGATCTGGCGGAGCTTCTAG AGAACTGGTCGTGTCCTACGTGAACGTGAACATGGGCCTGAAGATCCGGCAGCTGCTCTGGTTTCACA TCAGCTGTCTGACCTTCGGCCGGGAAACCGTGCTGGAATACCTGGTGTCCTTCGGCGTGTGGATCAGA ACCCCTCCTGCCTATAGACCTCCTAACGCTCCCATCCTGAGCACACTGCCTGAGACAACAGTTGTTGGA AGCGGAGGCGGAGGCCACCACCATCACCATCAT **[配列番号 98]**
HBcFIM HDGJ96	ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGCAGCACCGGCGACGACA TCGACCCCTACAAGGAGTTCGGCGCCAGCGTGGAGCTGCTGAGCTTCCTGCCCAGCGACTTCTTCCCC AGCATCCGGGACCTGCTGGACACCGCCAGCGCCCTGTACCGGGAGGCCCTGGAGAGCCCCGAGCACT GCAGCCCCCACCACACCGCCCTGCGGCAGGCCATCCTGTGCTGGGGCGAGCTGATGAACCTGGCCAC CTGGGTGGGCAGCAACCTGGAGGACCCCGGCAGCGGCGGCGGCGGCTTCGCCTGCAAGACCGCCAA CGGCACCGCCATCCCCATCGGCGGCGGCAGCGCCAACGTGTACGTGAACCTGGCCCCCGTGGTGAAC GTGGGCCAGAACCTGGTGGTGGACCTGAGCACCCAGATCTTCTGCCACAACGACTACCCCGAGACCAT CACCGACTACGTGACCCTGCAGCGGGGCAGCGCCTACGGCGGCGTGCTGAGCAACTTCAGCGGCACC GTGAAGTACAGCGGCAGCAGCTACCCCTTCCCCACCACCAGCGAGACCCCCCGGGTGGTGTACAACA GCCGGACCGACAAGCCCTGGCCCGTGGCCCTGTACCTGACCCCCGTGAGCAGCGCCGGCGGCGTGGC CATCAAGGCCGGCAGCCTGATCGCCGTGCTGATCCTGCGGCAGACCAACAACTACAACAGCGACGACT TCCAGTTCGTGTGGAACATCTACGCCAACAACGACGTGGTGGTGCCCACCGGCGGCTGCGACGTGAG CGCCCGGGACGTGACCGTGACCCTGCCCGACTACCCCGGCAGCGTGCCCATCCCCCTGACCGTGTACT GCGCCAAGAGCCAGAACCTGGGCTACTACCTGAGCGGCACCACCGCCGACGCCGGCAACAGCATCTT CACCAACACCGCCAGCTTCAGCCCCGCCCAGGGCGTGGGCGTGCAGCTGACCCGGAACGGCACCATC ATCCCCGCCAACAACACCGTGAGCCTGGGCGCCGTGGGCACCAGCGCCGTGAGCCTGGGCCTGACCG CCAACTACGCCCGGACCGGCGGCCAGGTGACCGCCGGCAACGTGCAGAGCATCATCGGCGTGACCTT CGTGTACCAGCCCGGCGACGGCAACGCCGACGTGACCATCACCGTGAACGGCAAGGTGGTGGCCAA GGGCAGCGGCGGCGGCGGCGCCAGCCGGGAGCTGGTGGTGAGCTACGTGAACGTGAACATGGGCCT GAAGATCCGGCAGCTGCTGTGGTTCCACATCAGCTGCCTGACCTTCGGCCGGGAGACCGTGCTGGAG TACCTGGTGAGCTTCGGCGTGTGGATCCGGACCCCCCCCGCCTACCGGCCCCCCAACGCCCCCATCCTG AGCACCCTGCCCGAGACCACCGTGGTGGGCAGCGGCGGCGGCGGCCACCACCACCACCACCAC **[配列番号 99]**

【図面】

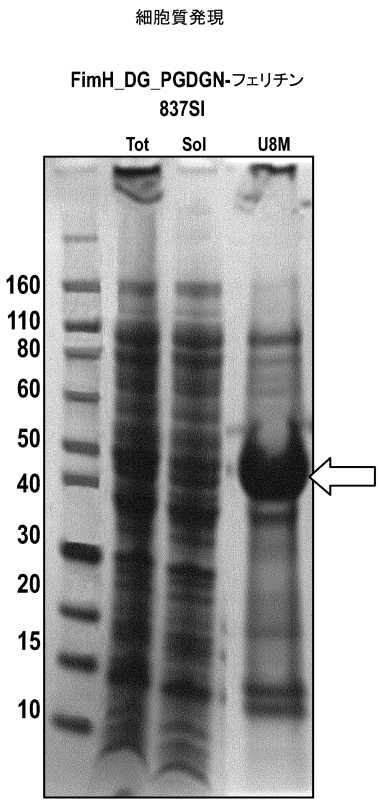
【図１Ａ】



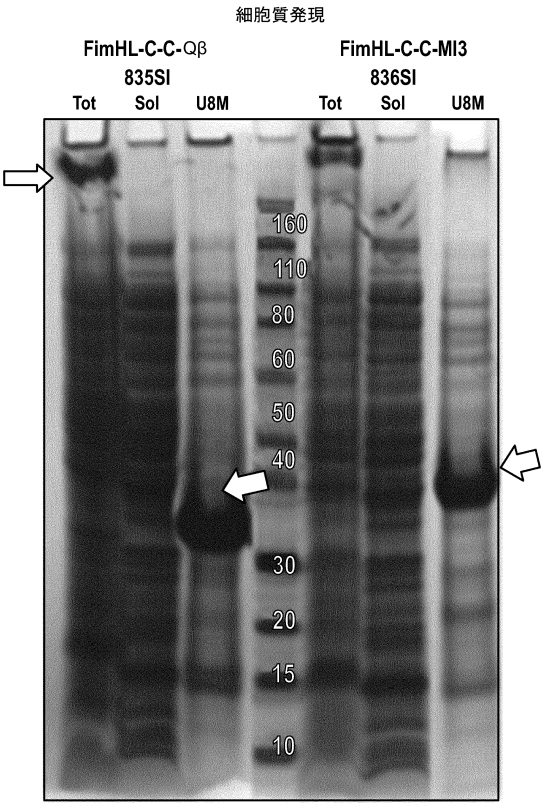
【図１Ｂ】



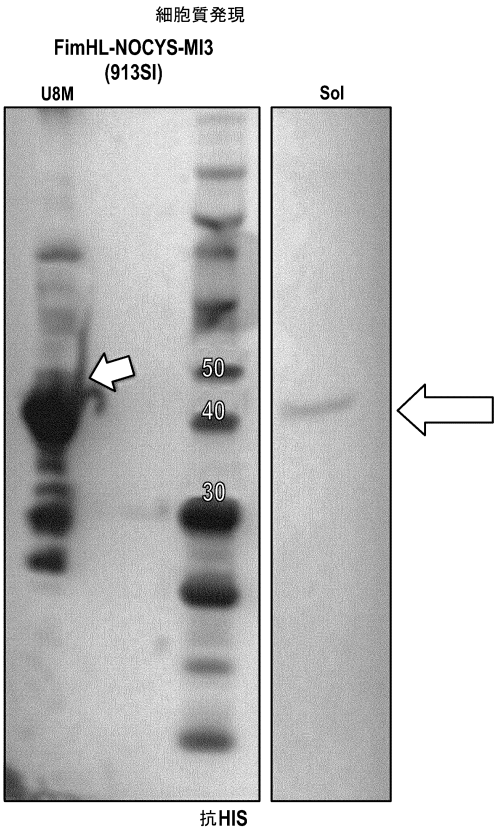
【図２Ａ－１】



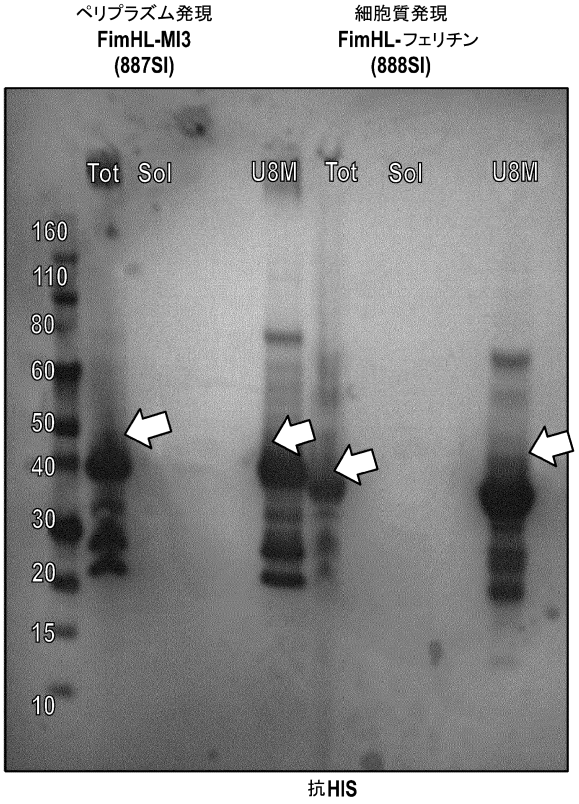
【図２Ａ－２】



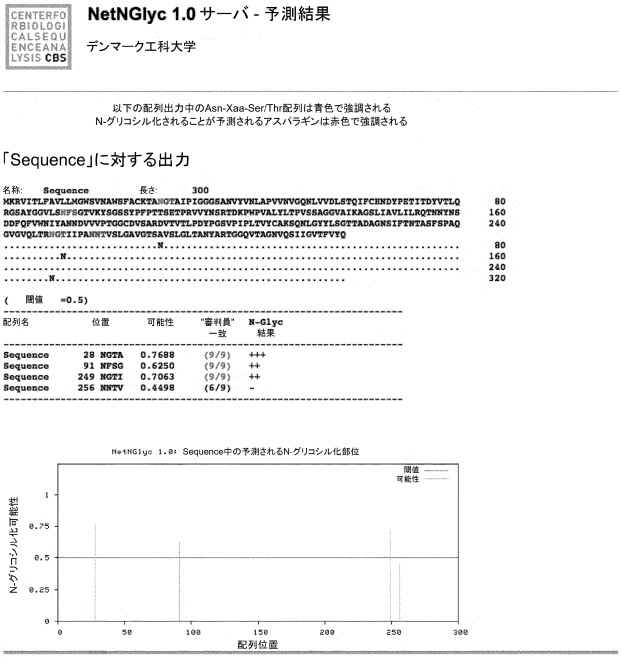
【図２Ａ－３】



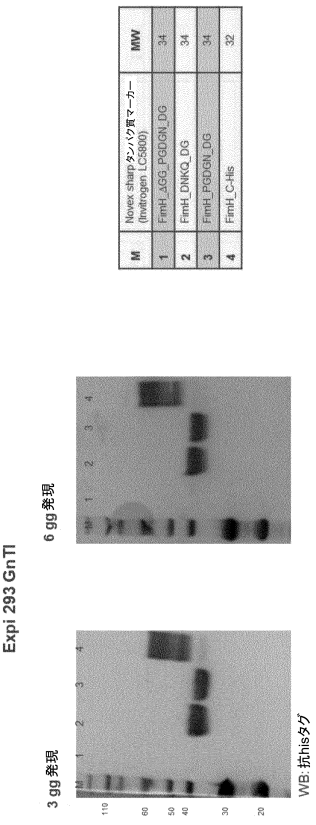
【図２Ｂ】



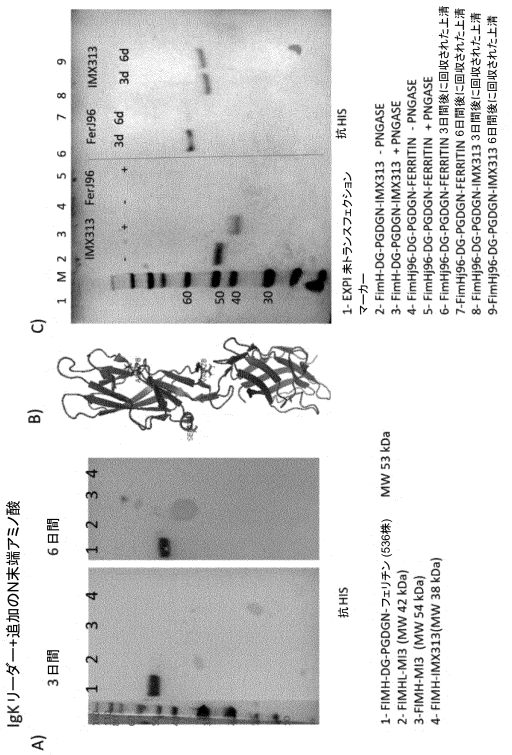
【図３】



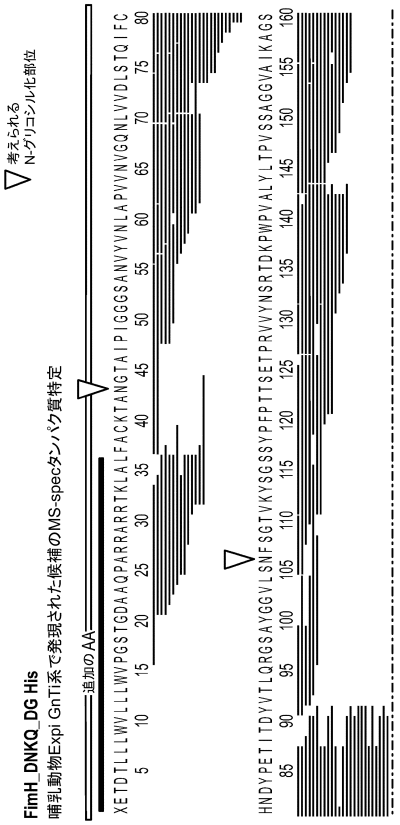
【図４】



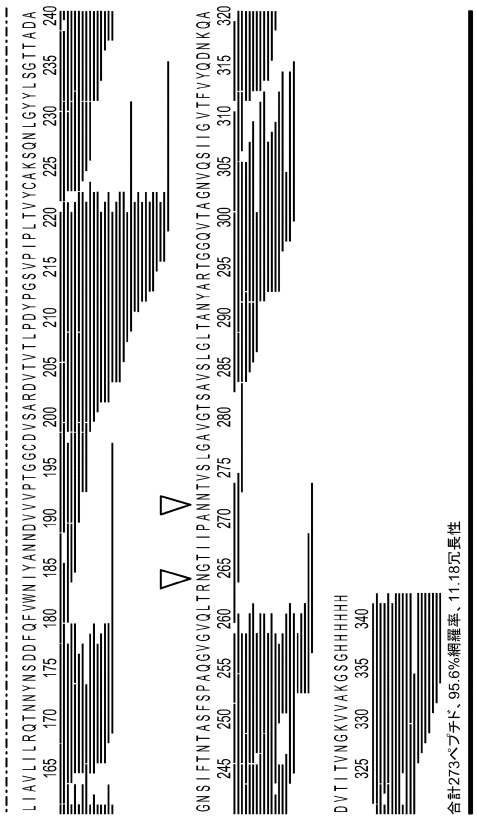
【図５】



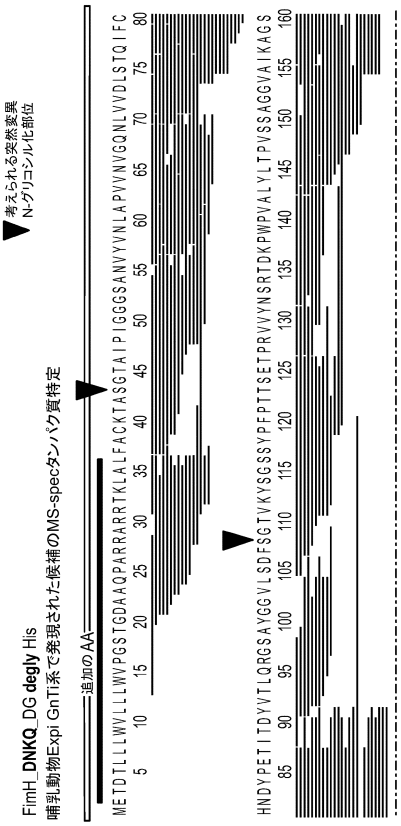
【図６－１】



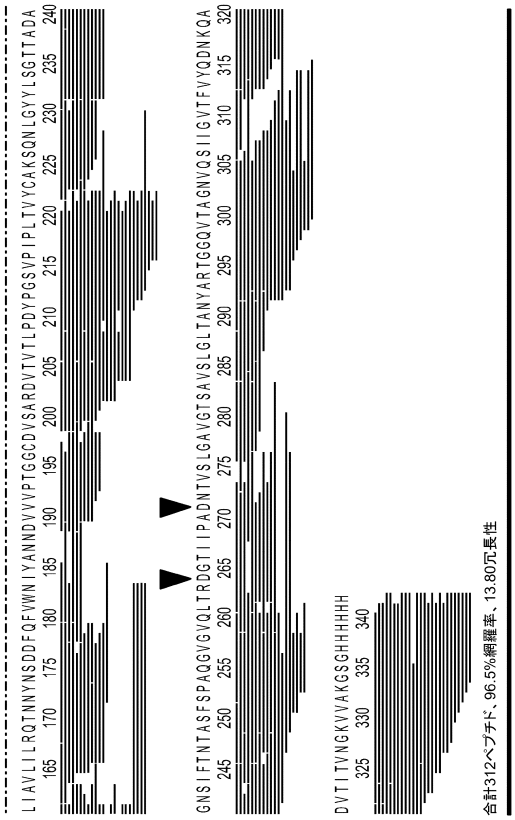
【図６－２】



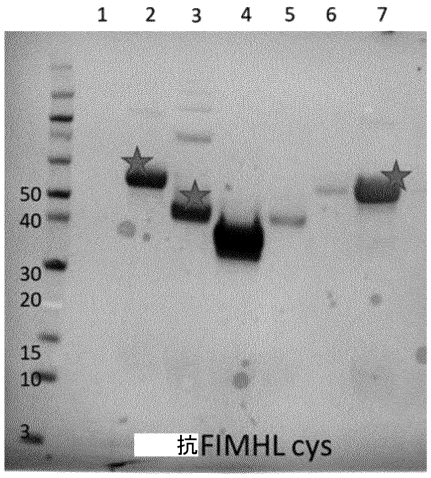
【図６－３】



【図６－４】

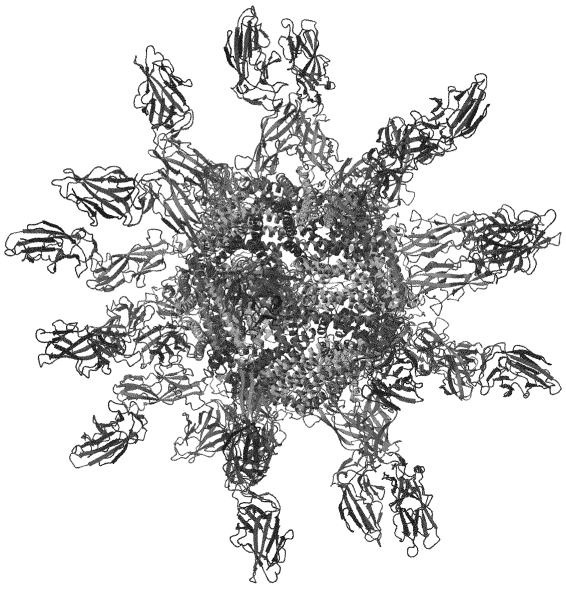


【図７】



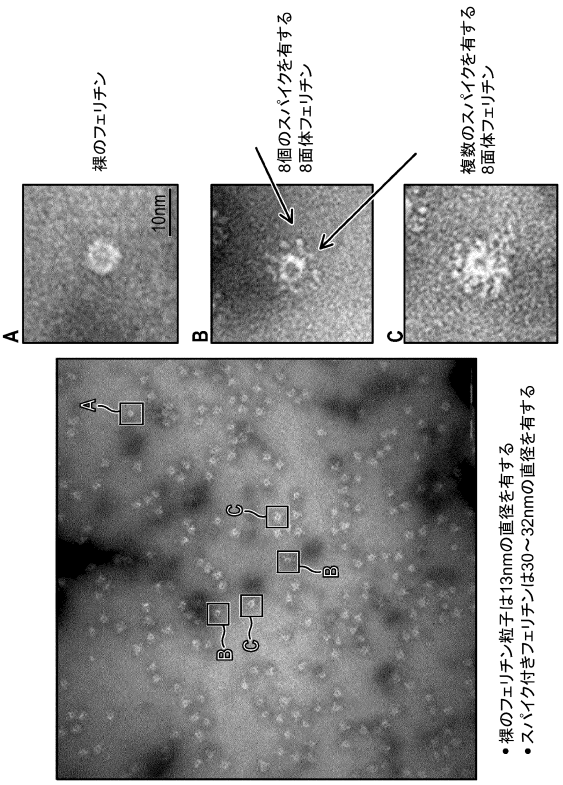
1- 未トランスフェクションGNTI細胞
2- 短リーダー FIMH_DG_PGDGN_フェリチン(j96) (1042SI)
3- 短リーダー FIMH_DG_PGDGN_IMX313(j96) (1043SI)
4- 短リーダー FIMH_DG_PGDGN (j96) (988SI)
5- 追加 AA FIMH_DG_PGDGN_IMX313 (j96) (993SI)
6- 追加 AAFIMH_DG_PGDGN_フェリチン(536) (995SI)
7- 短リーダー FIMH_DG_PGDGN_フェリチン(536) (1142SI)

【図８Ａ】

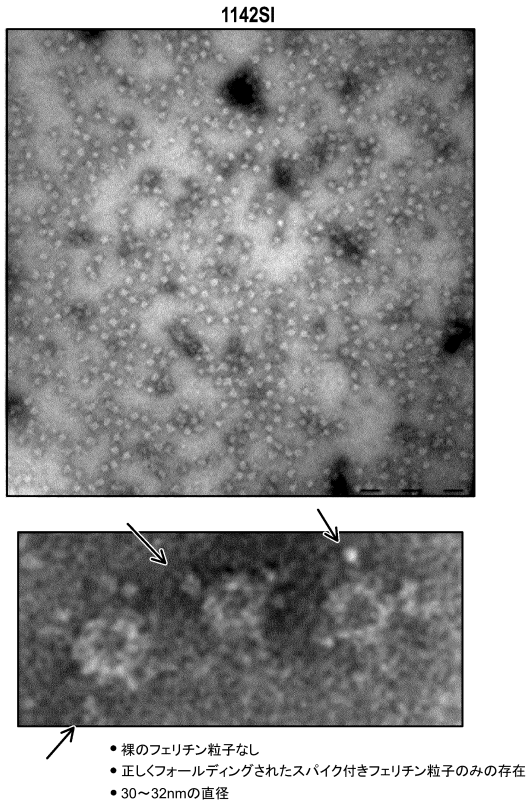


995SI

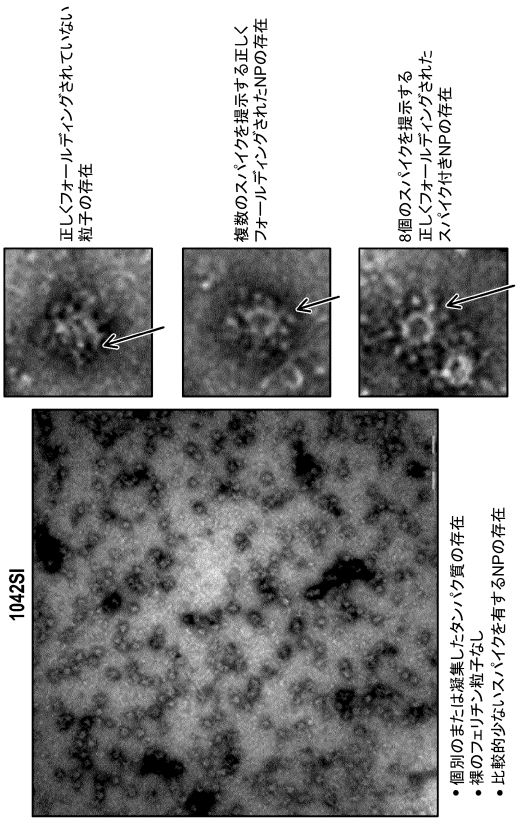
【図８Ｂ】



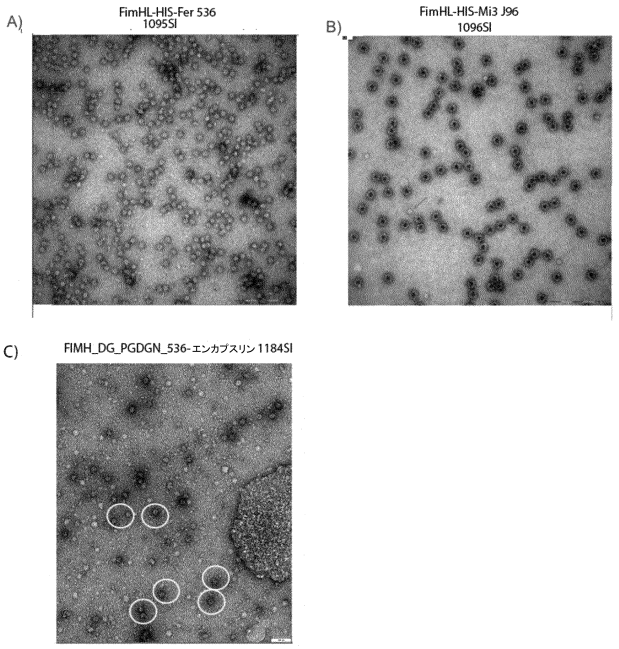
【図８Ｃ】



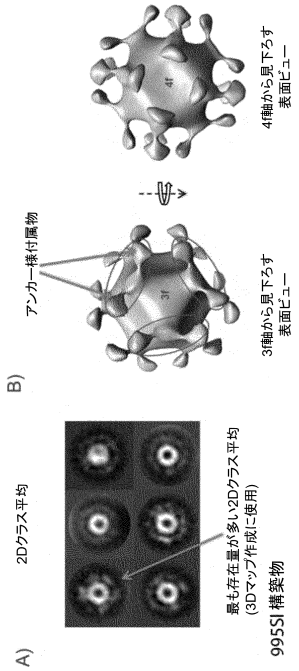
【図８Ｄ】



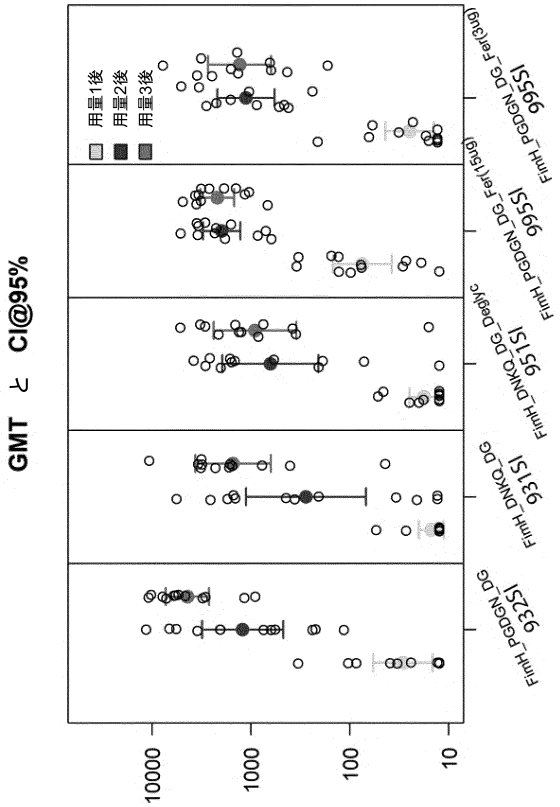
【図９】



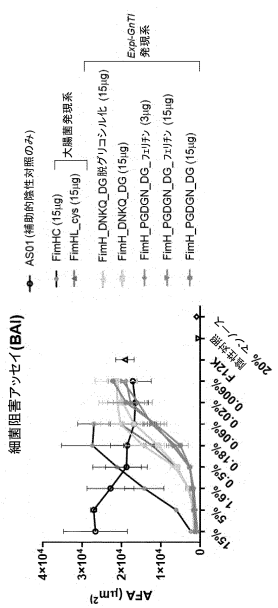
【図１０】



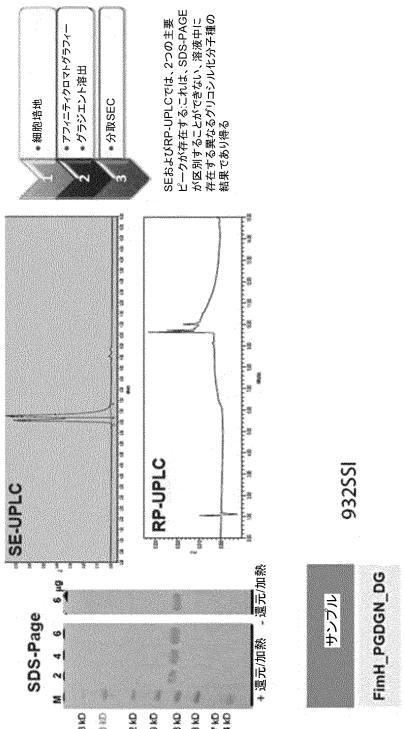
【図１１】



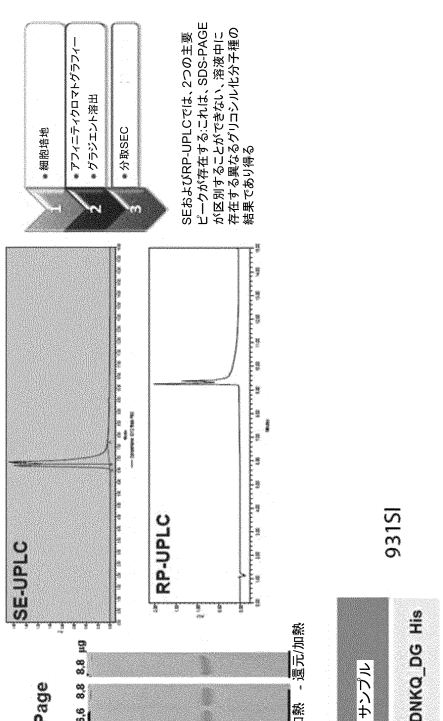
【図１２】



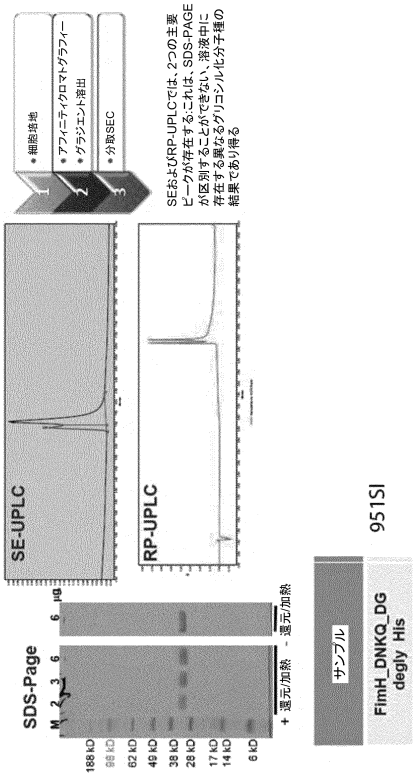
【図１３】



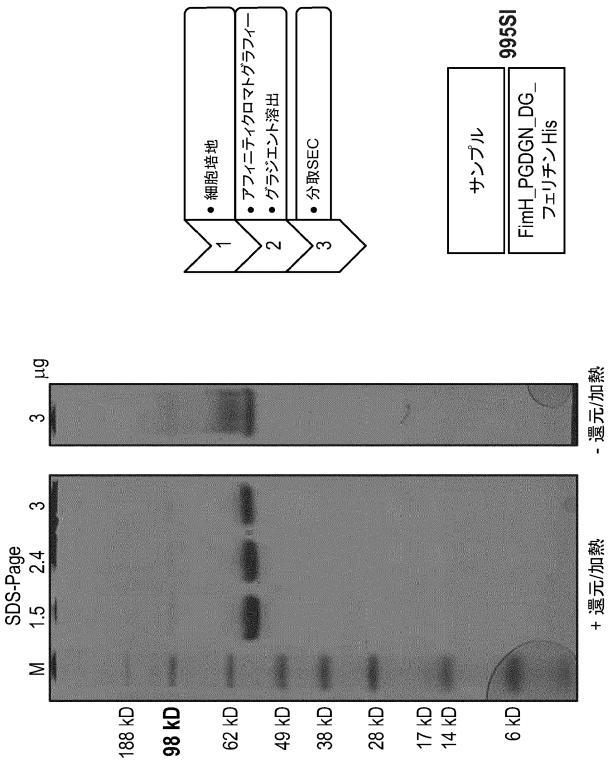
【図１４】



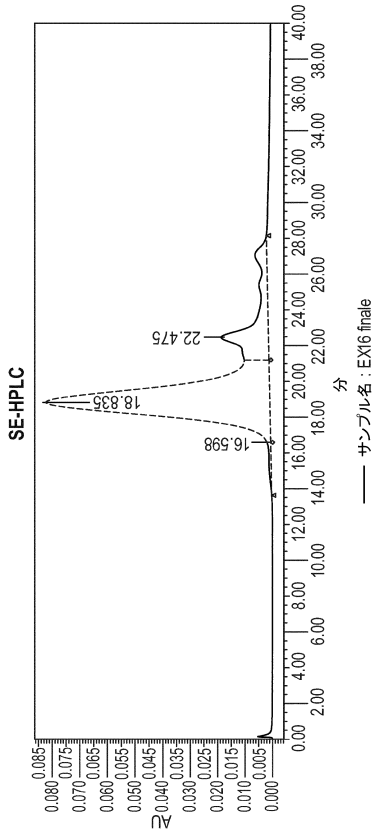
【図１５】



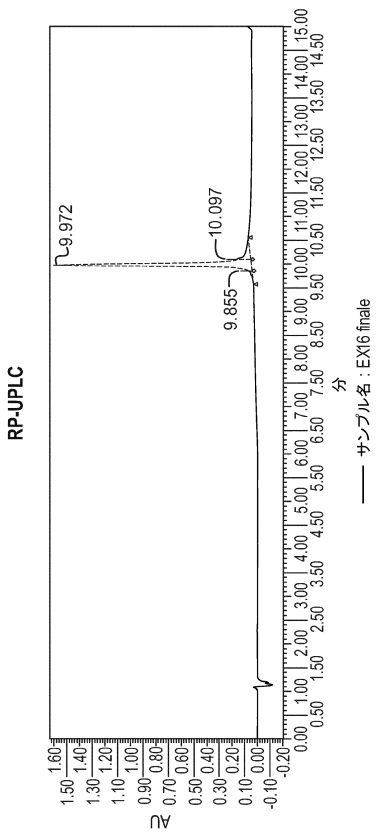
【図１６－１】



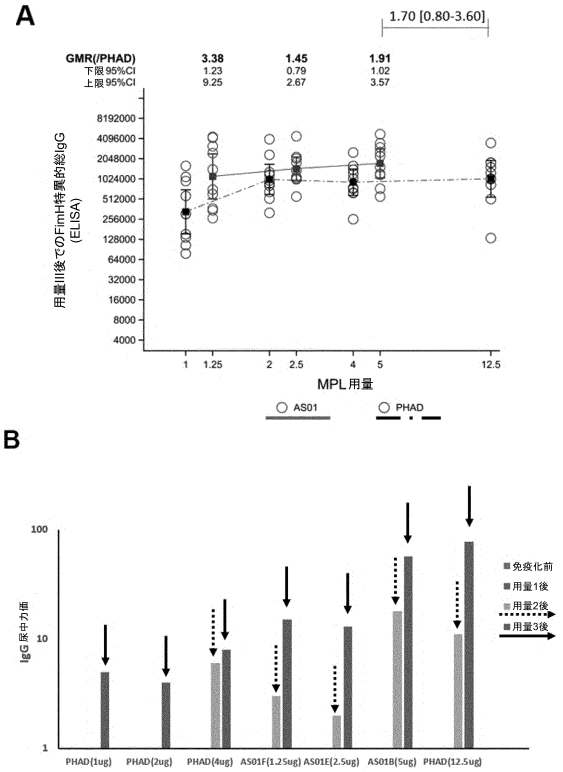
【図１６－２】



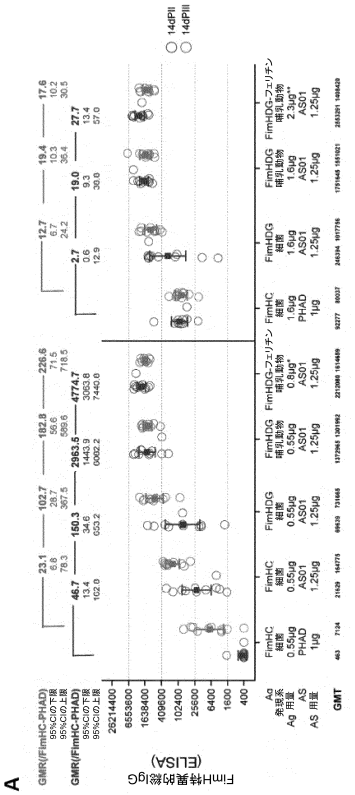
【図１６－３】



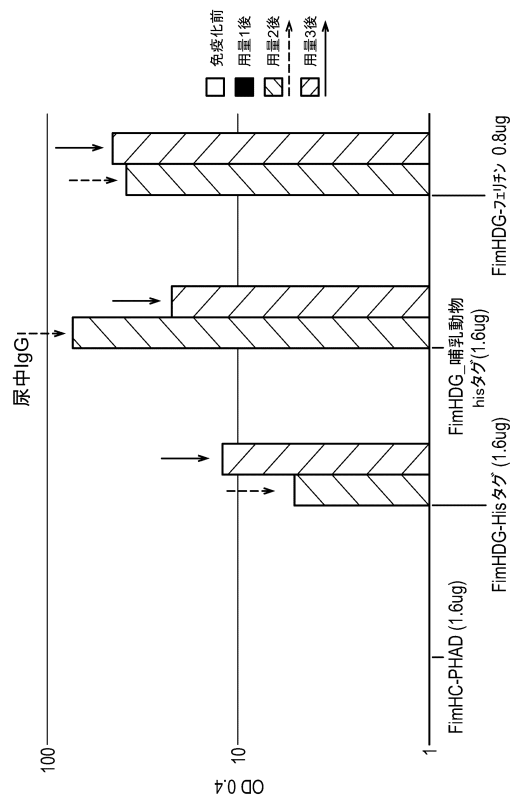
【図１７】



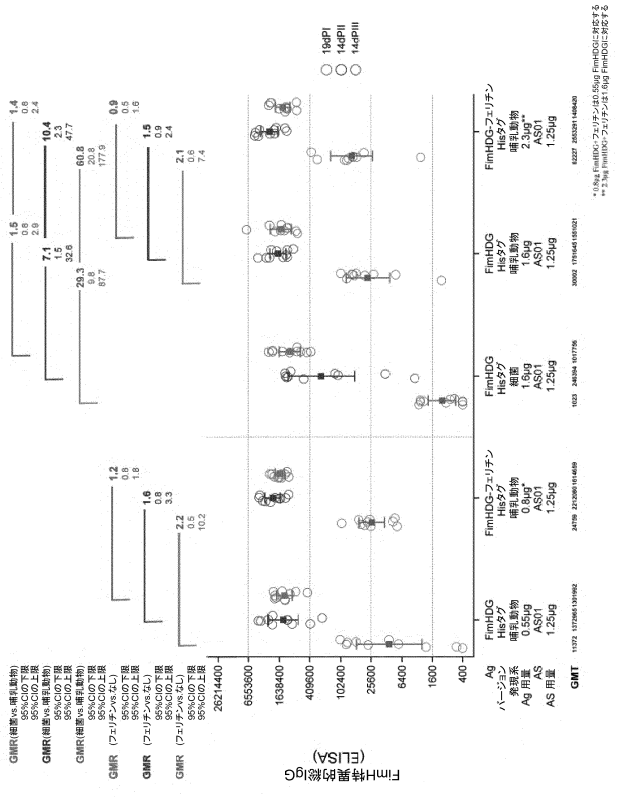
【図１８Ａ】



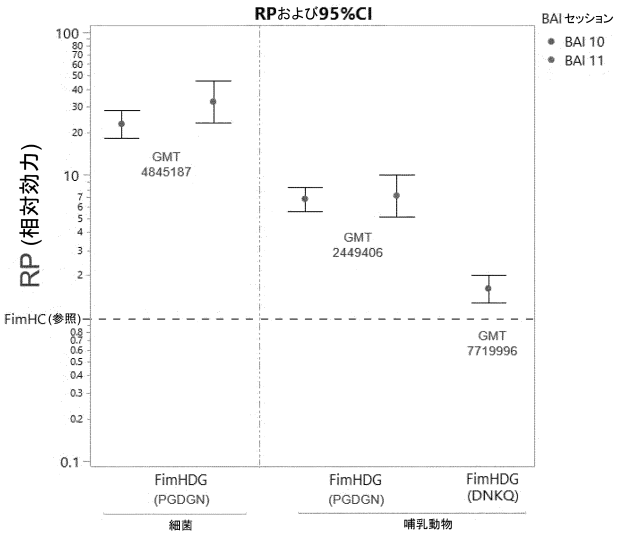
【図１８Ｂ】



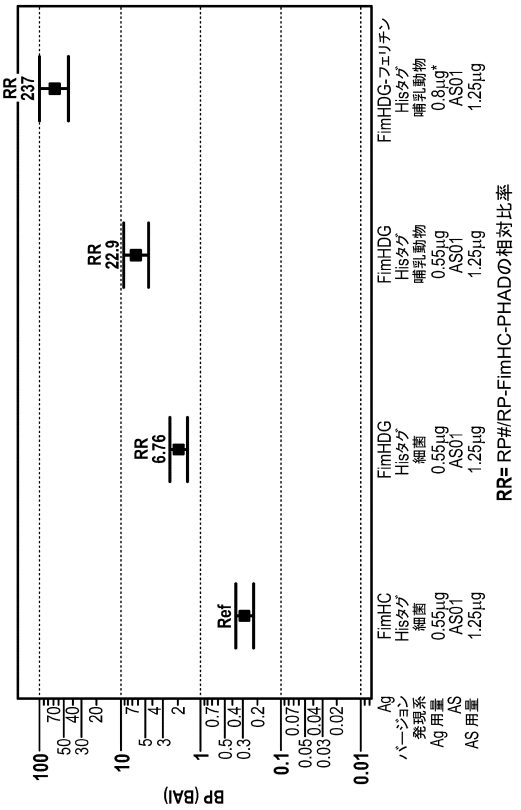
【図１９】



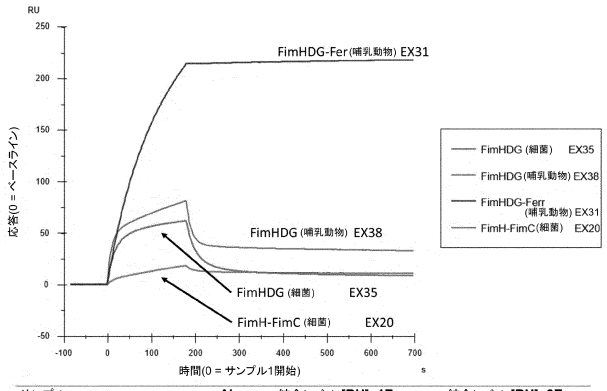
【図２０】



【図２１】

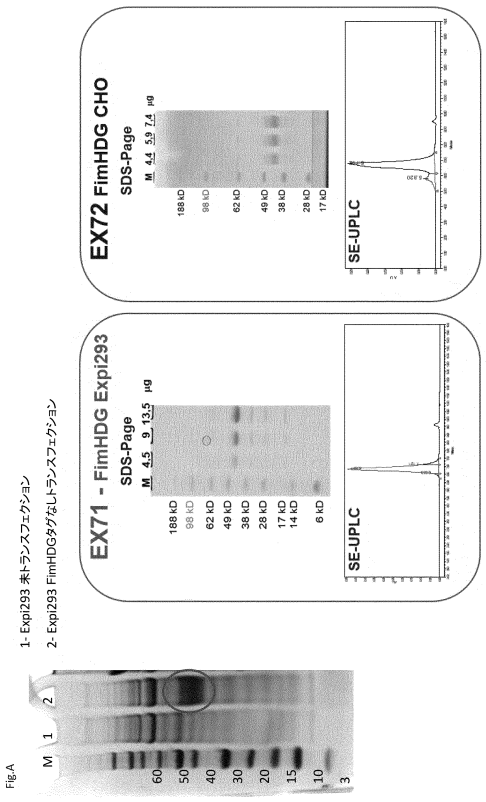


【図２２】

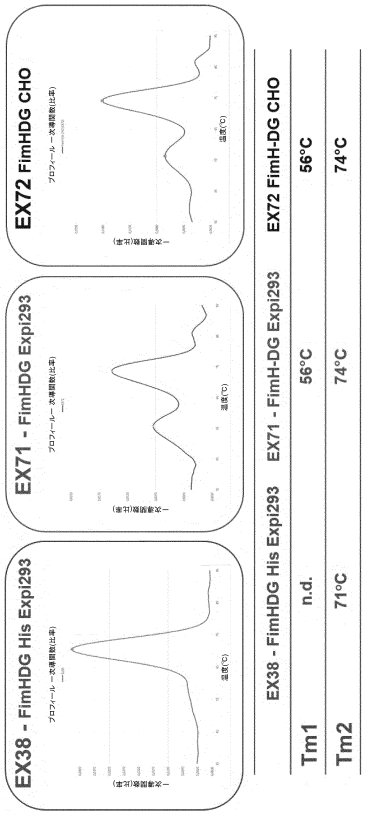


サンプル		mAb	結合レベル [RU]_1Exp	結合レベル [RU]_2Exp
FimH-FimC (細菌)	*EX20*	VK_926	21,4	18,0
FimH-DG (細菌)	*EX35*	VK_926	63,1	61,8
FimH-DG His(哺乳動物)	*EX38*	VK_926	81,8	80,3
FimHDG-Ferr(哺乳動物)	*EX31*	VK_926	200,2	211,0

【図２３Ａ】

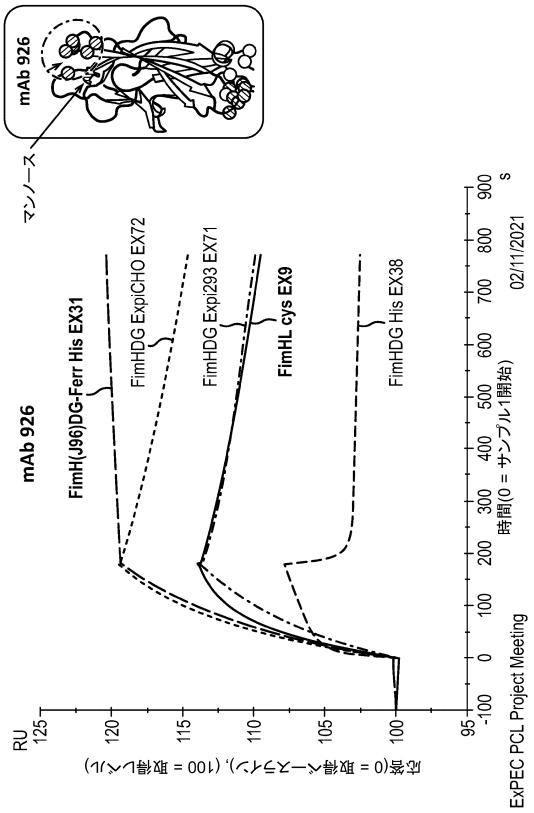


【図２３Ｂ】

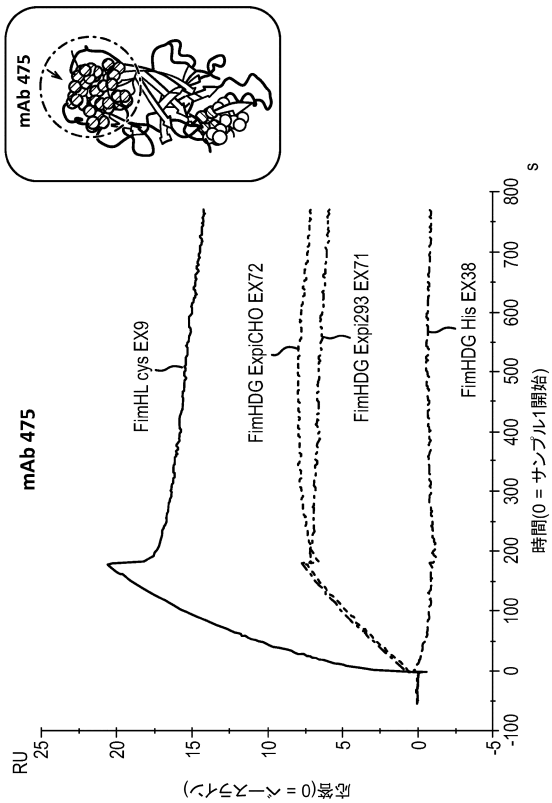


	EX38 - FimHDG His Expi293	EX71 - FimH-DG Expi293	EX72 FimH-DG CHO
Tm1	n.d.	56°C	56°C
Tm2	71°C	74°C	74°C

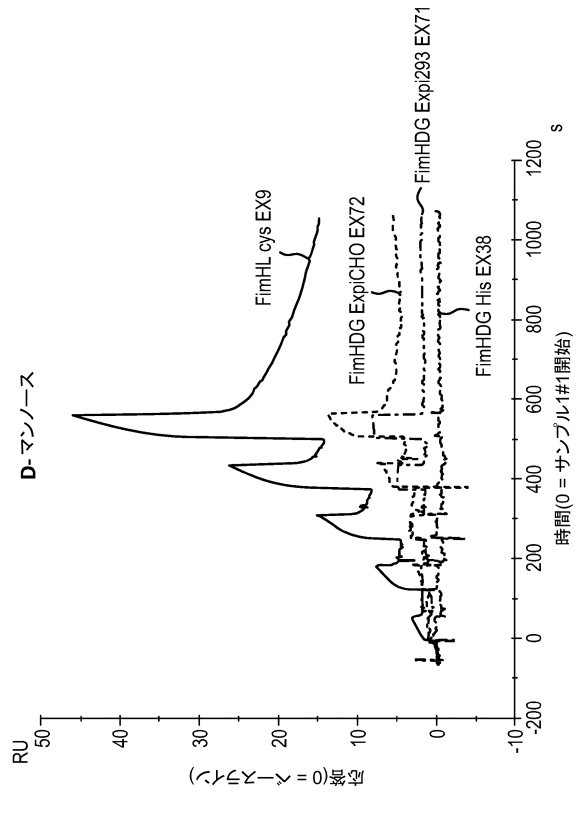
【図２３Ｃ－１】



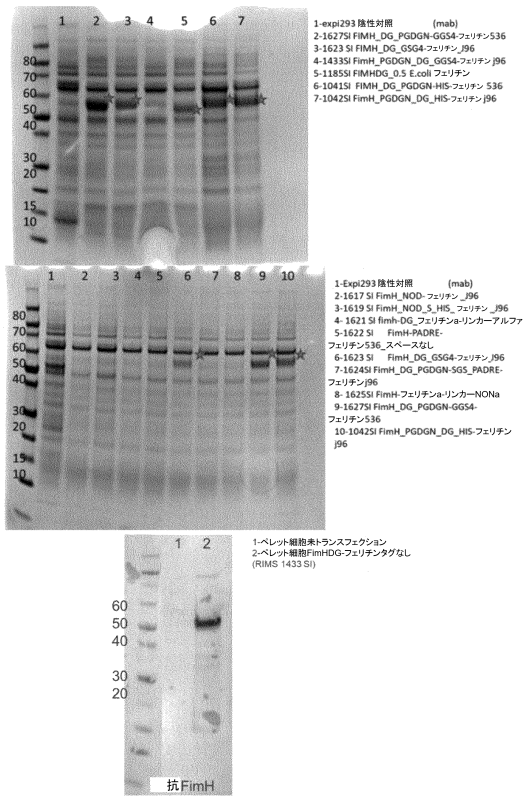
【図２３Ｃ－２】



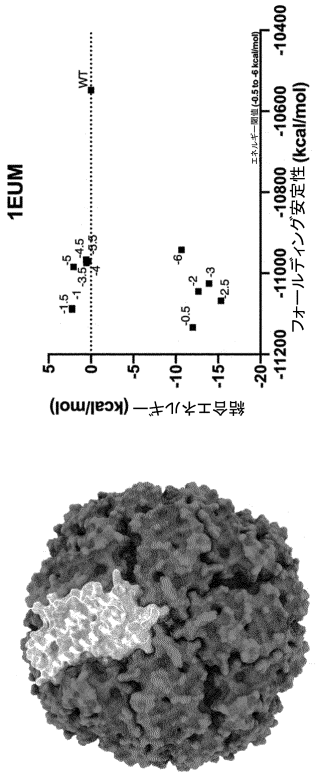
【図２３Ｃ－３】



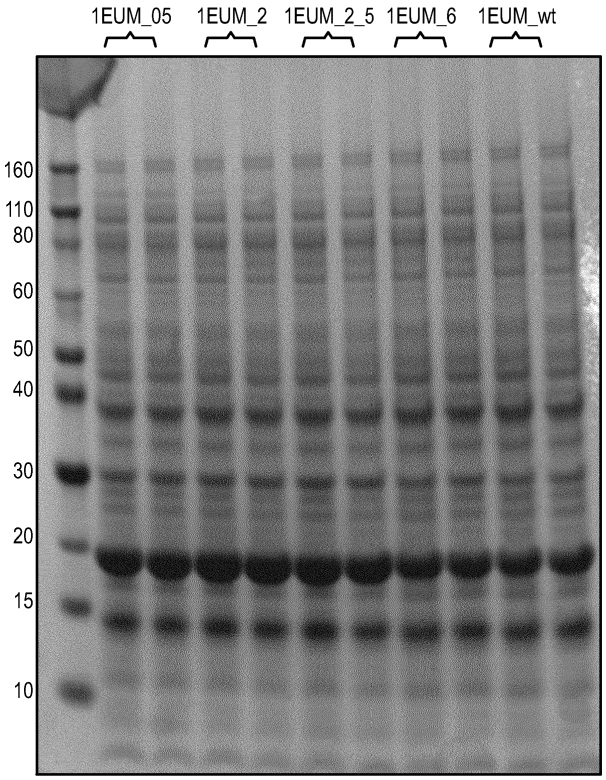
【図２３Ｄ】



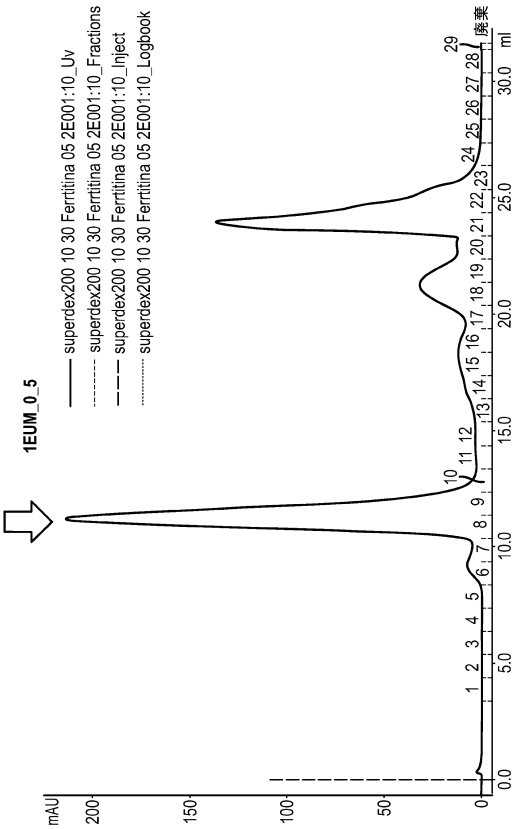
【図２４】



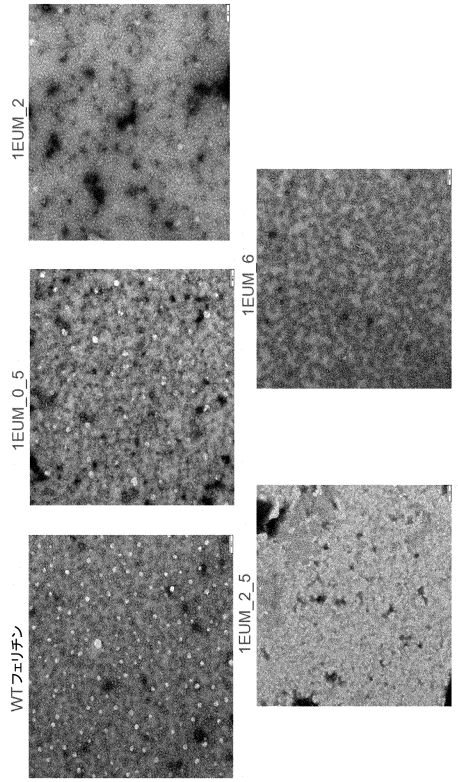
【図２５Ａ】



【図２５Ｂ】

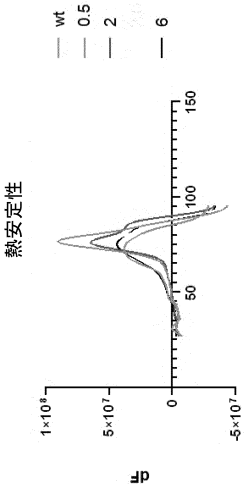


【図２６】

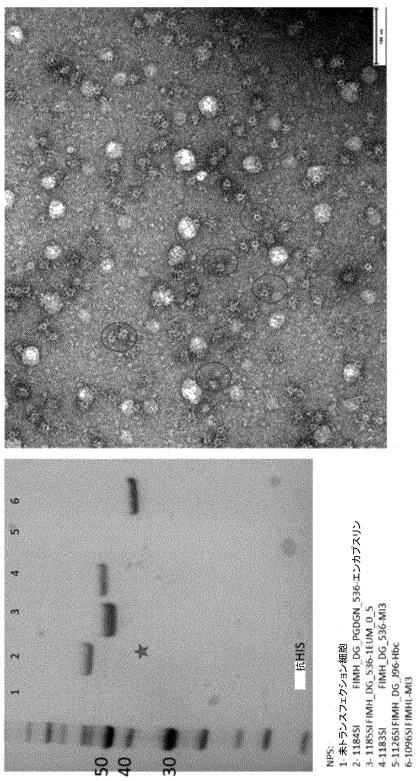


【図２７】

フェリチン	Tm [°C]
WT	72,5
0.5	76,5
2	75,5
6	74,5



【図２８】



【配列表】
2023553854000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/083659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/245 A61K39/00 A61K39/108 A61K35/74 A61P31/04
ADD.

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)
C07K C12R A61K A61P

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 practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, 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 01/04148 A2 (MEDIMMUNE INC [US]) 18 January 2001 (2001-01-18) page 19, line 24 page 11, line 32 - page 12, line 2; figure 9 page 15, line 7 - page 16, line 13 page 29, line 1 - page 30, line 16; sequences 3, 7	1-25, 31-64
X	& DATABASE Geneseq [Online] 8 May 2001 (2001-05-08), "Immunogenic complex: FimH-linker-FimG N-terminal extension.", retrieved from EBI accession no. GSP:AAB47073 Database accession no. AAB47073 page 81 - page 82; sequence claim 19	33,34
	----- -/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family 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 application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 March 2022	31/05/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Niebuhr-Ebel, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/083659

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHOUDHURY D ET AL: "X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic Escherichia coli", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 285, no. 5430, 13 August 1999 (1999-08-13), pages 1061-1066, XP002154985, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.285.5430.1061 cited in the application abstract page 1062, left-hand column, paragraph 1 page 1063; figure 2 page 1064; figure 3C -----	1-18
X	DATABASE Geneseq [Online] 29 December 2005 (2005-12-29), "Chimeric FimH and LTXA2B protein sequence SEQ ID NO:4.", XP002805832, retrieved from EBI accession no. GSP:AED52686 Database accession no. AED52686 sequence -----	33,34
X	LI C Q ET AL: "Ferritin nanoparticle technology... A new platform for antigen presentation and vaccine development", INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, MARY ANN LIEBERT, US, vol. 2, no. 2, 17 July 2006 (2006-07-17), pages 143-147, XP002739855, ISSN: 1550-9087, DOI: 10.1089/IND.2006.2.143 abstract page 144, left-hand column, paragraph 1 - page 147, left-hand column, last paragraph -----	31,32
X,P	WO 2021/084429 A1 (PFIZER [US]) 6 May 2021 (2021-05-06) the whole document	1-25, 33-64
X,P	& DATABASE Geneseq [Online] 24 June 2021 (2021-06-24), "E. coli fimH N28S/N91S/N249Q-mlgK signal-linker-His tag, SEQ 6.", retrieved from EBI accession no. GSP:BJH65886 Database accession no. BJH65886 sequence -----	1-18,33, 34

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/083659

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0104148 A2	18-01-2001	AU 6094000 A	30-01-2001
		CA 2373534 A1	18-01-2001
		EP 1194561 A2	10-04-2002
		HK 1045713 A1	06-12-2002
		JP 2003504083 A	04-02-2003
		WO 0104148 A2	18-01-2001
WO 2021084429 A1	06-05-2021	AU 2020375214 A1	12-05-2022
		JP 2021087420 A	10-06-2021
		WO 2021084429 A1	06-05-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/EP2021/083659

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-25, 31-64

Fusion proteins comprising the bacterial pilus protein FimH and donor-strand complementing amino acids from FimC or FimG that act as a kind of chaperone

---

2. claims: 26-30

Variants of E. coli ferritin (SEQ ID NO: 16)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/083659

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/083659

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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.:

1-25, 31-64

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/86 (2006.01)		C12N	15/86	Z	4C086
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15		4C087
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19		4H045
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21		
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10		
C12P 21/02 (2006.01)		C12P	21/02	C	
A61P 31/04 (2006.01)		A61P	31/04		
A61P 37/04 (2006.01)		A61P	37/04		
A61P 13/02 (2006.01)		A61P	13/02	105	
A61K 39/00 (2006.01)		A61K	39/00	G	
A61K 39/108 (2006.01)		A61K	39/108		
A61K 39/39 (2006.01)		A61K	39/39		
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	48/00		
A61K 35/76 (2015.01)		A61K	35/76		
A61K 9/16 (2006.01)		A61K	9/16		
A61K 31/7088 (2006.01)		A61K	31/7088		

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ファントーニ，アデレ
イタリア国 ５３１００ シエナ，ビア フィオレンティーナ １，ジーエスケー ヴァクシンズ エスアールエル

(72)発明者 フォガット，サンジェイ
イタリア国 ５３１００ シエナ，ビア フィオレンティーナ １，ジーエスケー ヴァクシンズ エスアールエル

(72)発明者 ロッシーニ，ロベルト
イタリア国 ５３１００ シエナ，ビア フィオレンティーナ １，ジーエスケー ヴァクシンズ エスアールエル

(72)発明者 スカーセリ，マリア
イタリア国 ５３１００ シエナ，ビア フィオレンティーナ １，ジーエスケー ヴァクシンズ エスアールエル

(72)発明者 ワホメ，ニュートン
アメリカ合衆国 ２０８５０ メリーランド州，ロックビル，シャディ グローブ ロード １４２００，グラクソスミスクライン

Ｆターム（参考） 4B064 AG01 AG31 BJ12 CA02 CA05 CA08 CA09 CA10 CA11 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA26Y AA57X AA83X AA86X AA87X AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA45 CA46
4C076 AA31 AA95 CC07 CC17 CC31
4C084 AA13 MA41 NA13 NA14 ZA81 ZB09 ZB35
4C085 AA03 AA38 BA21 CC07 CC21 DD61 EE01 FF11
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA41 NA13 NA14 ZA81 ZB09 ZB35
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA41 NA13 NA14 ZA81 ZB09 ZB35
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 DA86 EA20 EA31 EA50

Fターム（参考） 0 FA74