



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0127671
(43) 공개일자 2021년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/00 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/00 (2013.01)
C12P 21/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0135680(분할)
(22) 출원일자 2021년10월13일
심사청구일자 2021년10월13일
(62) 원출원 특허 10-2019-0100884
원출원일자 2019년08월19일
심사청구일자 2019년08월19일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이현수
경기도 김포시 김포한강3로 290-13, 601동 1902호
(장기동, 고창마을 한양수자인 리버팰리스)
(74) 대리인
특허법인엠에이피에스

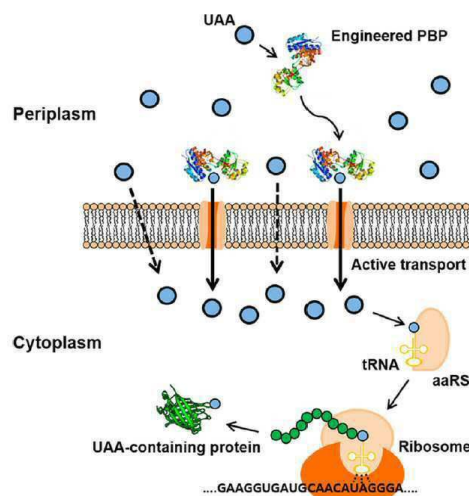
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 비천연 아미노산-결합 단백질, 및 이를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체

(57) 요약

비천연 아미노산을 능동 수송할 수 있는 비천연 아미노산-결합 단백질, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질을 포함하는 비천연 아미노산의 능동 수송용 조성물, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체, 및 상기 형질전환체를 포함하는 비천연 아미노산-함유 단백질 제조용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 2319/21 (2013.01)

C07K 2319/60 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345285839
과제번호	2016R1D1A1B03931369
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	당을 포함한 비천연 아미노산의 유전적 도입을 통한 당단백질의 생합성과 응용
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2018.09.01 ~ 2019.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345280876
과제번호	2018R1A6A1A03024940
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	바이오계면연구소
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

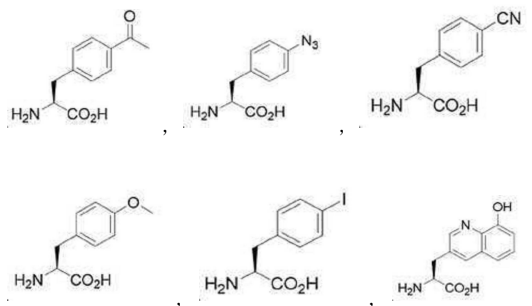
서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 비천연 아미노산-결합 단백질 (unnatural amino acid-binding protein)로서,

상기 서열번호 1의 41 번 위치의 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 또는 류신인 것이고,

상기 서열번호 1의 299 번 위치의 아미노산은 발린, 이소류신, 또는 류신인 것이고,

상기 서열번호 1의 44 번 위치의 아미노산은 글루탐산인 것이고,

상기 비천연 아미노산은,



및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산을

포함하는 것인,

비천연 아미노산-결합 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 서열번호 1의 41 번, 299 번, 및 44 번 위치의 아미노산은 각각 알라닌, 류신, 글루탐산인 것인, 비천연 아미노산-결합 단백질.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 비천연 아미노산을 능동 수송할 수 있는 것인, 비천연 아미노산-결합 단백질.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 비천연 아미노산-결합 단백질을 포함하는, 비천연 아미노산의 능동 수송용 조성물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 비천연 아미노산-결합 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된, 형질전

환체.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 형질전환체는 ABC-수송 시스템(ABC transport system)을 갖는 원핵생물인 것인, 형질전환체.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 ABC-수송 시스템을 갖는 원핵생물은 대장균(*Escherichia coli*), 폐렴쌍구균, 살모넬라균, 및 이들의 조합들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인, 형질전환체.

청구항 8

제 5 항에 따른 형질전환체를 포함하는, 비천연 아미노산-함유 단백질 제조용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은, 비천연 아미노산을 능동 수송할 수 있는 비천연 아미노산-결합 단백질, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질을 포함하는 비천연 아미노산의 능동 수송용 조성물, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체, 및 상기 형질전환체를 포함하는 비천연 아미노산-함유 단백질 제조용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 확장된 유전자 암호를 가진 설계된 유기체의 구축은, 이러한 유기체가 추가적 빌딩 블록을 사용하여 새로운 기능을 수행할 수 있기 때문에 화학 및 합성 생물학에서 매력적인 연구 주제였다. 이러한 분야에 대한 획기적인 공헌은 생성된 아미노아실 tRNA_{CUA} 및 아미노아실-tRNA 합성효소 쌍(aa-tRNA_{CUA}/aa-RS pairs)이 추가적 아미노산을 암호화하는 데에 사용된 설계된 대장균(*E. coli*)을 구축함으로써 만들어졌다. 이러한 시스템은 매력적인 생화학적 특성을 지닌 비천연 아미노산(unnatural amino acids, UAA)을 혼입하는데 광범위하게 사용되었다. 이것은 기술적 단순성, 높은 단백질 수율, 및 다양한 단백질 및 숙주 세포에 대한 적용 가능성을 포함하는 중요한 장점들을 가지고 있기는 하지만, 내인성 번역 기구(endogenous translational machineries)를 이용한 최소한의 섭동으로 단백질 합성에서 더 높은 효율을 위하여 상기 시스템의 기술적 개선이 여전히 요구된다.

[0004] 적절하고 효율적으로 기능하는, 확장된 유전자 암호를 갖는 설계된 유기체의 경우, 외인성 코돈인 aa-tRNA/aa-RS 쌍 및 비천연 아미노산을 포함하는 추가적 유전적 성분들은 내인성 번역 성분들과 직교(orthogonal)해야 하며 리보솜 및 연장 인자(elongation factor) Tu와 같은 내인성 번역 기구와 호환되어야 한다. 이러한 직교성 및 호환성을 달성하기 위해 많은 노력이 있었다. 추가적 코돈으로서, 앰버 코돈(TAG)은 아미노산을 암호화하지 않으며 그 용도가 거의 없기 때문에, 가장 흔하게 사용된다. 그러나, 상기 앰버 코돈은 여전히 내인성 단백질 합성을 위한 정지 신호로서 사용되며 방출 인자(release factor)에 의해 인식된다. 이러한 비상용성(incompatibility)은 세포 독성을 유발하고 비천연 아미노산 도입의 효율을 저하시킨다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Wang, L., Brock, A., Herberich, B., and Schultz, P. G. (2001)498.Expanding the Genetic Code of Escherichia coli. Science 292,500.

발명의 내용

해결하려는 과제

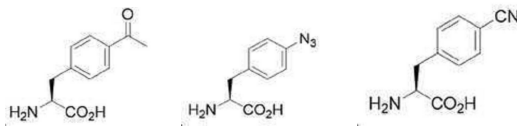
- [0007] 본원은, 비천연 아미노산을 능동 수송할 수 있는 비천연 아미노산-결합 단백질, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질을 포함하는 비천연 아미노산의 능동 수송용 조성물, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체, 및 상기 형질전환체를 포함하는 비천연 아미노산-함유 단백질 제조용 조성물을 제공하고 자 한다.

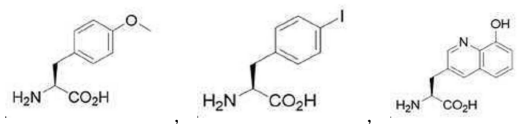
- [0008] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본원의 제 1 측면은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 비천연 아미노산-결합 단백질 (unnatural amino acid-binding protein)로서, 상기 서열번호 1의 41 번 위치의 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 또는 류신인 것이고, 상기 서열번호 1의 299 번 위치의 아미노산은 발린, 이소류신, 또는 류신인 것이고, 상기 서열번호 1의 44 번 위치의 아미노산은 글루탐산인 것이고,

- [0011] 상기 비천연 아미노산은,

- [0012] 

- [0013]  및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 것인, 비천연 아미노산-결합 단백질을 제공한다.

- [0014] 본원의 제 2 측면은, 본원의 제 1측면에 따른 비천연 아미노산-결합 단백질을 포함하는, 비천연 아미노산의 능동 수송용 조성물을 제공한다.

- [0015] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 1측면에 따른 비천연 아미노산-결합 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된, 형질 전환체를 제공한다.

- [0016] 본원의 제 4 측면은, 본원의 제 3 측면에 따른 형질전환체를 포함하는, 비천연 아미노산-함유 단백질 제조용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본원의 구현예들에 따르면, 페리플라즘-결합 단백질로서 류신-결합 단백질을 돌연변이시키므로써, 비천연 아미노산을 능동 수송할 수 있는 비천연 아미노산-결합 단백질을 제조할 수 있으며, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체로부터 비천연 아미노산을 함유하는 단백질을 대량으로 제조할 수 있다.

- [0019] 본원의 구현예들에 따른 상기 비천연 아미노산-결합 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체는, 천연 유기체와 비슷한 효율로 기능하며, 산업 및 대규모 응용 분야에서 비천연 아미노산의 농도가 낮을 때 돌연변이 단

백질의 수율을 증가시키는 데 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은, 본원의 일 실시예에 있어서, 비천연 아미노산-결합 단백질 및 이를 이용한 비천연 아미노산 능동 수송을 나타내는 개략도이다.
- 도 2의 (a) 내지 (c)는, 본원의 일 실시예에 있어서, (a) L-페닐알라닌(PDB ID 1USK)과 복합화된 비천연 아미노산-결합 단백질의 리간드 결합 부위, (b) 방향족 비천연 아미노산, 및 (c) 피롤리신 유도체를 나타낸 것이다.
- 도 3의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, (a) W18 또는 (b) W18 및 Y276에서 돌연변이를 갖는 비천연 아미노산-결합 단백질의 각각의 비천연 아미노산 및 L-류신에 대한 FRET 비율 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는, 본원의 일 실시예에 있어서, 비천연 아미노산-결합 단백질의 피롤라이신 유도체 및 L-류신에 대한 FRET 비율 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 5의 (a) 내지 (g)는, 본원의 일 실시예에 있어서, pET-emGFP-39TAG-LBP-WT(흑색) 또는 pET-emGFP-39TAG-LBP-AEL(적색) 및 pEvol 플라스미드를 포함하는 대장균 BL21(DE3)에서의 비천연 아미노산 흡수(uptake) 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6의 (a) 내지 (f)는, 본원의 일 실시예에 있어서, pET-emGFP-(TAG)n-LBP-WT(흑색) 또는 pET-emGFP-(TAG)n-LBP-AEL(적색) 및 pEvol 플라스미드를 포함하는 B-95.△A△fabR에서의 비천연 아미노산 흡수(uptake) 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은, 본원의 일 실시예에 있어서, pET-LBP-WT(청색 막대) 또는 pET-LBP-AEL(적색 막대)를 포함하는 대장균 BL21(DE3)로부터 제조된 세포 용해물에서의 비천연 아미노산의 농도 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0023] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 "전기적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다.
- [0024] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0025] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [0026] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합(들)"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0027] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B"의 기재는 "A 또는 B, 또는 A 및 B"를 의미한다.
- [0028] 본원 명세서 전체에서, "비천연 아미노산"은 20가지 통상의 아미노산, 파이로리신 또는 셀레노시스테인이 아닌 아미노산을 지칭하며; 용어 "비천연 아미노산"과 유사한 의미로 사용될 수 있는 다른 용어는 "비천연적으로 코딩된 아미노산", "자연적으로 존재하지 않는 아미노산" 등이 있다. "비천연 아미노산"은 천연적으로 코딩된 아미노산의 변형에 의해 자연적으로 발생하나, 그 자체가 번역 복합체에 의해 성장하는 폴리펩티드 내로 도입되지 않는 아미노산을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 천연적으로 코딩된 아미노산이란, 20가지 통상의

아미노산 또는 파이로리신 또는 셀레노시스테인을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본원 명세서 전체에서, "핵산"은 단일-또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오시드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오타이드 및 그의 중합체를 지칭한다. 달리 구체적으로 제한하지 않는 한, 본 용어는 참고 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 천연 발생의 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 구체적으로 제한하지 않는 한, 본 용어는 또한 PNA(펩티도핵산), 안티센스 기술에 사용되는 DNA 유사체(포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트 등)를 비롯한 올리고뉴클레오타이드도 지칭한다. 달리 명시하지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체 및 상보적 서열뿐만 아니라, 명확히 특정된 서열을 포함한다.

[0030] 본원 명세서 전체에서, "폴리펩티드", "펩티드", 및 "단백질"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 즉, 단백질에 대한 기술 사항은 동등하게 펩티드의 기술 사항 및 폴리펩티드의 기술 사항에도 적용되며, 반대의 경우도 마찬가지이다. 본 용어는 자연적으로 존재하는 아미노산 중합체뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산 잔기가 비천연 아미노산인 아미노산 중합체에도 적용된다. 본원에서 사용되는 바, 본 용어는 전체 길이의 단백질을 비롯한, 아미노산 잔기가 공유 펩티드 결합에 의해 연결되어 있는 임의 길이의 아미노산 쇄를 포함한다.

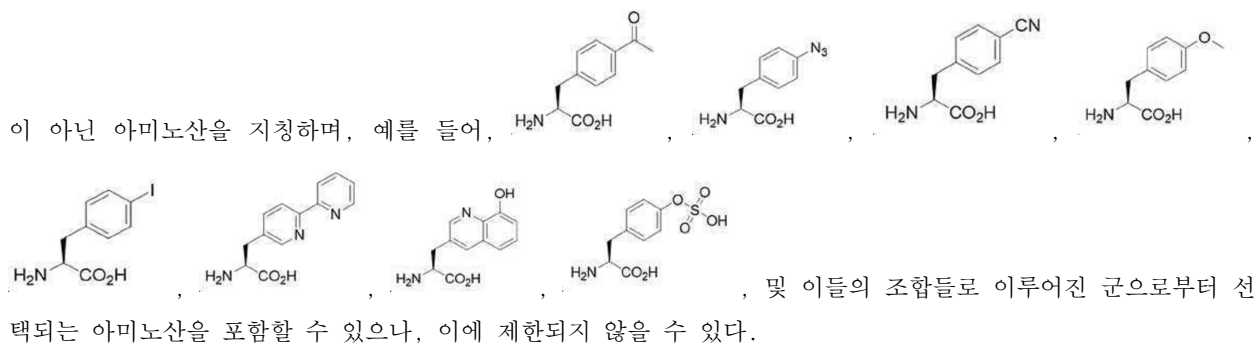
[0031] 본원 명세서 전체에서, FRET(형광 공명 에너지 전이, fluorescence resonance energy transfer)의 기제는, 단파장 형광 단백질인 공여체(donor)가 외부에서 에너지를 흡수하면, 상기 공여체의 여기 에너지가 빛 에너지로 방출되는 대신, 소정의 거리 안에 위치한 장파장 형광 단백질인 수용체(acceptor)가 발광 없이 전달되어, 수용체의 장파장 형광만이 방출되는 현상을 의미한다. FRET에 의한 수용체 형광의 발생 또는 공여체 방출광의 소멸 현상(photobleaching)이 나타나려면 상기 공여체와 수용체가 매우 짧은 거리(10 nm 미만)에 위치해야 한다. 특정 파장의 빛을 내는 형광 단백질인 상기 공여체와 이 발광 에너지와 공명을 일으켜 에너지를 흡수할 수 있는 형광 단백질인 상기 수용체가 소정의 거리 이내로 가까워지면, 외부에서 상기 공여체를 여기시키기 위해 조사된 빛 에너지가 상기 공여체로부터 상기 수용체로 발광 없이 전달되어 공여체의 고유한 파장의 발광이 감소하고, 공여체로부터 에너지를 전달받은 수용체가 자신의 고유한 파장대의 빛을 발광하는 FRET 현상이 일어난다.

[0033] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.

[0035] 본원의 제 1 측면은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 비천연 아미노산-결합 단백질(unnatural amino acid-binding protein)을 제공한다.

[0036] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 비천연 아미노산을 능동 수송하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 ABC-수송 시스템(ABC transport system)을 갖는 원핵생물에서, 주변세포질(periplasm)의 비천연 아미노산을 세포질(cytoplasm)로 능동 수송하는 것일 수 있다.

[0037] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산은 20가지 통상의 아미노산, 파이로리신 또는 셀레노시스테인



[0038] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 페리플라زم-결합 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 페리플라زم-결합 단백질은 아미노산을 인식할 수 있는 결합 단백질이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 구체적으로는 류신-결합 단백질(leucine-binding protein, LBP)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

- [0039] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 41 번 위치의 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 또는 류신일 수 있으며(본 명세서에서 각각 W18G, W18A, W18V, W18L로 표현됨), 이에 따라 상기 비천연 아미노산-결합 단백질들은 각각 서열번호 2 내지 5 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 서열번호 1의 41 번 위치가 글리신일 경우 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하며, 알라닌일 경우 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하고, 발린일 경우 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하며, 류신일 경우 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0040] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 41 번 위치의 아미노산이 글리신, 알라닌, 발린, 또는 류신을 나타냄에 따라, ABC-수송 시스템을 갖는 원핵생물에서, 주변세포질의 비천연 아미노산을 세포질로 능동 수송할 수 있다.
- [0041] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 299 번 위치의 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 이소류신, 또는 류신일 수 있다.
- [0042] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 41 번 위치의 아미노산이 글리신, 알라닌, 발린, 또는 류신일 수 있으며, 상기 299 번 위치의 아미노산이 글리신, 알라닌, 발린, 이소류신, 또는 류신일 수 있고(본 명세서에서 각각 Y276G, Y276A, Y276V, Y276I, 또는 Y276L로 표현됨), 이에 따라 상기 비천연 아미노산-결합 단백질들은 각각 서열번호 6 내지 25 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0043] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 41 번 위치의 아미노산이 글리신, 알라닌, 발린, 또는 류신이고, 상기 299 번 위치의 아미노산이 글리신, 알라닌, 발린, 이소류신, 또는 류신이며, 상기 44번 위치의 아미노산이 글루탐산(본 명세서에서 M21E로 표현됨)을 나타낼 수 있다. 이에 따라, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질들은 각각 서열번호 26 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0044] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 41 번, 299 번, 및 44 번 위치의 아미노산은 각각 알라닌, 류신, 및 글루탐산일 수 있으며, 구체적으로 본원의 비천연 아미노산-결합 단백질들은 각각 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 서열번호 1의 41 번, 299 번, 및 44 번 위치의 아미노산이 각각 알라닌, 류신, 및 글루탐산을 나타냄(W18A-Y276L-M21E)에 따라, ABC-수송 시스템을 갖는 원핵생물에서, 주변세포질의 비천연 아미노산을 세포질로 능동 수송할 수 있다.
- [0046] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 상기 비천연 아미노산의 능동 수송을 확인하기 위해, 형광 공여체 및 형광 수용체를 추가 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 형광 공여체 및 형광 수용체를 추가 포함함으로써, 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)에 의해 FRET 비율을 측정하여 비천연 아미노산의 능동 수송을 확인할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0047] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질들은 상기 비천연 아미노산들의 센서로 사용될 수 있으며, 상기 센서는 상기 비천연 아미노산-결합 단백질, 형광 공여체 및 형광 수용체를 포함하는 것일 수 있고, 상기 센서는 각 비천연 아미노산의 생합성과 관련된 효소 변형체들의 스크리닝에 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0048] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체는 비천연 아미노산을 포함할 수 있으며, 예를 들어, L-(7-하이드록시쿠마린-4-yl)에틸글리신 [L-(7-hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine, CouA], 3-(6-아세틸나프탈렌-2-yl)아미노)-2-아미노프로피온산 [3-(6-acetylnaphthalen-2-ylamino)-2-aminopropanoic acid], 아리코돈-2-yl알라닌 [acridon-2-ylalanine], 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0049] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체는 상기 서열번호 1 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 비천연 아미노산-결합 단백질에서 서열번호 1 내지 45 중 어느 하나의 201번 위치로 치환된 것일 수 있으며, 구체적으로, 상기 서열번호 1 내지 45 중 어느 하나의 201번 위치의 글리신(Gly, G)에서 치환되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체는 L-(7-하이드록시쿠마린-4-yl)에틸글리신 [L-(7-hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine, CouA]일 수 있으며, 상기 서열번호 1 내지 45 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 비천연 아미노산-결합 단백질에서 CouA 가 상기 아미노산 서열의 201번 위치로 치환된 것은 각

각 G178CouA 로 표현될 수 있다.

- [0051] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체의 도입은 아미노산 돌연변이에 의해 달성되는 것일 수 있다.
- [0052] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 수용체는 형광 단백질일 수 있으며, 예를 들어, 황색 형광 단백질 (YFP), 변형된 황색 형광 단백질 (mYFP), 증강된 황색 형광 단백질 (eYFP), 녹색 형광 단백질 (GFP), 변형된 녹색 형광 단백질 (mGFP), 증강된 녹색 형광 단백질 (eGFP), 적색 형광 단백질 (RFP), 변형된 적색 형광 단백질 (mRFP), 증강된 적색 형광 단백질 (eRFP), 청색 형광 단백질 (BFP), 변형된 청색 형광 단백질 (mBFP), 증강된 청색 형광 단백질 (eBFP), 남색 형광 단백질 (CFP), 변형된 남색 형광 단백질 (mCFP), 증강된 남색 형광 단백질 (eCFP), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0053] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 단백질은 상기 비천연 아미노산-결합 단백질의 N-말단에 연결된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 형광 단백질이 상기 비천연 아미노산-결합 단백질의 N-말단에 융합되어 상기 형광 공여체와 함께 FRET 쌍 (FRET pair)를 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0054] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산의 능동 수송은 FRET 비율의 변화를 측정함으로써 확인될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 FRET 비율의 변화는, 리간드의 농도가 0 일 때의 FRET 비율 (R_0)에 대한 리간드의 농도가 x일때의 FRET 비율 (R_x)을 측정함으로써 다음과 같은 식에 의하여 계산되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다:
- [0056]
$$\text{FRET 비율 변화} = \Delta R/R_0 = (R_c - R_0)/R_0$$
- [0058] 여기서, R_0 는 [리간드] = 0에서의 FRET 비율이고, R_c 는 [리간드] = C에서의 FRET 비율일 수 있다.
- [0059] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 서열번호 1 내지 45 중 어느 하나로 이루어진 것일 수 있다.
- [0061] 본원의 제 2 측면은, 본원의 제 1 측면에 따른 비천연 아미노산-결합 단백질을 포함하는, 비천연 아미노산의 능동 수송용 조성물을 제공한다.
- [0062] 본원의 제 2 측면에 따른 비천연 아미노산의 능동 수송용 조성물에 대하여, 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었다더라도 본원의 제 1 측면에 기재된 내용은 본원의 제 2 측면에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0064] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 1 측면에 따른 비천연 아미노산-결합 단백질을 코딩하는 유전자가 도입된, 형질 전환체를 제공한다.
- [0065] 본원의 제 3 측면에 따른 형질전환체에 대하여, 본원의 제 1 측면 또는 제 2 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었다더라도 본원의 제 1 측면 또는 제 2 측면에 기재된 내용은 본원의 제 3 측면에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0066] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형질전환체는 ABC-수송 시스템을 갖는 원핵생물일 수 있다. 예를 들어, 상기 ABC-수송 시스템을 갖는 원핵생물은 대장균(*Escherichia coli*), 폐렴쌍구균, 살모넬라균, 및 이들의 조합들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0067] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 비천연 아미노산-단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체를 배양함으로써, 주변세포질에서 세포질로 비천연 아미노산을 능동 수송할 수 있는, 비천연 아미노산-결합 단백질을 발현할 수 있다.
- [0068] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 2 내지 45 중 어느 하나의 아미노산을 포함하는 비천연 아미노산-단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체를 배양함으로써, 주변세포질에서 세포질로 비천연 아미노산을 능

동 수송할 수 있는, 비천연 아미노산-결합 단백질을 발현할 수 있다.

- [0069] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 41 번, 299 번, 및 44 번 위치의 아미노산은 각각 알라닌, 류신, 및 글루탐산을 나타낼 수 있으며, 구체적으로 서열번호 35의 아미노산 서열로 표현될 수 있고, 이에 따라 ABC-수송 시스템을 갖는 원핵생물, 구체적으로 대장균에서, 주변세포질의 비천연 아미노산을 세포질로 능동 수송할 수 있다.
- [0070] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 서열번호 1 내지 45 중 어느 하나로 이루어진 것일 수 있다.
- [0071] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질들은 상기 비천연 아미노산들의 센서로 사용될 수 있으므로, 각 비천연 아미노산의 생합성과 관련된 효소 변형체들의 스크리닝에 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0073] 본원의 제 4 측면은, 본원의 제 3 측면에 따른 형질전환체를 포함하는, 비천연 아미노산-함유 단백질 제조용 조성물을 제공한다.
- [0074] 본원의 제 4 측면에 따른 비천연 아미노산-함유 단백질 제조용 조성물에 대하여, 본원의 제 1 측면 내지 제 3 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었더라도 본원의 제 1 측면 내지 제 3 측면에 기재된 내용은 본원의 제 4 측면에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0075] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-함유 단백질 제조용 조성물은, 상기 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 비천연 아미노산-단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체를 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 비천연 아미노산-함유 단백질 제조용 조성물은, 상기 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 비천연 아미노산-단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체를 포함할 수 있으며, 상기 형질전환체가 상기 비천연 아미노산-결합 단백질을 발현함에 따라, 주변세포질의 비천연 아미노산을 세포질로 능동 수송할 수 있고, 결과적으로는 비천연 아미노산-함유 단백질을 대량 생산할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0076] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-함유 단백질 제조용 조성물은, 상기 서열번호 2 내지 45 중 어느 하나의 아미노산을 포함하는 비천연 아미노산-단백질을 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체를 포함하는 것일 수 있다.
- [0077] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 서열번호 1 내지 45 중 어느 하나로 이루어진 것일 수 있다.
- [0078] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은, 상기 서열번호 1의 41번, 299 번, 및 44 번 위치의 아미노산이 각각 알라닌, 류신, 및 글루탐산일 수 있으며, 이에 따라 주변세포질의 비천연 아미노산을 세포질로 능동 수송할 수 있다.
- [0079] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질들은 상기 비천연 아미노산들의 센서로 사용될 수 있으므로, 각 비천연 아미노산의 생합성과 관련된 효소 변형체들의 스크리닝에 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0081] 이하, 본원의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 본원의 이해를 돕기 위하여 예시하는 것 일뿐, 본원의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0083] **[실시예]**
- [0084] 본 실시예에서, 모든 화학 물질 및 DNA 올리고머는 상업적인 출처로부터 획득되었으며 추가 정제 없이 사용되었다. 또한, 모든 형광 스펙트럼은 Hitachi F-7000 형광분광광도계(Fluorescence Spectrophotometer)로 측정되었다.
- [0086] **YFP-LBP 융합 단백질의 발현 및 정제**

[0087] 상기 비천연 아미노산-결합 단백질로서 류신-결합 단백질(LBP) 유전자는 E. coli DH10β TM(Invitrogen, California, USA)로부터 증폭되었고, 상기 황색 형광 단백질 유전자는 유전자 합성에 의해 상업적 공급원으로부터 획득되었다. C-말단에서 His₆-태그를 갖는 상기 YFP-LBP 융합 유전자는 중첩 연장 PCR에 의해 합성되었으며, pBAD-YFP-LBP-WT를 생성하기 위해 pBAD/Myc-His(Invitrogen)의 NcoI 및 KpnI 제한 사이트에 삽입되었다. 류신-결합 단백질 설계에 대한 모든 돌연변이는 제조사의 프로토콜(Invitrogen, California, USA)에 따라 위치-특이적 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)에 의해 수행되었다. 지정된 돌연변이를 갖는 YFP-LBP-G178TAG 유전자를 포함하는 각각의 pBAD 플라스미드는 pEvol-CouA-RS47과 함께 대장균 C321.ΔA 균주(Addgene)으로 공동 형질전환되었다. 상기 형질전환된 세포는 암피실린(100 μg/mL) 및 클로람페니콜(35 μg/mL)이 첨가된 LB 배지(lysogeny broth)에서 증폭되었으며, 암피실린(100 μg/mL), 클로람페니콜(35 μg/mL) 및 1 mM CouA가 첨가된 100 mL LB 배지에 37°C에서 접종하기 위해 스타터 배양액(2 mL)이 사용되었다. 단백질 발현은 광학 밀도가 0.8(550 nm)에 도달하였을 때 0.2% L-아라비노스를 첨가하여 유도되었으며, 배양물은 37°C에서 밤새 성장되었다. 세포는 4°C에서 5 분 동안 10,000 rpm으로 원심분리하여 수확되었고, 용해 버퍼(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM 이미다졸 및 pH 8.0)에서 재현탁되고 초음파처리 되었다. 타겟 단백질은 제조사의 프로토콜(Qiagen, Hilden Germany)에 따라 자연적 조건 하에서 Ni-NTA 친화도 크로마토 그래피를 사용하여 정제되었다. 정제된 단백질은 인산염 버퍼(50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl 및 pH 9.0)에 8 회 투석하여 천연 아미노산을 제거하였다.

[0089] 형광 측정

[0090] 형광은 지정된 농도의 아미노산 리간드에서 YFP-LBP-G178CouA 유도체를 포함하는 분석 버퍼(50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl 및 pH 9.0)에서 측정되었다. 각 샘플에 대한 형광 세기는 360 nm에서 여기 하에 420 nm 내지 600 nm에서 기록되었고, FRET 비율 변화는 각 형광 스펙트럼으로부터 계산되었다. 모든 값은 3 번의 독립적인 측정값의 평균이다. 표 1의 해리 상수는 Origin 소프트웨어를 사용하여 계산되었다.

표 1

LBP	아미노산	K _d (μ M)
WT	L-Leu	0.41
AEL mutant	1	1.7 (±0.11)
AEL mutant	2	0.62 (±0.094)
AEL mutant	3	4.1 (±0.63)
AEL mutant	5	0.57 (±0.071)
AEL mutant	7	7.9 (±0.69)
AEL mutant	9	0.54 (±0.049)
AEL mutant	10	3.1 (±0.36)

[0093] 비천연 아미노산의 흡수(uptake) 분석

[0094] 상기 돌연변이 류신-결합 단백질(LBP-AEL) 유전자 및 위치 39에 옴버 코돈을 갖는 emGFP 유전자를 함유하는 유전자 카세트가 중첩 연장 PCR에 의해 합성되었다. 상기 유전자 카세트는 페리플라즘 표적화를 위한 신호 서열 및 유전자 사이의 부가적인 리보솜-결합 부위를 포함한다. 상기 유전자 카세트는 pET28a의 NcoI 및 XhoI 제한 위치에 삽입되었다. 3 가지의 옴버 코돈을 포함하는 야생형-류신 결합 단백질 및/또는 emGFP를 함유하는 플라스미드가 동일한 방법을 사용하여 제조되었다. 각각의 pET 플라스미드는 aa-tRNA/aa-RS 쌍 유전자를 포함하는 pEvol 플라스미드를 BL21(DE3) 또는 B95.ΔAΔfabR 균주로 동시에 형질전환되었다. 상기 형질전환된 세포는 카나마이신(100 μg/mL) 및 클로람페니콜(35 μg/mL)이 첨가된 LB 배지에서 증폭되었으며, 37°C에서 지시된 농도의 카나마이신(100 μg/mL), 클로람페니콜(35 μg/mL), 및 각각의 비천연 아미노산이 첨가된 10 mL P-5052 배지(50 mM Na₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄, 25 mM(NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% 미량 금속, 0.5% 글리세롤, 0.05% 글루코오스, 0.2% 아라비노스, 및 0.2% 락토오스)에 접종하기 위해 스타터 배양액(200 μL)이 사용되었다. 37°C에서 18 시간 동안 배양 후, 세포 밀도를 분광 광도계(600 nm)를 이용하여 측정하였다. 동일한 수(4.0×10⁹)의 세포가 원

심 분리되었으며, 상기 세포 펠렛은 DNase(벤조네이즈, Sigma-Aldrich)를 포함하는 100 μ L Bugbuster(Novagen)로 재현탁되었고, 상기 혼합물은 실온에서 1 시간 동안 배양 되었다. 그 후, 상기 세포 잔해물이 원심 분리에 의해 제거되었으며, 상등액이 100 μ L PBS로 희석되었다. emGFP의 형광 세기는 487 nm 여기 하에서 509 nm에서 측정되었다.

[0096] **세포 용해물에서 비천연 아미노산 농도 측정**

[0097] 대장균 BL21(DE3)은 LB 배지에서 증폭되었으며, 10 mL P-5052 배지(50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM KH_2PO_4 , 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% 미량 금속, 0.5% 글리세롤, 및 0.05% 글루코오스)에 접종하기 위해 상기 스타터 배양액(200 μ L)이 사용되었다. 광학 밀도가 0.8(550 nm)에 도달하면, (이후의 업테이크 실험과 동일한 배양 조건을 유지하기 위해) 락토오스(0.2%)가 첨가되었으며, 상기 세포는 37°C에서 2 시간 동안 배양되었다. 배양 후, 상기 세포는 수확되어 4°C에서 PBS로 4 회 세척되었다. 상기 세포 펠렛은 DNase(벤조네이즈, Sigma-Aldrich)가 포함된 200 μ L Bugbuster(Novagen)에 재현탁되었으며, 상기 혼합물은 실온에서 1 시간 동안 배양되었다. 세포 잔해물은 원심 분리에 의해 제거되었으며, 상등액은 200 μ L의 CHCl_3 로 추출되었다. 생성된 수성 층(150 μ L)은 450 μ L의 FRET 분석 버퍼(50 mM 포스페이트 버퍼, 50 mM NaCl, pH 9.0)으로 희석되었다. 상기 혼합물은 센서 단백질(YFP-LBP-AEL, 100 nM)의 존재 하에 각각의 비천연 아미노산으로 적정되었으며, 형광 스펙트럼은 360 nm 여기 하에서 기록되었다. FRET 비율 변화가 계산되었으며, 비천연 아미노산 농도(최대 10^{-6} M)에 대해 플롯되었고, 피팅식을 수득하기 위해 피팅되었다. 다음으로, 카나마이신(100 μ g/mL)이 첨가된 LB 배지에서 pET-LBP-WT 또는 pET-LBP-AEL을 포함하는 대장균 BL21(DE3)이 증폭되었으며, 카나마이신(100 μ g/mL)을 첨가된 10 mL P-5052 배지(50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM KH_2PO_4 , 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% 미량 금속, 0.5% 글리세롤, 및 0.05% 글루코오스)에 접종하기 위해 스타터 배양액(200 μ L)이 사용되었다. 광학 밀도가 0.8(550 nm)에 도달할 때, 각 배양액에 비천연 아미노산(1 mM) 및 락토오스(0.2%)가 첨가되었으며, 상기 세포는 37°C에서 2 시간 동안 배양되었다. 세포 용해물은 동일한 절차로 준비되었으며, 형광 분석은 상기 센서 단백질로 수행되었다. FRET 비율 변화가 계산되었으며, 각각의 적정 실험으로부터 피팅식을 사용하여 각 용해물에서 비천연 아미노산의 농도를 결정하였다.

[0099] **비천연 아미노산-결합 단백질의 설계 및 제조**

[0100] 비천연 아미노산 흡수의 개선을 위한 페리플라즘-결합 단백질을 설계하기 위하여, 기능적 및 구조적으로 잘 특성화 되어있고, 이의 결합 친화도를 조절할 수 있도록 잘 설계되었다는 이유로 류신-결합 단백질(leucine-binding protein, LBP)이 선택되었다. 상기 류신-결합 단백질은 페닐알라닌(Phe)을 비롯한 다른 천연 아미노산을 인식하며, 설계를 위한 아미노산 결합 위치에 공간을 포함하고 있다.

[0101] 상기 류신-결합 단백질로부터 비천연 아미노산-결합 단백질을 설계하기 위해, 비천연 아미노산-결합 단백질이 원하는 결합 특성에 대해 평가될 수 있도록 분석 방법이 요구되었다. 도 2a에 나타낸 바와 같이, 페닐알라닌과 복합화된 류신-결합 단백질의 X-선 결정 구조에서 상기 페닐알라닌의 페닐 고리는 W18(서열번호 1의 41번 위치)과 Y276(서열번호 1의 299번 위치) 사이에 위치한다. 상기 구조에 기반하여, W18 및 Y276이 돌연변이를 위해 선택되었다. 상기 잔기들은 결합된 페닐알라닌에 가까이 위치하며, 더 작은 잔기들로 대체될 경우 큰 공간을 생성할 것으로 예상되었다.

[0102] 상기 C-말단에서 His₆로 표지된 YFP-LBP에 대한 융합 유전자는 중첩 연장 중합효소 연쇄 반응(overlap extension polymerase chain reaction, PCR)에 의해 준비되었고, CouA 도입을 위한 앰버 돌연변이(TAG)가 YFP-LBP-G178TAG 유전자를 제조하기 위해 류신-결합 단백질의 178 위치(서열번호 1의 201번 위치)로 위치-지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)에 의해 도입되었다. 비천연 아미노산 결합을 위한 상기 비천연 아미노산-결합 단백질을 설계하기 위해, 페리플라즘-결합 단백질로서 류신-결합 단백질의 18 번 위치의 아미노산(W18)이 시스테인(Cys), 페닐알라닌(Phe), 타이로신(Tyr) 및 트립토판(Trp)을 제외한 다른 모든 아미노산으로 돌연변이되었고, 각각의 비천연 아미노산-결합 단백질 유전자(YFP-LBP-G178TAG-W18X)는 1 mM CouA의 존재 하에 상기 조절된 aa-tRNA/aa-RS(CouRS) 쌍을 발현하는 유전자 암호 확장 방법에 의해 발현되었다. 각각의 비천연 아미노산-결합 단백질은 친화도 정제에 의해 정제되었으며 SDS-PAGE, 형광 젤 이미징 및 쿠마시 염색에 의해 분석되었다. 분석 결과, 비천연 아미노산-결합 단백질의 178 위치에 유전적으로 도입된 CouA의 명확한 형광성 및 상기 YFP-

LBP 융합 단백질에 대한 정확한 단백질 크기(64 kDa)를 나타냈다. 각각의 비천연 아미노산-결합 단백질은 360 nm에서 여기 하에서 468 nm(I_{CouA}) 및 537 nm(I_{YFP})에서 형광 강도를 측정하였고 리간드 결합 전후 FRET 비율(R , $I_{\text{YFP}}/I_{\text{CouA}}$)을 계산함으로써 방향족 고리(도 2b)를 포함하는 다양한 비천연 아미노산 1 내지 8의 결합 친화도를 평가하였다(도 3a). 도 3의 그래프에서, FRET 비율은 각각의 비천연 아미노산의 존재(50 μM) 및 부재 시 360 nm 여기 하에서 $I_{\text{CouA}, 468 \text{ nm}}$ 및 $I_{\text{YFP}, 537 \text{ nm}}$ 에서 계산되었으며, FRET 비율 변화는 식 1로부터 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 3 번의 독립적인 실험의 평균이다. 오류 막대(error bar)는 명확성을 위해 생략되었으며, 모든 데이터 포인트에 대해 표준 편차는 ± 0.15 미만이다[분석 조건: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산염 버퍼(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 50 μM 아미노산].

[0103] 상기 FRET 비율 변화는 다음 식을 사용하여 계산되었다:

[0105] $\text{FRET 비율 변화} = \Delta R/R_0 = (R_x - R_0)/R_0$ (1)

[0107] 여기서, R_0 는 [비천연 아미노산] = 0에서의 FRET 비율이고, R_x 는 [비천연 아미노산] = x 에서의 FRET 비율이다. 상기 결과는 야생형(WT) 류신-결합 단백질이 테스트된 8 가지의 비천연 아미노산 중 어느 것도 인식하지 못한 것을 보여주었다. 그러나, 상기 W18G 및 W18A 비천연 아미노산-결합 단백질은 다수의 비천연 아미노산에 대해 중간 정도의 친화도를 나타냈다. 흥미롭게도, 상기 W18G 돌연변이는 L-류신(L-Leu)보다 비천연 아미노산에 5 배 더 높은 결합 친화도를 가지며, 상기 W18L 돌연변이는 8-하이드록시퀴놀린(8-hydroxyquinolin)을 포함하는 부피가 큰 비천연 아미노산 7에 대해 중간 정도의 친화도를 나타냈다. 안타깝게도, 비천연 아미노산 6 및 8에 대한 모든 비천연 아미노산-결합 단백질의 반응은 측세의 큰 크기 또는 음전하로 인하여 최소값을 나타냈다.

[0108] 상기 18 번 위치의 아미노산이 글리신(서열번호 2), 알라닌(서열번호 3), 발린(서열번호 4), 또는 류신(서열번호 5)인 비천연 아미노산-결합 단백질들을 특성분석 하기 전에, 더 많은 돌연변이들이 상기 비천연 아미노산-결합 단백질들(W18G, W18A, W18V 및 W18L)로 도입되었다. 상기 페닐알라닌과 복합화된 류신-결합 단백질의 구조에서, 상기 Y276 잔기는 페닐알라닌의 페닐기에 가깝고(도 2a), 더 작은 잔기로의 Y276 돌연변이는 방향족 비천연 아미노산을 수용하기 위한 공간을 더 많이 만들 것으로 예상되었다. 5 가지의 돌연변이(Y276G, Y276A, Y276V, Y276I 및 Y276L)가 상기 비천연 아미노산-결합 단백질들(W18G, W18A, W18V 및 W18L)에 각각 도입되었고, 20 가지의 비천연 아미노산-결합 단백질들이 수득되었다(서열번호 6 내지 서열번호 25). 각각의 비천연 아미노산-결합 단백질들은 친화도 정제에 의해 정제된 CouA를 도입하기 위해 유전자 암호 확장에 의해 발현되었고, FRET 분석(도 3b)에 의해 비천연 아미노산 결합에 대해 평가되었다. 상기 5 가지의 Y276 돌연변이 중에서, 상기 Y276G 및 Y276A 비천연 아미노산-결합 단백질은 L-류신을 포함한 모든 테스트된 아미노산에 대해 결합 친화도에서 부정적인 영향을 나타냈다. 그러나, 다른 비천연 아미노산-결합 단백질들은 W18 돌연변이에 의존하여 테스트된 비천연 아미노산 대부분에 대해 결합 친화도를 증가시켰다. 중요한 것은, Y276V, Y276I 및 Y276L 돌연변이와 W18G 및 W18A 돌연변이의 조합은 비천연 아미노산에 대해 L-류신보다 더 높은 친화도를 나타내었고, W18G-Y276L 및 W18A-Y276L 돌연변이를 포함하는 두 개의 비천연 아미노산-결합 단백질들은 다양한 비천연 아미노산에 대해 L-류신보다 월등한 결합 친화도를 나타냈다. 이러한 결과는 유전자 암호 확장 기술을 이용하는 FRET-기반 분석과 결합된 류신-결합 단백질 설계가, 천연 리간드인 L-류신보다 비천연 아미노산에 대해 더 높은 결합 친화도를 갖는 비천연 아미노산-검출 단백질을 생산할 수 있다는 것을 보여주었다.

[0109] 피롤라이신(pyrrolysine, Pyl) 유도체들의 유전적 도입이 Pyl-RS의 기질 혼잡과 원핵세포 및 진핵세포 모두에 대한 적용 가능성으로 인하여 많은 관심을 끌고있다. 선택된 비천연 아미노산-결합 단백질에 대해, 피롤라이신 유도체에 대한 이들의 친화도가 테스트되었다. 7 가지의 피롤라이신 유도체들(도 2c)이 선택되었으며 6 가지의 비천연 아미노산-결합 단백질들(W18A-Y276L, W18A-Y276I, W18A-Y276V, W18G-Y276L, W18V-Y276L 및 W18L-Y276L)을 테스트하였다(도 4). 도 4의 그래프에서, FRET 비율은 각 비천연 아미노산의 존재(50 μM) 및 부재 시 360 nm 여기 하에서 $I_{\text{CouA}, 468 \text{ nm}}$ 및 $I_{\text{YFP}, 537 \text{ nm}}$ 에서 계산되었고, FRET 비율 변화는 식 1로부터 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 3 번의 독립적인 실험의 평균이다. 오류 막대(error bar)는 명확성을 위해 생략되었으며, 모든 데이터 포인트에 대해 표준 편차는 ± 0.15 미만이다[분석 조건: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산염 버퍼(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 50 μM 아미노산].

[0110] 아지드기를 포함하는 비천연 아미노산 9는 상기 테스트된 피롤라이신 유도체 중에서 가장 높은 친화도를 나타냈

고, 상기 W18A-Y276L 비천연 아미노산-결합 단백질은 방향족 비천연 아미노산뿐만 아니라 상기 피롤라이신 유도체에도 폭넓은 결합 친화도를 나타냈다. 특히, 비천연 아미노산 9에 대한 상기 W18A-Y276L 비천연 아미노산-결합 단백질의 β_0 는 방향족 비천연 아미노산을 포함하는 상기 테스트된 모든 비천연 아미노산에서 가장 큰 값을 나타냈다.

[0111] 상기 제조된 비천연 아미노산-결합 단백질의 리간드-결합 형태를 안정화시키고 결합 친화도를 증가시키기 위해, 21 번 위치(서열번호 1의 44번 위치)의 메티오닌(M)을 글루탐산(E)으로 추가적으로 돌연변이시켰다. 상기 M21E 돌연변이는 상기 YFP-LBP-G178TAG-W18A-Y276L 비천연 아미노산-결합 단백질 유전자에 도입되었으며, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질 유전자는 CouA 도입에 대한 유전자 암호 확장에 의해 발현되었다. 상기 비천연 아미노산-결합 단백질이 제조되었으며 비천연 아미노산 결합에 대해 평가되었다. 예상한 바와 같이, 모든 테스트된 아미노산에 대해, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 리간드 결합 시 향상된 $\Delta R/R_0$ 값을 나타내었으며, 이것은 상기 M21E 돌연변이가 결합 친화도를 증가시킨다는 것을 증명한다. 상기 M21E 돌연변이를 도입함으로써, 결합 친화도가 추가적으로 증가할 수 있다.

[0112] 다음으로, 상기 최적화된 비천연 아미노산-결합 단백질인 YFP-LBP-G178CouA-W18A-M21E-Y276L(YFP-LBP-CouA-AEL)의 결합 특성을 선택된 비천연 아미노산에 대해 해리 상수를 측정함으로써 평가하였다. 상기 단백질을 각각의 비천연 아미노산으로 적정하였으며 형광 스펙트럼을 기록하였다. 이러한 실험들로부터, $\Delta R/R_0$ 이 비천연 아미노산 농도를 플롯팅하였으며, 해리 상수가 계산되었다(표 1).

[0113] 모든 해리 상수는 10 μ M 미만이었으며, 비천연 아미노산 2, 5 및 9에 대한 상수는 1 μ M 미만이었으며, 이것은 L-류신에 대한 야생형(WT) 류신-결합 단백질의 친화도($K_d = 0.41 \mu$ M)과 비슷하였다. YFP-LBP-CouA-AEL는 비천연 아미노산 3, 5, 9 및 10의 D-형에 대하여 L-형의 친화도가 평가되었다. 상기 테스트된 D-아미노산의 FRET 비율 변화는 최저값을 나타냈으며, 이것은 상기 비천연 아미노산-결합 단백질이 L-형 아미노산에 대해 특이적인 결합 특성을 가지고 있음을 나타냈다.

[0114] 비천연 아미노산-결합 단백질의 다중-스텝 설계로부터, YFP-LBP-CouA-AEL을 확인하고 특성 분석하였다. 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 비천연 아미노산의 능동 수송에 적용되었다. 상기 비천연 아미노산-결합 단백질이 세포 내에서 비천연 아미노산을 인식하고 능동적으로 수송할 수 있는지를 테스트하기 위해, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질을 확장된 유전자 암호로 박테리아에서 발현시켰다. YFP-LBP-CouA-AEL에서 상기 YFP 유전자가 제거되었으며, 178 번 위치에서의 상기 엠버 코돈이 글리신(Gly)의 원래 코돈으로 교체되었다. 3 가지 돌연변이(W18A, M21E, 및 Y276L)를 포함하는 상기 비천연 아미노산-결합 단백질이 각각의 비천연 아미노산에 대해 상응하는 aa-tRNA 및 aa-RS 쌍과 함께 공동-발현되었다. 39 위치에서 엠버 코돈을 포함하는 에머랄드 GFP 유전자(emGFP-F39TAG) 또한 형광에 의해 각각의 비천연 아미노산의 도입 효율에 대해 평가되었다. 확장된 유전자 암호 및 새로운 흡수 시스템을 포함하는 이러한 설계된 유기체가 다양한 농도에서 표 1에 나타낸 바와 같은 각각의 비천연 아미노산의 존재 하에 성장되었으며, 상기 발현된 emGFP로부터의 형광이 측정되었다. 야생형 류신-결합 단백질을 발현하는 대조군 세포 또한 비교를 위해 테스트되었다. 상기 설계된 유기체에서의 emGFP 형광은 동일한 농도의 모든 테스트된 비천연 아미노산에서 대조군 세포에서의 형광보다 현저히 더 높았다(도 5). 방향족 비천연 아미노산(1, 2, 3, 5 및 7)의 경우, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질(LBP-AEL)을 발현하는 상기 유기체로부터의 emGFP 형광은 비천연 아미노산의 2 배 내지 5 배 더 낮은 농도에서 포화되며, 이것은 상기 유기체가 2 배 내지 5 배 더 낮은 비천연 아미노산 농도에서 상기 emGFP 비천연 아미노산-결합 단백질의 동일한 양을 생성할 수 있는 것을 의미한다. 상기 피롤라이신 유도체(9 및 10)의 경우, 다른 비천연 아미노산만큼 향상되지는 않았지만 동일한 효과가 관찰되었다. 비천연 아미노산 2, 5 및 9에 대해, 동일한 분석이 내인성 TAG 코돈이 방출 인자 1의 결실과 함께 다른 정지 코돈으로 대체된 BL21 균주 유래의 특수 박테리아 균주(B-95. $\Delta A \Delta fabR$)에 적용되었으며, 그에 수반하는 독성 유전적 변이가 고정되었다. 이러한 박테리아 균주에서, LBP-AEL에 의한 증가된 흡수 효과는 도 5(도 6a)에 나타낸 것과 유사하였다. 또한, 동일한 실험이 상기 emGFP 유전자에서 3 가지의 TAG 코돈(39, 90 및 151 위치)으로 수행되었고, 포화에 대해 3 배 내지 5 배 더 낮은 비천연 아미노산 농도 및 20% 내지 50% 더 높은 최대값의 형광이 관찰되었다(도 6b). 도 6은 아미노산 흡수(uptake) 분석 결과를 나타낸 그래프로서, 엠버 코돈은 (a) 39 번의 한 위치(Y39) 또는 (b) 39 번, 90 번, 및 151 번의 세 위치(Y39, E90 및 Y151)에 도입되었다. 비천연 아미노산의 각 농도에서 성장된 동일한 수의 세포로부터 제조된 세포 용해물로부터 emGFP 형광을 측정하였다.

[0115] 전반적으로, 확장된 유전자 암호를 갖는 상기 유기체는 5 배 낮은 비천연 아미노산 농도에서 포화된 emGFP 발현을 나타냈으며, LBP-AEL이 발현될 때 emGFP의 증가된 최대값의 발현이 나타났고, 이것은 LBP-AEL이 설계된 흡수

시스템을 통해 비천연 아미노산의 농도를 증가시킨다는 것을 증명한다. 흥미롭게도, LBP-AEL을 발현하는 상기 B-95.△A△fabR 균주는 비천연 아미노산에 할당된 TAG 코돈과 비천연 아미노산에 대한 능동적 수송 시스템을 모두 포함하였으며, 이것은 종래에 달성되지 못했던 확장된 유전자 암호를 갖는 진화된 유기체를 만들도록 하였다.

[0116] LBP-AEL의 발현으로 인한 emGFP 형광의 증가가 각 비천연 아미노산의 증가된 세포 농도에 기인한다는 것을 확인하기 위해, LBP-AEL을 발현하는 상기 테스트된 세포에서의 농도를 LBP-WT를 발현하는 대조군 세포에서의 농도와 비교하여 측정하였다. 이러한 실험은 $K_d < 1 \mu M$ 인, 비천연 아미노산 2, 5 및 9에 대해 수행되었다. 상기 비천연 아미노산의 세포 농도 측정을 위한 제한된 실시예로 인하여, 상기 실험에 대한 적절한 분석은 문헌에서 발견되지 않았다. 따라서, FRET 센서 단백질인 YFP-LBP-CouA-AEL을 이용하여 비천연 아미노산의 세포 내 농도를 측정하는 방법을 개발하였다. 먼저, 대장균 BL21로부터 세포 용해물을 준비하였으며, 상기 세포 용해물을 YFP-LBP-CouA-AEL(100 nM)과 혼합하였다. 상기 센서 단백질을 포함하는 용해물을 각각의 비천연 아미노산으로 적정하였으며, 형광 스펙트럼을 기록하였다. $\Delta R/R_0$ 값을 계산하였으며 비천연 아미노산에 대해 플롯팅하였다. 상기 플롯의 선형 부분($<10^{-6} M$)에 대해 회귀식을 구하여 비천연 아미노산의 농도를 결정하는데 사용하였다. 다음으로, 각각의 비천연 아미노산(1 mM)의 존재 하에서 pET-LBP-WT 또는 pET-LBP-AEL을 포함하는 대장균 BL21을 성장시켰으며, 세포 용해물을 준비하였고, 상기 센서 단백질로부터 형광 스펙트럼을 획득하였다. 각각의 비천연 아미노산에 대해 맞는 피팅식을 사용하여, 각 세포 용해물에서의 농도를 확인하였다(도 7). 도 7에서, 상기 세포는 각 비천연 아미노산(1 mM)의 존재 하에 성장되었으며, 상기 센서 단백질(YFP-LBP-AEL, 100 nM)로부터 형광 강도를 측정하고, 그들의 세포 용해물 중 비천연 아미노산의 농도가 각각의 비천연 아미노산에 대해 측정되었다.

[0117] 상기 결과는 LBP-AEL을 발현하는 세포로부터 제조된 세포 용해물에 대한 비천연 아미노산의 농도가 명백하게 증가하였음을 나타냈다. 상기 증가는 비천연 아미노산 9의 경우 약 5 배, 비천연 아미노산 2 및 5의 경우 약 2 배 내지 3 배였다. 이러한 결과는 흡수 실험에서 나타나는 emGFP 발현의 증가가, 설계된 류신-결합 단백질로 형성된 신규한 능동 수송 시스템에 의해 야기된 각각의 비천연 아미노산의 세포 내 흡수의 증가에 기여한 것으로 나타났다. 세포에서 비천연 아미노산의 정확한 농도를 측정하지는 않았지만, 이러한 분석은 비천연 아미노산의 상대적 세포 내 농도에 대한 좋은 측정 예상치를 제공한다.

[0118] 상기 표 1에 나타난 해리 상수에 기초할 때, 비천연 아미노산 2, 5, 및 9가 LBP-AEL에 대해 가장 강한 친화도를 가지며, LBP-AEL의 발현을 통해 이들의 흡수 증가에 있어 가장 효과적일 것이라고 예상되었다. 그러나, 흡수 실험의 결과는 증가된 흡수량과 결합 친화도간에 상관 관계가 없음을 나타냈다. 이러한 현상은 두 가지 요인에 의해 설명될 수 있다. 도 5 및 도 6에서의 흡수 실험에서, 비천연 아미노산의 도입을 통한 emGFP 발현으로부터 형광 증가에 의해 흡수 증가가 관찰되었지만, 대응하는 비천연 아미노산에 대한 aa-RS의 친화도 또한 흡수 증가에 영향을 줄 수 있다. 상기 비천연 아미노산-결합 단백질은 페리플라즈م 단백질이고, 그에 따라 페리플라즈스에서 아미노산과 결합할 수 있기 때문에, 비천연 아미노산 흡수에 영향을 줄 수 있는 또 다른 요소는 페리플라즈에서의 각 비천연 아미노산의 농도이다. 따라서, 도 5, 6, 및 7의 결과는 각 비천연 아미노산에 대한 LBP-AEL의 결합 친화도와 직접적으로 연관될 수는 없다.

[0120] 본원에서, 페리플라즈 결합 단백질(periplasmic binding protein, PBP)을 돌연변이시켜 비천연 아미노산(unnatural amino acid, UAA)을 인식하는 신규한 비천연 아미노산-결합 단백질을 제조하였으며, 상기 비천연 아미노산-결합 단백질로부터 향상된 비천연 아미노산 업테이크(uptake) 능력을 가진 형질전환체를 제조하였다. 제조된 여러 가지의 비천연 아미노산-결합 단백질을 이용한 형질전환체로부터, 다양한 비천연 아미노산에 대한 우수한 결합 친화도($K_d \approx 500 nM$)를 FRET-기반 분석을 사용하여 확인하였다. 신규한 비천연 아미노산-결합 단백질(LBP-AEL)을 발현하는 박테리아 세포는 최대 5 배의 향상된 비천연 아미노산 흡수를 나타냈으며, 이것은 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)에 비천연 아미노산을 유전적으로 도입시키고 세포 용해물에서 비천연 아미노산 농도를 측정함으로써 확인되었다.

[0121] 본원은, 비천연 아미노산의 세포 내 흡수를 설계한 최초의 보고이며, 천연 유기체와 비슷한 효율로 기능하는, 확장된 유전자 암호를 갖는 향상된 비천연 유기체를 설계하는 데 있어 원동력을 제공할 수 있다. 상기 시스템은 산업 및 대규모 응용 분야에서 비천연 아미노산의 농도가 낮을 때 돌연변이 단백질의 수율을 증가시키는 데 유용하다. 또한, 센서 설계 및 세포 용해물에서의 비천연 아미노산 농도 측정과 같은, 본원에서 사용된 기

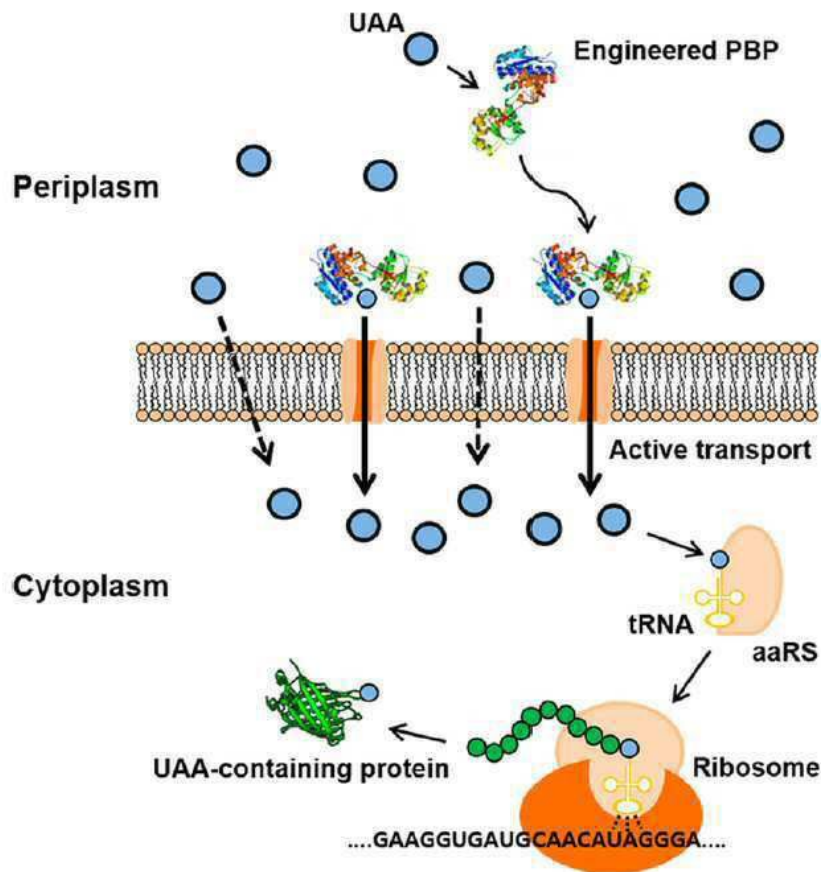
술들은 다른 생화학적 응용 분야에도 유용할 수 있다.

[0123] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

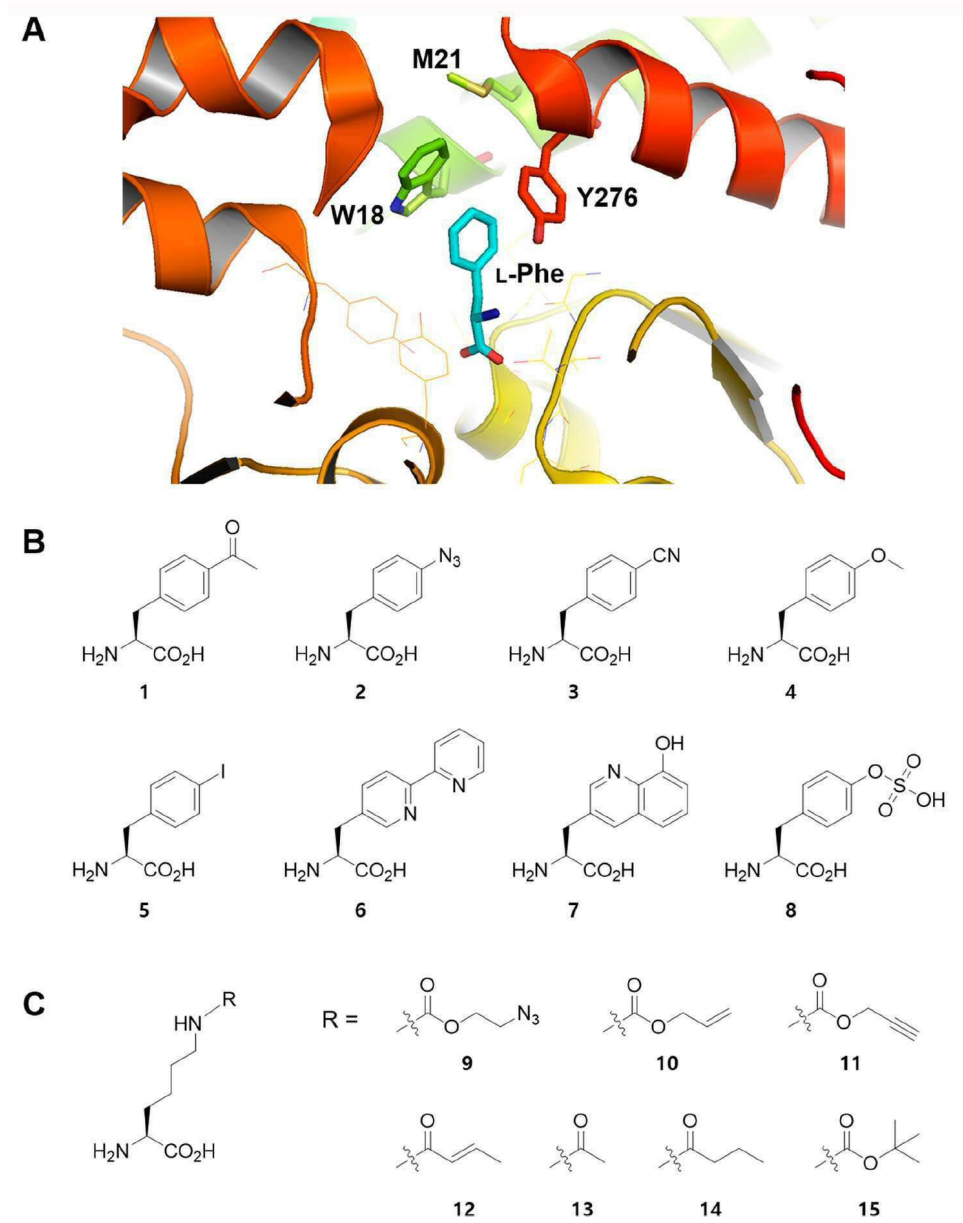
[0124] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

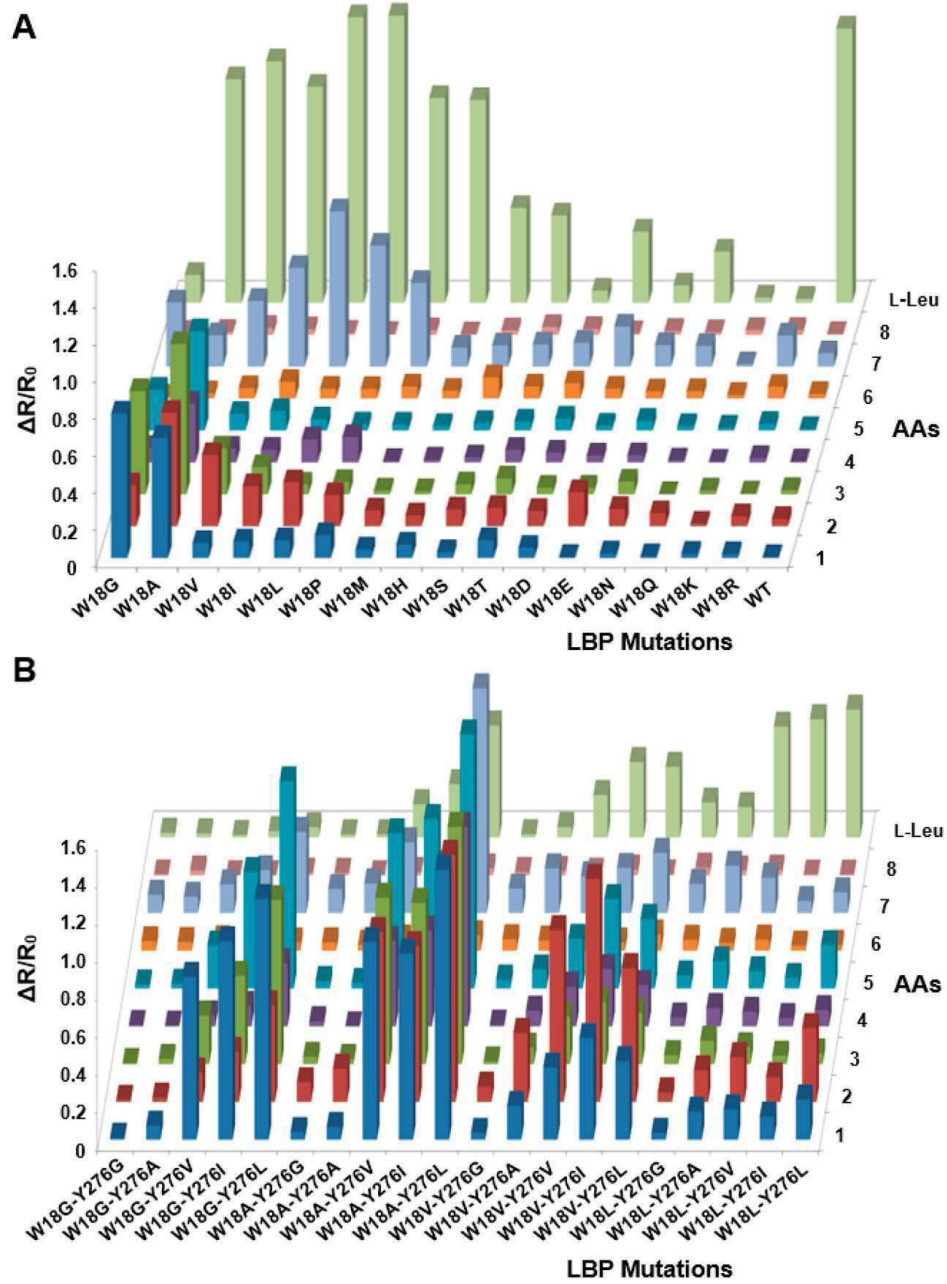
도면1



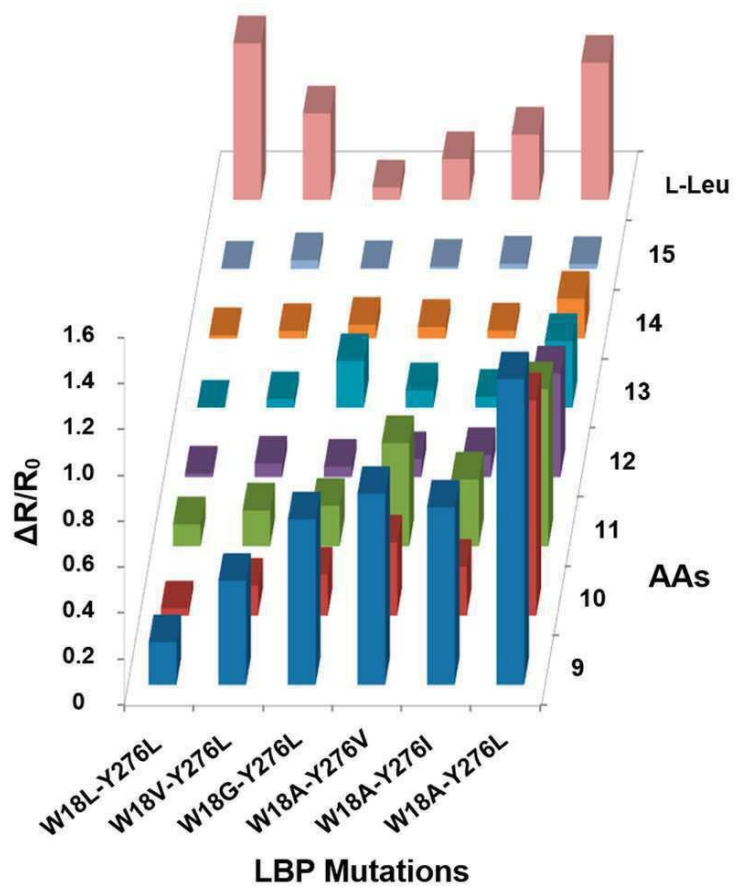
도면2



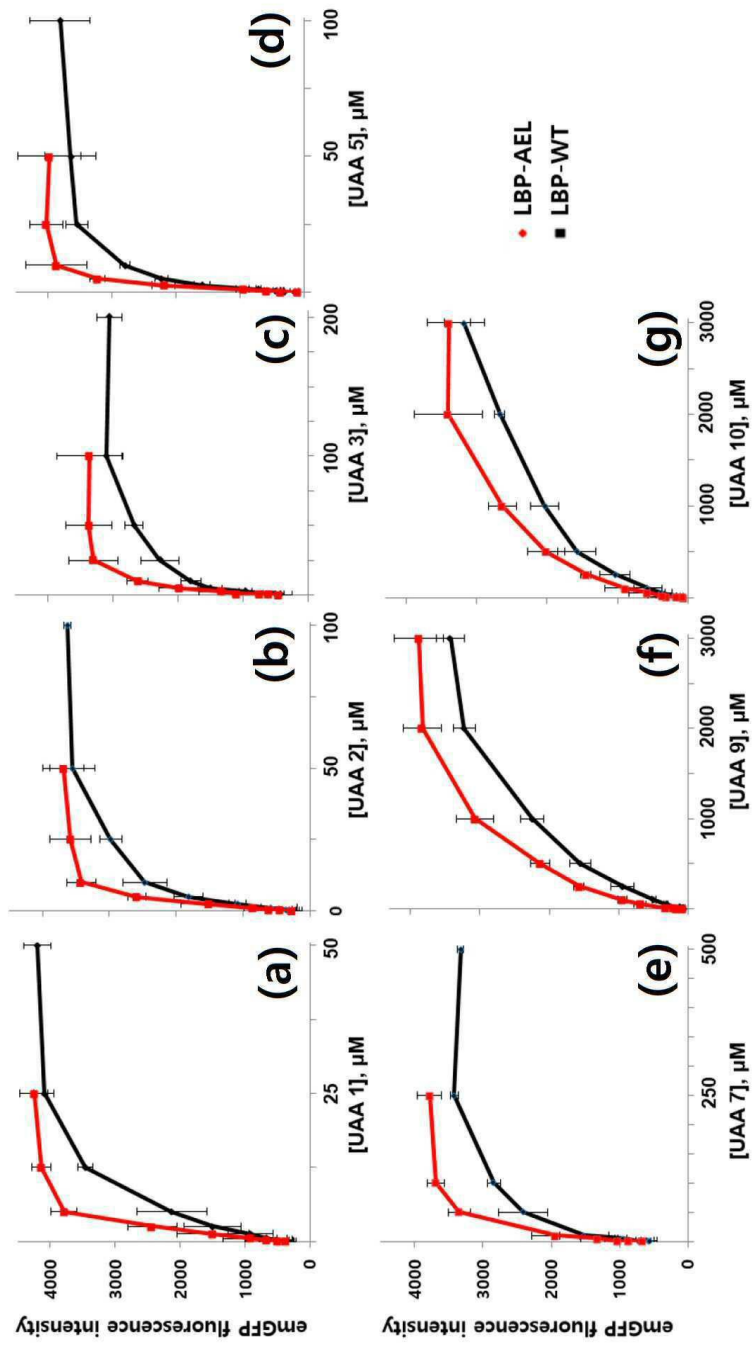
도면3



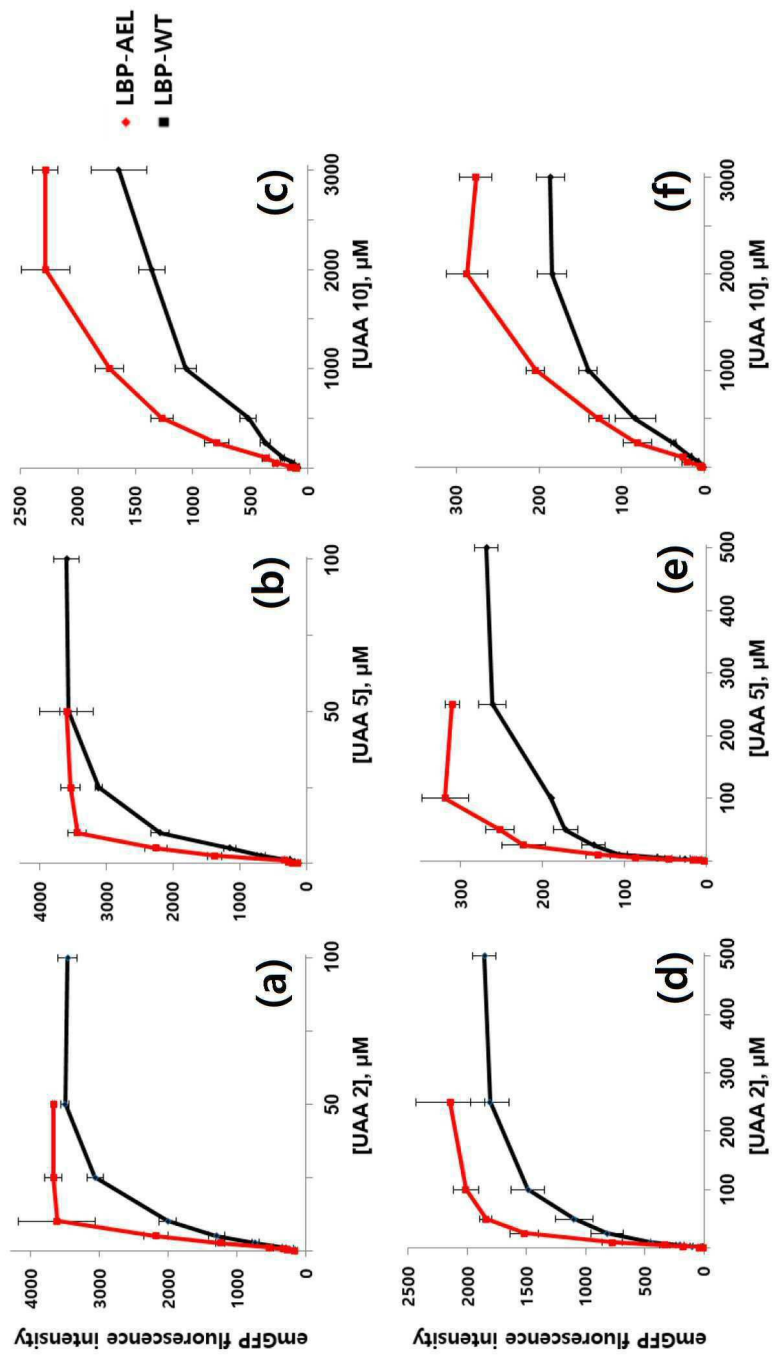
도면4



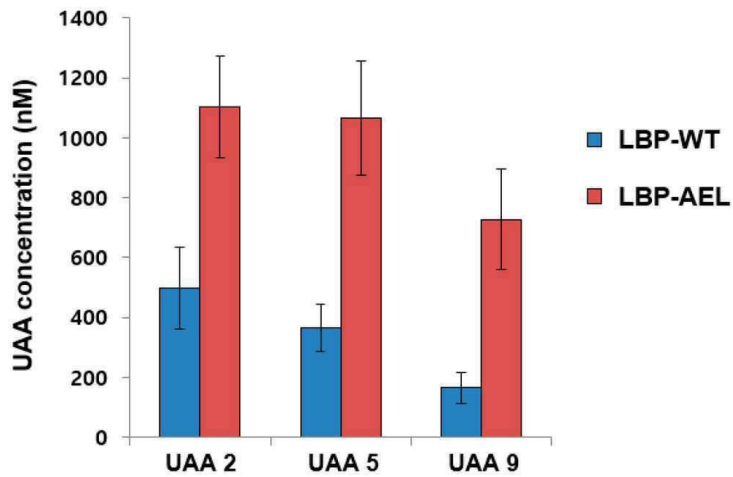
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION
 <120> UNNATURAL AMINO ACID-BINDING PROTEIN, AND TRANSFORMANT INTRODUCED
 WITH A GENE ENCODING THE SAME
 <130> DP20190457KR
 <160> 46
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP
 <400> 1

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30
 Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Xaa Gly Asp Xaa Glu Phe Asn Gly
 35 40 45
 Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
 50 55 60
 Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Xaa Val Trp Ile Thr Tyr
290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr

325 330 335
Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365
Lys

<210> 2
<211> 369
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18G

<400> 2
Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
1 5 10 15
Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
20 25 30
Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Gly Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly
35 40 45
Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80
Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95
Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110
Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
115 120 125
Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140
Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205

 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu

 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350

 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 3

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18A

<400> 3

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Ala Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly

35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr

100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu

115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly

165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val

180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly

210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly

225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr

 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

 355 360 365
 Lys

<210> 4

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18V

<400> 4

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Val Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly
 35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60
 Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80
 Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

 85 90 95
 Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125
 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160

 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly

 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 5

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18L

<400> 5

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

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 6

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18G-Y276G

<400> 6

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Gly Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly

35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr

100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu

115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly

165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val

180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

195 200 205

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

<210> 7
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP-W18G-Y276A
 <400> 7

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Gly Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly
35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ala Val Trp Ile Thr Tyr

290 295 300
Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
305 310 315 320
Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
325 330 335
Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365

Lys

<210> 8
<211> 369
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LBP-W18G-Y276V
<400> 8

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

50 55 60
Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80
Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95
Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Val Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

355 360 365

Lys

<210> 9

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18G-Y276I

<400> 9

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Gly Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly

35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr

100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu

115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly

165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val

180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ile Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 10

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18G-Y276L

<400> 10

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15
 Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30
 Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Gly Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly
 35 40 45
 Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
 50 55 60
 Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80

 Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
 85 90 95
 Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125
 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220

 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro

260 265 270
Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu

275 280 285
Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Leu Val Trp Ile Thr Tyr

290 295 300
Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp

305 310 315 320
Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr

325 330 335
Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

340 345 350
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

355 360 365

Lys

<210> 11

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18A-Y276G

<400> 11

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Ala Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly

35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85	90	95	
Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr			
100	105	110	
Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu			
115	120	125	
Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp			
130	135	140	
Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys			
145	150	155	160
Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly			
165	170	175	
Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val			
180	185	190	
Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu			
195	200	205	
Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly			
210	215	220	
Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly			
225	230	235	240
Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu			
245	250	255	
Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro			
260	265	270	
Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu			
275	280	285	
Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Gly Val Trp Ile Thr Tyr			
290	295	300	
Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp			
305	310	315	320
Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr			
325	330	335	

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

340 345 350
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

355 360 365
Lys

<210> 12

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18A-Y276A

<400> 12

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Ala Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly

35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr

100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu

115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ala Val Trp Ile Thr Tyr
290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
325 330 335

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365

Lys

<210> 13

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18A-Y276V

<400> 13

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15
Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
20 25 30
Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Ala Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly
35 40 45
Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
50 55 60
Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95
Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110
Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
115 120 125
Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
130 135 140
Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160
Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
165 170 175
Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
180 185 190
Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
195 200 205
Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly

225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Val Val Trp Ile Thr Tyr

 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365

Lys

<210> 14
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP-W18A-Y276I
 <400> 14

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

50 55 60
 Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80
 Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
 85 90 95
 Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125

 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270

 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ile Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp

305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 15
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP-W18A-Y276L
 <400> 15

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Ala Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly
 35 40 45
 Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
 50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80
 Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
 85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu

 115 120 125
 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175

 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Leu Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320

 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 16

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18V-Y276G

<400> 16

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1	5	10	15
Ile Ser His Thr	Ala Met Ala Asp Asp	Ile Lys Val Ala Val	Val Gly
20	25	30	
Ala Met Ser Gly	Pro Ile Ala Gln Val Gly	Asp Met Glu Phe	Asn Gly
35	40	45	
Ala Arg Gln Ala	Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys	Gly Gly Ile Lys	Gly
50	55	60	
Asp Lys Leu Val	Gly Val Glu Tyr Asp Asp	Ala Cys Asp Pro	Lys Gln
65	70	75	80

Ala Val Ala Val	Ala Asn Lys Ile Val	Asn Asp Gly Ile Lys	Tyr Val
85	90	95	
Ile Gly His Leu	Cys Ser Ser Ser Thr	Gln Pro Ala Ser	Asp Ile Tyr
100	105	110	
Glu Asp Glu Gly	Ile Leu Met Ile Ser	Pro Gly Ala Thr	Asn Pro Glu
115	120	125	
Leu Thr Gln Arg	Gly Tyr Gln His Ile Met	Arg Thr Ala Gly	Leu Asp
130	135	140	
Ser Ser Gln Gly	Pro Thr Ala Ala Lys	Tyr Ile Leu Glu	Thr Val Lys

145	150	155	160
Pro Gln Arg Ile	Ala Ile Ile His Asp	Lys Gln Gln Tyr	Gly Glu Gly
165	170	175	
Leu Ala Arg Ser	Val Gln Asp Gly Leu	Lys Ala Ala Asn	Ala Asn Val
180	185	190	
Val Phe Phe Asp	Gly Ile Thr Ala Gly	Glu Lys Asp Phe	Ser Ala Leu
195	200	205	
Ile Ala Arg Leu	Lys Lys Glu Asn Ile	Asp Phe Val Tyr	Tyr Gly Gly

210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly

225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro

260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu

275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Gly Val Trp Ile Thr Tyr

290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp

305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr

325 330 335

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

340 345 350

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

355 360 365

Lys

<210> 17

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18V-Y276A

<400> 17

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Val Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly

35 40 45
 Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

 50 55 60
 Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80
 Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
 85 90 95
 Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125

 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270

 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ala Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 18
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP-W18V-Y276V
 <400> 18

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Val Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly
 35 40 45
 Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
 50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80
 Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
 85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
 100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125
 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175

 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Val Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320

 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365

Lys

<210> 19

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18V-Y276I

<400> 19

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1	5	10	15
Ile Ser His Thr	Ala Met Ala Asp	Asp Ile Lys Val	Ala Val Val Gly
20	25	30	
Ala Met Ser Gly	Pro Ile Ala Gln	Val Gly Asp Met	Glu Phe Asn Gly
35	40	45	
Ala Arg Gln Ala	Ile Lys Asp Ile	Asn Ala Lys Gly	Gly Ile Lys Gly
50	55	60	
Asp Lys Leu Val	Gly Val Glu Tyr	Asp Asp Ala Cys	Asp Pro Lys Gln
65	70	75	80

Ala Val Ala Val	Ala Asn Lys Ile	Val Asn Asp Gly	Ile Lys Tyr Val
85	90	95	
Ile Gly His Leu	Cys Ser Ser Ser	Thr Gln Pro Ala	Ser Asp Ile Tyr
100	105	110	
Glu Asp Glu Gly	Ile Leu Met Ile	Ser Pro Gly Ala	Thr Asn Pro Glu
115	120	125	
Leu Thr Gln Arg	Gly Tyr Gln His	Ile Met Arg Thr	Ala Gly Leu Asp
130	135	140	
Ser Ser Gln Gly	Pro Thr Ala Ala	Lys Tyr Ile Leu	Glu Thr Val Lys

145	150	155	160
Pro Gln Arg Ile	Ala Ile Ile His	Asp Lys Gln Gln	Tyr Gly Glu Gly
165	170	175	
Leu Ala Arg Ser	Val Gln Asp Gly	Leu Lys Ala Ala	Asn Ala Asn Val
180	185	190	

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ile Val Trp Ile Thr Tyr
290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
325 330 335

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365

Lys

<210> 20

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18V-Y276L

<400> 20

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
1 5 10 15

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

260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu

275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Leu Val Trp Ile Thr Tyr

290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp

305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr

325 330 335

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

340 345 350

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

355 360 365

Lys

<210> 21

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18L-Y276G

<400> 21

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Leu Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly

35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85 90 95
 Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125
 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Gly Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365

Lys

<210> 22

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18L-Y276A

<400> 22

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15
Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30
Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Leu Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly

35 40 45
Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60
Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
165 170 175
Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
180 185 190
Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
195 200 205
Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
210 215 220
Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
225 230 235 240
Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
245 250 255
Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
260 265 270
Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
275 280 285
Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ala Val Trp Ile Thr Tyr
290 295 300
Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
305 310 315 320
Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
325 330 335
Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365

Lys

<210> 23
<211> 369
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18L-Y276V

<400> 23

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Leu Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly

35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr

100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu

115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly

165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val

180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly

210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly

225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270

 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Val Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

 <210> 24
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP-W18L-Y276I
 <400> 24
 Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30

 Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Leu Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly
 35 40 45
 Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
 50 55 60

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

[illegible]

<210>	25
<211>	369
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	LBP-W18L-Y276L
<400>	25

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1					5					10					15				
Ile	Ser	His	Thr	Ala	Met	Ala	Asp	Asp	Ile	Lys	Val	Ala	Val	Val	Gly				
				20				25				30							
Ala	Met	Ser	Gly	Pro	Ile	Ala	Gln	Leu	Gly	Asp	Met	Glu	Phe	Asn	Gly				
				35				40				45							
Ala	Arg	Gln	Ala	Ile	Lys	Asp	Ile	Asn	Ala	Lys	Gly	Gly	Ile	Lys	Gly				
				50				55				60							
Asp	Lys	Leu	Val	Gly	Val	Glu	Tyr	Asp	Asp	Ala	Cys	Asp	Pro	Lys	Gln				
				65				70				75				80			

Ala	Val	Ala	Val	Ala	Asn	Lys	Ile	Val	Asn	Asp	Gly	Ile	Lys	Tyr	Val
85							90				95				
Ile	Gly	His	Leu	Cys	Ser	Ser	Ser	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Asp	Ile	Tyr
100							105				110				
Glu	Asp	Glu	Gly	Ile	Leu	Met	Ile	Ser	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Pro	Glu
115							120				125				
Leu	Thr	Gln	Arg	Gly	Tyr	Gln	His	Ile	Met	Arg	Thr	Ala	Gly	Leu	Asp

130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly

 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val

 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly

 210 215 220

 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro

 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu

 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Leu Val Trp Ile Thr Tyr

 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr

 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

 355 360 365

Lys

<210> 26

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18G-Y276G-M21E

<400> 26

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Gly Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly

35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr

100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu

115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly

165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val

180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Gly Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 27
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP-W18G-Y276A-M21E
 <400> 27

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Gly Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly
35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ala Val Trp Ile Thr Tyr
290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
325 330 335

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365

Lys

<210> 28

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18G-Y276V-M21E

<400> 28

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15
Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30
Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Gly Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly

35 40 45
Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60
Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125
 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220

 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Val Val Trp Ile Thr Tyr

 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

	355						360										365
Lys																	
<210>	29																
<211>	369																
<212>	PRT																
<213>	Artificial Sequence																
<220><223>	LBP-W18G-Y276I-M21E																
<400>	29																
Met	Lys	Arg	Asn	Ala	Lys	Thr	Ile	Ile	Ala	Gly	Met	Ile	Ala	Leu	Ala		
1				5					10					15			
Ile	Ser	His	Thr	Ala	Met	Ala	Asp	Asp	Ile	Lys	Val	Ala	Val	Val	Gly		
			20					25					30				
Ala	Met	Ser	Gly	Pro	Ile	Ala	Gln	Gly	Gly	Asp	Glu	Glu	Phe	Asn	Gly		
		35					40					45					
Ala	Arg	Gln	Ala	Ile	Lys	Asp	Ile	Asn	Ala	Lys	Gly	Gly	Ile	Lys	Gly		
	50						55					60					
Asp	Lys	Leu	Val	Gly	Val	Glu	Tyr	Asp	Asp	Ala	Cys	Asp	Pro	Lys	Gln		
65						70				75					80		
Ala	Val	Ala	Val	Ala	Asn	Lys	Ile	Val	Asn	Asp	Gly	Ile	Lys	Tyr	Val		
			85						90				95				
Ile	Gly	His	Leu	Cys	Ser	Ser	Ser	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Asp	Ile	Tyr		
		100						105					110				
Glu	Asp	Glu	Gly	Ile	Leu	Met	Ile	Ser	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Pro	Glu		
		115					120						125				
Leu	Thr	Gln	Arg	Gly	Tyr	Gln	His	Ile	Met	Arg	Thr	Ala	Gly	Leu	Asp		
	130					135						140					
Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Thr	Ala	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu	Glu	Thr	Val	Lys		
145					150					155					160		
Pro	Gln	Arg	Ile	Ala	Ile	Ile	His	Asp	Lys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Glu	Gly		
			165					170					175				
Leu	Ala	Arg	Ser	Val	Gln	Asp	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Asn	Ala	Asn	Val		

180 185 190
Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

195 200 205
Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly

210 215 220
Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly

225 230 235 240
Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

245 250 255
Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro

260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu

275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ile Val Trp Ile Thr Tyr

290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp

305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr

325 330 335

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

340 345 350

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

355 360 365

Lys

<210> 30

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18G-Y276L-M21E

<400> 30

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15
 Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30

 Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Gly Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly
 35 40 45
 Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
 50 55 60
 Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80
 Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
 85 90 95
 Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr

 100 105 110
 Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125
 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175

 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

 245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
260 265 270
Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
275 280 285
Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Leu Val Trp Ile Thr Tyr
290 295 300
Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
325 330 335
Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365
Lys

<210> 31
<211> 369
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LBP-W18A-Y276G-M21E
<400> 31

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15
Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
20 25 30
Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Ala Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly
35 40 45
Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
50 55 60
Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Gly Val Trp Ile Thr Tyr

290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
325 330 335

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365

Lys

<210> 32

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18A-Y276A-M21E

<400> 32

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Ala Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly
35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly

165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val

180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly

210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly

225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro

260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu

275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ala Val Trp Ile Thr Tyr

290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp

305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr

325 330 335

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

340 345 350

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

355 360 365

Lys

<210> 33

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18A-Y276V-M21E

<400> 33

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Ala Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly

35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr

100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu

115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly

165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val

180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly

210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly

225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

245 250 255
Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
260 265 270
Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
275 280 285
Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Val Val Trp Ile Thr Tyr
290 295 300
Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
325 330 335
Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365

Lys

<210> 34
<211> 369
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LBP-W18A-Y276I-M21E
<400> 34

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15
Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
20 25 30
Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Ala Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly
35 40 45
Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ile Val Trp Ile Thr Tyr

290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp

305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365

Lys

<210> 35
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP-W18A-Y276L-M21E
 <400> 35

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

130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270

 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Leu Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 36

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18V-Y276G-M21E

<400> 36

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Val Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly

35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr

100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu

115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly

165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val

180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly

210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Gly Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320

 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 37

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18V-Y276A-M21E

<400> 37

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15
 Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30
 Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Val Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly

35 40 45
 Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
 50 55 60
 Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80

 Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
 85 90 95
 Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125
 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220

 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ala Val Trp Ile Thr Tyr

290 295 300
Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
305 310 315 320
Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
325 330 335
Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365

Lys

<210> 38
<211> 369
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LBP-W18V-Y276V-M21E
<400> 38

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

50 55 60
Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80
Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95
Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125

 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270

 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Val Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

355 360 365

Lys

<210> 39

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18V-Y276I-M21E

<400> 39

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly

20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Val Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly

35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr

100 105 110

Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu

115 120 125

Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140

Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly

165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val

180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ile Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 40

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18V-Y276L-M21E

<400> 40

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15
 Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30
 Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Val Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly
 35 40 45
 Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
 50 55 60
 Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80

 Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
 85 90 95
 Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125
 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220

 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro

260 265 270
Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu

275 280 285
Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Leu Val Trp Ile Thr Tyr

290 295 300
Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp

305 310 315 320
Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr

325 330 335
Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

340 345 350
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

355 360 365

Lys

<210> 41

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18L-Y276G-M21E

<400> 41

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Leu Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly
35 40 45

Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly

50 55 60
Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80
Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val

85	90	95	
Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr			
100	105	110	
Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu			
115	120	125	
Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp			
130	135	140	
Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys			
145	150	155	160
Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly			
165	170	175	
Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val			
180	185	190	
Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu			
195	200	205	
Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly			
210	215	220	
Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly			
225	230	235	240
Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu			
245	250	255	
Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro			
260	265	270	
Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu			
275	280	285	
Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Gly Val Trp Ile Thr Tyr			
290	295	300	
Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp			
305	310	315	320
Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr			
325	330	335	

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

340 345 350
Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala

355 360 365
Lys

<210> 42
<211> 369
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> LBP-W18L-Y276A-M21E
<400> 42

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
1 5 10 15
Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Leu Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly
35 40 45
Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
50 55 60
Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80
Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95
Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr

100 105 110
Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
115 120 125
Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
130 135 140
Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
145 150 155 160

Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
165 170 175

Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
180 185 190

Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
195 200 205

Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
225 230 235 240

Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

245 250 255

Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
260 265 270

Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
275 280 285

Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ala Val Trp Ile Thr Tyr
290 295 300

Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
305 310 315 320

Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
325 330 335

Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
340 345 350

Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
355 360 365

Lys

<210> 43

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP-W18L-Y276V-M21E

<400> 43

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1 5 10 15
Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
20 25 30
Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Leu Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly
35 40 45
Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
50 55 60
Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80

Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
85 90 95
Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
100 105 110
Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
115 120 125
Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
130 135 140
Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys

145 150 155 160
Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
165 170 175
Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
180 185 190
Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
195 200 205
Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
210 215 220

Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly

225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Val Val Trp Ile Thr Tyr

 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365

Lys

<210> 44
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP-W18L-Y276I-M21E
 <400> 44

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

50 55 60
 Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80
 Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
 85 90 95
 Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu
 115 120 125

 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp
 130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu

 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270

 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Ile Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp

305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe

 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 45
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP-W18L-Y276L-M21E
 <400> 45

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly
 20 25 30

Ala Met Ser Gly Pro Ile Ala Gln Leu Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly
 35 40 45
 Ala Arg Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly
 50 55 60

Asp Lys Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln
 65 70 75 80
 Ala Val Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val
 85 90 95

Ile Gly His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Glu Asp Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu

 115 120 125
 Leu Thr Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp

130 135 140
 Ser Ser Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly
 165 170 175

 Leu Ala Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val
 180 185 190
 Val Phe Phe Asp Gly Ile Thr Ala Gly Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ile Ala Arg Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu

 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Leu Val Trp Ile Thr Tyr
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320

 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365
 Lys

<210> 46

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP Wild type

<400> 46

Met Lys Arg Asn Ala Lys Thr Ile Ile Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala

1	5	10	15
Ile Ser His Thr	Ala Met Ala Asp	Asp Ile Lys Val	Ala Val Val Gly
20	25	30	
Ala Met Ser Gly	Pro Ile Ala Gln	Trp Gly Asp Met	Glu Phe Asn Gly
35	40	45	
Ala Arg Gln Ala	Ile Lys Asp Ile	Asn Ala Lys Gly	Gly Ile Lys Gly
50	55	60	
Asp Lys Leu Val	Gly Val Glu Tyr	Asp Asp Ala Cys	Asp Pro Lys Gln
65	70	75	80

Ala Val Ala Val	Ala Asn Lys Ile	Val Asn Asp Gly	Ile Lys Tyr Val
85	90	95	
Ile Gly His Leu	Cys Ser Ser Ser	Thr Gln Pro Ala	Ser Asp Ile Tyr
100	105	110	
Glu Asp Glu Gly	Ile Leu Met Ile	Ser Pro Gly Ala	Thr Asn Pro Glu
115	120	125	
Leu Thr Gln Arg	Gly Tyr Gln His	Ile Met Arg Thr	Ala Gly Leu Asp
130	135	140	
Ser Ser Gln Gly	Pro Thr Ala Ala	Lys Tyr Ile Leu	Glu Thr Val Lys

145	150	155	160
Pro Gln Arg Ile	Ala Ile Ile His	Asp Lys Gln Gln	Tyr Gly Glu Gly
165	170	175	
Leu Ala Arg Ser	Val Gln Asp Gly	Leu Lys Ala Ala	Asn Ala Asn Val
180	185	190	
Val Phe Phe Asp	Gly Ile Thr Ala	Gly Glu Lys Asp	Phe Ser Ala Leu
195	200	205	
Ile Ala Arg Leu	Lys Lys Glu Asn	Ile Asp Phe Val	Tyr Tyr Gly Gly

210 215 220
 Tyr Tyr Pro Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu
 245 250 255
 Ser Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu
 275 280 285
 Lys Ala Asp Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr

 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp
 305 310 315 320
 Glu Pro Leu Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr
 325 330 335
 Val Ile Gly Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe
 340 345 350
 Asp Phe Gly Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala
 355 360 365

 Lys