(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월01일
(11) 등록번호 10-1525230
(24) 등록일자 2015년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) *C07H 15/04* (2006.01)
C07H 15/20 (2006.01) *C12P 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0062733
(22) 출원일자 2013년05월31일
심사청구일자 2013년05월31일
(65) 공개번호 10-2014-0141228
(43) 공개일자 2014년12월10일
(56) 선행기술조사문헌
Biotechnology Advances. 2012, Vol.30, pp.1268-1278*
KR100914525 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 진켐
대전광역시 유성구 가정북로 26-69 (장동)
(72) 발명자
우진석
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 509동 1602호 (전민동, 엑스포아파트)
김병기
서울특별시 서초구 서초중앙로 188, C동 2202호 (서초동, 아크로비스타)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 한지혜

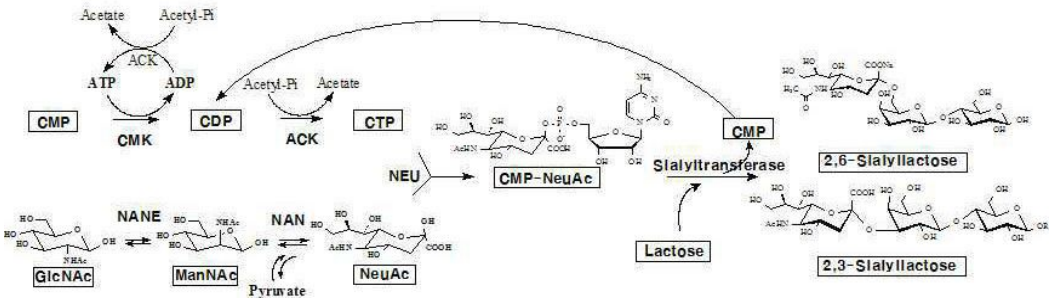
(54) 발명의 명칭 **시알산 유도체의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 하나의 반응기 내에서, N-아세틸-D-글루코사민을 이용하여 CMP-N-아세틸뉴라민산을 제조하는 공정과 갈락토오스 또는 갈락토오스 유도체에 시알산을 결합시키는 시알산(뉴라민산) 유도체를 제조하는 공정을 함께 수행하는 것을 특징으로 하는 시알산 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 고가의 시티딘 5'-일인산(CMP)을 반응용기 내에서 재활용할 수 있어, 반응에 투입되는 시티딘 5'-일인산(CMP)양을 줄이고, 저가의 N-아세틸-D-글루코사민과 피루브산을 기질로 하여, 시알산 유도체를 제조할 수 있으며, 높은 활성을 가지는 시알산 전이효소 변이체를 이용하여 보다 고효율로 시알산 유도체를 제조할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도



(72) 발명자

김대희

대전 서구 대덕대로 150, 106동 907호 (갈마동, 큰마을아파트)

최윤희

서울특별시 양천구 오목로 30, 401호 (신월동, 세진아파트)

송재경

충청남도 아산시 신창면 온천대로 725

강선엽

대전광역시 유성구 송강로42번길 61, 309동 511호 (송강동, 송강청솔아파트)

서원민

대전광역시 서구 둔산로 15, 108동 804호 (둔산동, 향촌아파트)

양지영

대전광역시 중구 계백로1615번길 34, 102동 606호 (유천동, 현대아파트)

이상미

대전광역시 동구 백룡로5번길 187-3 (자양동)

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 시알산 유도체의 제조방법:

(a) 단일반응 용기에서, 시티딘 5'-일인산(CMP), 아세틸 포스페이트(Acetyl phosphate), NTP(Nucleotide triphosphate), N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc), 피루브산(Sodium pyruvate) 및 갈락토오스 잔기를 포함하는 화합물을 기질로 첨가하고, 서열번호 1의 α-2,3 시알산 전이효소에서 313번째 R이 N, H, T 또는 Y로 치환 되거나 265번째 T가 N 또는 S로 치환된 α-2,3 시알산 전이효소 변이체 또는 서열번호 13의 α-2,6 시알산 전이효소에서 411번째 I가 T로 치환 되거나, 433번째 L이 S 또는 T로 치환된 α-2,6 시알산 전이효소 변이체와 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU), N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE) 및 N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN)를 첨가한 반응액을 반응시켜 시알릴락토오스 또는 갈락토오스 잔기를 포함하는 화합물의 시알산 유도체를 제조하는 단계; 및

(b) 상기 제조된 시알릴락토오스 또는 갈락토오스 잔기를 포함하는 화합물의 시알산 유도체를 수득하는 단계.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 α-2,3 시알산 전이효소는 서열번호 2~6 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 α-2,6 시알산 전이효소는 서열번호 14~18 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 반응은 25~38℃에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 반응액의 pH는 7~9인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase)는 서열번호 25의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 갈락토오스 잔기를 포함하는 화합물은 단당, 올리고당, 링커, 플라보노이드, 항암제, 항생제, 면역억제제 및 항체로 구성되는 군에서 선택되는 화합물의 갈락토오스 유도체인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 하나의 반응기 내에서, N-아세틸-D-글루코사민(N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc)으로부터 CMP-N-아세틸뉴라민산(CMP-NeuAc)을 제조하는 공정과 락토오스 등 갈락토오스를 포함하는 유도체에 시알산을 결합시키는 시알산(뉴라민산) 유도체를 제조하는 공정을 함께 수행하고 높은 활성을 가지는 시알산전이효소 변이체를 사용하는 것을 특징으로 하는 시알산 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 당(sugar)은 자연계에서 가장 넓고 풍부하게 존재하는 생체분자 중에 하나이며, 세포에서 인식 및 신호전달에 관여하는 가장 일반적인 분자이다. 대부분의 당 구성단위는 핵산에 의해서 활성화될 때 aglycon에 부가될 수 있다. 핵산당(nucleotide-sugar)은 단당류들의 활성화된 형태이며, 당전이 효소(glycosyltransferase)에 의한 당전이 반응에서 공여체로써 역할을 한다. 그러나 당전이는 아직까지 당전이 효소의 반응성이 약하고, 활성화된 glycan 구성단위들의 활용이 제한적인 점 등의 문제점을 가지고 있다.

[0003] 최근, 당쇄에 관한 구조 및 기능에 관한 연구가 급속하게 진행되어 생리 활성을 갖는 올리고당, 당 지질, 당 단백질 등의 의약품 또는 기능성 소재로서의 용도 개발이 활발히 이루어지고 있다. 그 중, 말단에 N-아세틸뉴라민산(NeuAc)을 함유하는 시알산 함유 당쇄는 세포 접착이나 바이러스 감염시 수용체가 되는 등 중요한 기능을 갖는 당쇄이다.

[0004] 시알산 함유 당쇄는 일반적으로 시알산 전이효소의 촉매작용에 의해 합성된다. 시알산 전이효소는 CMP-N-아세틸뉴라민산을 당 공급체로 하여 당쇄 등의 수용체에 시알산을 전달하는 효소이다. 그러나, 당 공급체로서 사용하는 CMP-N-아세틸뉴라민산은 매우 비싸고 양적으로도 시약 수준의 적은 양으로밖에 공급되지 않는 것이 현실이다.

[0005] CMP-N-아세틸뉴라민산의 제조방법으로는 시티딘 5'-삼인산(CTP)과 N-아세틸뉴라민산(NeuAc)을 기질로 하여 CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제 (synthetase)의 촉매에 의해 합성하는 방법이 알려져 있으나, 원료가 되는 CTP 및 NeuAc가 고가이기 때문에 직접 원료로 하여 합성된 CMP-N-아세틸뉴라민산도 고가일 수 밖에 없다.

[0006] CMP-N-아세틸뉴라민산(CMP-N-acetylneuraminic acid, CMP-NeuAc)의 생산방법으로는 (1) N-아세틸뉴라민산 리아제 (lyase)또는 N-아세틸뉴라민산 신타아제를 사용하여 N-아세틸-D-만노사민(N-acetyl-D-mannosamine, ManNAc)으로부터 제조하는 방법(*J. Am. Chem. Soc.*, 110:6481, 1988; *J. Am. Chem. Soc.*, 110:7159, 1988; 일본공개특허 평 제10-4961호), (2) 알칼리 조건하에서 N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc)을 N-아세틸-D-만노사민(ManNAc)으로 변환시키고, 여기에 N-아세틸뉴라민산 리아제 또는 N-아세틸뉴라민산 신타아제를 첨가하여 N-아세틸뉴라민산(NeuAc)을 제조하는 방법(일본공개특허 평 제5-211884호; *Biotechnol. Bioeng.*, 66:2, 1999; *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 1997), (3) GlcNAc에서 ManNAc로의 변환을 촉매하는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 2-에피머라아제 (epimerase)와 N-아세틸뉴라민산 리아제 또는 N-아세틸뉴라민산 신타아제를 사용하여 N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc)로부터 N-아세틸뉴라민산(NeuAc)을 제조하는 방법 (WO 95/26399; 일본공개특허 평3-180190호; 일본공개특허 2001-136982호), (4) 대장균과 효모 균체를 이용하여 CMP-N-아세틸뉴라민산을 합성하는 방법(WO 2004/009830) 등이 보고되고 있다.

[0007] 그러나, (1)의 방법은 원료인 N-아세틸-D-만노사민(ManNAc)이 고가이고, (2)의 방법은 저렴한 N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc)을 원료로 하는 방법이기는 하지만, GlcNAc과 N-아세틸-D-만노사민(ManNAc)의 혼합물에서 ManNAc를 정제하는 공정이 복잡하다는 문제가 있다. 또한, (3)의 방법에서 사용하는 GlcNAc2-에피머라아제는 ATP(아데노신 트리 포스페이트)가 필요하기 때문에 고가의 ATP를 첨가하거나, 미생물을 사용하여 ATP의 전구체인 아데닌에서 ATP를 생성시켜야 한다는 단점이 있고, (4)의 방법은 대장균과 효모 균체를 이용하는 방법이 공정상 복잡하다는 문제가 있다.

[0008] 대한민국공개특허 제10-2006-0010706호에서는 CMP-N-아세틸뉴라민산의 제조방법으로, N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제를 코딩하는 유전자 및 N-아세틸뉴라민산 알도라제를 코딩하는 유전자를 포함하는 공발현 벡터가 도입된 형질전환체에 시티딘 5'-일인산(CMP), N-아세틸-D-글루코사민, 피루브산(Sodium pyruvate) 및 효모를 첨가하여 뉴라민산을 합성한 후, CMP-N-아세틸뉴라민산 합성효소를 첨가하거나, N-아세틸뉴라민산 알도라제를 코딩하는 유전자 및 CMP-N-아세틸뉴라민산 합성효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 공발현 벡터가 도입된 형질전환체에 시티딘 5'-일인산(CMP), N-아세틸-D-글루코사민, 피루브산 및 효모를 첨가하여 CMP-N-아세틸뉴라민산을 제조하는 방법을 개시하고 있으나, CMP-N-아세틸뉴라민산을 제조하는데 있어 여러 단계를 거쳐야 하고, 기질로 사용되는 시티딘 5'-일인산(CMP)이 시티딘 5'-삼인산(CTP)로 전환되는 수율이 낮은 문제점이 있었다.

[0009] 당단백질, 당지질에 시알릴올리고당들과 푸코스(fucose)당이 포함된 glycan 들은 생물학적 과정에서 여러 가지로 매우 중요한 역할을 한다.

[0010] 그러나, 종래 알려진 시알산과 생리활성물질 유도체들을 결합시키는 반응은 고가의 CMP-N-아세틸뉴라민산을 출발물질로하여, 시알산 전이효소(Sialyltransferase)에 의하여 제조되고, 제조효율 또한 낮은 단점이 있었으며, N-아세틸-D-글루코사민을 출발물질로 하여, 시알산 유도체를 제조한 기술도 존재하였으나, 시알산 전이효소의 활성범위와 활성이 떨어져 시알산 유도체의 제조효율이 낮은 단점이 있었다(김대희, 선문대학교 대학원 이학박사학위논문, 2011).

[0011] 이에, 본 발명자들은 보다 경제적이면서도 높은 효율로 생리활성물질의 시알산 유도체를 제조하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, N-아세틸-D-글루코사민과 시티딘 5'-일인산(CMP)를 출발물질로하여, CMP-N-아세틸뉴라민산을 제조하는 단계와 CMP-N-아세틸뉴라민산으로부터 시알산과 결합한 생리활성물질 유도체를 제조하는 단계를 시알산 전이효소 변이주를 이용하여, 단일 반응용기에서 수행하는 경우, 고가원료인 시티딘 5'-일인산(CMP)의 재활용이 가능하고, 높은 수율로 생리활성 물질의 시알산 유도체를 제조할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 높은 수율과 낮은 단가로 시알산 유도체를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 단일반응 용기에서, 시티딘 5'-일인산(Cytidine 5'-monophosphate, CMP) , NTP(Nucleotide triphosphate), 피루브산(Sodium pyruvate), 갈락토오스 잔기를 포함하는 화합물을 기질로 첨가하고, 서열번호 1의 α-2,3 시알산 전이효소에서 313번째 R이 N, H, T 또는 Y로 치환되거나 265번째 T가 N 또는 S로 치환된 α-2,3 시알산 전이효소 변이체 또는 서열번호 13의 α-2,6 시알산 전이효소에서 411번째 I가 T로 치환 되거나, 433번째 L이 S 또는 T로 치환된 α-2,6 시알산 전이효소 변이체와 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), CMP-N-아세틸뉴라민산 합성 효소(CMP-NeuAc synthetase, NEU), N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE) 및 N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN)를 첨가한 반응액을 반응시켜 시알릴락토오스(Sialyllactose) 또는 갈락토오스 잔기를 포함하는 화합물의 시알산 유도체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0014] (b) 상기 제조된 시알릴락토오스 또는 갈락토오스 잔기를 포함하는 화합물의 시알산 유도체를 수득하는 단계를 포함하는 시알산 유도체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면, 고가의 시티딘 5'-일인산(CMP)를 반응용기 내에서 재활용할 수 있어, 반응에 투입되는 시티딘 5'-일인산(CMP)양을 줄이고, 저가의 N-아세틸-D-글루코사민과 피루브산을 기질로 하여, 시알산 유도체를 제조할 수 있으며, 높은 활성을 가지는 시알산 전이효소 변이체를 이용하여 보다 고효율로 시알산 유도체를 제조

할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명에 따른 원팟 (One-pot, 일체형 회분식) 반응으로 2,3-시알릴락토오스 및 2,6-시알릴락토오스를 제조하는 합성과정을 나타낸 것이다.

도 2는 2,3 시알산 전이효소 변이체의 2,6 시알산 전이 부반응을 확인한 것으로, (a)는 pH4.5 ~6.0의 조건에서의 결과를 나타낸 것이고, (b)는 pH6.5~7.0의 조건에서의 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 원팟 반응으로 합성된 2,3-시알릴락토오스를 LC와 Mass로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 원팟 반응으로 합성된 2,6-시알릴락토오스를 LC와 Mass로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 원팟 반응으로 시알릴갈락토오스를 제조하는 합성과정을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 원팟 반응으로 합성된 시알릴갈락토오스를 TLC 및 Mass로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 락토오스와 결합된 링커의 시알산 유도체 합성과정을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 원팟 반응으로 합성된 락토오스와 결합된 링커의 시알산 유도체(aminohexyl linker 2,3-sialyllactose)를 TLC 및 Mass로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 플라보노이드 CSH-I-54의 갈락토오스 잔기를 포함하는 유도체의 시알산 유도체의 합성과정을 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 원팟 반응으로 합성된 2,3-시알릴락토오스-CSH-I-54를 LC 및 Mass로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 면역억제제 타크로리무스 (tacrolimus) 갈락토오스 유도체의 시알산 유도체의 합성과정을 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 원팟 반응으로 합성된 2,3-시알릴락토오스-타크로리무스를 LC 및 Mass로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 항암제 탁솔 (taxol) 갈락토오스 유도체의 시알산 유도체의 합성과정을 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 원팟 반응으로 합성된 2,3-시알릴락토오스-탁솔을 LC 및 Mass로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 항생제 반코마이신 (vancomycin) 유도체의 시알산 유도체의 합성과정을 나타낸 것이다.

도 16a는 본 발명의 원팟 반응으로 합성된 2,3-시알릴락토오스-반코마이신을 LC로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 16b는 본 발명의 원팟 반응으로 합성된 2,3-시알릴락토오스-반코마이신을 Mass로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 (a) 시티딘 5'-일인산(CMP), 아세틸 포스페이트, NTP(Nucleotide triphosphate), N-아세틸-D-글루코사민, 피루브산 및 갈락토오스 또는 갈락토오스 잔기를 포함하는 화합을 기질로 첨가하고, 서열번호 1의 α-2,3 시알산 전이효소에서 313번째 R이 N, H, T 또는 Y로 치환 되거나 265번째 T가 N 또는 S로 치환된 α-2,3 시알산 전이효소 변이체 또는 서열번호 13의 α-2,6 시알산 전이효소에서 411번째 I가 T로 치환 되거나, 433번째 L이 S 또는 T로 치환된 α-2,6 시알산 전이효소 변이체와 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU), N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE) 및 N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN)를 첨가한 반응액을 반응시켜 시알릴락토오스 또는 갈락토오스 잔기를 포함하는 화합물의 시알산 유도체를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 제조된 시알릴락토오스 또는 갈락토오스 잔기를 포함하는 화합물의 시알산 유도체를 수득하는 단계를 포함하는 시알산 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

[0018] 본 발명의 시알산 유도체의 제조방법은 하나의 반응기 내에서, N-아세틸-D-글루코사민으로부터 CMP-N-아세틸뉴라민산을 제조하는 공정과 갈락토오스를 포함하는 유도체에 시알산을 결합시키는 시알산(뉴라민산) 유도체를 제조하는 공정을 함께 수행하여, 고가의 기질인 시티딘 5'-일인산(CMP)를 재활용할 수 있으면서, 높은 수율로 시알산 유도체를 제조할 수 있는 기술이다.

[0019] 종래 시알산 유도체의 제조방법은 CMP-N-아세틸뉴라민산을 출발물질로 하여, 시알산 전이효소(sialyltransferase)에 의해 락토오스 또는 갈락토오스를 포함하는 유도체에 시알산을 결합시키는 공정이었으나, CMP-N-아세틸뉴라민산이 매우 고가의 물질이므로, 시알산 유도체 생산에 많은 비용이 소요되었다.

[0020] 본 발명자들은 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 박테로이드 프라질리스 NCTC 9343(Bacteroides fragilis NCTC 9343)유래 신규 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제 효소를 이용하여, 시티딘 5'-일인산(CMP) 및 극소량의 NTP와 여러 기질과 효소를 사용하여, 고수율로 CMP-N-아세틸뉴라민산을 제조하는 방법을 개발한 바 있다(대한민국 등록특허 제0888513호).

[0021] CMP-N-아세틸뉴라민산과 락토오스를 시알산 전이효소와 반응시키면, 락토오스에 시알산이 전이되면서, 시알릴락토오스와 시티딘 5'-일인산(CMP)가 생성되게 된다. 종래의 시알릴락토오스 제조공정에서는 시티딘 5'-일인산(CMP)를 기질로 하여 CMP-N-아세틸뉴라민산을 제조하는 공정과 시알산 전이 공정이 다른 용기에서 진행되어, 상기 생성되는 시티딘 5'-일인산(CMP)를 재활용할 수 가 없었다.

[0022] 본 발명에서는 시티딘 5'-일인산(CMP)로부터 CMP-N-아세틸뉴라민산이 제조되는 반응과 CMP-N-아세틸뉴라민산과 락토오스 등과 같은 갈락토오스를 포함하는 유도체에 시알산 전이효소에 의하여 시알산 유도체와 시티딘 5'-일인산(CMP)가 생성되는 반응이 동일한 반응용기에서 수행되므로, 시알산 전이 반응에 의해 생성된 시티딘 5'-일인산(CMP)를 CMP-N-아세틸뉴라민산 제조 반응에 재활용할 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 단일용기에서의 2,3-시알릴락토오스 및 2,6-시알릴락토오스를 제조하는 합성과정을 도 1에 나타내었다.

[0024] 본 발명의 일 양태에서, 시알릴락토오스(sialyllactose)는 *in vitro*에서 저렴한 기질인 N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc), 피루브산(Sodium pyruvate), 시티딘 5'-일인산(CMP) 등으로부터 원팟 반응으로 생산한다. 7.5mM/hr~8.5mM/hr의 CMP-N-아세틸뉴라민산 생성 속도하에서 시알릴락토오스의 전환율은 시티딘 5'-일인산(CMP) 기준으로 650%이고 N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc)로부터 81%이다. 98% 이상의 순도를 가지는 시알릴락토오스의 정제 수율은 75%이다. *In situ*의 시티딘 5'-일인산(CMP) 재사용 시스템에 의한 시알릴락토오스 생산은 세포 추출액 효소를 이용하여 성공적으로 수행되었다.

[0025] 본 발명의 다른 양태에서는 본 발명에 따른 원팟 시알릴락토오스 생산방법과 기존의 투팟(two-pot) 시알릴락토오스 제조방법을 비교한 결과, 본 발명의 원팟 시알릴락토오스 생산방법이, 첨가하는 시티딘 5'-일인산(CMP)의 농도가 1/5로 줄어도, 생산되는 시알릴락토오스의 량은 2배 증가하는 것을 확인하였다(표 4 참조).

[0026] 본 발명에서, 시알산 전이효소(Sialyltransferase)는 2,3-시알산 전이효소, 2,6-시알산 전이효소 또는 2,8-시알산 전이효소를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 2,3-시알산 전이효소 또는 2,6-시알산 전이효소를 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명은 CMP-N-아세틸뉴라민산이 제조되는 반응에 관여하는 효소인 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU) 및 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE)과 동일한 활성 조건에서도 높은 활성을 나타내는 시알산 전이효소(Sialyltransferase)를 개발하기 위하여, 파스텔라 멀토시다(*Pasteurella multocida*) 유래의 2,3-시알산 전이효소와 포토박테리움 담셀라(*Photobacterium damselae*) 균주 유래의 2,6-시알산 전이효소를 변이시켜, 상기 다른 효소들과 동일 조건에서 높은 활성을 가지는 변이효소를 개발하였다.

[0028] 따라서 본 발명의 2,3-시알산 전이효소는 서열번호 2~6 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 2,3-시알산 전이효소의 변이효소인 것을 특징으로 할 수 있고, 본 발명의 2,6-시알산 전이효소는 서열번호 14~18 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 2,6-시알산 전이효소의 변이효소인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명의 시알산 유도체의 제조반응은 반응에 관여하는 각 효소의 활성온도를 감안하여 25~38℃에서 수행하는 것이 바람직하며, 반응에 관여하는 각 효소의 활성 pH를 감안하여, pH 7~9에서 수행하는 것이 바람직하다.

[0030] 본 발명에서, N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE)는 박테로이드 프라질리스 NCTC 9343(Bacteroides fragilis NCTC 9343)유래 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제 효소인 서열번호 25의 아미노산 서열을 가지는 효소를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에서, 갈락토오스 잔기를 포함하는 화합물은 단당, 올리고당, 링커, 플라보노이드, 항암제, 항생제, 면역억제제 및 항체로 구성되는 군에서 선택되는 화합물의 갈락토오스를 포함하는 유도체인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에서, 상기 단당은 글루코오스, N-아세틸-D-글루코사민, 만노스 등일 수 있으며, 상기 링커는 에스테르 또는 아마이드 결합을 활용하여 연결할 수 있는 관능기일 수 있으며, 예를 들면, 포밀(Formyl), 아세틸기, 프로피오닐(propionyl)기, 부틸기, 아크릴기, 에틸석시닐(ethylsuccinyl)기, 석시닐(succinyl)기, 아미노헥실(aminohexyl)기 등을 연결할 수 있는 링커를 의미한다.

[0033] 본 발명에 이용된 2,6-시알산 전이효소의 변이주는 포토박테리움 담셀라 (*Photobacterium damselae*) 균주에서 유래하며 당전이 효소의 구조 접힘과 서열로 볼때 파스테우렐라에서 유래한 2,3-시알산 전이효소와 같은 GT family 80에 속한다. 포토박테리움 유래의 2,6-시알산 전이효소의 경우에도 최근 2,6 시알릴다아제와 시알릴트랜스퍼라아제의 활성이 밝혀졌으나 이러한 부반응의 활성이 2,6-시알산 전이의 활성보다 매우 미미하기 때문에 (150배 이상) 시알산 전이의 활성이 대부분이라 볼 수 있다. 2,6-시알산 전이효소의 경우 부반응이 거의 없고 2,6-시알산 전이의 활성이 대부분이며 기질 특이성이 다양하다는 장점을 가진 반면, 효소 활성의 차이가 파스테우렐라 유래의 2,3-시알산 전이효소보다 5-6배 이상 낮은 단점을 가지고 있다.

[0034] 2,3 및 2,6 결합을 가지는 다양한 시알릴올리고당의 생산 효율을 증가시키기 위해서는 위에서 명시한 기질특이성이 다양한 2,3 및 2,6-시알산 전이효소의 기능이 향상된 변이주를 생성하고 이들을 시알릴올리고당 생산에 응용할 필요가 있다.

[0035] 시알산 전이효소의 시알산 공여체인 CMP-N-아세틸뉴라민산의 다섯 가지 효소에 의한 생합성은 중성 pH에서 최적의 생산성을 나타내는 반면, 2,3-전이효소에 의한 시알산 전이 반응은 pH 8 내지 9에서 최적의 반응성을 나타낸다. 이는 2,3-시알산 전이효소가 넓은 범위의 pH내에서 활성을 나타내지만 중성 pH 이하에서 부반응을 나타내는 다기능적 특성에 기인한다. 중성 pH이하에서는 2,3-시알산 전이효소에 의해 2,6-시알릴락토오스가 부가적으로 생성되기 때문에 기존의 반응에서는 중성 pH에서 CMP-N-아세틸뉴라민산을 생산하고 완충용액을 pH 8내지 9로 전환하는 단계를 거쳐 2,3-시알산 전이효소를 적용하는 2단계의 반응을 수행하였다. 따라서 2,3-시알산 전이효소의 경우 부반응의 생성을 억제함으로써 회분식 일체형 반응을 가능케 하고 촉매반응을 빠르게 하여 2,3-시알릴락토오스를 포함한 다양한 2,3-시알릴유도체의 생산성 및 효율을 향상시킬 수 있다.

[0036] 본 발명에서는 시알산 전이효소의 변이주를 생성하기 위하여, 하이브리드(hybrid) 즉, 세미-래셔널(semi-rational) 방법을 사용하였다. 이 방법은 방향성 진화 (directed evolution)와 논리적 예측 (rational design) 방법을 결합한 것으로서 양질의 적은 수의 변이주 라이브러리만을 확보하고자 하기 위함이다. 이 방법은 단백질의 목적이 되는 부분을 분석하고 단백질의 서열, 구조와 기능 및 컴퓨터 프로그램을 이용하여 특정 아미노산의 잔기를 선택하여 변이를 수행하는 것을 말한다.

[0037] 본 발명에서, 시알산 전이효소는 를루아르 당전이 효소로서, CMP-N-아세틸뉴라민산으로부터 N-아세틸뉴라민산을 수용체 당물질에 전이하는 효소를 의미한다. 수용체 기질 중 하나인, 락토오스는 Galβ1,4Glc (갈락토오스와 글루코오스가 β1,4 결합으로 연결됨)로 구성된 올리고당이다.

[0038] 2,3- 및 2,6-시알릴올리고당은 N-아세틸뉴라민산 (시알산)이 갈락토오스 부분에 a2,3 또는 a2,6 결합으로 연결된 올리고당을 의미하며, 갈락토오스 또는 글루코오스에 다른 당이 더 결합할 수 있다. 2,3- 및 2,6-시알릴락토오스는 Neu5Aca2,3/2,6Galβ,4Glc (시알산이 락토오스의 갈락토오스에 α2,3 또는 α2,6 결합으로 연결됨)로 구성된 삼탄당 (triose) 물질을 의미한다.

[0039] 본 발명에서, 전세포 반응은 특정 효소를 포함하는 세포를 파쇄하여 세포 내용물을 이용하거나 또는 효소를 분리정제하지 않고 온전한 세포 전체를 이용한 반응을 의미하며, 본 발명의 반응은 전세포반응으로 수행할 수도 있고, 정제된 각각의 효소를 독립적으로 첨가하여 수행할 수 있으며, 각각의 효소를 정제하여 비드형태로 고정하여 수행할 수도 있다.

[0040] 본 발명에서, 위치지정 돌연변이 (site directed mutagenesis)는 유전자의 지정된 위치에 지정된 염기배열의 변화를 도입하는 것을 말하며, 포화 변이 (saturation mutagenesis)는 유전자의 지정된 위치에 다양한 염기배열의

변화를 도입하는 것을 말한다. 포화 변이는 주형가닥에 결합하는 상보적인 서열의 프라이머 (primer)상에 변이시키고자 하는 서열대신 NNK 코돈 (codon)을 삽입하여 PCR을 통해 변이를 삽입시키는 것을 말한다. 이 때, NNK 코돈에서 N은 뉴클레오디드의 A, T, G, C를 의미하며 K는 T, G를 의미한다.

[0041] 벡터는 단일가닥, 이중가닥, 원형 또는 초나선 DNA 또는 RNA로 이루어진 폴리뉴클레오티드를 의미하며, 재조합 단백질을 생산할 수 있도록 적절한 거리에 작동적으로 연결되어 있는 구성요소들을 포함할 수 있다.

[0042] 이러한 구성요소에는 복제 오리진, 프로모터, 인핸서, 5' mRNA 리더 서열, 리보솜 결합부위, 핵산 카세트, 종결 및 폴리아데닐화 부위, 또는 선별 가능한 표지 서식 등이 포함될 수 있으며, 상기 구성요소들은 특이적인 용도에 따라 하나 또는 그 이상이 빠질 수도 있다. 핵산 카세트는 발현할 재조합 단백질의 삽입을 위한 제한효소 부위를 포함할 수 있다. 기능적 벡터에 있어서, 핵산 카세트는 번역 개시 및 종결 부위를 포함하는 발현될 핵산 서열을 함유하며, 필요에 따라 벡터에 내에 두 종류의 카세트를 삽입할 수 있는 벡터를 사용하기도 하며 상기 언급한 기능들이 부가적으로 서열화 될 수 있다.

[0043] 재조합 벡터에 삽입된 유전자는 발현용 대장균 균주 BW25113(DE3), BL21(DE3) 등을 사용할 수 있으나, 삽입된 벡터의 종류에 따라 달라질 수 있다. 이러한 벡터 및 발현 균주는 당업자라면 용이하게 선택할 수 있다.

[0044] 본 발명의 다른 양태에서는 락토오스 유도체로, LacNAc를 사용하여, Lewis X을 성공적으로 얻을 수 있었다. 본 발명에 따르면 sialyl Lewis X(SLeX)와 같은 다양한 기능성 올리고당들을 생산할 수 있다.

[0045] 본 발명의 또 다른 양태에서는 시알릴 반코마이신(vancomycin) 유도체들을 합성하기 위하여 β1,4-GalT와 α2,3-SiaT 2개의 당전이 효소을 이용한 효소적인 접근방법을 사용하였고, 반코마이신과 반코마이신 유사체(pseudo-vancomycin)의 글루코오스(glucose) 부분에 갈락토오스(galactose)와 시알산의 결합을 증명하였다. 게다가 MIC 시험 결과 갈락토오스를 포함한 유도체들의 MRSA와 VSEF에 대한 항생제 활성은 갈락토오스/시알산을 포한한 유도체보다 같거나 높았다. 본 발명에 따른 느슨한 기질 특이성을 가지는 전이효소는 다른 glycopeptide 항생제들이나 polyketide와 nonribosomal peptide 같은 당이 결합된 자연계의 작은 분자들의 시알릴레이션(sialylation)에 적용할 수 있다.

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0047] **실시예 1: 시알산전이효소의 변이주의 제조**

[0048] 본 발명에서 사용되는 2,3-시알산 전이효소는 결정구조로부터 기질 결합 포켓부분을 확인하였으며, 2,6-시알산 전이효소는 다른 포토박테리움 유래의 2,6-시알산 전이효소의 결정구조를 주형으로 한 모델구조로부터 기질 결합 부분을 확인하였다. CMP-N-아세틸뉴라민산과 수용체 기질로부터 5 내지 20 Å이내에 위치하는 잔기들을 각각의 2,3-시알산 전이효소와 2,6-시알산 전이효소로부터 선택하였다.

[0049] 본 발명에서 사용한 야생형 2,3-Sialyltransferase는 *Pasteurella multosida* (ATCC15742)유래이고, 야생형 2,6-Sialyltransferase는 *Photobacterium damselae* (ATCC29690) 유래이다.

[0050] 본 발명에서는 생물정보학의 서열정보를 이용한 다수서열정렬 (multiple sequence alignment)을 수행하였고 단백질 구조 내에 특정 위치의 아미노산 잔기를 보존하고 있는 것은 변이 잔기로서 배제하였다. 기질 결합 잔기들 중에서 위에서 선택된 잔기들 중, 포화변이를 수행할 기능적 잔기 (functional residues)를 선택하기 위해서 알라닌으로 위치지정 돌연변이를 수행하였다. 알라닌으로의 치환은 잔기가 제거된 것과 같이, 특정 잔기가 기질과의 작용으로 인해 중요한 촉매 활성에 기여를 하는지의 여부를 해석할 수 있다. 알라닌으로 치환 이후에 효소활성을 비색법으로 측정하여 야생주와의 활성의 차이를 비교하였다.

[0051] 또한 본 발명에서는 야생주와 비교하여 발현된 단백질의 접힘 (folding) 정도를 유지하는 알라닌 치환 변이주를 선택하였다. 결론적으로 각 2,3 및 2,6-시알산 전이효소의 알라닌 치환변이주 중에서 야생주에 비해 30% 이상, 바람직하게는 50% 이상, 더욱 바람직하게는 60% 이상의 활성을 나타내고 단백질의 폴딩을 유지하는 잔기를 다음 단계인 포화 변이를 수행할 기능적 잔기로 선택하였다.

[0052] 촉매반응에 있어서 기질과의 상호작용에 필수적으로 기여하는, 즉 시알산 전이의 주된 활성에 기여하는 잔기들

은 그대로 두고, 효소의 폴딩 및 본래 활성을 유지하는 알라닌 치환 변이주의 잔기에 포화변이를 수행함으로써 효소의 '중립적 움직임' (neutral drift)을 유도하여, 포화변이를 통해서 야생주보다 기질에 더욱 적절하게 맞는 활성형의 효소-기질 복합체를 생성시킬 수 있다.

[0053] **1-1: 시알산 전이효소의 기능적 잔기에 대한 포화 변이 수행 및 변이주 탐색**

[0054] 2,3-시알산 전이효소의 아미노산 위치 313 및 265에 해당하는 AGA 및 ACC서열을 랜덤하게 치환한 NNK 서열(N은 A, C, G 또는 T이고, K는 G 또는 T인 서열)이 도입된 프라이머를 이용하여 벡터전체를 PCR하여 라이브러리를 구축하였다. 본 발명의 2,3-시알산 전이효소는 N 말단에 24개의 아미노산이 제거된 형태이기 때문에 첫 메티오닌 서열부터 25번째가 메티오닌이 된다.

[0055] 2,6-시알산 전이효소의 아미노산 위치 411 및 433에 해당하는 ATT 및 CTG서열을 랜덤하게 치환한 NNK 서열 (N은 A, C, G 또는 T이고, K는 G 또는 T인 서열)이 도입된 프라이머를 이용하여 벡터 전체를 PCR하여 라이브러리를 구축하였다. 본 발명의 2,6-시알산 전이효소는 첫 메티오닌 서열부터 헤아릴 경우 메티오닌이 1번이 된다. 벡터 서열을 포함한 시알산 전이효소의 증폭된 유전자는 본래의 플라스미드를 제거하기 위해 Dpn효소 처리 후, 대장균 DH5a에 형질전환 시켰다. 발생된 모든 콜로니로부터 변이 유전자를 추출하여 이를 대장균 BW25113 (DE3)에 형질전환 하였다. 형질전환된 각각의 콜로니를 96-정 상에서 암피실린이 포함된 LB 배지 500㎕에 접종하여 30 내지 37에서 18내지 24시간 동안 진탕 배양 후, 배양액 일부를 100 ㎍ mL^{-1} 암피실린과 IPTG가 포함된 새로운 LB 배지 500㎕에 접종하여 18 내지 30℃에서 18 내지 40 시간을 배양하였다. 배양된 세포들은 원심분리 후, 세포를 1 내지 10 mM 트리스 완충용액 100㎕에 재부유 시킨 다음 이 중 10 ㎕의 전세포를 변이주 탐색반응에 사용하거나 또는 세포를 50㎕의 버그부스터(BugBuster) 단백질 추출 시약으로 재부유시켜 원심분리 후에 세포추출물을 얻어 이 중 10㎕를 변이주 탐색반응에 사용하였다. 90㎕의 반응 용액은 1 내지 10mM 트리스 완충용액, 1 내지 5mM CMP-N-아세틸뉴라민산과 락토오스, 0.1 내지 1mM pH 지시약을 포함하며 시알산 전이효소의 전세포 또는 세포 추출액 10㎕를 첨가함과 동시에 반응을 진행하여 1분의 시간간격으로 10-30 분간의 반응 속도를 야생주와 비교하여 관찰하였다.

[0056] 대장균 BW25113 (DE3)에 형질전환된 시알산 전이효소의 야생주 및 변이주는 50 mL의 배양 부피로 인듀서인 IPTG를 이용하여 발현 한 이후 Ni-NTA 컬럼을 이용하여 순수 단백질만을 정제하고, 고유 활성도 및 동역학 변수를 측정하였다.

[0057] 2,3 및 2,6-시알산 전이효소의 단일 아미노산 치환 변이주의 고유 활성도는 각각 동일한 양의 단백질을 사용하여 상기 pH 지시약을 이용한 효소 활성 분석 방법을 통해 분석하였으며, 반응은 5 내지 10 분간 진행하여 초기 수용체 기질 농도 대비 10 내지 25%의 전환 수율을 나타냈을 때의 효소 mg 당 활성 (unit)으로 계산하였으며, 이를 표 1에 나타내었다.

[0058] 2,3-시알산 전이효소의 선택된 기능적 잔기들에 대해 NNK 코돈을 사용하여 PCR을 통해 포화변이를 수행한 후, 변이주 라이브러리에 대해 pH 지시약을 이용한 비색법을 통해 스크리닝하였다. 야생주에 비해 시간에 따른 흡광도의 변화가 증가한 변이주를 1차적으로 탐색한 후, 이들 변이주들을 배양하여 수득한 세포추출물을 이용하여 초기반응 속도를 세포추출물의 부피 (mL)당 unit으로 계산하였다.

[0059] 2,3-시알산 전이효소 변이주의 경우, R313의 아르기닌은 락토오스의 글루코오스 근처의 루프(loop)상에 위치하고 있다. R313의 변이주들에 대해, 알라닌과 글리신과 같은 작은 크기 아미노산으로의 치환된 변이주는 야생주에 비해 중립적인 활성을 나타냈고 세린, 트레오닌, 티로신, 아스파르트산, 아스파라긴, 히스티딘과 같은 친수성 아미노산으로 치환된 변이주들은 야생주에 비해 1.5배 이상의 활성을 나타냈다.

[0060] CMP-N-아세틸뉴라민산의 20 Å 이내에 위치하는 T265 변이주에 대해서는 글리신, 세린, 아스파라긴으로 치환된 변이주가 야생주와 비슷하거나 높은 활성을 가진 것으로 탐색되었다.

[0061] R313 변이주에 대해 야생형 대비 상대적인 고유활성도를 비교한 결과, R313은 상대적으로 다양한 변이주들을 받아들일 수 있었으며, 그 중 R313N의 고유활성도가 야생주 대비 231%로서 단일 변이주 중 가장 높았다. 또한 T265 변이주에 대한 야생형 대비 상대적인 고유활성도를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0062] 2,3-및 2,6-시알산 전이효소 변이주의 활성도

효소 (α2,3PST)	Rel. Specific Ac (%)	효소 (α2,6PdST)	Rel. Specific Ac (%)
WT	100	WT	100
R313N	231	I411T	198
R313H	146	L433S	289
R313T	129	L433T	296
R313Y	125	I411T/L433S	194
R313D	108	I411T/L433T	510
T265N	126		
T265S	116		
T265G	94		
R313N/T265S	216		
R313H/T265S	237		

[0063] 반면, 2,6-시알산 전이효소의 선택된 기능적 잔기들에 대해서도 마찬가지로 NNK 코돈을 사용하여 PCR 을 통해 포화 변이 수행 이후, 변이주 라이브러리에 대해 pH 지시약을 이용한 비색법을 통해 스크리닝을 수행하였다. I411과 L433은 CMP-N-아세틸뉴라민산으로부터 5 내지 20 Å 거리 내에 위치하고 있다. L433의 변이주들 중에서 L433S와 L433T가 야생형 대비 3배의 증가된 활성을 나타냈다. I411의 변이주들 중에서는 I411T가 야생형 대비 2배의 활성을 나타내는 것으로 탐색되었다. 야생형 2,6-시알산 전이효소의 경우 pET15b벡터보다 pET28a벡터에서의 발현이 증가되는 바, 탐색된 변이주들들 pET28a벡터에 클로닝하여 이들의 고유활성도를 확인하였다(표 1).

[0064] **1-2: 2,3-시알산 전이효소의 시알산 전이효소의 변이주 특성 분석**

[0065] 본 발명에서 2,3-시알산 전이효소의 R313의 단일 아미노산 치환 변이주 R313N은 서열번호 2의 아미노산 서열을 나타내며 313 번째의 아미노산 위치에 친수성 아미노산 서열을 갖는 단백질이며, 서열번호 2의 단백질을 암호화하는 DNA는 서열번호 8이며 상기의 아미노산을 암호화하는 모든 DNA 서열 또한 포함할 수 있다.

[0066] 또한, R313H은 서열번호 3의 아미노산 서열을 나타내며 313번째의 아미노산 위치에 친수성 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 이 변이체 서열이 포함된 97% 이상의 상동성을 가지고 시알산 전이의 활성을 가지는 효소도 모두 가능하다. 서열번호 3의 단백질을 암호화 하는 DNA는 서열번호 9이며 상기의 아미노산을 암호화하는 모든 DNA 서열 또한 포함될 수 있다.

[0067] 또한, T265S는 서열번호 4의 아미노산 서열을 나타내며 265번째의 아미노산 위치에 친수성 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 이 변이체 서열이 포함된 97% 이상의 상동성을 가지고 시알산 전이의 활성을 가지는 효소도 모두 가능하다. 서열번호 3의 단백질을 암호화 하는 DNA는 서열번호 10이며 상기의 아미노산을 암호화하는 모든 DNA 서열 또한 포함될 수 있다.

[0068] 또한, R313N과 T265S의 조합적 변이주는 서열번호 5의 아미노산 서열을 나타내며 R313H와 T265S의 조합적 변이주는 서열번호 6의 아미노산 서열을 나타낸다. 또한 313 번째의 아미노산 위치 또는 265번째의 아미노산 위치에 친수성 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 이 변이체 서열이 포함된 97% 이상의 상동성을 가지고 시알산 전이의 활성을 가지는 효소도 모두 가능하다. 서열번호 5의 단백질을 암호화 하는 DNA는 서열번호 11이고 서열번호 6의 단백질을 암호화 하는 DNA는 서열 12이며, 상기의 아미노산을 암호화하는 모든 DNA 서열 또한 포함될 수 있다.

[0069] 상기 명시한 2,3-시알산 전이효소의 변이체와 97% 이상의 상동성을 가지는 예로서는, 상기 변이체의 변이된 서열을 포함하고 있으며, 2,3-시알산 전이효소의 활성을 갖는다고 명명, 또는 예측되는 서열로서, 파스테우렐라(*Pasteurella*) 속 (genus), 특히 그 중 멀토시다 (*multocida*) 종 (species) 유래의 서열이 포함될 수 있다.

[0070] 본 발명에서는 또한 높은 고유 활성도를 가지는 2,3-시알산 전이효소의 R313의 단일 아미노산 치환 변이주와 T265의 단일 아미노산 치환 변이주에 대해서 각각의 조합적인 변이주를 만들었으며, 조합적 변이주 중 R313H/T265S와 R313N/T265S가 야생주 대비 237%, 216%의 가장 높은 고유활성도를 나타냈다. 기질 공여체와 수용체에 대해 각각의 변이가 미치는 영향을 알아보기 위해 단일 아미노산 치환 변이주와 조합적 변이주에 대해 동역학 변수를 측정하였다.

[0071] 동역학변수의 측정은 상기 비색법을 이용한 변이주 탐색 방법을 통해 분석하였고, 반응은 실온에서 5 내지 10분간 수행하여 30 초마다의 간격을 두고 초기 수용체 기질 농도 대비 10 내지 25%의 전환 수율을 나타냈을 때의 초기 반응속도를 측정하였다. 동역학 변수의 측정은 공여체 기질인 CMP-N-아세틸뉴라민산과 수용체 기질인 락토오스 두 가지에 대해 모두 측정하였으며 기질 농도는 0.1 에서 30 mM 까지의 범위를 사용하였다. k_{cat} 과 K_m의 동역학 변수는 시그마 플롯 (SigmaPlot) 프로그램을 사용하여 미카엘리스-멘텐 (Michaelis-Menten)방정식의 비선형 회귀분석을 통해 얻었다. 2,3-시알산 전이효소의 야생주와 변이주에 대한 동역학변수는 표 2에 나타내었다.

표 2

[0072] 2,3-시알산 전이효소변이주의 동역학 변수

효소 (a2,3 PST)	CMP-Neu5Ac[a]				Lac[b]		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat} /K_m (s^{-1} mM^{-1})		k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat} /K_m (s^{-1} mM^{-1})
WT	12.9	1.83	7.01		57.4	2.31	24.8
R313N	23.9	2.51	9.51		89.9	2.55	35.2
R313H	26.8	3.24	8.26		80.5	2.68	30.1
T265S	22.1	2.23	9.91		63.2	2.43	26.1
R313N/T265S	36.9	3.33	11.1		82.4	2.21	37.3
R313H/T265S	43.4	3.94	11.0		73.9	1.65	44.8

[0073] 단일 아미노산 치환 변이주인 R313N과 R313H는 CMP-N-아세틸뉴라민산과 락토오스에 대해서 k_{cat} 값이 증가하고, 두 기질에 대해 k_{cat}/K_m은, R313N이 야생주 대비 약 1.4 배, R313H이 약 1.2 배 증가한다. 조합 변이체인 R313N/T265S 와 R313H/T265S 는 두 기질에 대해 k_{cat} 값이 증가하고, 두 조합 변이체는 CMP-N-아세틸뉴라민산에 대해 k_{cat}/K_m이 약 1.6 배 증가한다. 또한 R313N/T265S 와 R313H/T265S 는 락토오스에 대해서 k_{cat}/K_m이 야생주 대비 각각 약 1.5배, 약 1.8배 증가한다.

[0074] 본 발명에서는 또한 2,3-시알산 전이효소의 313번째 아미노산 위치에 아르기닌을 대체하여 다른 친수성 아미노산 (N, D, Y, T, H)으로 전환됐을 때 효소의 고유 활성도가 증가하는 것을 확인함과 함께, 이들 변이주에 대해서 2,6-시알산 전이 부반응을 확인하였다. 2,6-시알산 전이 부반응이 발생하는 pH4.5 내지 7.0에서 R313N, R313D, R313Y, R313T, R313H 및 조합변이주인 R313N/T265S와 R313H/T265S의 2,6-시알산 전이 부반응을 측정한 결과 pH4.5내지 6.0(도 2의 a)에서는 2,6-시알릴락토오스의 생성량이 야생주에 비해 4-30배 감소하였으며, pH6.5내지 pH7.0(도 2의 b)에서는 2,6-시알릴락토오스의 생성량이 R313Y (15배 감소)를 제외하고 모두 사라진 것을 확인할 수 있었으며, 이는 도 2에 나타내었다.

[0075] **1-3: 2,6-시알산 전이효소의 시알산 전이효소의 변이주 특성 분석**

[0076] 본 발명에서 2,6-시알산 전이효소의 I411의 단일 아미노산 치환 변이주 I411T는 서열번호 14의 아미노산 서열을 나타내며 411 번째의 아미노산 위치에 작은 크기 또는 친수성 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 이 변이체 서열이 포함된 55% 이상의 상동성을 가지고 시알산 전이의 활성을 가지는 효소도 모두 가능하다. 서열번호 14의 단백질을 암호화 하는 DNA는 서열번호 20이며 상기의 아미노산을 암호화하는 모든 DNA 서열 또한 포함할 수 있다.

[0077] 또한, L433S은 서열번호 15의 아미노산 서열을 나타내고, L433T는 서열번호 16의 아미노산 서열을 나타내며, 433번째의 아미노산 위치에 친수성 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 이 변이체 서열이 포함된 55% 이상의 상동성을 가지고 시알산 전이의 활성을 가지는 효소도 모두 가능하다. 서열번호 15 및 16의 단백질을 암호화하는 DNA는 서열번호 21 및 22이며 상기의 아미노산을 암호화하는 모든 DNA 서열 또한 포함될 수 있다.

[0078] 또한, I411T과 L433S의 조합적 변이주는 서열번호 17의 아미노산 서열을 나타내며 I411T와 L433T의 조합적 변이주는 서열번호 18의 아미노산 서열을 나타낸다. 또한 411 번째의 아미노산 위치 또는 433번째의 아미노산 위치

에 작은 크기 또는 친수성 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 이 변이체 서열이 포함된 55% 이상의 상동성을 가지고 시알산 전이의 활성을 가지는 효소도 모두 가능하다. 서열번호17의 단백질을 암호화 하는 DNA는 서열번호 23이고 서열번호 19의 단백질을 암호화 하는 DNA는 서열번호 24이며, 상기의 아미노산을 암호화하는 모든 DNA 서열 또한 포함될 수 있다.

[0079] 상기 명시한 2,6-시알산 전이효소의 변이체와 55% 이상의 상동성을 가지는 예로서는, 상기 변이체의 변이된 서열을 포함하고 있으며 2,6-시알산 전이효소의 활성을 갖는다고 명명, 또는 예측되는 서열로서, 포토박테리움(*Photobacterium*)속, 특히 그 중 담셀라 (*damseale*),레이오그나티 (*leiognathi*)종 유래의 서열이 포함될 수 있다. 또한 본 발명의 2,6-시알산 전이효소와 55%의 상동성을 가짐으로 인해 본 발명의 단백질 모델 구조를 형성하는 주형 단백질이 되는 포토박테리움 Jt-Ish-224 2,6-시알산 전이효소의 서열이 포함될 수 있다.

[0080] 본 발명에서는 높은 고유 활성도를 가지는 2,6-시알산 전이효소의 I411T의 단일 아미노산 치환 변이주와 L433S 및 L433T의 단일 아미노산 치환 변이주에 대해서 각각의 조합적인 변이주를 만들었으며, 조합적 변이주 중 I411T/L433S 와 I411T/L433T가 야생주 대비 194%, 510%의 높은 고유활성도를 나타냈다. 기질 공여체와 수용체에 대해 각각의 변이가 미치는 영향을 알아보기 위해 단일 아미노산 치환 변이주와 조합적 변이주에 대해 동역학 변수를 측정하였으며 이를 표 3에 나타냈다.

표 3

[0081] α-2,6 시알산전이효소 변이주의 동역학 변수

Enzymes (a2,6 PdST)	CMP-Neu5Ac[a]				Lac[b]		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s^{-1} mM^{-1})		k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s^{-1} mM^{-1})
WT	3.99	5.47	0.73		4.45	9.03	0.49
I411T	11.1	6.36	1.75		25.7	28.4	0.90
L433S	18.3	9.54	1.92		85.4	59.1	1.45
L433T	10.4	2.11	4.90		73.2	56.7	1.29
I411T/L433S	17.4	11.9	1.47		113	78.5	1.31
I411T/L433T	18.1	3.09	5.86		119	57.0	1.90

[0082] 수용체 기질인 락토오스에 대해서 모든 변이주가 기질과의 결합력은 감소한데 반해 k_{cat}값을 증가시켰으며, 야생주에 비해 k_{cat}값이 6배에서 최대 27배까지 증가하였다. 단일 변이주인 I411T, L433S와 L433T의 k_{cat}/K_m은 야생주 대비 1.8배, 3배, 2.6배 증가하였으며 조합변이주인 I411T/L433S, I411T/L433T의 k_{cat}/K_m은 야생주 대비 각각 2.7배, 3.9배 증가하였다.

[0083] 반면, 공여체 기질인 CMP-N-아세틸뉴라민산에 대해서는 I411T와 L433S 단일 아미노산 치환 변이주의 경우 k_{cat}/K_m는 야생주 대비 각각 2.4배, 2.6배 증가하였고 L433T는 기질과의 친화력도 함께 증가하여 k_{cat}/K_m이 야생주 대비 6.7배 증가하였다. I411T/L433S와 I411T/L433T의 조합적인 변이주의 경우, k_{cat}이 야생주 대비 4.5배 증가하였고 k_{cat}/K_m은 각각 2배, 8배 증가하였다.

[0084] 본 발명을 통해 생산한 2,3 및 2,6-시알산 전이효소의 변이주는 상기 언급한 락토오스 수용체 기질뿐 만 아니라 이당류 수용체 기질인, N-아세틸락토사민 (LacNAc), 아자이도 β-D-갈락토피라노실-(1-4)-β-D-글루코피라노사이드 (LacβN3), 3-아자이도프로필 β-D-갈락토피라노실-(1-4)-β-D-글루코피라노사이드 (LacβProN3), 메틸 β-D-갈락토피라노실-(1-4)- β-D-글루코피라노사이드 (LacβOMe)를 포함하여 갈락토오스 부분을 포함하는 다양한 올리고당 기질에 적용할 수 있다.

[0085] 또한 본 발명을 통해 생산한 2,3 및 2,6-시알산 전이효소의 변이주는 상기 언급한 CMP-N-아세틸뉴라민산 공여체 기질뿐 만 아니라 시티딘 일인산 디아미노뉴라민산 (CMP-KDN, CMP-deaminoneuraminic acid), 시티딘 일인산-N-글리콜릴뉴라민산 (CMP-Neu5Gc, CMP-N-glycolylneuraminic acid)을 포함한 다양한 유도체 기질에 적용할 수 있다.

[0086] **실시예 2: CMP-N-아세틸뉴라민산 합성을 위한 효소의 제조**

[0087] 시알릴레이션(siaylation) 반응의 중간물질인 CMP-N-아세틸뉴라민산 제조를 위하여, 사용되는 효소를 제조하였다.

[0088] N-아세틸-D-글루코사민에서 CMP-N-아세틸뉴라민산을 제조하는 단계에 사용되는 효소는 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU) 및 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE)이며, CMP-N-아세틸뉴라민산과 락토오스를 반응시켜 2,3-시알릴락토오스(Sialyllactose)를 제조하는 효소는 2,3-시알산 전이효소이고, CMP-N-아세틸뉴라민산과 락토오스를 반응시켜 2,6-시알릴락토오스(Sialyllactose)를 제조하는 효소는 2,6-시알산 전이효소이다.

[0089] 상기 N-아세틸-D-글루코사민에서 CMP-N-아세틸뉴라민산을 제조하는 단계에 사용되는 상기 효소의 제조방법은 대한민국 특허공개 10-2008-0055588에 자세히 기재되어 있다.

[0090] 간략히 요약하면,다음과 같다:

[0091] (1) N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc 2-epimerase)의 제조

[0092] 박테로이드 프라질리스 NCTC 9343(Bacteroides fragilis NCTC 9343, NC_003228)의 게놈으로부터 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc 2-epimerase, 서열번호 25)를 코딩하는 nanE 유전자를 클로닝하기 위하여, 박테로이드 프라질리스 NCTC 9343(Bacteroides fragilis NCTC 9343) 균주의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 26 및 서열번호 27의 프라이머를 사용하여 PCR 법에 의해 nanE 유전자를 증폭하였다.

[0093] 서열번호 26: 5'-ct gcc atg gtt atg aat act aca g

[0094] 서열번호 27: 5'-aat gga tcc tta ttt ttc tga cag

[0095] 상기 증폭된 PCR 산물을 정제한 후, 제한효소 NcoI 및 BamHI로 절단하고, 상기와 동일한 제한효소 NcoI 및 BamHI로 절단된 플라스미드 pET28a(+)(Novagen) T4 DNA (Takara)에 리가아제를 사용하여 연결하고 재조합벡터 pNANe를 제작하였다. 상기 재조합벡터를 *E.coli* BL21(DE3)(Invitrogen)에 도입하고, 이를 *E.coli*/pNANe을 수득하였다.

[0096] (2) N-아세틸뉴라민산 알도라제(NeuNAc aldolase)의 제조

[0097] N-아세틸뉴라민산 알도라제(NeuNAc aldolase)를 코딩하는 nanA 유전자(서열번호 28)를 클로닝하기 위하여, 대장균 K-12(E. coli K-12 C600(KCTC 1116)균주의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 29 및 서열번호 30의 프라이머를 사용하여 PCR 법에 의해 nanA 유전자를 증폭하였다.

[0098] 서열번호 29: 5'-ggtatccatggcaacgaatttacg

[0099] 서열번호 30: 5'-ggtaggctcgagcgaggggaaac

[0100] 상기 증폭된 PCR 산물을 정제한 후, 제한효소 NcoI 및 XhoI로 절단하고, 상기와 동일한 제한효소 NcoI 및 XhoI로 절단된 플라스미드 pET32a(+)(Novagen) T4 DNA(Takara)에 리가아제를 사용하여 연결하여 재조합 벡터 pNANa를 제작하였다. 상기 pNANa를 *E.coli* BL21(DE3)pLysS(Invitrogen)에 도입시켜,

[0101] *E. coli*/pNANa를 수득하였다.

[0102] (3) 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine 5'monophosphate kinase, CMK)의 제조

[0103] 시티딘 5' 5'-일인산 키나아제(cytidine 5'monophosphate kinase)를 코딩하는 cmk 유전자(서열번호 31)를 클로닝하기 위하여, 대장균 K-12(E. coli K-12 (KCTC 1116) 균주의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 32 및 서열번호 33의 프라이머를 사용하여 PCR 법에 의해 cmk 유전자를 증폭하였다.

[0104] 서열번호 32: 5'-cat atg acggca att gcc ccg gtt att ac

[0105] 서열번호 33: 5'-gaa ttc ggt cgc tta tgc gag agc c

[0106] 증폭된 PCR 산물을 정제하고, 제한효소 NdeI 및 EcoRI로 절단하고, 상기와 동일한 제한효소 NdeI 및 EcoRI로 절단한 플라스미드 pET22b(+)(Novagen) T4 DNA(Takara)에 리가아제를 사용하여 연결하였여, 재조합 벡터 pCMK를 제조하였다. 상기 pCMK를 *E.coli* BL21(DE3)pLysS(Invitrogen)에 도입시켜, E.coli/pCMK를 수득하였다.

[0107] (4) 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK)의 제조

[0108] 아세테이트 키나아제(acetate kinase)를 코딩하는 ack 유전자(서열번호 34)를 클로닝하기 위하여, 대장균 K-12(E. coli K-12(KCTC 1116) 균주의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 35 및 서열번호 36의 프라이머를 사용하여, PCR 법에 의해 ack 유전자를 증폭하였다.

[0109] 서열번호 35: 5'-catatgtcgagtaagttagtttctg

[0110] 서열번호 36: 5'-gaatcctcaggcagtcaggcggctcgcgtc

[0111] 증폭된 PCR 산물을 정제하고, 제한효소 NdeI 및 EcoRI로 절단하고, 상기와 동일한 제한효소 NdeI 및 EcoRI로 절단한 플라스미드 pET24ma(+)(Novagen) T4 DNA(Takara)에 리가아제를 사용하여 연결하여, 재조합 벡터 pACKa를 제조하였다.

[0112] 상기 pACKa를 *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen)에 도입하여, E. coli/pACKa를 제작하였다.

[0113] (5) CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuNAc synthetase, NEU)의 제조

[0114] CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuNAc synthetase)를 코딩하는 neu 유전자(서열번호 37)를 클로닝하기 위하여, 네이세리아 메니기티디스(Neisseria meningitidis, Koram Biotech) 균주의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 38 및 서열번호 39의 프라이머 DNA를 사용하여 PCR 법에 의해 neu 유전자를 증폭하였다.

[0115] 서열번호 38: 5'-aagcatatggaaaaacaaaatattgcg

[0116] 서열번호 39: 5'-gtggaattcttagctttccttgtg

[0117] 상기 증폭된 PCR 산물을 정제하고, 제한효소 NdeI 및 EcoRI로 절단하고, 상기와 동일한 제한효소 NdeI 및 EcoRI로 절단한 플라스미드 pET32a(+)(Novagen) T4 DNA(Takara)에 리가아제를 사용하여 연결하여, 재조합 벡터 pSYNb를 제조하였다.

[0118] 상기 pSYNb를 *E.coli* BL21(DE3)(Invitrogen)에 도입하여, E. coli/pSYNb를 제작하였다.

[0119] 상기 형질전환체 E. coli/pNANe, E. coli/pNANa, E. coli/pCMK, E. coli/pACKa 및 E. coli/pSYNb를 LB 배지에서 배양한 종균 500㎖를 본배양 LB 배지 5ℓ에 접종하고, 접종 4시간 후 발현 유도물질로 IPTG를 1-2mM 첨가하여 단백질의 고발현을 유도한다. 세포의 밀도(OD600)가 약 3~5일 때 세포를 수확하였다. 상기 수득된 세포를 초음파 파쇄기 또는 프렌치프레스로 파쇄한 후, SDS-PAGE 젤을 통해 각각의 효소 발현 정도를 확인하였다. 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphe kinase), 아세테이트 키나아제(acetate kinase), N-아세틸뉴라민산 알도라제(NeuNAc aldolase), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제 (CMP-NeuAc synthetase), N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc 2-epimerase) 등의 효소를 황산암모늄(ammonium sulfe)을 이용한 침전 및 이온교환 수지 컬럼으로 정제하였다. (Protein purification techniqes 제2판, Oxford University Press, 2001).

[0120] **실시예 3: 2,3-시알산 전이효소를 이용한 락토오스의 원팟 시알릴레이션(sialylation)**

[0121] 실시예 1,2에서 제조한 2,3-시알산 전이효소(PST2,3st R313N), 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU) 및 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE)가 혼합된 효소반응액을 이용하여, N-아세틸-D-글루코사민, 피루브산, 락토오

스를 기질로 하여, 락토오스의 원팟 시알릴레이션을 수행하였다.

[0122] N-아세틸-D-글루코사민에서 2,3-시알릴락토오스 또는 2,6-시알릴락토오스를 생산하는 화학반응식은 도 1에 나타내었으며, 단일반응용기 내에서의 수행에 따라, 고가의 기질인 시티딘 5'-일인산 (CMP)를 재순환할 수 있다는 것이 나타나 있다.

[0123] 반응 혼합액[5~10mM 시티딘 5'-일인산(CMP, Shanghai QZU Bioscience & Biotechnology), 20~80mM N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc, Shanghai Jiubang Chemical), 40~120mM 피루브산(Sodium pyruvate, ZMC Inc), 40~120mM 락토오스(Lactose, DMV Inc), 20mM $MgCl_2 \cdot H_2O$(Duksan), 1mM NTP(Nucleotide triphosphate, sigma), 80~300mM 아세틸 포스페이트(Acetyl phosphate, sigma), 50mM Tris HCl 버퍼(pH 7.0), 37℃ 2M NaOH를 사용하여 pH 6.5~8.0 유지]을 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU) 및 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE), 2,3-시알산 전이효소(PST2,3st R313N)를 혼합한 후, 반응기에서 교반하여 5~12시간 동안 반응시켰다.

[0124] LC, Mass 분석 결과, 2,3-시알릴락토오스가 합성되었다는 것을 확인할 수 있었다 (도 3). LC의 경우, Dionex DX-500 Chromatography system을 사용하여 수행하였으며, 조건은 다음과 같다:

[0125] Column : CarboPac PA100 Analytical Column(P/N 043055) with guard (P/N 043054)

[0126] Flow : 1ml/min

[0127] Run time : 20min

[0128] Injection volume : 25ul

[0129] Detection: ED40 Electrochemical Detector (gold electrode)

[0130] Eluent : 100mM NaOH / 100mM NaOAc.

[0131] 2,3-시알릴락토오스의 mass 분석결과 Molecular ion이 $[M-H]^-$ 형태로 m/z 632.2으로 검출되었다.

[0132] 동일한 방법으로, 상기 반응용액에, 2,3-시알산 전이효소(2,3- Sialyltransferase)를 대신하여, 2,6-시알산 전이효소(2,6-Sialyltransferase)인 2,6- 시알산 전이효소(2,6STN L433S)를 첨가하여, 반응시킨 결과, 2,6-시알릴락토오스를 합성하였다 (도 4).

[0133] **실시예 4: 락토오스의 원팟 시알릴레이션(sialylation)과 기존 방법의 비교**

[0134] 실시예 3의 방법과 동일한 원팟 방법으로, 표 4의 기질농도를 사용하여 시알락토오스의 제조한 방법과의 시알릴락토오스 생산량과 기존의 투팟(two-pot) 방법을 사용한 시알릴락토오스의 제조한 방법의 시알릴락토오스 생산량을 비교하였다.

[0135] 기존의 투팟(two-pot) 방법은 반응 혼합액[50mM 시티딘 5'-일인산(CMP), 100mM N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc), 100mM 피루브산(Sodium pyruvate), 20mM $MgCl_2 \cdot H_2O$, 1mM NTP(Nucleotide triphosphate), 300mM 아세틸 포스페이트(Acetyl phosphate), 50mM Tris HCl 버퍼(pH 7.0) 7ℓ, 37℃ 2M NaOH를 사용하여 pH 6.5~8.0 유지]을 상기 실시예 2에서 제조한 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU) 및 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE)를 혼합한 후, 반응기에서 교반하여 5~12시간 동안 반응시켜, CMP-N-아세틸뉴라민산을 합성하였다.

[0136] 50mM Tris HCl(pH7.5) 완충용액에 상기 합성된 약 40mM CMP-N-아세틸뉴라민산에 100mM 락토오스를 넣고 2,3-시알산 전이효소를 첨가하여 반응시켜, 시알릴락토오스를 생산하였으며, 표준 시알릴락토오스(Sigma)의 표준곡선과 비교하여, LC로 시알릴락토오스양을 측정하였다.

[0137]

표 4

[0138]

합성에 필요한 주요 기질		기존 방법 (Two step)	본원 발명의 시알산 전이효소를 사용한 방법 (One step)
	CMP	50mM	10mM
	N-아세틸-D-글루코사민	100mM	80mM
	피루브산	100mM	80mM
	아세틸포스페이트	300mM	200mM
	락토오스	100mM	80mM
시알릴락토오스 생산량		20g/L	40g/L

[0139] 그 결과, 표 4에 나타난 바와 같이, 본원발명의 원팟 시알릴락토오스 생산방법으로 제조할 경우, 첨가하는 CMP의 농도가 1/5로 줄어도, 생산되는 시알릴락토오스의 량은 2배 증가하는 것을 확인하였다.

[0140] **실시예 5: 갈락토오스의 원팟 시알릴레이션(sialylation)**

[0141] 단당인 갈락토오스(sigma) 시알릴레이션을 수행하였으며, 시알릴레이션 과정을 도 5에 나타내었다.

[0142] 반응 혼합액[5~10mM 시티딘 5'-일인산(CMP), 20~80mM N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc), 40~120mM 피루브산(Sodium pyruvate), 40~120mM 갈락토오스(Galactose) 20mM $MgCl_2 \cdot H_2O$, 1mM NTP(Nucleotide triphosphate), 80~300mM 아세틸 포스페이트(Acetyl phosphate), 50mM Tris HCl 버퍼(pH 7.0), 37℃ 2M NaOH를 사용하여 pH 6.5~8.0 유지]을 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU) 및 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE), 2,3-시알산 전이효소(PST2,3st R313N)를 혼합한 후, 반응기에서 교반하여 5~12시간 동안 반응시켰다.

[0143] LC, Mass 및 TLC 분석 결과, 시알릴 갈락토오스가 합성되었다는 것을 확인할 수 있었으며, Mass 분석결과 Molecular ion이 $[M-H]^-$ 형태로 m/z 470.2으로 검출되었다. (도 6).

[0144] **실시예 6: 링커의 시알산 유도체 제조**

[0145] 갈락토오스를 말단 잔기로 포함하는 아미노 핵실 링커(Aminohexyl linker)의 시알릴레이션을 수행하였으며, 시알릴레이션 과정을 도 7에 나타내었다.

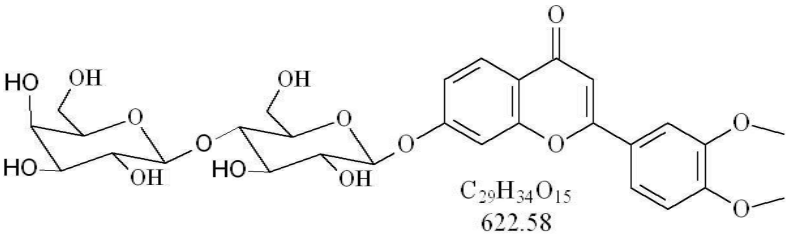
[0146] 반응 혼합액[5~10mM 시티딘 5'-일인산(CMP), 20~80mM N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc), 40~120mM 피루브산(Sodium pyruvate), 40~120mM 갈락토오스 말단의 아미노핵실 링커, 20mM $MgCl_2 \cdot H_2O$, 1mM NTP(Nucleotide triphosphate), 80~300mM 아세틸 포스페이트(Acetyl phosphate), 50mM Tris HCl 버퍼(pH 7.0), 37℃ 2M NaOH를 사용하여 pH 6.5~8.0 유지]을 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU) 및 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE), 2,3-시알산 전이효소(2,3-Sialyltransferase)를 각각 혼합한 후, 반응기에서 교반하여 5~12시간 동안 반응시켰다.

[0147] TLC 및 Mass 분석 결과, 2,3-시알릴락토오스-링커가 합성되었다는 것을 확인할 수 있었으며, Mass 의 경우, Molecular ion이 $[M-H]^-$ 형태로 m/z 731.3으로 검출되었다 (도 8).

[0148] **실시예 7: 플라보노이드의 시알산 유도체 제조**

[0149] 하기 화학식 1의 구조를 가지는 플라보노이드 CSH-I-54의 락토오스 유도체의 시알릴레이션을 수행하였으며, 시알릴레이션 과정을 도 9에 나타내었다.

화학식 1

[0150] 

[0151] 반응 혼합액[5~10mM 시티딘 5'-일인산(CMP), 20~80mM N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc), 40~120mM 피루브산(Sodium pyruvate), 40~120mM 플라보노이드 CSH-I-54의 락토오스 유도체, 20mM $MgCl_2 \cdot H_2O$, 1mM NTP(Nucleotide triphosphate), 80~300mM 아세틸 포스페이트(Acetyl phosphate), 50mM Tris HCl 버퍼(pH 7.0), 37℃ 2M NaOH를 사용하여 pH 6.5~8.0 유지]을 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU) 및 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE), 2,3-시알산 전이효소(2,3-Sialyltransferase)를 각각 혼합한 후, 반응기에서 교반하여 5~12 시간 동안 반응시켰다.

[0152] 2,3-시알릴락토오스-CSH-I-54의 합성은 LC와 Mass로 확인하였으며, LC 분석 조건은 하기와 같다:

[0153] Column : Thermo ODS Hypersil (250*4.6mm)

[0154] Detection : UV 340nm

[0155] Temp.: R.T

[0156] Flow rate: 1mL/min

[0157] Inj. Volume: 20uL

[0158] Mobile phase: A buffer: 0.1 M TEAA

[0159] B buffer : CH3CN

[0160] 초기: B conc. 0%

[0161] 15min 70%

[0162] 20min 100%

[0163] 22min 100%

[0164] 25min 0%

[0165] 30min 0% .

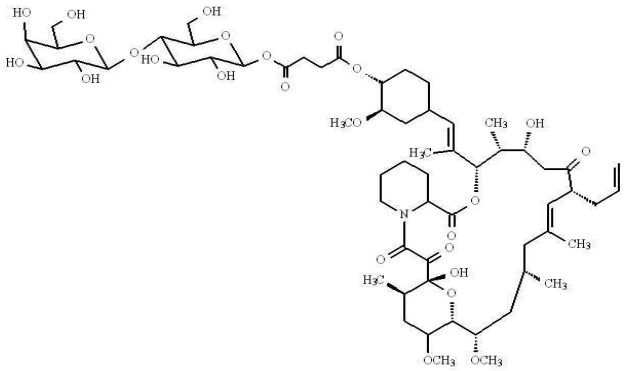
[0166] LC 및 Mass 분석 결과, 2,3-시알릴락토오스-CSH-I-54가 합성되었다는 것을 확인할 수 있었으며, mass 분석의 경우, Molecular ion이 $[M-H]^-$ 형태로 m/z 912.3으로 검출되었다 (도 10).

[0167] **실시예 8: 타크로리무스의 시알산 유도체 제조**

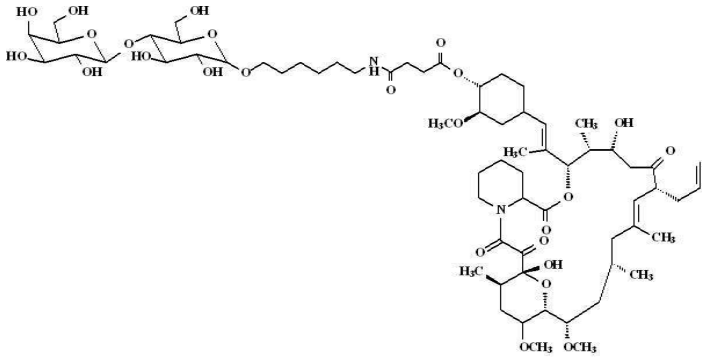
[0168] 화학식 2의 구조를 가지는 면역억제제 타크로리무스의 갈락토오스 유도체와 화학식 3의 구조를 가지는 링커를 가진 타크로리무스의 갈락토오스 유도체의 시알릴레이션을 수행하였으며, 시알릴레이션 과정을 도 11에 나타내었다.

[0169] 타크로리무스의 갈락토오스 유도체

화학식 2

[0170] 

화학식 3

[0171] 

[0172] 반응 혼합액[5~10mM 시티딘 5'-일인산(CMP), 20~80mM N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc), 40~120mM 피루브산(Sodium pyruvate), 40~120mM 타크로리무스 갈락토오스 유도체, 20mM $MgCl_2 \cdot H_2O$, 1mM NTP(Nucleotide triphosphate), 80~300mM 아세틸 포스페이트(Acetyl phosphate), 50mM Tris HCl 버퍼(pH 7.0), 37℃ 2M NaOH를 사용하여 pH 6.5~8.0 유지]을 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU) 및 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE), 2,3-시알산 전이효소(2,3-Sialyltransferase)를 각각 혼합한 후, 반응기에서 교반하여 5~12시간 동안 반응시켰다.

[0173] 2,3-시알릴락토오스-타크로리무스의 합성은 LC와 Mass로 확인하였으며, LC 분석 조건은 하기와 같다 (도 12):

[0174] Column : Thermo ODS Hypersil (250*4.6mm)

[0175] Detection : UV 225nm

[0176] Temp.: 55℃

[0177] Flow rate: 1mL/min

[0178] Inj. Volume: 20uL

[0179] Mobile phase: A buffer: H2O

[0180] B buffer : CH3CN

[0181] 초기: B conc. 30%

[0182] 5min 30%

[0183] 35min 80%

[0184] 36min 80%

[0185] 38min 100%

[0186] 45min 100%

[0187] 46min 30%

[0188] 50min 30%

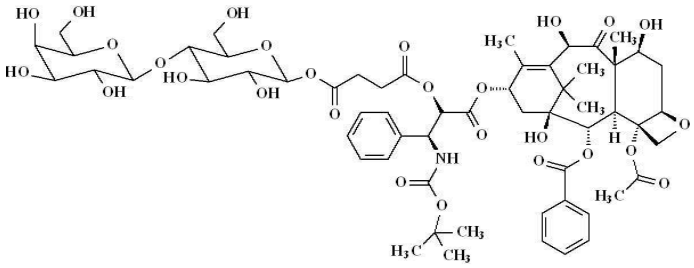
[0189] Mass 분석결과, 화학식 2의 갈락토오스-타크로리무스의 경우, Molecular ion이 $[M+Na]^+$ 형태로 m/z 1564.3으로 검출되었으며, 화학식 3의 아미노 헥실 링커(Aminohexyl linker)가 있는 2,3-시알릴락토오스-타크로리무스의 경우, Molecular ion이 $[M-2H]^{2-}$ 형태로 m/z 1616.8로 검출되었다 (도 12).

[0190] **실시예 9: 항암제 탁솔의 시알산 유도체 제조**

[0191] 화학식 4의 구조를 가지는 면역억제제 탁솔(Taxol)의 갈락토오스 유도체의 시알릴레이션을 수행하였으며, 시알릴레이션 과정을 도 13에 나타내었다.

[0192] 탁솔(Taxol)의 갈락토오스 유도체

화학식 4

[0193] 

[0194] 반응 혼합액[5~10mM 시티딘 5'-일인산(CMP), 20~80mM N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc), 40~120mM 피루브산(Sodium pyruvate), 40~120mM 탁솔 갈락토오스 유도체, 20mM $MgCl_2 \cdot H_2O$, 1mM NTP(Nucleotide triphosphate), 80~300mM 아세틸 포스페이트(Acetyl phosphate), 50mM Tris HCl 버퍼(pH 7.0), 37℃ 2M NaOH를 사용하여 pH 6.5~8.0 유지]을 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU) 및 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE), 2,3-시알산 전이효소(2,3-Sialyltransferase)를 각각 혼합한 후, 반응기에서 교반하여 5~12시간 동안 반응시켰다.

[0195] 2,3-시알릴락토오스-탁솔의 합성은 LC와 Mass로 확인하였으며, LC 분석 조건은 하기와 같다 (도 14):

[0196] Column : Termo ODS Hypersil(4.6*250mm)

[0197] Detection : UV 260nm

[0198] Temp.: R.T

[0199] Flow rate: 1mL/min

[0200] Inj. Volume: 20uL

[0201] Mobile phase: A buffer: 0.1 M TEAA

[0202] B buffer : CH3CN

[0203] 초기: B conc. 35%

[0204] 30min 65%

[0205] 33min 65%

[0206] 35min 35%

[0207] 38min 35%

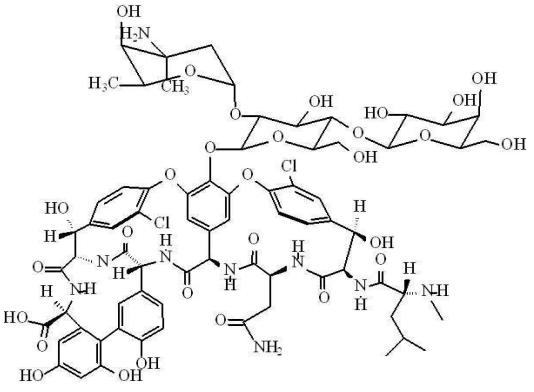
[0208] Mass 분석결과, 갈락토오스-탁솔의 경우, Molecular ion이 [M+Na]+ 형태로 m/z 1255.3으로 검출되었으며, 2,3-시알릴락토오스-탁솔의 경우, Molecular ion이 $[M+Na]^+$ 형태로 m/z 1568.0으로 검출되었다 (도 14).

[0209] **실시예 10: 항생제 반코마이신의 시알산 유도체 제조**

[0210] 화학식 5의 구조를 가지는 항생제 반코마이신(Vancomycin)의 갈락토오스 유도체의 시알릴레이션을 수행하였으며, 시알릴레이션 과정을 도 15에 나타내었다.

[0211] 반코마이신(Vancomycin)의 갈락토오스 유도체

화학식 5

[0212] 

[0213] 반응 혼합액[5~10mM 시티딘 5'-일인산(CMP), 20~80mM N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc), 40~120mM 피루브산(Sodium pyruvate), 40~120mM 반코마이신 갈락토오스 유도체, 20mM $MgCl_2 \cdot H_2O$, 1mM NTP(Nucleotide triphosphate), 80~300mM 아세틸 포스페이트(Acetyl phosphate), 50mM Tris HCl 버퍼(pH 7.0), 37℃ 2M NaOH를 사용하여 pH 6.5~8.0 유지]을 시티딘 5'-일인산 키나아제(cytidine monophosphate kinase, CMK), 아세테이트 키나아제(acetate kinase, ACK), N-아세틸뉴라민산 알돌라제(NeuAc aldolase, NAN), CMP-N-아세틸뉴라민산 신타아제(CMP-NeuAc synthetase, NEU) 및 N-아세틸글루코사민-2-에피머라아제(GlcNAc-2-epimerase, NANE), 2,3-시알산 전이효소(2,3-Sialyltransferase)를 각각 혼합한 후, 반응기에서 교반하여 5~12시간 동안 반응시켰다.

[0214] 2,3-시알릴락토오스-반코마이신의 합성은 LC와 Mass로 확인하였으며, LC 분석 조건은 하기와 같다 (도 16a):

[0215] Column : Chromollth performance RP-18e, 4.6ιλ100mm

[0216] Detection : UV 260nm

[0217] Temp.: R.T

[0218] Flow rate: 1mL/min

[0219] Inj. Volume: 20uL

[0220] Mobile phase: A buffer: H2O

[0221] B buffer : CH3CN

[0222] 초기: B conc. 5%

[0223] 3min 10%

[0224] 20min 20%

[0225] 25min 30%

[0226] 30min 80%

[0227] 35min 80%

[0228] 37min 5%

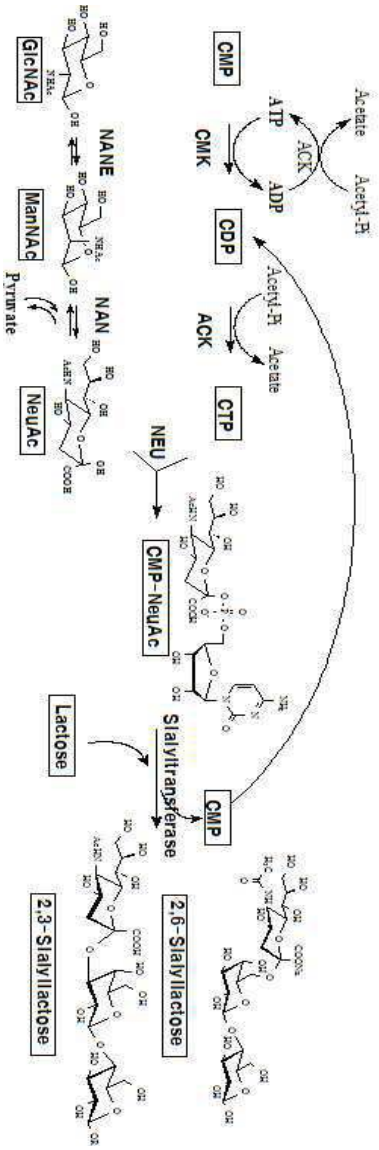
[0229] 40min 5%

[0230] Mass 분석결과, 2,3-시알릴락토오스-반코마이신의 경우, Molecular ion이 $[M+4H]^+$ 형태로 m/z 1905.4로 검출되었다 (도 16b).

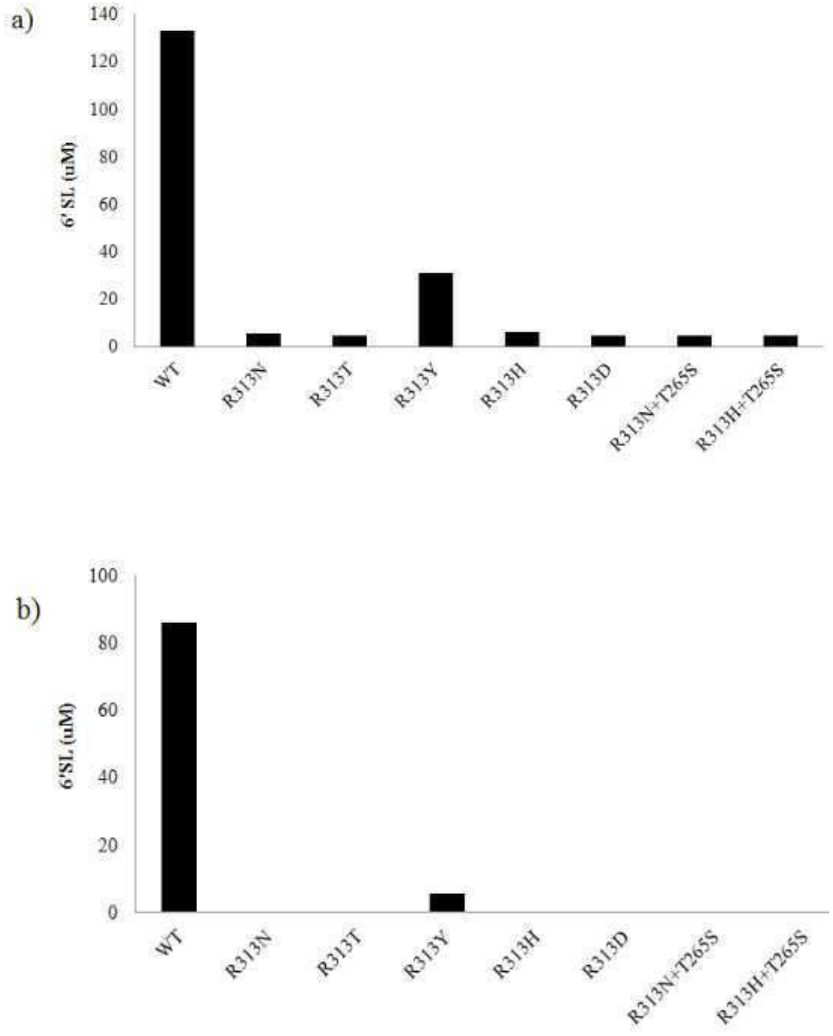
[0231] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

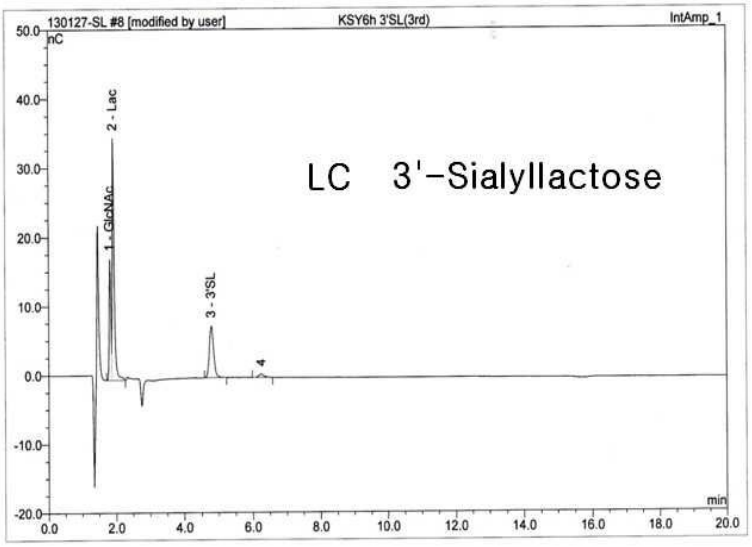

GlcNAc
NANE
ManNAc
NAN
NeuAc
Pyruvate
CMP
CMK
ATP
ADP
ACK
Acetate
Acetyl-P
CDP
CTP
NEU
CMP-NeuAc
Lactose
Sialyltransferase
CMP
2,3-Sialyllactose
2,6-Sialyllactose

도면2

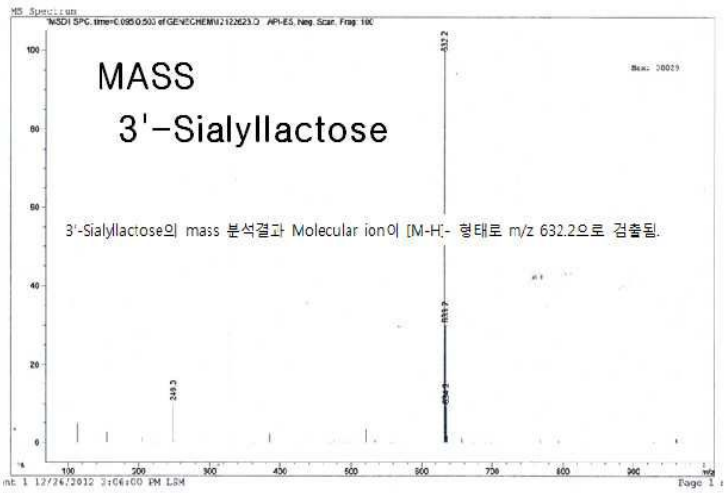

a)
140
120
100
80
60
40
20
0
6' SL (uM)
WT
R313N
R313T
R313Y
R313H
R313D
R313N+T265S
R313H+T265S
b)
100
80
60
40
20
0
6'SL (uM)
WT
R313N
R313T
R313Y
R313H
R313D
R313N+T265S
R313H+T265S

도면3

A

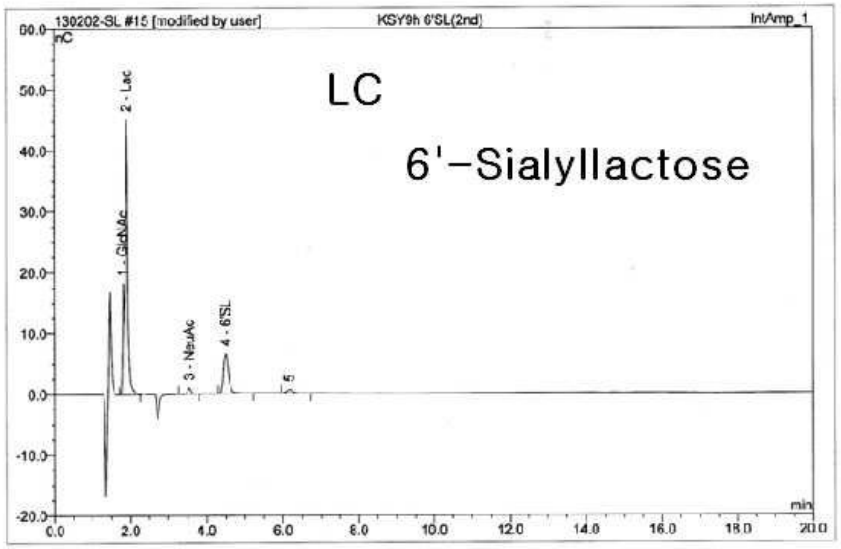

130127-SL #8 [modified by user]
KSY6h 3'SL(3rd)
IntAmp_1
nC
2 - Lac
1 - GlcNAc
3 - 3'SL
4
LC 3'-Sialyllactose
min

B

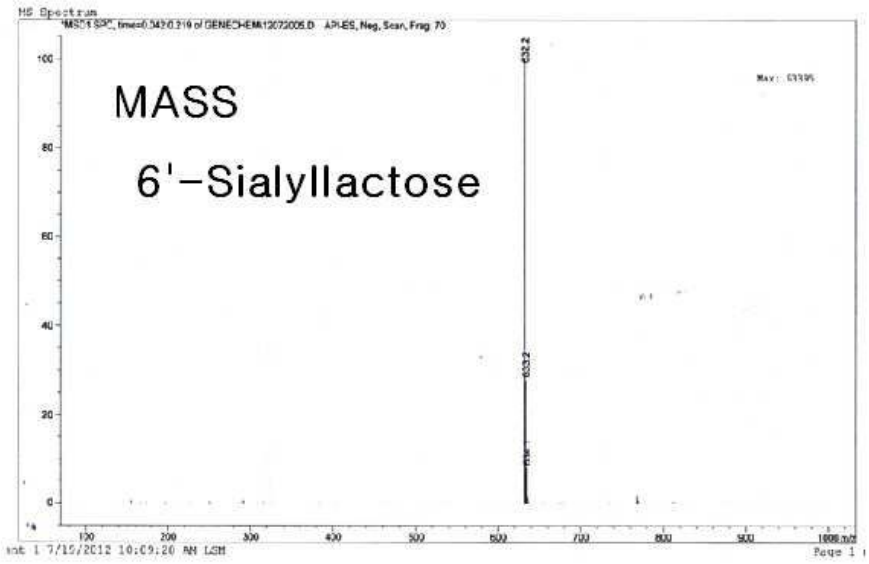

MASS
3'-Sialyllactose
3'-Sialyllactose의 mass 분석결과 Molecular ion이 [M-H]- 형태로 m/z 632.2으로 검출됨.

도면4

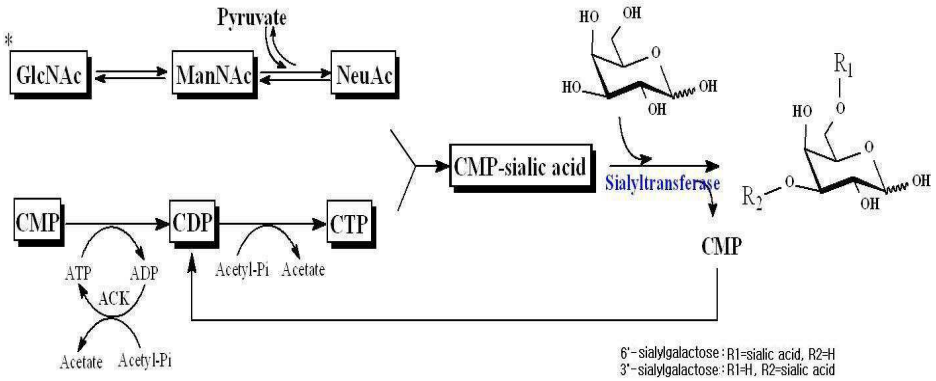
A


130202-SL #15 [modified by user]
KSY9h 6'SL(2nd)
InlAmp_1
nC
LC
6'-Sialyllactose
2 - Lac
1 - GlcNAc
3 - Neu5Ac
4 - 6'SL
5
min

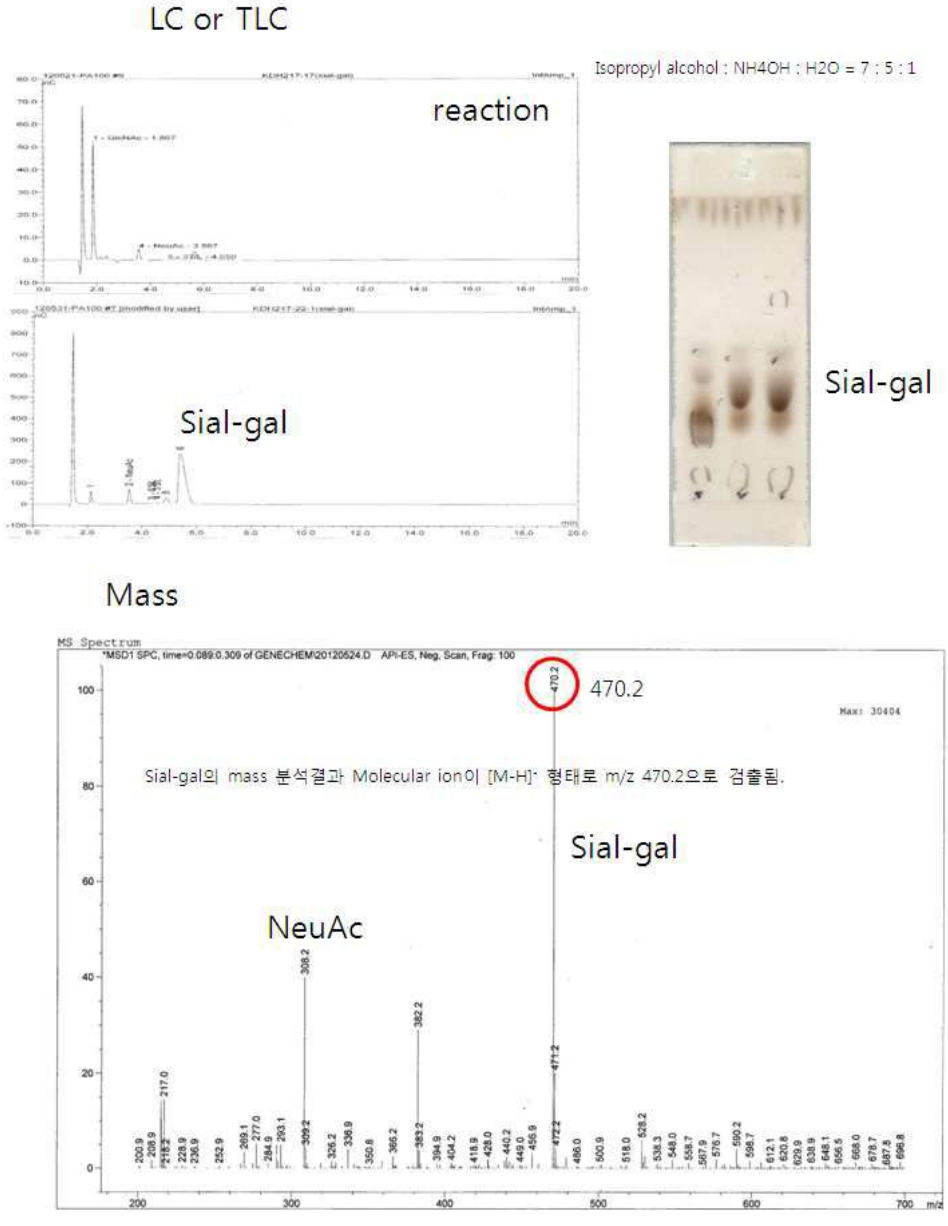
B


MASS
6'-Sialyllactose

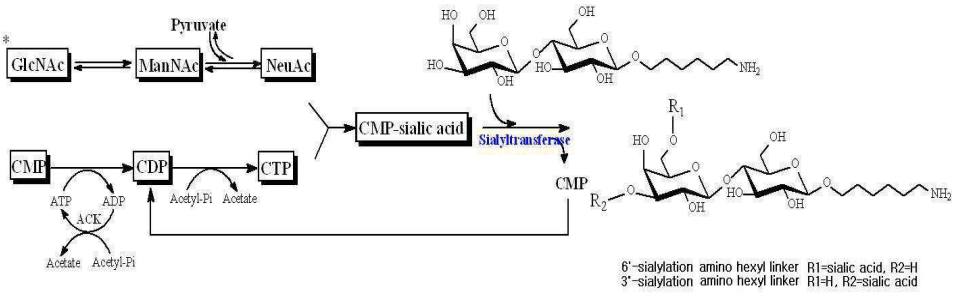
도면5


Pyruvate
GlcNAc
ManNAc
NeuAc
CMP-sialic acid
Sialyltransferase
CMP
CDP
CTP
ATP
ADP
ACK
Acetyl-Pi
Acetate
Acetate
Acetyl-Pi
CMP
6'-sialylgalactose : R1=sialic acid, R2=H
3'-sialylgalactose : R1=H, R2=sialic acid

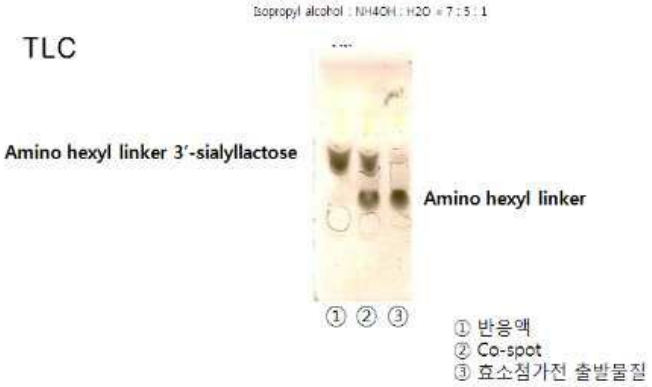
도면6

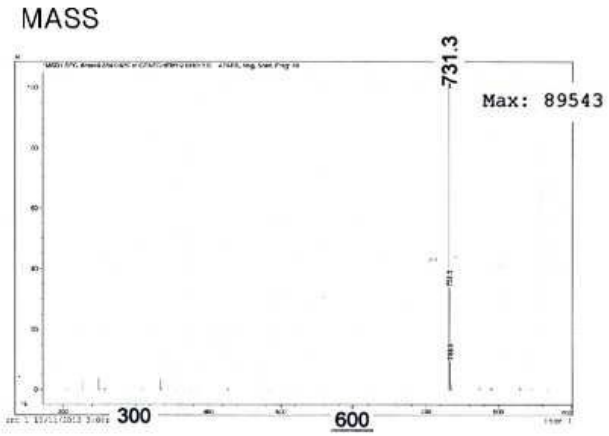

LC or TLC
reaction
Sial-gal
Isopropyl alcohol : NH4OH : H2O = 7 : 5 : 1
Sial-gal
Mass
470.2
Sial-gal의 mass 분석결과 Molecular ion이 [M-H]⁻ 형태로 m/z 470.2으로 검출됨.
Sial-gal
NeuAc

도면7

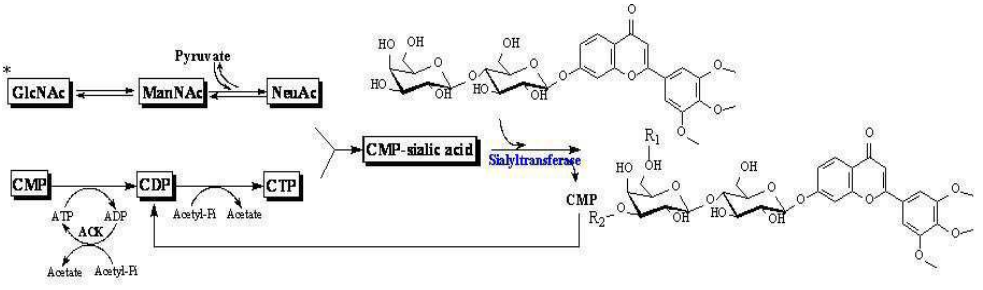

Pyruvate
GlcNAc
ManNAc
NeuAc
CMP-sialic acid
Sialyltransferase
CMP
CDP
CTP
ATP
ADP
ACK
Acetyl-Pi
Acetate
6'-sialylation amino hexyl linker R1=sialic acid, R2=H
3'-sialylation amino hexyl linker R1=H, R2=sialic acid

도면8


Isopropyl alcohol : NH4OH : H2O = 7 : 5 : 1
TLC
Amino hexyl linker 3'-sialyllactose
Amino hexyl linker
① ② ③
① 반응액
② Co-spot
③ 효소첨가전 출발물질

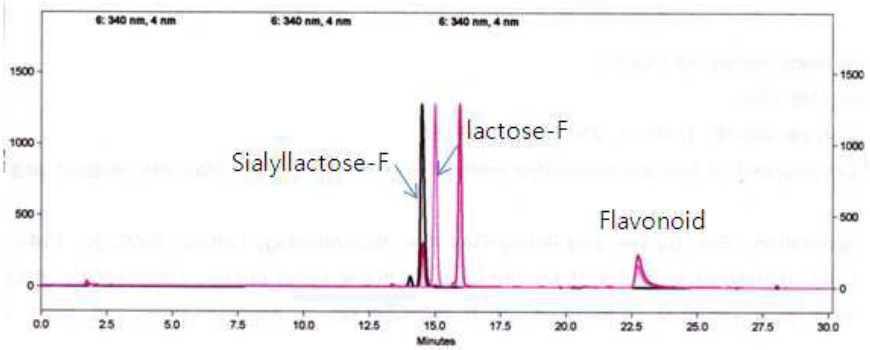

MASS
731.3
Max: 89543
300
600

도면9


Pyruvate
GlcNAc
ManNAc
NeuAc
CMP-sialic acid
Sialyltransferase
CMP
CDP
CTP
ATP
ADP
ACK
Acetyl-Pi
Acetate
6'-sialylation CSH-I-54 유도체: R1=sialic acid, R2=H
3'-sialylation CSH-I-54 유도체: R1=H, R2=sialic acid

도면10

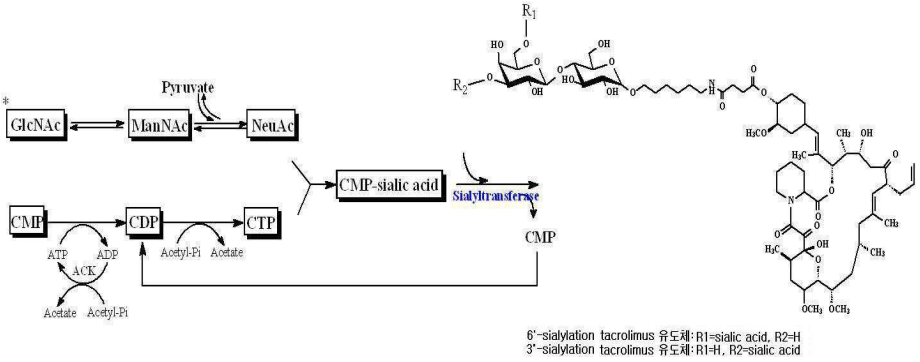
HPLC



Mass

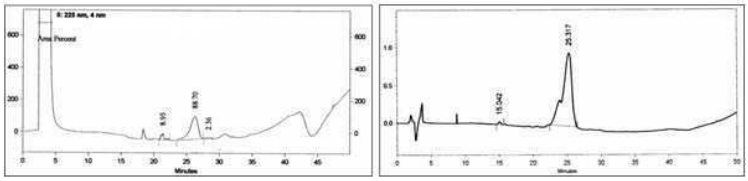


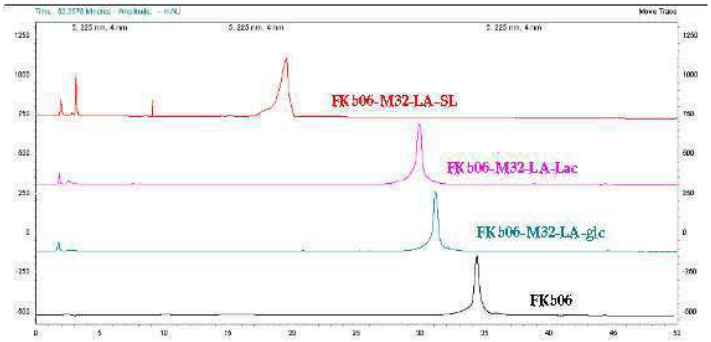
도면11



도면12a

HPLC

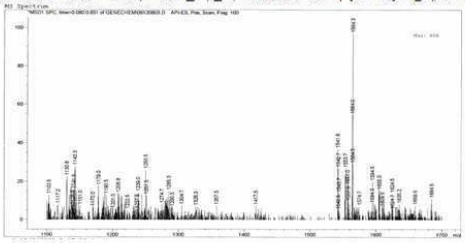




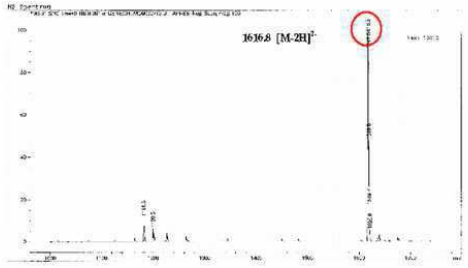
도면12b

Mass

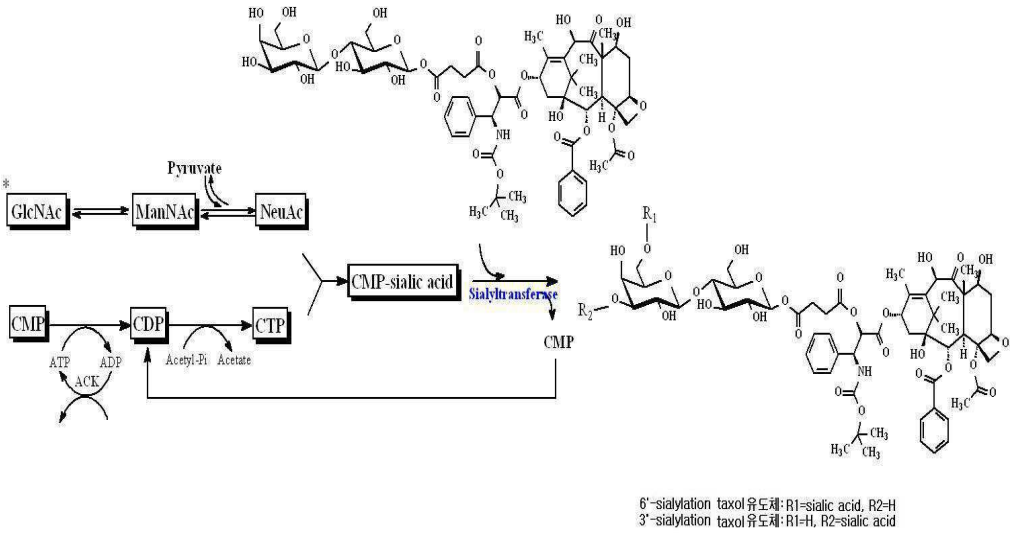
FK506-M32-LS-SL sodium salt의 mass 분석결과 Molecular ion이 [M+Na]+ 형태로 m/z 1564.3으로 검출됨.



FK506-M32-LA-SL의 mass 분석결과 Molecular ion이 [M-2H]2- 형태로 m/z 1616.8로 검출됨

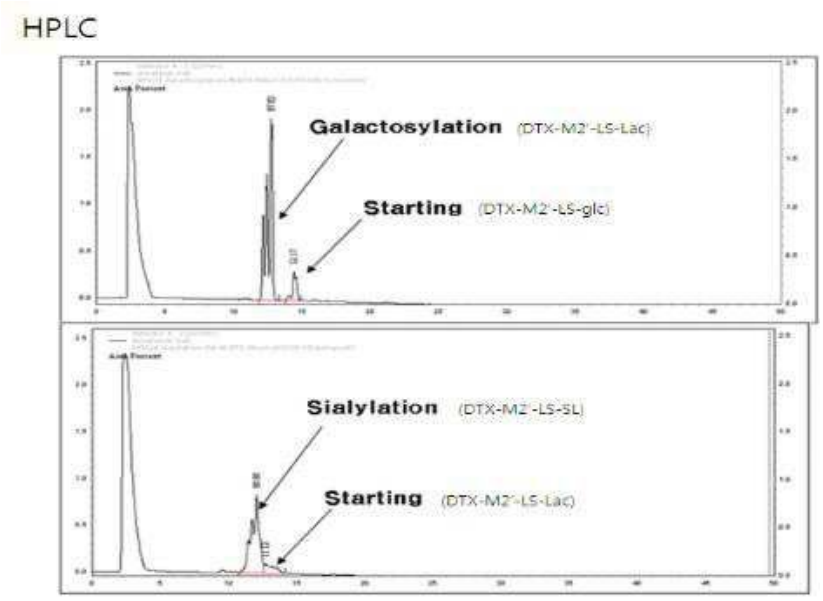


도면13

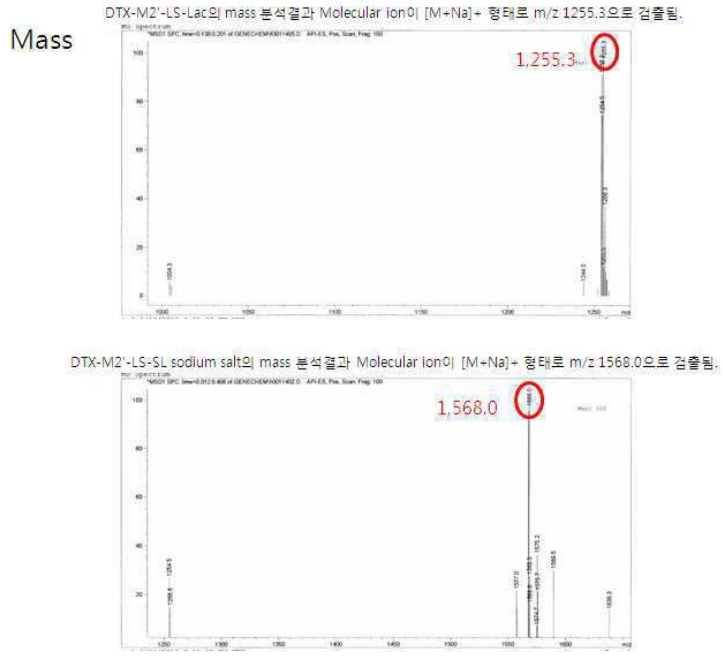


6'-sialylation taxol 유도체: R1=sialic acid, R2=H
3'-sialylation taxol 유도체: R1=H, R2=sialic acid

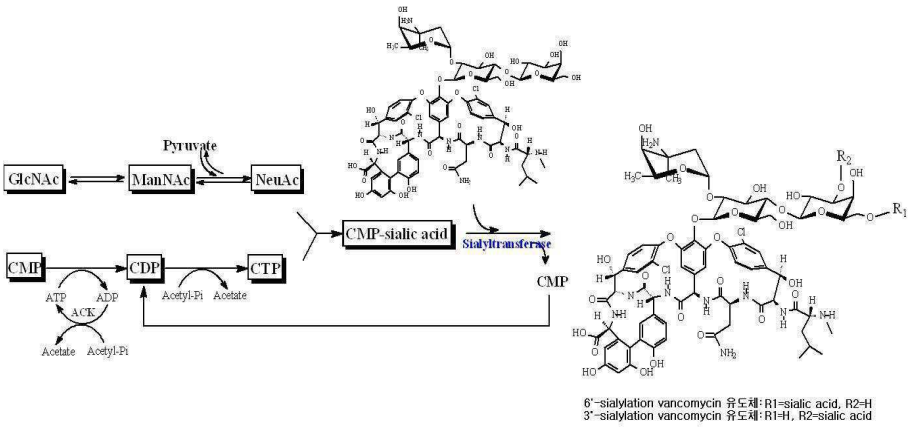
도면14a



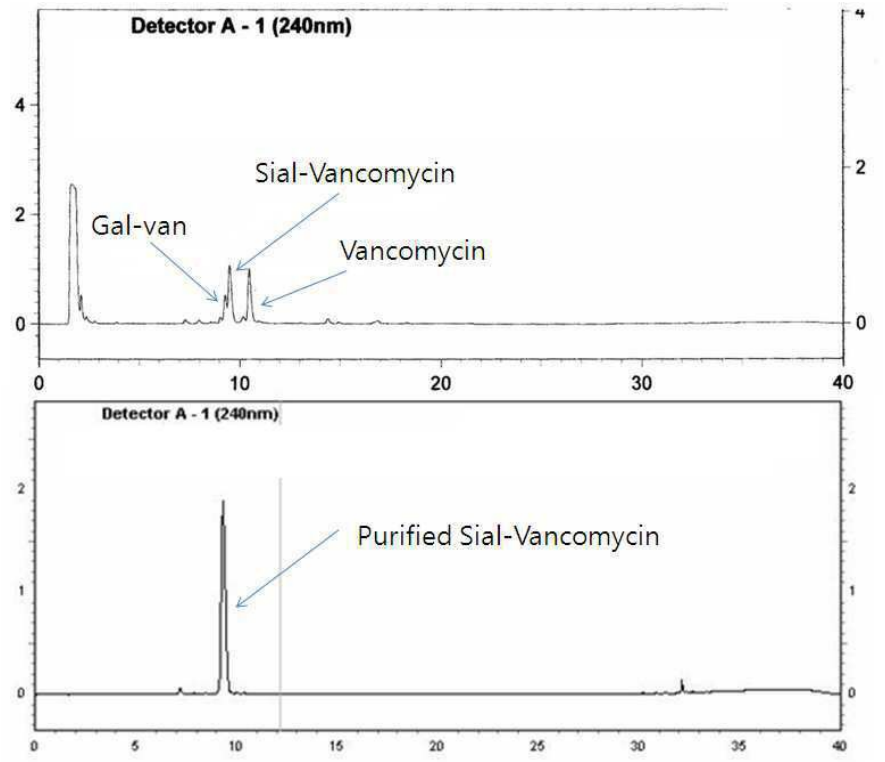
도면14b


Mass
DTX-M2'-LS-Lac의 mass 분석결과 Molecular ion이 [M+Na]+ 형태로 m/z 1255.3으로 검출됨.
1,255.3
DTX-M2'-LS-SL sodium salt의 mass 분석결과 Molecular ion이 [M+Na]+ 형태로 m/z 1568.0으로 검출됨.
1,568.0

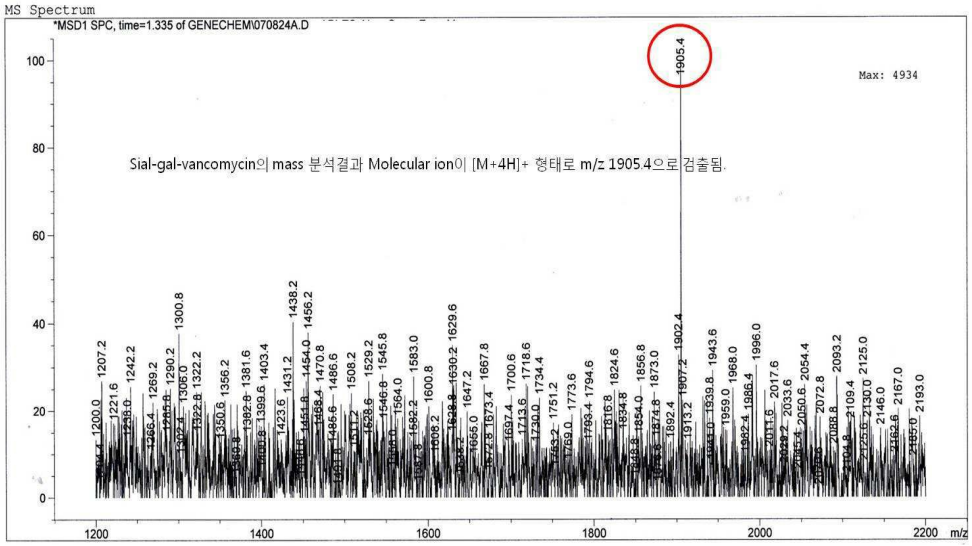
도면15


GlcNAc
ManNAc
NeuAc
Pyruvate
CMP
CDP
CTP
ATP
ADP
ACK
Acetate
Acetyl-Pi
CMP-sialic acid
Sialyltransferase
6'-sialylation vancomycin 유도체: R1=sialic acid, R2=H
3'-sialylation vancomycin 유도체: R1=H, R2=sialic acid

도면16a



도면16b



서 열 목 록

<110> GeneChem Inc.

<120> Method of Preparing Sialyl Derivative

<130> P13-B009

<160> 39

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 391

<212> PRT

<213> Pasteurella multosida

<400> 1

Met Lys Thr Ile Thr Leu Tyr Leu Asp Pro Ala Ser Leu Pro Ala Leu
1 5 10 15

Asn Gln Leu Met Asp Phe Thr Gln Asn Asn Glu Asp Lys Thr His Pro
20 25 30

Arg Ile Phe Gly Leu Ser Arg Phe Lys Ile Pro Asp Asn Ile Ile Thr
35 40 45

Gln Tyr Gln Asn Ile His Phe Val Glu Leu Lys Asp Asn Arg Pro Thr
50 55 60

Glu Ala Leu Phe Thr Ile Leu Asp Gln Tyr Pro Gly Asn Ile Glu Leu
65 70 75 80

Asn Ile His Leu Asn Ile Ala His Ser Val Gln Leu Ile Arg Pro Ile
85 90 95

Leu Ala Tyr Arg Phe Lys His Leu Asp Arg Val Ser Ile Gln Gln Leu
100 105 110

Asn Leu Tyr Asp Asp Gly Ser Met Glu Tyr Val Asp Leu Glu Lys Glu
115 120 125

Glu Asn Lys Asp Ile Ser Ala Glu Ile Lys Gln Ala Glu Lys Gln Leu
130 135 140

Ser His Tyr Leu Leu Thr Gly Lys Ile Lys Phe Asp Asn Pro Thr Ile
145 150 155 160

Ala Arg Tyr Val Trp Gln Ser Ala Phe Pro Val Lys Tyr His Phe Leu
165 170 175

Ser Thr Asp Tyr Phe Glu Lys Ala Glu Phe Leu Gln Pro Leu Lys Glu
180 185 190

Tyr Leu Ala Glu Asn Tyr Gln Lys Met Asp Trp Thr Ala Tyr Gln Gln
195 200 205

Leu Thr Pro Glu Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Thr Leu Val Gly Phe Asn

210 215 220

Asp Glu Val Lys Gln Ser Leu Glu Val Gln Gln Ala Lys Phe Ile Phe
225 230 235 240

Thr Gly Thr Thr Thr Trp Glu Gly Asn Thr Asp Val Arg Glu Tyr Tyr
245 250 255

Ala Gln Gln Gln Leu Asn Leu Leu Asn His Phe Thr Gln Ala Glu Gly
260 265 270

Asp Leu Phe Ile Gly Asp His Tyr Lys Ile Tyr Phe Lys Gly His Pro
275 280 285

Arg Gly Gly Glu Ile Asn Asp Tyr Ile Leu Asn Asn Ala Lys Asn Ile
290 295 300

Thr Asn Ile Pro Ala Asn Ile Ser Phe Glu Val Leu Met Met Thr Gly
305 310 315 320

Leu Leu Pro Asp Lys Val Gly Gly Val Ala Ser Ser Leu Tyr Phe Ser
325 330 335

Leu Pro Lys Glu Lys Ile Ser His Ile Ile Phe Thr Ser Asn Lys Gln
340 345 350

Val Lys Ser Lys Glu Asp Ala Leu Asn Asn Pro Tyr Val Lys Val Met
355 360 365

Arg Arg Leu Gly Ile Ile Asp Glu Ser Gln Val Ile Phe Trp Asp Ser
370 375 380

Leu Lys Gln Leu Gly Gly Gly
385 390

<210> 2

<211> 391

<212
> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R313N

<400> 2

Met Lys Thr Ile Thr Leu Tyr Leu Asp Pro Ala Ser Leu Pro Ala Leu
1 5 10 15

Asn Gln Leu Met Asp Phe Thr Gln Asn Asn Glu Asp Lys Thr His Pro

```
            20                  25                  30
Arg Ile Phe Gly Leu Ser Arg Phe Lys Ile Pro Asp Asn Ile Ile Thr
        35                  40                  45
Gln Tyr Gln Asn Ile His Phe Val Glu Leu Lys Asp Asn Arg Pro Thr

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

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

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

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

340 345 350
Val Lys Ser Lys Glu Asp Ala Leu Asn Asn Pro Tyr Val Lys Val Met
355 360 365
Arg Arg Leu Gly Ile Ile Asp Glu Ser Gln Val Ile Phe Trp Asp Ser
370 375 380
Leu Lys Gln Leu Gly Gly Gly
385 390

<210> 3

<211> 391

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R313H

<400> 3

Met Lys Thr Ile Thr Leu Tyr Leu Asp Pro Ala Ser Leu Pro Ala Leu

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

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

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

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

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

Leu Pro Lys Glu Lys Ile Ser His Ile Ile Phe Thr Ser Asn Lys Gln
340 345 350
Val Lys Ser Lys Glu Asp Ala Leu Asn Asn Pro Tyr Val Lys Val Met
355 360 365

Arg Arg Leu Gly Ile Ile Asp Glu Ser Gln Val Ile Phe Trp Asp Ser
370 375 380
Leu Lys Gln Leu Gly Gly Gly
385 390

<210> 4
<211> 391
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> T265S
<400> 4

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

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

100 105 110
Asn Leu Tyr Asp Asp Gly Ser Met Glu Tyr Val Asp Leu Glu Lys Glu
115 120 125
Glu Asn Lys Asp Ile Ser Ala Glu Ile Lys Gln Ala Glu Lys Gln Leu
130 135 140

Ser His Tyr Leu Leu Thr Gly Lys Ile Lys Phe Asp Asn Pro Thr Ile
145 150 155 160
Ala Arg Tyr Val Trp Gln Ser Ala Phe Pro Val Lys Tyr His Phe Leu
165 170 175

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

Leu Leu Pro Asp Lys Val Gly Gly Val Ala Ser Ser Leu Tyr Phe Ser
325 330 335
Leu Pro Lys Glu Lys Ile Ser His Ile Ile Phe Thr Ser Asn Lys Gln
340 345 350
Val Lys Ser Lys Glu Asp Ala Leu Asn Asn Pro Tyr Val Lys Val Met
355 360 365
Arg Arg Leu Gly Ile Ile Asp Glu Ser Gln Val Ile Phe Trp Asp Ser
370 375 380
Leu Lys Gln Leu Gly Gly Gly

385 390

<210> 5

<211> 391

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R313N+T265S

<400> 5

Met Lys Thr Ile Thr Leu Tyr Leu Asp Pro Ala Ser Leu Pro Ala Leu
1 5 10 15

Asn Gln Leu Met Asp Phe Thr Gln Asn Asn Glu Asp Lys Thr His Pro
20 25 30

Arg Ile Phe Gly Leu Ser Arg Phe Lys Ile Pro Asp Asn Ile Ile Thr
35 40 45

Gln Tyr Gln Asn Ile His Phe Val Glu Leu Lys Asp Asn Arg Pro Thr
50 55 60

Glu Ala Leu Phe Thr Ile Leu Asp Gln Tyr Pro Gly Asn Ile Glu Leu
65 70 75 80

Asn Ile His Leu Asn Ile Ala His Ser Val Gln Leu Ile Arg Pro Ile
85 90 95

Leu Ala Tyr Arg Phe Lys His Leu Asp Arg Val Ser Ile Gln Gln Leu
100 105 110

Asn Leu Tyr Asp Asp Gly Ser Met Glu Tyr Val Asp Leu Glu Lys Glu

115 120 125

Glu Asn Lys Asp Ile Ser Ala Glu Ile Lys Gln Ala Glu Lys Gln Leu
130 135 140

Ser His Tyr Leu Leu Thr Gly Lys Ile Lys Phe Asp Asn Pro Thr Ile
145 150 155 160

Ala Arg Tyr Val Trp Gln Ser Ala Phe Pro Val Lys Tyr His Phe Leu
165 170 175

Ser Thr Asp Tyr Phe Glu Lys Ala Glu Phe Leu Gln Pro Leu Lys Glu
180 185 190

Tyr Leu Ala Glu Asn Tyr Gln Lys Met Asp Trp Thr Ala Tyr Gln Gln

195 200 205

Leu Thr Pro Glu Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Thr Leu Val Gly Phe Asn

210 215 220

Asp Glu Val Lys Gln Ser Leu Glu Val Gln Gln Ala Lys Phe Ile Phe

225 230 235 240

Ser Gly Thr Thr Thr Trp Glu Gly Asn Thr Asp Val Arg Glu Tyr Tyr

245 250 255

Ala Gln Gln Gln Leu Asn Leu Leu Asn His Phe Thr Gln Ala Glu Gly

260 265 270

Asp Leu Phe Ile Gly Asp His Tyr Lys Ile Tyr Phe Lys Gly His Pro

275 280 285

Asn Gly Gly Glu Ile Asn Asp Tyr Ile Leu Asn Asn Ala Lys Asn Ile

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Leu Pro Asp Lys Val Gly Gly Val Ala Ser Ser Leu Tyr Phe Ser

325 330 335

Leu Pro Lys Glu Lys Ile Ser His Ile Ile Phe Thr Ser Asn Lys Gln

340 345 350

Val Lys Ser Lys Glu Asp Ala Leu Asn Asn Pro Tyr Val Lys Val Met

355 360 365

Arg Arg Leu Gly Ile Ile Asp Glu Ser Gln Val Ile Phe Trp Asp Ser

370 375 380

Leu Lys Gln Leu Gly Gly Gly

385 390

<210> 6

<211> 391

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R313H+T265S

<400> 6

Met Lys Thr Ile Thr Leu Tyr Leu Asp Pro Ala Ser Leu Pro Ala Leu

1 5 10 15

Asn Gln Leu Met Asp Phe Thr Gln Asn Asn Glu Asp Lys Thr His Pro

20 25 30

Arg Ile Phe Gly Leu Ser Arg Phe Lys Ile Pro Asp Asn Ile Ile Thr

35 40 45

Gln Tyr Gln Asn Ile His Phe Val Glu Leu Lys Asp Asn Arg Pro Thr

50 55 60

Glu Ala Leu Phe Thr Ile Leu Asp Gln Tyr Pro Gly Asn Ile Glu Leu

65 70 75 80

Asn Ile His Leu Asn Ile Ala His Ser Val Gln Leu Ile Arg Pro Ile

85 90 95

Leu Ala Tyr Arg Phe Lys His Leu Asp Arg Val Ser Ile Gln Gln Leu

100 105 110

Asn Leu Tyr Asp Asp Gly Ser Met Glu Tyr Val Asp Leu Glu Lys Glu

115 120 125

Glu Asn Lys Asp Ile Ser Ala Glu Ile Lys Gln Ala Glu Lys Gln Leu

130 135 140

Ser His Tyr Leu Leu Thr Gly Lys Ile Lys Phe Asp Asn Pro Thr Ile

145 150 155 160

Ala Arg Tyr Val Trp Gln Ser Ala Phe Pro Val Lys Tyr His Phe Leu

165 170 175

Ser Thr Asp Tyr Phe Glu Lys Ala Glu Phe Leu Gln Pro Leu Lys Glu

180 185 190

Tyr Leu Ala Glu Asn Tyr Gln Lys Met Asp Trp Thr Ala Tyr Gln Gln

195 200 205

Leu Thr Pro Glu Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Thr Leu Val Gly Phe Asn

210 215 220

Asp Glu Val Lys Gln Ser Leu Glu Val Gln Gln Ala Lys Phe Ile Phe

225 230 235 240

Ser Gly Thr Thr Thr Trp Glu Gly Asn Thr Asp Val Arg Glu Tyr Tyr

245 250 255

Ala Gln Gln Gln Leu Asn Leu Leu Asn His Phe Thr Gln Ala Glu Gly

260 265 270

Asp Leu Phe Ile Gly Asp His Tyr Lys Ile Tyr Phe Lys Gly His Pro

275 280 285

His Gly Gly Glu Ile Asn Asp Tyr Ile Leu Asn Asn Ala Lys Asn Ile

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Leu Pro Asp Lys Val Gly Gly Val Ala Ser Ser Leu Tyr Phe Ser

325 330 335

Leu Pro Lys Glu Lys Ile Ser His Ile Ile Phe Thr Ser Asn Lys Gln

340 345 350

Val Lys Ser Lys Glu Asp Ala Leu Asn Asn Pro Tyr Val Lys Val Met

355 360 365

Arg Arg Leu Gly Ile Ile Asp Glu Ser Gln Val Ile Phe Trp Asp Ser

370 375 380

Leu Lys Gln Leu Gly Gly Gly

385 390

<210> 7

<211> 1173

<212> DNA

<213> Pasteurella multosida

<400> 7

atgaaaacaa tcacgctgta tttagatcct gcctccttac cggcattaaa tcagctgatg 60

gactttacgc aaaataatga agataaaaca catccacgta tttttggtct ttctcgcttt 120

aaaatccctg acaacattat tacacagtat caaaatatcc atttcgtcga actcaaagat 180

aatcgtccca ctgaagcact ttttacgatt ttagatcaat accctggtaa cattgagtta 240

aatatacact taaatattgc tcattccgtt caattaattc gtccgatttt ggcatatcgt 300

tttaaacatt tagatcgtgt atcaattcag cagttaaatc tttatgacga tggctcaatg 360

gaatatgttg atttagaaaa agaagaaaat aaagatattt ccgcagaaat taagcaagca 420

gaaaaacaac tttctcacta tttgcttact ggcaaaataa aatttgataa cccaactatt 480

gctcgttatg tctggcaatc cgcgttccca gtaaaatatc atttttaag tacagactat 540

tttgaaaaag ccgaattttt acaaccacta aaagaatatt tagcagaaaa ttatcaaaaa 600

atggactgga ctgcttacca acagctgact ccagaacagc aagcattcta cttaacattg 660

gtaggcttca atgacgaagt caagcagtcg ctagaagtgc aacaagctaa atttatcttt 720

accggcacga caacttggga aggaaatacc gatgtgcgag aatactacgc acagcaacaa 780

cttaatttac ttaatcactt tacccaagct gagggcgatt tatttattgg tgatcattat 840

aaaatctact ttaaagggca tcctagaggt ggtgaaatta atgactacat tctgaacaat 900

gctaaaaata tcaccaatat ccctgccaat atttcctttg aagtattgat gatgacaggc 960

ttattacctg ataaagtggg tggtgttgca agttcactgt atttctcctt accaaaagaa 1020

aaaattagcc atattatttt cacatcgaat aaacaagtga aaagcaaaga agatgcgcta 1080

aataatccgt atgttaaggt catgcgtcgt ttaggtataa ttgacgaatc acaagtcatc 1140

ttttgggaca gtttaaaaca gttgggtgga ggt 1173

<210> 8

<211> 1173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R313N

<400> 8

atgaaaacaa tcacgctgta tttagatcct gcctccttac cggcattaaa tcagctgatg 60

gactttacgc aaaataatga agataaaaca catccacgta tttttggtct ttctcgcttt 120

aaaatccctg acaacattat tacacagtat caaaatatcc atttcgtcga actcaaagat 180

aatcgtccca ctgaagcact ttttacgatt ttagatcaat accctggtaa cattgagtta 240

aatatacact taaatattgc tcattccgtt caattaattc gtccgatttt ggcatatcgt 300

tttaaacatt tagatcgtgt atcaattcag cagttaaatc tttatgacga tggctcaatg 360

gaatatgttg atttagaaaa agaagaaaat aaagatattt ccgcagaaat taagcaagca 420

gaaaaacaac tttctcacta tttgcttact ggcaaaataa aatttgataa cccaactatt 480

gctcgttatg tctggcaatc cgcgttccca gtaaaatatc atttttaag tacagactat 540

tttgaaaaag ccgaattttt acaaccacta aaagaatatt tagcagaaaa ttatcaaaaa 600

atggactgga ctgcttacca acagctgact ccagaacagc aagcattcta cttaacattg 660

gtaggcttca atgacgaagt caagcagtcg ctagaagtgc aacaagctaa atttatcttt 720

accggcacga caacttggga aggaaatacc gatgtgcgag aatactacgc acagcaacaa 780

cttaatttac ttaatcactt tacccaagct gagggcgatt tatttattgg tgatcattat 840

aaaatctact ttaaagggca tcctaatggt ggtgaaatta atgactacat tctgaacaat 900

gctaaaaata tcaccaatat ccctgccaat atttcctttg aagtattgat gatgacaggc 960

ttattacctg ataaagtggg tggtgttgca agttcactgt atttctcctt accaaaagaa 1020

aaaattagcc atattatttt cacatcgaat aaacaagtga aaagcaaaga agatgcgcta 1080

aataatccgt atgttaaggt catgcgtcgt ttaggtataa ttgacgaatc acaagtcatc 1140

ttttgggaca gtttaaaaca gttgggtgga ggt 1173

<210> 9

<211> 1173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R313H

<400> 9

atgaaaacaa tcacgctgta tttagatcct gcctccttac cggcattaaa tcagctgatg 60

gactttacgc aaaataatga agataaaaca catccacgta tttttggtct ttctcgcttt 120

aaaatccctg acaacattat tacacagtat caaaatatcc atttcgtcga actcaaagat 180

aatcgtccca ctgaagcact ttttacgatt ttagatcaat accctggtaa cattgagtta 240

aatatacact taaatattgc tcattccgtt caattaattc gtccgatttt ggcatatcgt 300

tttaaacatt tagatcgtgt atcaattcag cagttaaatc tttatgacga tggctcaatg 360

gaatatgttg atttagaaaa agaagaaaat aaagatattt ccgcagaaat taagcaagca 420

gaaaaacaac tttctcacta tttgcttact ggcaaaataa aatttgataa cccaactatt 480

gctcgttatg tctggcaatc cgcgttccca gtaaaatatc atttttttaag tacagactat 540

tttgaaaaag ccgaattttt acaaccacta aaagaatatt tagcagaaaa ttatcaaaaa 600

atggactgga ctgcttacca acagctgact ccagaacagc aagcattcta cttaacattg 660

gtaggcttca atgacgaagt caagcagtcg ctagaagtgc aacaagctaa atttatcttt 720

agtggcacga caacttggga aggaaatacc gatgtgcgag aatactacgc acagcaacaa 780

cttaatttac ttaatcactt tacccaagct gagggcgatt tatttattgg tgatcattat 840

aaaatctact ttaaagggca tcctcatggt ggtgaaatta atgactacat tctgaacaat 900

gctaaaaata tcaccaatat ccctgccaat atttcctttg aagtattgat gatgacaggc 960

ttattacctg ataaagtggg tggtgttgca agttcactgt atttctcctt accaaaagaa 1020

aaaattagcc atattatttt cacatcgaat aaacaagtga aaagcaaaga agatgcgcta 1080

aataatccgt atgttaaggt catgcgtcgt ttaggtataa ttgacgaatc acaagtcatc 1140

ttttgggaca gtttaaaaca gttgggtgga ggt 1173

<210> 10

<211> 1173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T265S

<400> 10

atgaaaacaa tcacgctgta tttagatcct gcctccttac cggcattaaa tcagctgatg 60

gactttacgc aaaataatga agataaaaca catccacgta tttttggtct ttctcgcttt 120

aaaatccctg acaacattat tacacagtat caaaatatcc atttcgtcga actcaaagat 180

aatcgtccca ctgaagcact ttttacgatt ttagatcaat accctggtaa cattgagtta 240

aatatacact taaatattgc tcattccgtt caattaattc gtccgatttt ggcatatcgt 300

tttaaacatt tagatcgtgt atcaattcag cagttaaatc tttatgacga tggctcaatg 360

gaatatgttg atttagaaaa agaagaaaat aaagatattt ccgcagaaat taagcaagca 420

gaaaaacaac tttctcacta tttgcttact ggcaaaataa aatttgataa cccaactatt 480

gctcgttatg tctggcaatc cgcgttccca gtaaaatatc atttttaag tacagactat 540

tttgaaaaag ccgaattttt acaaccacta aaagaatatt tagcagaaaa ttatcaaaaa 600

atggactgga ctgcttacca acagctgact ccagaacagc aagcattcta cttaacattg 660

gtaggcttca atgacgaagt caagcagtcg ctagaagtgc aacaagctaa atttatcttt 720

agtggcacga caacttggga aggaaatacc gatgtgcgag aatactacgc acagcaacaa 780

cttaatttac ttaatcactt tacccaagct gagggcgatt tatttattgg tgatcattat 840

aaaatctact ttaaagggca tcctagaggt ggtgaaatta atgactacat tctgaacaat 900

gctaaaaata tcaccaatat ccctgccaat atttcctttg aagtattgat gatgacaggc 960

ttattacctg ataaagtggg tggtgttgca agttcactgt atttctcctt accaaaagaa 1020

aaaattagcc atattatttt cacatcgaat aaacaagtga aaagcaaaga agatgcgcta 1080

aataatccgt atgttaaggt catgcgtcgt ttaggtataa ttgacgaatc acaagtcatc 1140

ttttgggaca gtttaaaaca gttgggtgga ggt 1173

<210> 11

<211> 1173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R313N+T265S

<400> 11

atgaaaacaa tcacgctgta tttagatcct gcctccttac cggcattaaa tcagctgatg 60

gactttacgc aaaataatga agataaaaca catccacgta tttttggtct ttctcgcttt 120

aaaatccctg acaacattat tacacagtat caaaatatcc atttcgtcga actcaaagat 180

aatcgtccca ctgaagcact ttttacgatt ttagatcaat accctggtaa cattgagtta 240

aatatacact taaatattgc tcattccgtt caattaattc gtccgatttt ggcatatcgt 300

tttaaacatt tagatcgtgt atcaattcag cagttaaatc tttatgacga tggctcaatg 360

gaatatgttg atttagaaaa agaagaaaat aaagatattt ccgcagaaat taagcaagca 420

gaaaaacaac tttctcacta tttgcttact ggcaaaataa aatttgataa cccaactatt 480

gctcgttatg tctggcaatc cgcgttccca gtaaaatatc atttttaag tacagactat 540

tttgaaaaag ccgaattttt acaaccacta aaagaatatt tagcagaaaa ttatcaaaaa 600

atggactgga ctgcttacca acagctgact ccagaacagc aagcattcta cttaacattg 660

gtaggcttca atgacgaagt caagcagtcg ctagaagtgc aacaagctaa atttatcttt 720

agcggcacga caacttggga aggaaatacc gatgtgcgag aatactacgc acagcaacaa 780

cttaatttac ttaatcactt tacccaagct gagggcgatt tatttattgg tgatcattat 840

aaaatctact ttaaagggca tcctaatggt ggtgaaatta atgactacat tctgaacaat 900

gctaaaaata tcaccaatat ccctgccaat atttcctttg aagtattgat gatgacaggc 960

ttattacctg ataaagtggg tggtgttgca agttcactgt atttctcctt accaaaagaa 1020

aaaattagcc atattatttt cacatcgaat aaacaagtga aaagcaaaga agatgcgcta 1080

aataatccgt atgttaaggt catgcgtcgt ttaggtataa ttgacgaatc acaagtcatc 1140

ttttgggaca gtttaaaaca gttgggtgga ggt 1173

<210> 12

<211> 1173

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R313H+T265S

<400> 12

atgaaaacaa tcacgctgta tttagatcct gcctccttac cggcattaaa tcagctgatg 60

gactttacgc aaaataatga agataaaaca catccacgta tttttggtct ttctcgcttt 120

aaaatccctg acaacattat tacacagtat caaaatatcc atttcgtcga actcaaagat 180

aatcgtccca ctgaagcact ttttacgatt ttagatcaat accctggtaa cattgagtta 240

aatatacact taaatattgc tcattccgtt caattaattc gtccgatttt ggcatatcgt 300

tttaaacatt tagatcgtgt atcaattcag cagttaaatc tttatgacga tggctcaatg 360

gaatatgttg atttagaaaa agaagaaaat aaagatattt ccgcagaaat taagcaagca 420

gaaaaacaac tttctcacta tttgcttact ggcaaaataa aatttgataa cccaactatt 480

gctcgttatg tctggcaatc cgcgttccca gtaaaatatc atttttaag tacagactat 540

tttgaaaaag ccgaattttt acaaccacta aaagaatatt tagcagaaaa ttatcaaaaa 600

atggactgga ctgcttacca acagctgact ccagaacagc aagcattcta cttaacattg 660

gtaggcttca atgacgaagt caagcagtcg ctagaagtgc aacaagctaa atttatcttt 720

agcggcacga caacttggga aggaaatacc gatgtgcgag aatactacgc acagcaacaa 780

cttaatttac ttaatcactt tacccaagct gagggcgatt tatttattgg tgatcattat 840

aaaatctact ttaaagggca tcctcatggt ggtgaaatta atgactacat tctgaacaat 900

gctaaaaata tcaccaatat ccctgccaat atttcctttg aagtattgat gatgacaggc 960

ttattacctg ataaagtggg tggtgttgca agttcactgt atttctcctt accaaaagaa 1020

aaaattagcc atattatttt cacatcgaat aaacaagtga aaagcaaaga agatgcgcta 1080

aataatccgt atgttaaggt catgcgtcgt ttaggtataa ttgacgaatc acaagtcatc 1140

ttttgggaca gtttaaaaca gttgggtgga ggt 1173

<210> 13

<211> 483

<212> PRT

<213> Photobacterium damselae

<400> 13

Met Cys Asn Ser Asp Asn Thr Ser Leu Lys Glu Thr Val Ser Ser Asn

1 5 10 15

Ser Ala Asp Val Val Glu Thr Glu Thr Tyr Gln Leu Thr Pro Ile Asp

20 25 30

Ala Pro Ser Ser Phe Leu Ser His Ser Trp Glu Gln Thr Cys Gly Thr

35 40 45

Pro Ile Leu Asn Glu Ser Asp Lys Gln Ala Ile Ser Phe Asp Phe Val

50 55 60

Ala Pro Glu Leu Lys Gln Asp Glu Lys Tyr Cys Phe Thr Phe Lys Gly

65 70 75 80

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

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

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

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

Pro Asn Phe Ile Phe Thr Gly Thr Thr Thr Trp Ala Gly Gly Glu Thr
340 345 350
Lys Glu Tyr Tyr Ala Gln Gln Gln Val Asn Val Ile Asn Asn Ala Ile
355 360 365

Asn Glu Thr Ser Pro Tyr Tyr Leu Gly Lys Asp Tyr Asp Leu Phe Phe
370 375 380
Lys Gly His Pro Ala Gly Gly Val Ile Asn Asp Ile Ile Leu Gly Ser
385 390 395 400
Phe Pro Asp Met Ile Asn Ile Pro Ala Lys Ile Ser Phe Glu Val Leu
405 410 415
Met Met Thr Asp Met Leu Pro Asp Thr Val Ala Gly Ile Ala Ser Ser
420 425 430
Leu Tyr Phe Thr Ile Pro Ala Asp Lys Val Asn Phe Ile Val Phe Thr

435 440 445
Ser Ser Asp Thr Ile Thr Asp Arg Glu Glu Ala Leu Lys Ser Pro Leu
450 455 460
Val Gln Val Met Leu Thr Leu Gly Ile Val Lys Glu Lys Asp Val Leu
465 470 475 480
Phe Trp Ala

<210> 14
<211> 483
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> I411T
<400> 14
Met Cys Asn Ser Asp Asn Thr Ser Leu Lys Glu Thr Val Ser Ser Asn
1 5 10 15

Ser Ala Asp Val Val Glu Thr Glu Thr Tyr Gln Leu Thr Pro Ile Asp
20 25 30
Ala Pro Ser Ser Phe Leu Ser His Ser Trp Glu Gln Thr Cys Gly Thr
35 40 45

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

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

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

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

290 295 300

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

370 375 380
Lys Gly His Pro Ala Gly Gly Val Ile Asn Asp Ile Ile Leu Gly Ser
385 390 395 400
Phe Pro Asp Met Ile Asn Ile Pro Ala Lys Thr Ser Phe Glu Val Leu
405 410 415
Met Met Thr Asp Met Leu Pro Asp Thr Val Ala Gly Ile Ala Ser Ser
420 425 430
Leu Tyr Phe Thr Ile Pro Ala Asp Lys Val Asn Phe Ile Val Phe Thr
435 440 445

Ser Ser Asp Thr Ile Thr Asp Arg Glu Glu Ala Leu Lys Ser Pro Leu
450 455 460
Val Gln Val Met Leu Thr Leu Gly Ile Val Lys Glu Lys Asp Val Leu
465 470 475 480
Phe Trp Ala

<210> 15
<211> 483
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> L433S
<400> 15
Met Cys Asn Ser Asp Asn Thr Ser Leu Lys Glu Thr Val Ser Ser Asn

1 5 10 15

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

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

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

225 230 235 240
Ser Leu Leu Ala Asn Tyr Leu Ala Gly Thr Ser Pro Asp Ala Pro Lys
245 250 255

Gly Met Gly Asn Arg Tyr Asn Trp His Lys Leu Tyr Asp Thr Asp Tyr
260 265 270
Tyr Phe Leu Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Glu Ala Asn Leu His Asp
275 280 285
Leu Arg Asp Tyr Leu Gly Ser Ser Ala Lys Gln Met Pro Trp Asp Glu
290 295 300

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

370 375 380
Lys Gly His Pro Ala Gly Gly Val Ile Asn Asp Ile Ile Leu Gly Ser
385 390 395 400
Phe Pro Asp Met Ile Asn Ile Pro Ala Lys Ile Ser Phe Glu Val Leu
405 410 415
Met Met Thr Asp Met Leu Pro Asp Thr Val Ala Gly Ile Ala Ser Ser
420 425 430
Ser Tyr Phe Thr Ile Pro Ala Asp Lys Val Asn Phe Ile Val Phe Thr
435 440 445

Ser Ser Asp Thr Ile Thr Asp Arg Glu Glu Ala Leu Lys Ser Pro Leu
450 455 460
Val Gln Val Met Leu Thr Leu Gly Ile Val Lys Glu Lys Asp Val Leu
465 470 475 480
Phe Trp Ala

<210> 16
<211> 483

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> L433T

<400> 16

Met Cys Asn Ser Asp Asn Thr Ser Leu Lys Glu Thr Val Ser Ser Asn
1 5 10 15

Ser Ala Asp Val Val Glu Thr Glu Thr Tyr Gln Leu Thr Pro Ile Asp
20 25 30

Ala Pro Ser Ser Phe Leu Ser His Ser Trp Glu Gln Thr Cys Gly Thr
35 40 45

Pro Ile Leu Asn Glu Ser Asp Lys Gln Ala Ile Ser Phe Asp Phe Val
50 55 60

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

Ile Thr Gly Asp His Arg Tyr Ile Thr Asn Thr Thr Leu Thr Val Val
85 90 95

Ala Pro Thr Leu Glu Val Tyr Ile Asp His Ala Ser Leu Pro Ser Leu
100 105 110

Gln Gln Leu Ile His Ile Ile Gln Ala Lys Asp Glu Tyr Pro Ser Asn
115 120 125

Gln Arg Phe Val Ser Trp Lys Arg Val Thr Val Asp Ala Asp Asn Ala
130 135 140

Asn Lys Leu Asn Ile His Thr Tyr Pro Leu Lys Gly Asn Asn Thr Ser
145 150 155 160

Pro Glu Met Val Ala Ala Ile Asp Glu Tyr Ala Gln Ser Lys Asn Arg
165 170 175

Leu Asn Ile Glu Phe Tyr Thr Asn Thr Ala His Val Phe Asn Asn Leu
180 185 190

Pro Pro Ile Ile Gln Pro Leu Tyr Asn Asn Glu Lys Val Lys Ile Ser
195 200 205

His Ile Ser Leu Tyr Asp Asp Gly Ser Ser Glu Tyr Val Ser Leu Tyr
210 215 220

Gln Trp Lys Asp Thr Pro Asn Lys Ile Glu Thr Leu Glu Gly Glu Val

225 230 235 240

Ser Leu Leu Ala Asn Tyr Leu Ala Gly Thr Ser Pro Asp Ala Pro Lys

245 250 255

Gly Met Gly Asn Arg Tyr Asn Trp His Lys Leu Tyr Asp Thr Asp Tyr

260 265 270

Tyr Phe Leu Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Glu Ala Asn Leu His Asp

275 280 285

Leu Arg Asp Tyr Leu Gly Ser Ser Ala Lys Gln Met Pro Trp Asp Glu

290 295 300

Phe Ala Lys Leu Ser Asp Ser Gln Gln Thr Leu Phe Leu Asp Ile Val

305 310 315 320

Gly Phe Asp Lys Glu Gln Leu Gln Gln Gln Tyr Ser Gln Ser Pro Leu

325 330 335

Pro Asn Phe Ile Phe Thr Gly Thr Thr Thr Trp Ala Gly Gly Glu Thr

340 345 350

Lys Glu Tyr Tyr Ala Gln Gln Gln Val Asn Val Ile Asn Asn Ala Ile

355 360 365

Asn Glu Thr Ser Pro Tyr Tyr Leu Gly Lys Asp Tyr Asp Leu Phe Phe

370 375 380

Lys Gly His Pro Ala Gly Gly Val Ile Asn Asp Ile Ile Leu Gly Ser

385 390 395 400

Phe Pro Asp Met Ile Asn Ile Pro Ala Lys Ile Ser Phe Glu Val Leu

405 410 415

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

420 425 430

Thr Tyr Phe Thr Ile Pro Ala Asp Lys Val Asn Phe Ile Val Phe Thr

435 440 445

Ser Ser Asp Thr Ile Thr Asp Arg Glu Glu Ala Leu Lys Ser Pro Leu

450 455 460

Val Gln Val Met Leu Thr Leu Gly Ile Val Lys Glu Lys Asp Val Leu

465 470 475 480

Phe Trp Ala

<210> 17

<211> 483

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> I411T+L433S

<400> 17

Met Cys Asn Ser Asp Asn Thr Ser Leu Lys Glu Thr Val Ser Ser Asn

1 5 10 15

Ser Ala Asp Val Val Glu Thr Glu Thr Tyr Gln Leu Thr Pro Ile Asp

20 25 30

Ala Pro Ser Ser Phe Leu Ser His Ser Trp Glu Gln Thr Cys Gly Thr

35 40 45

Pro Ile Leu Asn Glu Ser Asp Lys Gln Ala Ile Ser Phe Asp Phe Val

50 55 60

Ala Pro Glu Leu Lys Gln Asp Glu Lys Tyr Cys Phe Thr Phe Lys Gly

65 70 75 80

Ile Thr Gly Asp His Arg Tyr Ile Thr Asn Thr Thr Leu Thr Val Val

85 90 95

Ala Pro Thr Leu Glu Val Tyr Ile Asp His Ala Ser Leu Pro Ser Leu

100 105 110

Gln Gln Leu Ile His Ile Ile Gln Ala Lys Asp Glu Tyr Pro Ser Asn

115 120 125

Gln Arg Phe Val Ser Trp Lys Arg Val Thr Val Asp Ala Asp Asn Ala

130 135 140

Asn Lys Leu Asn Ile His Thr Tyr Pro Leu Lys Gly Asn Asn Thr Ser

145 150 155 160

Pro Glu Met Val Ala Ala Ile Asp Glu Tyr Ala Gln Ser Lys Asn Arg

165 170 175

Leu Asn Ile Glu Phe Tyr Thr Asn Thr Ala His Val Phe Asn Asn Leu

180 185 190

Pro Pro Ile Ile Gln Pro Leu Tyr Asn Asn Glu Lys Val Lys Ile Ser

195 200 205

His Ile Ser Leu Tyr Asp Asp Gly Ser Ser Glu Tyr Val Ser Leu Tyr

210 215 220

Gln Trp Lys Asp Thr Pro Asn Lys Ile Glu Thr Leu Glu Gly Glu Val

225 230 235 240

Ser Leu Leu Ala Asn Tyr Leu Ala Gly Thr Ser Pro Asp Ala Pro Lys

245 250 255

Gly Met Gly Asn Arg Tyr Asn Trp His Lys Leu Tyr Asp Thr Asp Tyr

260 265 270

Tyr Phe Leu Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Glu Ala Asn Leu His Asp

275 280 285

Leu Arg Asp Tyr Leu Gly Ser Ser Ala Lys Gln Met Pro Trp Asp Glu

290 295 300

Phe Ala Lys Leu Ser Asp Ser Gln Gln Thr Leu Phe Leu Asp Ile Val

305 310 315 320

Gly Phe Asp Lys Glu Gln Leu Gln Gln Gln Tyr Ser Gln Ser Pro Leu

325 330 335

Pro Asn Phe Ile Phe Thr Gly Thr Thr Thr Trp Ala Gly Gly Glu Thr

340 345 350

Lys Glu Tyr Tyr Ala Gln Gln Gln Val Asn Val Ile Asn Asn Ala Ile

355 360 365

Asn Glu Thr Ser Pro Tyr Tyr Leu Gly Lys Asp Tyr Asp Leu Phe Phe

370 375 380

Lys Gly His Pro Ala Gly Gly Val Ile Asn Asp Ile Ile Leu Gly Ser

385 390 395 400

Phe Pro Asp Met Ile Asn Ile Pro Ala Lys Thr Ser Phe Glu Val Leu

405 410 415

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

420 425 430

Ser Tyr Phe Thr Ile Pro Ala Asp Lys Val Asn Phe Ile Val Phe Thr

435 440 445

Ser Ser Asp Thr Ile Thr Asp Arg Glu Glu Ala Leu Lys Ser Pro Leu
450 455 460
Val Gln Val Met Leu Thr Leu Gly Ile Val Lys Glu Lys Asp Val Leu
465 470 475 480
Phe Trp Ala

<210> 18
<211> 483
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> I411T+L433T
<400> 18
Met Cys Asn Ser Asp Asn Thr Ser Leu Lys Glu Thr Val Ser Ser Asn
1 5 10 15

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

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

145 150 155 160

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

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

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

370 375 380
Lys Gly His Pro Ala Gly Gly Val Ile Asn Asp Ile Ile Leu Gly Ser
385 390 395 400

Phe Pro Asp Met Ile Asn Ile Pro Ala Lys Thr Ser Phe Glu Val Leu
405 410 415
Met Met Thr Asp Met Leu Pro Asp Thr Val Ala Gly Ile Ala Ser Ser
420 425 430
Thr Tyr Phe Thr Ile Pro Ala Asp Lys Val Asn Phe Ile Val Phe Thr
435 440 445

Ser Ser Asp Thr Ile Thr Asp Arg Glu Glu Ala Leu Lys Ser Pro Leu
450 455 460
Val Gln Val Met Leu Thr Leu Gly Ile Val Lys Glu Lys Asp Val Leu
465 470 475 480
Phe Trp Ala

<210> 19
<211> 1449
<212> DNA
<213> Photobacterium damselae
<400> 19
atgtgtaata gtgacaatac cagcttgaaa gaaacggtaa gctctaattc tgcagatgta 60
gtagaaacag aaacttacca actgacaccg attgatgctc ctagctcttt tttatctcat 120

tcttgggagc aaacatgtgg cacacctatc ttgaatgaaa gtgacaagca agcgatatct 180
tttgattttg ttgctccaga gttaaagcaa gatgaaaagt attgttttac ttttaaaggt 240
attacaggcg atcataggta tatcacaaat acaacattaa ctgttgttgc acctacgcta 300
gaagtttaca tcgatcatgc atccttacca tcgctacagc agcttatcca cattattcaa 360
gcaaaagatg aatacccaag taatcaacgt tttgtctctt ggaagcgtgt aactgttgat 420
gctgataatg ccaataagtt aaacattcat acttatccat taaaaggcaa taatacctca 480
ccagaaatgg tggcagcgat tgatgagtat gctcagagca aaaatcgatt gaatatagag 540

ttctatacaa atacagctca tgtttttaat aatttaccac ctattattca acctttatat 600
aataacgaga aggtgaaaat ttctcatatt agtttgtatg atgatggttc ttctgaatat 660
gtaagtttat atcaatggaa agatacacca aataagatag aaacattaga aggtgaagta 720
tcgcttcttg ctaattattt agcaggaaca tctccggatg caccaaaagg aatgggaaat 780
cgttataact ggcataaatt atatgacact gattattact ttttgcgcga agattacctt 840
gacgttgaag caaacctaca tgatttacgt gattatttag gctcttccgc aaagcaaatg 900

ccatgggatg aatttgctaa attatctgat tctcagcaaa cactattttt agatattgtg 960

ggttttgata aagagcaatt gcaacaacaa tattcacaat ccccactacc aaactttatt 1020

tttaccggca caacaacttg ggctgggggg gaaacgaaag agtattatgc tcagcaacaa 1080

gtaaatgtga ttaataatgc gatcaatgaa actagccctt attatttagg taaagactac 1140

gatctatttt tcaaggggca tcctgctggt ggcgttatta acgacatcat tcttggaagc 1200

ttccctgata tgatcaatat tccagccaag atttcatttg aggtcttgat gatgacggat 1260

atgttgcctg atacagtagc tggtattgcg agctctctgt acttcacaat tcctgccgat 1320

aaagttaatt ttattgtatt tacttcatct gacactatta ctgatcgtga agaggctctt 1380

aaatcaccat tagtacaagt gatgctaacg ttgggtattg ttaaagaaaa agatgttctg 1440

ttctgggct 1449

<210> 20

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> I411T

<400> 20

atgtgtaata gtgacaatac cagcttgaaa gaaacggtaa gctctaattc tgcagatgta 60

gtagaaacag aaacttacca actgacaccg attgatgctc ctagctcttt tttatctcat 120

tcttgggagc aaacatgtgg cacacctatc ttgaatgaaa gtgacaagca agcgatatct 180

tttgattttg ttgctccaga gttaaagcaa gatgaaaagt attgttttac ttttaaaggt 240

attacaggcg atcataggta tatcacaaat acaacattaa ctgttgttgc acctacgcta 300

gaagtttaca tcgatcatgc atccttacca tcgctacagc agcttatcca cattattcaa 360

gcaaaagatg aatacccaag taatcaacgt tttgtctctt ggaagcgtgt aactgttgat 420

gctgataatg ccaataagtt aaacattcat acttatccat taaaaggcaa taatacctca 480

ccagaaatgg tggcagcgat tgatgagtat gctcagagca aaaatcgatt gaatatagag 540

ttctatacaa atacagctca tgtttttaat aatttaccac ctattattca acctttatat 600

aataacgaga aggtgaaaat ttctcatatt agtttgtatg atgatggttc ttctgaatat 660

gtaagtttat atcaatggaa agatacacca aataagatag aaacattaga aggtgaagta 720

tcgcttcttg ctaattattt agcaggaaca tctccggatg caccaaaagg aatgggaaat 780

cgttataact ggcataaatt atatgacact gattattact ttttgcgcga agattacctt 840

gacgttgaag caaacctaca tgatttacgt gattatttag gctcttccgc aaagcaaatg 900

ccatgggatg aatttgctaa attatctgat tctcagcaaa cactattttt agatattgtg 960

ggttttgata aagagcaatt gcaacaacaa tattcacaat ccccactacc aaactttatt 1020

tttaccggca caacaacttg ggctgggggg gaaacgaaag agtattatgc tcagcaacaa 1080

gtaaatgtga ttaataatgc gatcaatgaa actagccctt attatttagg taaagactac 1140

gatctatttt tcaaggggca tcctgctggt ggcgttatta acgacatcat tcttggaagc 1200

ttccctgata tgatcaatat tccagccaag acttcatttg aggtcttgat gatgacggat 1260

atgttgcctg atacagtagc tggtattgcg agctctctgt acttcacaat tcctgccgat 1320

aaagttaatt ttattgtatt tacttcatct gacactatta ctgatcgtga agaggctctt 1380

aaatcaccat tagtacaagt gatgctaacg ttgggtattg ttaaagaaaa agatgttctg 1440

ttctgggct 1449

<210> 21

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> L433S

<400> 21

atgtgtaata gtgacaatac cagcttgaaa gaaacggtaa gctctaattc tgcagatgta 60

gtagaaacag aaacttacca actgacaccg attgatgctc ctagctcttt tttatctcat 120

tcttgggagc aaacatgtgg cacacctatc ttgaatgaaa gtgacaagca agcgatatct 180

tttgattttg ttgctccaga gttaaagcaa gatgaaaagt attgttttac ttttaaaggt 240

attacaggcg atcataggta tatcacaaat acaacattaa ctgttgttgc acctacgcta 300

gaagtttaca tcgatcatgc atccttacca tcgctacagc agcttatcca cattattcaa 360

gcaaaagatg aatacccaag taatcaacgt tttgtctctt ggaagcgtgt aactgttgat 420

gctgataatg ccaataagtt aaacattcat acttatccat taaaaggcaa taatacctca 480

ccagaaatgg tggcagcgat tgatgagtat gctcagagca aaaatcgatt gaatatagag 540

ttctatacaa atacagctca tgtttttaat aatttaccac ctattattca acctttatat 600

aataacgaga aggtgaaaat ttctcatatt agtttgtatg atgatggttc ttctgaatat 660

gtaagtttat atcaatggaa agatacacca aataagatag aaacattaga aggtgaagta 720

tcgcttcttg ctaattattt agcaggaaca tctccggatg caccaaaagg aatgggaaat 780

cgttataact ggcataaatt atatgacact gattattact ttttgcgcga agattacctt 840

gacgttgaag caaacctaca tgatttacgt gattatttag gctcttccgc aaagcaaatg 900

ccatgggatg aatttgctaa attatctgat tctcagcaaa cactattttt agatattgtg 960

ggttttgata aagagcaatt gcaacaacaa tattcacaat ccccactacc aaactttatt 1020

tttaccggca caacaacttg ggctgggggg gaaacgaaag agtattatgc tcagcaacaa 1080

gtaaatgtga ttaataatgc gatcaatgaa actagccctt attatttagg taaagactac 1140

gatctatttt tcaaggggca tcctgctggt ggcgttatta acgacatcat tcttggaagc 1200

ttccctgata tgatcaatat tccagccaag acttcatttg aggtcttgat gatgacggat 1260

atgttgcctg atacagtagc tggtattgcg agctctagtt acttcacaat tcctgccgat 1320

aaagttaatt ttattgtatt tacttcatct gacactatta ctgatcgtga agaggctctt 1380

aaatcaccat tagtacaagt gatgctaacg ttgggtattg ttaaagaaaa agatgttctg 1440

ttctgggct 1449

<210> 22

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> L433T

<400> 22

atgtgtaata gtgacaatac cagcttgaaa gaaacggtaa gctctaattc tgcagatgta 60

gtagaaacag aaacttacca actgacaccg attgatgctc ctagctcttt tttatctcat 120

tcttgggagc aaacatgtgg cacacctatc ttgaatgaaa gtgacaagca agcgatatct 180

tttgattttg ttgctccaga gttaaagcaa gatgaaaagt attgttttac ttttaaaggt 240

attacaggcg atcataggta tatcacaaat acaacattaa ctgttgttgc acctacgcta 300

gaagtttaca tcgatcatgc atccttacca tcgctacagc agcttatcca cattattcaa 360

gcaaaagatg aatacccaag taatcaacgt tttgtctctt ggaagcgtgt aactgttgat 420

gctgataatg ccaataagtt aaacattcat acttatccat taaaaggcaa taatacctca 480

ccagaaatgg tggcagcgat tgatgagtat gctcagagca aaaatcgatt gaatatagag 540

ttctatacaa atacagctca tgtttttaat aatttaccac ctattattca acctttatat 600

aataacgaga aggtgaaaat ttctcatatt agtttgtatg atgatggttc ttctgaatat 660

gtaagtttat atcaatggaa agatacacca aataagatag aaacattaga aggtgaagta 720

tcgcttcttg ctaattattt agcaggaaca tctccggatg caccaaaagg aatgggaaat 780

cgttataact ggcataaatt atatgacact gattattact ttttgcgcga agattacctt 840

gacgttgaag caaacctaca tgatttacgt gattatttag gctcttccgc aaagcaaatg 900

ccatgggatg aatttgctaa attatctgat tctcagcaaa cactattttt agatattgtg 960

ggttttgata aagagcaatt gcaacaacaa tattcacaat ccccactacc aaactttatt 1020

tttaccggca caacaacttg ggctgggggg gaaacgaaag agtattatgc tcagcaacaa 1080

gtaaatgtga ttaataatgc gatcaatgaa actagccctt attatttagg taaagactac 1140

gatctatttt tcaaggggca tcctgctggt ggcgttatta acgacatcat tcttggaagc 1200

ttccctgata tgatcaatat tccagccaag acttcatttg aggtcttgat gatgacggat 1260

atgttgcctg atacagtagc tggtattgcg agctctacgt acttcacaat tcctgccgat 1320

aaagttaatt ttattgtatt tacttcatct gacactatta ctgatcgtga agaggctctt 1380

aaatcaccat tagtacaagt gatgctaacg ttgggtattg ttaaagaaaa agatgttctg 1440

ttctgggct 1449

<210> 23

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> I411T + L433S

<400> 23

atgtgtaata gtgacaatac cagcttgaaa gaaacggtaa gctctaattc tgcagatgta 60

gtagaaacag aaacttacca actgacaccg attgatgctc ctagctcttt tttatctcat 120

tcttgggagc aaacatgtgg cacacctatc ttgaatgaaa gtgacaagca agcgatatct 180

tttgattttg ttgctccaga gttaaagcaa gatgaaaagt attgttttac ttttaaaggt 240

attacaggcg atcataggta tatcacaaat acaacattaa ctgttgttgc acctacgcta 300

gaagtttaca tcgatcatgc atccttacca tcgctacagc agcttatcca cattattcaa 360

gcaaaagatg aatacccaag taatcaacgt tttgtctctt ggaagcgtgt aactgttgat 420

gctgataatg ccaataagtt aaacattcat acttatccat taaaaggcaa taatacctca 480

ccagaaatgg tggcagcgat tgatgagtat gctcagagca aaaatcgatt gaatatagag 540

ttctatacaa atacagctca tgtttttaat aatttaccac ctattattca acctttatat 600

aataacgaga aggtgaaaat ttctcatatt agtttgtatg atgatggttc ttctgaatat 660

gtaagtttat atcaatggaa agatacacca aataagatag aaacattaga aggtgaagta 720

tcgcttcttg ctaattattt agcaggaaca tctccggatg caccaaaagg aatgggaaat 780

cgttataact ggcataaatt atatgacact gattattact ttttgcgcga agattacctt 840

gacgttgaag caaacctaca tgatttacgt gattatttag gctcttccgc aaagcaaatg 900

ccatgggatg aatttgctaa attatctgat tctcagcaaa cactattttt agatattgtg 960

ggttttgata aagagcaatt gcaacaacaa tattcacaat ccccactacc aaactttatt 1020

tttaccggca caacaacttg ggctgggggg gaaacgaaag agtattatgc tcagcaacaa 1080

gtaaatgtga ttaataatgc gatcaatgaa actagccctt attatttagg taaagactac 1140

gatctatttt tcaaggggca tcctgctggt ggcgttatta acgacatcat tcttggaagc 1200

ttccctgata tgatcaatat tccagccaag acttcatttg aggtcttgat gatgacggat 1260

atgttgcctg atacagtagc tggtattgcg agctctagtt acttcacaat tcctgccgat 1320

aaagttaatt ttattgtatt tacttcatct gacactatta ctgatcgtga agaggctctt 1380

aaatcaccat tagtacaagt gatgctaacg ttgggtattg ttaaagaaaa agatgttctg 1440

ttctgggct 1449

<210> 24

<211> 1449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> I411T + L433T

<400> 24

Ala Thr Gly Thr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Gly Thr Gly Ala Cys Ala
1 5 10 15

Ala Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Ala Ala Gly Ala
20 25 30

Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala Ala Gly Cys Thr Cys Thr Ala Ala Thr
35 40 45

Thr Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Thr Ala Gly Thr Ala Gly
50 55 60

Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Ala Ala Cys Thr Thr Ala Cys Cys Ala
65 70 75 80

Ala Cys Thr Gly Ala Cys Ala Cys Cys Gly Ala Thr Thr Gly Ala Thr
85 90 95

Gly Cys Thr Cys Cys Thr Ala Gly Cys Thr Cys Thr Thr Thr Thr Thr

100 105 110

Thr Ala Thr Cys Thr Cys Ala Thr Thr Cys Thr Thr Gly Gly Gly Ala

115 120 125

Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Ala Cys Ala

130 135 140

Cys Cys Thr Ala Thr Cys Thr Thr Gly Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala

145 150 155 160

Gly Thr Gly Ala Cys Ala Ala Gly Cys Ala Ala Gly Cys Gly Ala Thr

165 170 175

Ala Thr Cys Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Thr Thr

180 185 190

Gly Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Thr Thr Ala Ala Ala Gly Cys

195 200 205

Ala Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Thr Ala Thr Thr Gly

210 215 220

Thr Thr Thr Thr Ala Cys Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Gly Gly Thr

225 230 235 240

Ala Thr Thr Ala Cys Ala Gly Gly Cys Gly Ala Thr Cys Ala Thr Ala

245 250 255

Gly Gly Thr Ala Thr Ala Thr Cys Ala Cys Ala Ala Ala Thr Ala Cys

260 265 270

Ala Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Cys Thr Gly Thr Thr Gly Thr Thr

275 280 285

Gly Cys Ala Cys Cys Thr Ala Cys Gly Cys Thr Ala Gly Ala Ala Gly

290 295 300

Thr Thr Thr Ala Cys Ala Thr Cys Gly Ala Thr Cys Ala Thr Gly Cys

305 310 315 320

Ala Thr Cys Cys Thr Thr Ala Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Thr Ala

325 330 335

Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Ala Thr Cys Cys Ala Cys Ala

340 345 350

Thr Thr Ala Thr Thr Cys Ala Ala Gly Cys Ala Ala Ala Ala Gly Ala

355 360 365

Thr Gly Ala Ala Thr Ala Cys Cys Cys Ala Ala Gly Thr Ala Ala Thr

370 375 380

Cys Ala Ala Cys Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Thr

385 390 395 400

Gly Gly Ala Ala Gly Cys Gly Thr Gly Thr Ala Ala Cys Thr Gly Thr

405 410 415

Thr Gly Ala Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Ala Ala Thr Gly Cys Cys

420 425 430

Ala Ala Thr Ala Ala Gly Thr Thr Ala Ala Ala Cys Ala Thr Thr Cys

435 440 445

Ala Thr Ala Cys Thr Thr Ala Thr Cys Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala

450 455 460

Ala Gly Gly Cys Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala Cys Cys Thr Cys Ala

465 470 475 480

Cys Cys Ala Gly Ala Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly

485 490 495

Cys Gly Ala Thr Thr Gly Ala Thr Gly Ala Gly Thr Ala Thr Gly Cys

500 505 510

Thr Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ala Ala Ala Ala Ala Thr Cys Gly Ala

515 520 525

Thr Thr Gly Ala Ala Thr Ala Thr Ala Gly Ala Gly Thr Thr Cys Thr

530 535 540

Ala Thr Ala Cys Ala Ala Ala Thr Ala Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala

545 550 555 560

Thr Gly Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala

565 570 575

Cys Cys Ala Cys Cys Thr Ala Thr Thr Ala Thr Thr Cys Ala Ala Cys

580 585 590

Cys Thr Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ala Cys Gly Ala

595 600 605

Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr Thr Thr Cys Thr

610 615 620

Cys Ala Thr Ala Thr Thr Ala Gly Thr Thr Thr Gly Thr Ala Thr Gly
625 630 635 640
Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Thr Cys Thr Thr Cys Thr Gly Ala
645 650 655
Ala Thr Ala Thr Gly Thr Ala Ala Gly Thr Thr Thr Ala Thr Ala Thr
660 665 670
Cys Ala Ala Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Thr Ala Cys Ala Cys

675 680 685
Cys Ala Ala Ala Thr Ala Ala Gly Ala Thr Ala Gly Ala Ala Ala Cys
690 695 700
Ala Thr Thr Ala Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Thr Ala
705 710 715 720
Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr Thr Gly Cys Thr Ala Ala Thr Thr
725 730 735
Ala Thr Thr Thr Ala Gly Cys Ala Gly Gly Ala Ala Cys Ala Thr Cys
740 745 750

Thr Cys Cys Gly Gly Ala Thr Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Ala Ala
755 760 765
Gly Gly Ala Ala Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Gly Thr Thr
770 775 780
Ala Thr Ala Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Thr Ala Ala Ala Thr Thr
785 790 795 800
Ala Thr Ala Thr Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Ala Thr Thr Ala Thr
805 810 815
Thr Ala Cys Thr Thr Thr Thr Thr Gly Cys Gly Cys Gly Ala Ala Gly

820 825 830
Ala Thr Thr Ala Cys Cys Thr Thr Gly Ala Cys Gly Thr Thr Gly Ala
835 840 845
Ala Gly Cys Ala Ala Ala Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Ala Thr
850 855 860
Thr Thr Ala Cys Gly Thr Gly Ala Thr Thr Ala Thr Thr Thr Ala Gly
865 870 875 880

Gly Cys Thr Cys Thr Thr Cys Cys Gly Cys Ala Ala Ala Gly Cys Ala
885 890 895

Ala Ala Thr Gly Cys Cys Ala Thr Gly Gly Gly Ala Thr Gly Ala Ala
900 905 910

Thr Thr Thr Gly Cys Thr Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr Cys Thr Gly
915 920 925

Ala Thr Thr Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Cys Thr
930 935 940

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Ala Gly Ala Thr Ala Thr Thr Gly Thr Gly
945 950 955 960

Gly Gly Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys
965 970 975

Ala Ala Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Thr Ala
980 985 990

Thr Thr Cys Ala Cys Ala Ala Thr Cys Cys Cys Cys Ala Cys Thr Ala
995 1000 1005

Cys Cys Ala Ala Ala Cys Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Ala
1010 1015 1020

Cys Cys Gly Gly Cys Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Thr Gly
1025 1030 1035 1040

Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Cys Gly
1045 1050 1055

Ala Ala Ala Gly Ala Gly Thr Ala Thr Thr Ala Thr Gly Cys Thr Cys
1060 1065 1070

Ala Gly Cys Ala Ala Cys Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Thr Gly Thr
1075 1080 1085

Gly Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ala Thr Gly Cys Gly Ala Thr Cys
1090 1095 1100

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr Ala Gly Cys Cys Cys Thr Thr
1105 1110 1115 1120

Ala Thr Thr Ala Thr Thr Thr Ala Gly Gly Thr Ala Ala Ala Gly Ala

1125 1130 1135

Cys Thr Ala Cys Gly Ala Thr Cys Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Cys

1140 1145 1150

Ala Ala Gly Gly Gly Gly Cys Ala Thr Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly

1155 1160 1165

Gly Thr Gly Gly Cys Gly Thr Thr Ala Thr Thr Ala Ala Cys Gly Ala

1170 1175 1180

Cys Ala Thr Cys Ala Thr Thr Cys Thr Thr Gly Gly Ala Ala Gly Cys

1185 1190 1195 1200

Thr Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Thr Ala Thr Gly Ala Thr Cys Ala

1205 1210 1215

Ala Thr Ala Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys

1220 1225 1230

Thr Thr Cys Ala Thr Thr Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly

1235 1240 1245

Ala Thr Gly Ala Thr Gly Ala Cys Gly Gly Ala Thr Ala Thr Gly Thr

1250 1255 1260

Thr Gly Cys Cys Thr Gly Ala Thr Ala Cys Ala Gly Thr Ala Gly Cys

1265 1270 1275 1280

Thr Gly Gly Thr Ala Thr Thr Gly Cys Gly Ala Gly Cys Thr Cys Thr

1285 1290 1295

Ala Cys Cys Thr Ala Cys Thr Thr Cys Ala Cys Ala Ala Thr Thr Cys

1300 1305 1310

Cys Thr Gly Cys Cys Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Thr Thr Ala Ala

1315 1320 1325

Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Gly Thr Ala Thr Thr Thr Ala Cys Thr

1330 1335 1340

Thr Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Cys Ala Cys Thr Ala Thr Thr Ala

1345 1350 1355 1360

Cys Thr Gly Ala Thr Cys Gly Thr Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Cys

1365 1370 1375

Thr Cys Thr Thr Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala

1380 1385 1390

Gly Thr Ala Cys Ala Ala Gly Thr Gly Ala Thr Gly Cys Thr Ala Ala

1395 1400 1405

Cys Gly Thr Thr Gly Gly Gly Thr Ala Thr Thr Gly Thr Thr Ala Ala

1410 1415 1420

Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Thr Gly Thr Thr Cys Thr Gly

1425 1430 1435 1440

Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Thr

1445

<210> 25

<211> 394

<212> PRT

<213> Bacteroides fragilis

<400> 25

Met Asn Thr Thr Glu Tyr Leu Gln Thr Trp Ser Asp Ser Tyr Lys Asn

1 5 10 15

Asp Met Ile Ser Asn Ile Met Pro Phe Trp Met Lys Tyr Gly Trp Asp

20 25 30

Arg Lys Asn Gly Gly Val Tyr Thr Cys Val Asp Arg Asp Gly Gln Leu

35 40 45

Met Asp Thr Thr Lys Ser Val Trp Phe Gln Gly Arg Phe Ala Phe Thr

50 55 60

Cys Ser Tyr Ala Tyr Asn His Ile Glu Arg Asn Thr Glu Trp Leu Ala

65 70 75 80

Ala Ala Lys Ser Thr Leu Asp Phe Ile Glu Ala His Cys Phe Asp Thr

85 90 95

Asp Gly Arg Met Phe Phe Glu Val Thr Glu Thr Gly Leu Pro Ile Arg

100 105 110

Lys Arg Arg Tyr Val Phe Ser Glu Thr Phe Ala Ala Ile Ala Met Ser

115 120 125

Glu Tyr Ala Ile Ala Ser Gly Asp His Ser Tyr Ala Val Lys Ala Leu

130 135 140

Lys Leu Phe Asn Asp Ile Arg His Phe Leu Ser Thr Pro Gly Ile Leu

145 150 155 160

Glu Pro Lys Tyr Cys Glu Arg Val Gln Met Lys Gly His Ser Ile Ile

165 170 175

Met Ile Leu Ile Asn Val Ala Ser Arg Ile Arg Ala Ala Ile Asn Asp

180 185 190

Pro Val Leu Asp Arg Gln Ile Glu Glu Ser Ile Ala Ile Leu His Lys

195 200 205

Asp Phe Met His Pro Glu Phe Lys Ala Leu Leu Glu Thr Val Gly Pro

210 215 220

Asn Gly Glu Phe Ile Asp Thr Asn Ala Thr Arg Thr Ile Asn Pro Gly

225 230 235 240

His Cys Ile Glu Thr Ser Trp Phe Ile Leu Glu Glu Ala Lys Asn Arg

245 250 255

Asn Trp Asp Lys Glu Met Val Asp Thr Ala Leu Thr Ile Leu Asp Trp

260 265 270

Ser Trp Glu Trp Gly Trp Asp Lys Glu Tyr Gly Gly Ile Ile Asn Phe

275 280 285

Arg Asp Cys Arg Asn Leu Pro Ser Gln Asp Tyr Ala His Asp Met Lys

290 295 300

Phe Trp Trp Pro Gln Thr Glu Ala Ile Ile Ala Thr Leu Tyr Ala Tyr

305 310 315 320

Gln Ala Thr Lys Asn Glu Lys Tyr Leu Ala Met His Lys Gln Ile Ser

325 330 335

Asp Trp Thr Tyr Ala His Phe Pro Asp Ala Glu Phe Gly Glu Trp Tyr

340 345 350

Gly Tyr Leu His Arg Asp Gly Thr Ile Ser Gln Pro Ala Lys Gly Asn

355 360 365

Leu Phe Lys Gly Pro Phe His Ile Pro Arg Met Met Thr Lys Gly Tyr

370 375 380

Ala Leu Cys Gln Glu Leu Leu Ser Glu Lys

385 390

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pimer

<400> 26

ctgccatggt tatgaatact acag 24

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pimer

<400> 27

aatggatcct tatttttctg acag 24

<210> 28

<211> 893

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 28

atggcaacga atttacgtgg cgtaatggct gcactcctga ctccttttga ccaacaacaa 60

gcactggata aagcgagtct gcgtcgcctg gttcagttca atattcagca gggcatcgac 120

ggtttatacg tgggtggttc gaccggcgag gcctttgtac aaagcctttc cgagcgtgaa 180

caggtactgg aaatcgtcgc cgaagagggc aaaggtaaga ttaaactcat cgcccacgtc 240

ggttgcgtca cgaccgccga aagccaacaa cttgcggcat cggctaaacg ttatggcttc 300

gatgccgtct ccgccgtcac gccgttctac tatcctttca gctttgaaga acactgcgat 360

cactatcggg caattattga ttcggcggat ggtttgccga tggtggtgta caacattcca 420

gccctgagtg gggtaaaact gaccctggat cagatcaaca cacttgttac attgcctggc 480

gtaggtgcgc tgaaacagac ctctggcgat ctctatcaga tggagcagat ccgtcgtgaa 540

catcctgatc ttgtgctcta taacggttac ggagaaatct tcgcctctgg tctgctggcg 600

ggcgctgatg gtggtatcgg cagtacctac aacatcatgg gctggcgcta tcaggggatc 660

gttaaggcgc tgaaagaagg cgatatccag accgcgcaga aactgcaaac tgaatgcaat 720

aaagtcattg atttactgat caaaacgggc gtattccgcg gcctgaaaac tgtcctccat 780

tatatggatg tcgtttctgt gccgctgtgc cgcaaaccgt ttggaccggt agatgaaaaa 840

tatcagccag aactgaaggc gctggcccag cagttgatgc mgagcgcggg tga 893

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pimer

<400> 29

ggtatccatg gcaacgaatt tacg 24

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pimer

<400> 30

ggtaggctcg agcgagggga aac 23

<210> 31

<211> 663

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 31

atgaagacat acaagattgc cgttgatggg cctgctgcga gcggaaaaag cagcacatcc 60

gacttggttg caaggaaact ggggttttcc catctgatat ctggaaatct gtatagagct 120

gtgacatatg gtctggtaag gcgctttgga gaggtgcgtc caggagacga ggaacagaaa 180

agatttgttc ttgagctgag tatagaggta aggaacaaca gggtattcct agacggagag 240

gacgtgtcgg agagcctccg taaggaggtg gtcgaccgcc acgttgtttc tgttgcaagg 300

gagaaatata tccgggaaaa agtgtttaca attcagaggt cggtgataga ccttgagaag 360

aggggaatag ttgtggatgg aagagatata gccaccagga taatgccaaa tgcagatctg 420

aaggtgtttc ttacagcaag cccggagacg agggccagaa gaagatacat ggaaggcggg 480

tctgagtcct acgaggaact gctcgagtcc ataaaaaaaa gagatcacaa cgatagaaca 540

agggagcatg atccccttgt tgccacctgc gattctattg ttatcgaaaa tgacagcatg 600

acattggagg aaacagccga cgaaatcata aggctcttca gaagagtaga gtcttttaat 660

taa 663

<210> 32

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pimer

<400> 32

catatgacgg caattgcccc ggttattac 29

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pimer

<400> 33

gaattcggtc gcttatgcga gagcc 25

<210> 34

<211> 1203

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 34

atgtcgagta agttagtact ggttctgaac tgcggtagtt cttcactgaa atttgccatc 60

atcgatgcag taaatggtga agagtacctt tctggtttag ccgaatgttt ccacctgccc 120

gaagcacgta tcaaatggaa aatggacggc aataaacagg aagcggcttt aggtgcaggc 180

gccgctcaca gcgaagcgct caactttatc gttaatacta ttctggcaca aaaaccagaa 240

ctgtctgcgc agctgactgc tatcggtcac cgtatcgtac acggcggcga aaagtatacc 300

agctccgtag tgatcgatga gtctgttatt cagggtatca aagatgcagc ttcttttgca 360

ccgctgcaca acccggctca cctgatcggt atcgaagaag ctctgaaatc tttcccacag 420

ctgaaagaca aaaacgttgc tgtatttgac accgcgttcc accagactat gccggaagag 480

tcttacctct acgccctgcc ttacaacctg tacaaagagc acggcatccg tcgttacggc 540

gcgcacggca ccagccactt ctatgtaacc caggaagcgg caaaaatgct gaacaaaccg 600

gtagaagaac tgaacatcat cacctgccac ctgggcaacg gtggttccgt ttctgctatc 660

cgcaacggta aatgcgttga cacctctatg ggcctgaccc cgctggaagg tctggtcatg 720

ggtacccgtt ctggtgatat cgatccggcg atcatcttcc acctgcacga caccctgggc 780

atgagcgttg acgcaatcaa caaactgctg accaaagagt ctggcctgct gggtctgacc 840

gaagtgacca gcgactgccg ctatgttgaa gacaactacg cgacgaaaga agacgcgaag 900

cgcgcaatgg acgtttactg ccaccgcctg gcgaaataca tcggtgccta cactgcgctg 960

atggatggtc gtctggacgc tgttgtattc actggtggta tcggtgaaaa tgccgcaatg 1020

gttcgtgaac tgtctctggg caaactgggc gtgctgggct ttgaagttga tcatgaacgc 1080

aacctggctg cacgtttcgg caaatctggt ttcatcaaca aagaaggtac ccgtcctgcg 1140

gtggttatcc caaccaacga agaactggtt atcgcgcaag acgcgagccg cctgactgcc 1200

tga 1203

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pimer

<400> 35

catatgtcga gtaagttagt ttctg 25

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pimer

<400> 36

gaatcctcag gcagtcaggc ggctcgcgtc 30

<210> 37

<211> 687

<212> DNA

<213> Neisseria meningitidis

<400> 37

atggaaaaac aaaatattgc ggttatactt gcgcgccaaa actccaaagg attgccatta 60

aaaaatctcc ggaaaatgaa tggcatatca ttacttggtc atacaattaa tgctgctata 120

tcatcaaagt gttttgaccg cataattgtt tcgactgatg gcgggttaat tgcagaagaa 180

gctaaaaatt tcggtgtcga agtcgtccta cgccctgcag agctggcctc cgatacagcc 240

agctctattt caggtgtaat acatgcttta gaaacaattg gcagtaattc cggcacagta 300

accctattac aaccaaccag tccattacgc acaggggctc atattcgtga agctttttct 360

ctatttgatg agaaaataaa aggatccgtt gtctctgcat gcccaatgga gcatcatcca 420

ctaaaaaccc tgcttcaaat caataatggc gaatatgccc ccatgcgcca tctaagcgat 480

ttggagcagc ctcgccaaca attacctcaa gcatttaggc ctaatggtgc aatttacatt 540

aatgatactg cttcactaat tgcaaataat tgtttttta tcgccccaac caaactttat 600

attatgtctc atcaagactc tatcgatatt gatactgagc ttgatttaca acaggcagaa 660

aacattctta atcacaagga aagctaa 687

<210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pimer

<400> 38

aagcatatgg aaaaacaaaa tattgcg 27

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pimer

<400> 39

gtggaattct tagctttcct tgtg 24