



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107660211 A

(43)申请公布日 2018.02.02

(21)申请号 201680022032.9

(22)申请日 2016.02.16

(30)优先权数据

15305242.8 2015.02.18 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/053226 2016.02.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/131804 EN 2016.08.25

(71)申请人 赛诺菲

地址 法国巴黎

(72)发明人 C·科维 H·斯达姆普

J·克吕普 B·卡兰德拉

A·雷伊 N·卡斯特 M·莫拉斯

L·弗雷斯 C·罗思

A·艾尔斯多尔夫 A·维德曼

M·欣纳 B·伦德 K·延森

M·许尔斯迈尔

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 谢梦欣

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书59页

序列表78页 附图9页

(54)发明名称

新的对绿脓菌荧光素和绿脓菌螯铁蛋白特异性的蛋白质

(57)摘要

本公开内容提供了hNGAL突变蛋白,其结合绿脓菌荧光素家族成员或绿脓菌螯铁蛋白,并且可以用于各种应用,包括药物应用,例如以抑制或降低铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)的生长。本公开内容还关注生成本文中描述的一种或多种结合绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白的突变蛋白的方法及包含一种或多种此类突变蛋白的组合物。本公开内容进一步涉及编码此类突变蛋白的核酸分子和用于生成此类突变蛋白和核酸分子的方法。另外,本申请公开了这些突变蛋白及包含一种或多种此类突变蛋白的组合物治疗和/或诊断用途。

1. 一种对绿脓菌荧光素I、II、III型或绿脓菌螯铁蛋白具有结合特异性的多肽,其中所述多肽包含以可检出的亲和力结合绿脓菌荧光素I、II、III型或绿脓菌螯铁蛋白的hNGAL突变蛋白。

2. 权利要求1的多肽,其中所述hNGAL突变蛋白包含在对应于下述位置的一个或多个位置处的突变氨基酸残基:成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的位置28、34、36、39-42、44-47、49、52、54-55、65、68、70、72-75、77、79-81、87、96、100、103、106、108、123、125、127、132、134、141和145。

3. 一种核酸分子,其包含编码权利要求1或29中任一项的多肽的核苷酸序列。

4. 一种宿主细胞,其含有权利要求3的核酸分子。

5. 一种生成根据权利要求1或2中任一项的多肽的方法,其中通过遗传工程方法从编码所述多肽的核酸开始生成所述多肽。

6. 一种组合物,其包含一种或多种选自下组的多肽:(i)对绿脓菌荧光素I型特异性的多肽,(ii)对绿脓菌荧光素II型特异性的多肽,(iii)对绿脓菌荧光素III型特异性的多肽和(iv)对绿脓菌螯铁蛋白特异性的多肽。

7. 一种结合受试者中的绿脓菌荧光素I、II、III型和/或绿脓菌螯铁蛋白的方法,其包括对所述受试者施用有效量的权利要求13的组合物。

8. 一种试剂盒,其在一个或多个容器中分开或混合包含和权利要求6的组合物。

9. (i)能够结合绿脓菌荧光素I型的根据权利要求1的多肽,(ii)能够结合绿脓菌荧光素II型的根据权利要求1的多肽,(iii)能够结合绿脓菌荧光素III型的根据权利要求1的多肽和/或(iv)能够结合绿脓菌螯铁蛋白的根据权利要求1的多肽用于结合受试者中的绿脓菌荧光素I、II、III型和/或绿脓菌螯铁蛋白的用途。

10. (i)能够结合绿脓菌荧光素I型的根据权利要求1的多肽,(ii)能够结合绿脓菌荧光素II型的根据权利要求1的多肽,(iii)能够结合绿脓菌荧光素III型的根据权利要求1的多肽和/或(iv)能够结合绿脓菌螯铁蛋白的根据权利要求1的多肽用于结合受试者中的绿脓菌荧光素I、II、III型和/或绿脓菌螯铁蛋白以预防或降低受试者中由铜绿假单胞菌经由绿脓菌螯铁蛋白和/或绿脓菌荧光素的铁摄取的用途。

11. (i)能够结合绿脓菌荧光素I型的根据权利要求1的多肽,(ii)能够结合绿脓菌荧光素II型的根据权利要求1的多肽,(iii)能够结合绿脓菌荧光素III型的根据权利要求1的多肽和/或(iv)能够结合绿脓菌螯铁蛋白的根据权利要求1的多肽用于结合受试者中的绿脓菌荧光素I、II、III型和/或绿脓菌螯铁蛋白以治疗或减轻受试者中的铜绿假单胞菌生物膜感染的用途。

12. 两种或更多种根据权利要求1或2中任一项的多肽的组合。

新的对绿脓菌荧光素和绿脓菌螯铁蛋白特异性的蛋白质

[0001] I. 发明背景

[0002] 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 一种引起主要与组织损伤相关的急性感染的机会病原体。铜绿假单胞菌在留置装置上以及在具有遗传病症囊性纤维化的患者的肺组织上形成生物膜。生物膜感染难以用常规的抗生素治疗。然而, 研究已经证明了铁是铜绿假单胞菌的正确生物膜形成必需的, 因此铁摄取系统是抗假单胞菌疗法的潜在靶。

[0003] 铜绿假单胞菌能够通过使用分泌性铁结合铁载体 (siderophore) 绿脓菌螯铁蛋白 (pyochelin) 和绿脓菌荧光素 (pyoverdine) 从宿主环境中清除铁。绿脓菌荧光素 (Pvd) 是一种肽连接的氧羟酸盐-和儿茶酚盐-型 (catecholate-type) 配体, 而绿脓菌螯铁蛋白 (Pch) 是水杨酸盐和两个半胱氨酸分子的且具有酚、羧酸盐和胺配体官能度的衍生化缀合物。Pvd 和 Pch 两者都已经证明了以协同作用的某种指示在铜绿假单胞菌毒力中的作用。不能生成任一种铁载体的双重缺陷突变体比仅不能生成两种铁载体之一的单一缺陷突变体在毒力上减弱得多 (Takase 等, *Infection and immunity*, Apr. 2000, p. 1834-1839)。此外, 绿脓菌荧光素作用为信号传导分子以控制几种毒力因子及绿脓菌荧光素自身的生成; 同时已经提出了除三价铁外, 绿脓菌螯铁蛋白可为用于获得二价金属, 如二价铁和锌以实现铜绿假单胞菌的致病性的系统的一部分 (Visca 等, 1992)。

[0004] 已经从几种铜绿假单胞菌菌株中鉴定出三种结构上不同的绿脓菌荧光素类型或组: 从铜绿假单胞菌 ATCC 15692 (Briskot 等, 1989, *Liebigs Ann Chem*, p. 375-384), 从铜绿假单胞菌 ATCC 27853 (Tappe 等, 1993, *J. Prakt-Chem.*, 335, p. 83-87) 以及从天然隔离群 (natural isolate) 铜绿假单胞菌 R (Gipp 等, 1991, *Z. Naturforsch*, 46c, p. 534-541)。此外, 对 88 株临床隔离群和上文提及的两种保藏中心菌株的比较生物学调查根据下述参照菌株揭示了三种不同的菌株特异性绿脓菌荧光素介导的铁摄取系统 (Cornells 等, 1989, *Infect Immun.*, 57, p. 3491-3497; Meyer 等, 1997, *Microbiology*, 143, p. 35-43): 铜绿假单胞菌 ATCC 15692 (I 型 Pvd 或 Pvd I)、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 (II 型 Pvd 或 Pvd II) 和临床隔离群铜绿假单胞菌 R 和 pa6 (III 型 Pvd 或 Pvd III)。

[0005] 每种绿脓菌荧光素类型具有作为琥珀酰基、琥珀酸酰胺基 (succinamid) 或 α -酮戊二酰基的侧链上有所不同的三种成员 (亚型), 即 Pvd I 型琥珀酰基、Pvd I 型琥珀酸酰胺基、Pvd I 型 α -酮戊二酰基、Pvd II 型琥珀酰基、Pvd II 型琥珀酸酰胺基、Pvd II 型 α -酮戊二酰基、Pvd III 型琥珀酰基、Pvd III 型琥珀酸酰胺基和 Pvd III 型 α -酮戊二酰基。

[0006] 每种铜绿假单胞菌菌株表达一种 Pvd 类型, 即铜绿假单胞菌 ATCC 15692 表达 I 型 Pvd, 铜绿假单胞菌 ATCC 27853 表达 II 型 Pvd, 而铜绿假单胞菌 R 和 pa6 表达 III 型 Pvd, 从而每种 Pvd 类型包括相应类型的所有三种成员, 并且每种所述菌株还表达绿脓菌螯铁蛋白。

[0007] 在这方面, 我们将绿脓菌荧光素和绿脓菌螯铁蛋白鉴定为对于铜绿假单胞菌的致病性至关重要的靶物, 并且在不产生由常规抗生素造成的强选择压力的情况下开发出针对如本文中公开的此类靶物, 即针对每种 Pvd 类型, 包括对于每种类型而言在侧链上不同的三种成员 (亚型) (Pvd I s, Pvd I sa, Pvd I α KG, Pvd II s, Pvd II sa, Pvd II α KG, Pvd III

s, Pvd III sa, Pvd IIIaKG) 以及针对 Pch, 并且在每种情况下针对游离的铁载体及针对具有结合铁的铁载体的特异性抑制剂。此外, 我们选择区别游离的和加载有铁的绿色菌螯铁蛋白的抑制剂。

[0008] 作为代表 Pieris AG, Sanofi-Aventis 和 Sanofi-Pasteur Inc. (它们是现有联合研究协议的各方) 承担的活动的结果做出本发明, 并且在联合研究协议的范围内做出。

[0009] II. 定义

[0010] 以下列表定义了贯穿本说明书使用的术语、短语和缩写。本文中列出并定义的所有术语意图涵盖所有语法形式。

[0011] 如本文中使用的, “绿脓菌荧光素 (pyoverdine)” 意指在铁缺乏性生长条件下由革兰氏阴性细菌铜绿假单胞菌生成并且对铁具有高亲和力的荧光铁载体。绿脓菌荧光素由三个结构部分构成: 二羟基喹啉生色团、侧链和可变肽链。肽链模块参与受体识别和结合。已经鉴定出三种不同 Pvd (在它们的肽链上不同) (I-III 型)。绿脓菌荧光素类型的大小和氨基酸组成及绿脓菌荧光素识别特异性对于每种物种是独特的。可以区别三种铜绿假单胞菌菌株, 每种生成不同绿脓菌荧光素类型 (I-III 型, 图 1) 和相关的 (cognate) FpvA 受体。

[0012] 如本文中使用的, “绿脓菌螯铁蛋白 (pyochelin)” 意指由铜绿假单胞菌生成并且溶解三价铁的水杨酸盐和两个半胱氨酸分子的且具有酚、羧酸盐和胺配体官能度的噻唑啉衍生化缀合物。绿脓菌螯铁蛋白是一种拥有酚盐, 而既无氧肟酸盐也无儿茶酚盐模块的结构上独特的铁载体 (参见图 1)。

[0013] 如本文中使用的, “可检出的亲和力” 意指以一般至少约 10^{-5} M 以下的亲和常数结合选择的靶物的能力。更低的亲和力一般用常见的方法, 如 ELISA 不再能测量到, 因此是次要的。

[0014] 如本文中使用的, 可通过本领域技术人员已知的多种方法测量公开内容的蛋白质 (例如人脂蛋白 (lipocalin) 2 的突变蛋白) 或其融合多肽对选择的靶物 (在本案的情况中为绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白) 的 “结合亲和力” (从而确定突变蛋白-配体复合物的 K_D 值)。此类方法包括但不限于荧光滴定、直接 ELISA、竞争 ELISA、量热方法, 如等温滴定量热学 (ITC) 和表面等离子共振 (surface Plasmon resonance) (Biacore)。此类方法是本领域中完善建立的, 并且其例子也在下文详述。

[0015] 还注意到相应的结合剂和其配体之间的复合物形成受到许多不同因素影响, 如相应结合配偶体的浓度、竞争剂的存在、使用的缓冲液系统的 pH 和离子强度、和用于测定解离常数 K_D 的实验方法 (例如荧光滴定、直接 ELISA、竞争 ELISA 或表面等离子共振, 仅举几例) 或者甚至用于评估实验数据的数学算法。

[0016] 因此, 技术人员还清楚的是, K_D 值 (相应结合剂和其靶物/配体之间形成的复合物的解离常数) 可以在某个实验范围内变化, 这取决于用于测定特定突变蛋白对给定配体的亲和力的方法和实验设置。这意味着可以有测量的 K_D 值的略微偏差或公差范围, 这取决于例如通过表面等离子共振 (Biacore), 通过竞争 ELISA, 还是通过 “直接 ELISA” 测定 K_D 值。

[0017] 如本文中使用的, “突变蛋白”、“突变的” 实体 (不管是蛋白质还是核酸) 或 “变体” 指与天然存在 (野生型) 核酸或蛋白质 “参照” 支架相比一个或多个核苷酸或氨基酸的交换、缺失或插入。所述术语还包括如本文中描述的突变蛋白和变体的片段。优选地, 本公开内容的突变蛋白、其片段或变体保留结合如本文中描述的绿色菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白

的功能。

[0018] 如本文中与公开内容的突变蛋白相联使用的术语“片段”涉及N端和/或C端缩短,即缺乏至少一个N端和/或C端氨基酸的源自全长成熟人脂笼蛋白2的蛋白质或肽。此类片段可包括成熟人脂笼蛋白2的一级序列的至少10,更多,如20或30或更多个连续氨基酸,并且在成熟人脂笼蛋白2的免疫测定法中通常可检出。一般地,如本文中就公开内容的突变蛋白或根据公开内容的组合或本文中描述的融合蛋白的相应蛋白质配体而言使用的,术语“片段”涉及N端和/或C端缩短的蛋白质或肽配体,其保留全长配体被根据公开内容的突变蛋白识别和/或结合的能力。

[0019] 如本文中使用的,术语“诱变”意指实验条件选择为使得成熟人脂笼蛋白2的给定序列位置处天然存在的氨基酸可以由至少一种不存在于相应天然多肽序列中的此特定位置处的氨基酸替换。术语“诱变”还包括通过缺失或插入一个或多个氨基酸的序列区段长度的(额外)修饰。因此,在公开内容的范围内的是例如选定序列位置处的一个氨基酸由三个随机突变的区段替换,导致与野生型蛋白质的相应区段的长度相比两个氨基酸残基的插入。可以在能进行公开内容中的诱变的任何肽区段中彼此独立引入此类插入或缺失。

[0020] 术语“随机诱变”意指某个序列位置处不存在预先确定的单个氨基酸(突变),而是可以在诱变期间在预先确定的序列位置处以某种概率并入至少两个氨基酸。

[0021] “同一性”是序列的特性,其测量它们的相似性或关系。如本公开内容中使用的,术语“序列同一性”或“同一性”意指成对相同残基(公开内容的多肽的序列与所讨论的序列的(同源)比对后)相对于这两个序列中的较长者中的残基数目的百分比。通过用相同氨基酸残基的数目除以残基的总数,并且将结果乘以100测量序列同一性。

[0022] 术语“同源性”在本文中以其通常的意义使用,包括相同氨基酸及在公开内容的多肽(例如公开内容的任何突变蛋白)的线性氨基酸序列中的等同位置处视为保守取代(例如用天冬氨酸残基替换谷氨酸残基)的氨基酸。

[0023] 在本文中例如使用程序BLASTP,版本blastp 2.2.5(2002年11月16日;参见Altschul,S.F.等,(1997)Nucl.Acids Res.25,3389-3402)测定序列同源性或序列同一性的百分比。在此实施方案中,同源性百分比基于整个多肽序列(包括前肽序列)的比对(矩阵:BLOSUM 62;缺口代价:11.1;截留值设置为 10^{-3}),优选在成对比较中使用野生型蛋白质支架作为参照。它以作为BLASTP程序输出中的结果指示的“阳性”(同源氨基酸)数目除以由比对程序选择的氨基酸总数的百分比计算。

[0024] 具体地,为了确定与野生型人脂笼蛋白2不同的突变蛋白的氨基酸序列的氨基酸残基是否对应于野生型人脂笼蛋白2的氨基酸序列中的某个位置,熟练技术人员可以手动或通过使用计算机程序如BLAST2.0(其代表基本局部比对搜索工具)或ClustalW或适合于产生序列比对的任何其它合适的程序使用本领域中公知的手段和方法,例如比对。因而,野生型人脂笼蛋白2可以充当“主题序列”或“参照序列”,而与本文中描述的野生型人脂笼蛋白2不同的突变蛋白的氨基酸序列充当“查询序列”。术语“参照序列”和“野生型序列”在本文中可互换使用。

[0025] “缺口”是作为氨基酸添加或缺失的结果的比对中的空格。因此,完全相同的序列的两个拷贝具有100%同一性,但是不太高度保守,并且具有缺失、添加或替换的序列可具有较低程度的序列同一性。本领域技术人员会认可几种计算机程序可用于使用标准参数测

定序列同一性,例如Blast (Altschul等(1997) *Nucleic Acids Res.* 25,3389-3402), Blast2 (Altschul等(1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410) 和Smith-Waterman (Smith等(1981) *J. Mol. Biol.* 147, 195-197)。

[0026] 如本公开内容中使用的,术语“变体”涉及包含氨基酸序列的修饰(例如通过取代、缺失、插入或化学修饰)的蛋白质或肽的衍生物。在一些实施方案中,此类修饰不降低蛋白质或肽的功能性。此类变体包括蛋白质,其中一个或多个氨基酸已经被其相应的D-立体异构体或被除了天然存在的20种氨基酸外的氨基酸,如例如鸟氨酸、羟脯氨酸、瓜氨酸、高丝氨酸、羟赖氨酸、正缬氨酸替换。然而,此类取代也可以是保守的,即氨基酸残基用化学上类似的氨基酸残基替换。保守取代的例子是下组的成员间的替换:1) 丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸;2) 天冬氨酸和谷氨酸;3) 天冬酰胺和谷氨酰胺;4) 精氨酸和赖氨酸;5) 异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸;和6) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。

[0027] “天然序列”人脂笼蛋白2意指具有与源自自然的相应多肽相同氨基酸序列的人脂笼蛋白2。因此,天然序列人脂笼蛋白2可以具有相应的天然存在的人脂笼蛋白2的氨基酸序列。此类天然序列多肽可以从自然界中分离或者可以通过重组或合成手段生成。术语“天然序列”多肽具体涵盖人脂笼蛋白2的天然存在的截短或分泌形式,人脂笼蛋白2的天然存在的变体形式,如可替换的剪接形式和天然存在的等位变体。多肽“变体”意指与天然序列多肽具有至少约50%、60%、70%、80%或至少约85%氨基酸序列同一性的生物学活性多肽。此类变体包括例如下述多肽,其中在多肽的N或C端添加或缺失一个或多个氨基酸残基。一般地,变体与天然序列多肽具有至少约70%,包括至少约80%,如至少约85%氨基酸序列同一性,包括至少约90%氨基酸序列同一性或至少约95%氨基酸序列同一性。

[0028] 术语“位置”在根据公开内容使用时意指本文中描述的氨基酸序列内的氨基酸的位置或本文中描述的核酸序列内的核苷酸的位置。为了理解如本文中在一种或多种突变蛋白的氨基酸序列位置的语境中使用的术语“对应”或“对应的”,对应的位置不仅由前述核苷酸/氨基酸的编号确定。因而,可以取代的根据公开内容的给定氨基酸的位置可由于(突变体或野生型)人脂笼蛋白2中别处的氨基酸缺失或添加而变化。类似地,可以取代的根据公开内容的给定核苷酸的位置可由于突变蛋白或野生型人脂笼蛋白2 5'-非翻译区(UTR)中别处的缺失或额外的核苷酸而变化,所述5'-非翻译区(UTR)包括启动子和/或任何其它调节序列或基因(包括外显子和内含子)。

[0029] 因此,对于根据公开内容的相应位置,优选地理解核苷酸/氨基酸的位置可以在指定的编号上不同于类似的相邻核苷酸/氨基酸,但是一个或多个相应的位置也包括所述相邻的核苷酸/氨基酸(其可以被交换,缺失或添加)。

[0030] 另外,对于基于根据公开内容的参照支架的突变蛋白中的相应位置,优选地理解核苷酸/氨基酸的位置在结构上对应于突变蛋白或野生型人脂笼蛋白2中别处的位置,即使它们可以在指定的编号上不同。

[0031] 如本文中对非天然靶物使用的术语“有机分子”或“小有机分子”意指包含至少两个碳原子,但是优选不超过7或12个可旋转碳键,具有范围为100-2000道尔顿,优选100-1000道尔顿的分子量,且任选包含一个或两个金属原子的有机分子。

[0032] 如本文中所使用的,词语“检测”或“可检测的”在定量和定性水平两者及其组合上理解。因此,它包括感兴趣分子的定量、半定量和定性测量。

[0033] “受试者”是脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。术语“哺乳动物”在本文中用于指分类为哺乳动物的任何动物,包括但不限于人、家畜和农场动物(farm animal)、和动物园、运动或宠物动物,如绵羊、犬、马、猫、牛、大鼠、猪、猿,如猕猴等,仅举几个说明性例子。优选地,本文中的哺乳动物是人。

[0034] “有效量”指足以实现有益或期望结果的量。有效量可以在一次或多次施用中施用。

[0035] “样品”定义为从任何受试者中采集的生物样品。生物样品包括但不限于血液、血清、尿液、粪便、精液或组织。

[0036] III.附图简述

[0037] 图1:显示铜绿假单胞菌铁载体的结构。图1A-C显示三种铜绿假单胞菌绿脓菌荧光素的结构,图1A:Pvd I型的结构(参见Birskot等,1989);图1B:Pvd II型的结构(参见Birskot等,1989);图1C:Pvd III型的结构(Gipp等,1991);图1D:与生色团部分附接的R可以是琥珀酰基、琥珀酸酰胺基或 α -酮戊二酰基侧链;和图1E:绿脓菌螯铁蛋白的结构(Brandel等,2011)。

[0038] 图2:提供通过表面等离子共振对Pvd I s(+Fe)结合脂笼蛋白突变蛋白SEQ ID NO:16(图2A),Pvd II s(+Fe)结合脂笼蛋白突变蛋白SEQ ID NO:36(图2B),Pvd III(+Fe)结合脂笼蛋白突变蛋白SEQ ID NO:53(图2C)和绿脓菌螯铁蛋白(+Fe)结合SEQ ID NO:62(图2D)的结合速率(on-rate)和解离速率(off-rate)的典型测量。另外,图2E-H中显示了1200nM(对于绿脓菌螯铁蛋白为200nM)的相应铁载体对阴性对照脂笼蛋白SEQ ID NO:64的结合的缺乏。

[0039] 图3:显示脂笼蛋白突变蛋白SEQ ID NO:35的例示性特异性和交叉反应性概貌,如通过表面等离子共振测定的。证明了对绿脓菌荧光素II琥珀酰基、琥珀酸酰胺基和 α -酮戊二酰基的特异性结合,而显示了对I型和III型的绿脓菌荧光素、绿脓菌螯铁蛋白、肠菌素(Enterobactin)和去铁胺(Desferoxamin)的结合的缺乏。对于所有分析物,使用2 μ M的高浓度。

[0040] 图4:显示来自生长抑制测定法的例示性数据。图4A:与在没有突变蛋白的情况下生长的对照培养物相比,Pvd I特异性突变蛋白SEQ ID NO:16显示Pvd I特异性铜绿假单胞菌菌株(ATCC27853)的生长抑制。图4B:与在没有突变蛋白的情况下生长的对照培养物相比,Pvd II特异性突变蛋白SEQ ID NO:19和36显示Pvd II特异性铜绿假单胞菌菌株(ATCC15692)的生长抑制。SEQ ID NO:36与SEQ ID NO:19相比具有更高的结合亲和力,并且显示了更大的生长抑制。图4C:与在没有突变蛋白的情况下生长的对照培养物相比,Pvd III特异性突变蛋白SEQ ID NO:53显示Pvd III特异性铜绿假单胞菌菌株(ATCC33360)的生长抑制。图4D:与在没有突变蛋白的情况下生长的对照培养物相比,Pch特异性突变蛋白SEQ ID NO:62显示依赖Pch进行铁摄取的Pvd I敲除铜绿假单胞菌菌株(ATCC15692 Δ pvdA)的生长抑制。在测定法中应用10 μ M脂笼蛋白突变蛋白。

[0041] 图5:在小鼠中铜绿假单胞菌诱导的肺感染模型中显示在细菌攻击前1小时和当时施用SEQ ID NO:19以剂量依赖性方式防止小鼠中感染的发生。在从200 μ g/小鼠的SEQ ID NO:19开始观察到显著的预防效果,在2000 μ g/小鼠具有最大效果。

[0042] 图6:显示为了结晶表达的氨基酸序列,包括第1位的开始甲硫氨酸、第2位的赖氨

酸、第3-8位的六组氨酸标签、第9-15位的氨基酸DYDIPTT的接头区(SEQ ID NO:132)、第16-22位的烟草蚀纹病毒(TEV)蛋白酶切割位点ENLYFQG(SEQ ID NO:133),接着是从第23位向前的感兴趣突变蛋白的氨基酸序列。

[0043] 图7:显示SEQ ID NO:31-Pvd-Fe复合物结构。来自不对称单位的两个SEQ ID NO:31分子,即链A和链B的重迭(overlay)。

[0044] 图8:显示SEQ ID NO:31和Pvd-Fe相互作用。来自不对称单位的两个分子重迭。描绘了与Pvd-Fe相互作用的侧链。

[0045] 图9:显示了Pvd组成。框示了参与铁结合的氧原子。

[0046] IV.发明详述

[0047] 本公开内容提供了对绿脓菌荧光素I、II、III型或绿脓菌螯铁蛋白具有结合特异性的多肽,其中多肽包含以可检出的亲和力结合绿脓菌荧光素I、II、III型或绿脓菌螯铁蛋白的hNGAL突变蛋白。

[0048] 如本文中使用的,术语“人脂笼蛋白2”或“人Lcn 2”或“人NGAL”或“hNGAL”指具有SWISS-PROT/UniProt数据库登录号P80188的成熟人嗜中性粒细胞明胶酶相关的脂笼蛋白(NGAL)。公开内容的人脂笼蛋白2突变蛋白在本文中也可以称为“hNGAL突变蛋白”。SWISS-PROT/UniProt数据库登录号P80188中显示的氨基酸序列可用作优选的“参照序列”,更优选地,将SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列用作参照序列。

[0049] 在一些实施方案中,以可检出的亲和力结合绿脓菌荧光素(I、II或III型)或绿脓菌螯铁蛋白的hNGAL突变蛋白可包含天然半胱氨酸残基被另一种氨基酸(例如丝氨酸残基)的至少一个氨基酸取代。在一些其它实施方案中,以可检出的亲和力结合绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白的突变蛋白可包含取代野生型hNGAL的一个或多个氨基酸的一个或多个非天然半胱氨酸残基。在又一个具体的实施方案中,根据公开内容的hNGAL突变蛋白包含天然氨基酸被半胱氨酸残基的至少两个氨基酸取代,由此形成一个或多个半胱氨酸桥。在一些实施方案中,所述半胱氨酸桥可连接至少两个环区。这些区的定义在本文中根据Flower(Flower,1996,见上文,Flower等,2000,见上文)和Breustedt等(2005,见上文)使用。

[0050] 在一些实施方案中,公开内容的hNGAL突变蛋白不结合肠菌素。

[0051] 在一个方面,本公开内容包括至少以可检出的亲和力结合绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白的各种hNGAL突变蛋白。在此意义上,绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白视为参照野生型hNGAL的非天然配体,其中“非天然配体”指在生理学条件下不结合野生型人脂笼蛋白2的化合物。通过在某些序列位置处用一处或多处突变工程化改造野生型hNGAL,本发明人已证明对非天然配体绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白的高亲和力和高特异性是可能的。在一些实施方案中,在编码野生型I人脂笼蛋白2上的某些序列位置的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或甚至更多个核苷酸三联体处,可经由这些位置处被核苷酸三联体的子集取代进行随机诱变。

[0052] 此外,公开内容的突变蛋白可在与hNGAL的线性多肽序列的某些序列位置(如人NGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的序列位置28、34、36、39-42、44-47、49、52、54-55、65、68、70、72-75、77、79-81、87、96、100、103、106、108、123、125、127、132、134、141和145)对应的任何一个或多个,包括至少在任何1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个序列位置处具有突变的氨基酸残基。

[0053] 公开内容的突变蛋白可包含突变的氨基酸序列位置外部的“亲本”蛋白支架(如hNGAL)的野生型(天然)氨基酸序列。在一些实施方案中,根据公开内容的hNGAL突变蛋白还可携带一个或多个序列位置处的一个或多个氨基酸突变,只要此类突变至少实质上不阻碍或不干扰突变蛋白的结合活性和折迭。可使用建立的标准方法(Sambrook, J.等(2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)在DNA水平上非常容易地完成此类突变。氨基酸序列的改变的说明性例子是插入或缺失以及氨基酸取代。此类取代可为保守的,即氨基酸残基用化学相似特性(特别就极性以及大小而言)的氨基酸残基替换。保守取代的例子是下组的成员间的替换:1) 丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸;2) 天冬氨酸和谷氨酸;3) 天冬酰胺和谷氨酰胺;4) 精氨酸和赖氨酸;5) 异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸;和6) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。另一方面,也可在氨基酸序列中引入非保守的改变。另外,代替替换单一氨基酸残基,也可插入或缺失人脂蛋白2的一级结构的一个或多个连续氨基酸,只要这些缺失或插入导致稳定的折迭/功能性突变蛋白(例如具有截短的N和C端的hNGAL突变蛋白)。在此类突变蛋白中,例如,在多肽的N或C端添加或缺失一个或多个氨基酸残基。一般地,此类突变蛋白与成熟hNGAL的氨基酸序列可具有约至少70%,包括至少约80%,如至少约85%氨基酸序列同一性。作为一个说明性例子,本公开内容还涵盖如上文定义的hNGAL突变蛋白,其中已经缺失了成熟hNGAL的线性多肽序列的4个氨基酸残基(G-N-I-K;第95-98位;SEQ ID NO:130)(例如SEQ ID NO:46)。

[0054] 在与其它脂蛋白比较序列同一性时,本文中公开的hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与成熟hNGAL(SEQ ID NO:1)具有高序列同一性。在此一般语境中,公开内容的突变蛋白的氨基酸序列与天然的野生型hNGAL的氨基酸序列是至少基本上相似的,条件是比对中可能有缺口(如下文定义),其是氨基酸添加或缺失的结果。在一些实施方案中,与成熟hNGAL的序列基本上相似的公开内容的突变蛋白的相应序列与成熟hNGAL的序列具有至少70%同一性或序列同源性、至少75%同一性或序列同源性、至少80%同一性或序列同源性、至少82%同一性或序列同源性、至少85%同一性或序列同源性、至少87%同一性或序列同源性、或至少90%同一性或序列同源性,包括至少95%同一性或序列同源性,条件是改变的位置或序列得到保留,并且一个或多个缺口是可能的。

[0055] 如本文中使用的,若公开内容的突变蛋白能够区分靶物和一种或多种参照靶物,则它“特异性结合”靶物(例如绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白),因为结合特异性不是绝对的,而是相对的性质。可例如根据Western印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-测试、FACS、IHC和肽扫描测定“特异性结合”。

[0056] 在一个实施方案中,公开内容的突变蛋白在其N端和/或其C端与融合配偶体融合,所述融合配偶体是延长突变蛋白的血清半衰期的蛋白质域。在其它具体的实施方案中,蛋白质域是免疫球蛋白的Fc部分、免疫球蛋白的CH3域、免疫球蛋白的CH4域、清蛋白结合肽、或清蛋白结合蛋白。

[0057] 在另一个实施方案中,将公开内容的突变蛋白与延长突变蛋白的血清半衰期的化合物缀合。更优选地,将突变蛋白与选自下组的化合物缀合:聚亚烷基二醇分子、羟乙基淀粉、免疫球蛋白的Fc部分、免疫球蛋白的CH3域、免疫球蛋白的CH4域、清蛋白结合肽、或清蛋白结合蛋白。

[0058] 在又一个实施方案中,本公开内容涉及核酸分子,其包含编码本文中公开的突变蛋白的核苷酸序列。公开内容涵盖含有所述核酸分子的宿主细胞。

[0059] 对绿脓菌荧光素特异性的突变蛋白。

[0060] 迄今为止,铜绿假单胞菌隔离群的研究帮助将绿脓菌荧光素分类成三种不同类型(Meyer等,Use of Siderophores to Type Pseudomonads:The Three Pseudomonas Aeruginosa Pyoverdine Systems,Microbiology,1997;vol.143no.1 35-43)。大致42%的铜绿假单胞菌隔离群具有与Pvd I型相同的绿脓菌荧光素系统,42%的铜绿假单胞菌隔离群行为像Pvd II型,而16%的铜绿假单胞菌隔离群属Pvd III型(Cornelis等,1989a;表4)。每种类型具有作为琥珀酰基、琥珀酸酰胺基或 α -酮戊二酰基的侧链中不同的三种成员(亚型),即Pvd I型琥珀酰基、Pvd I型琥珀酸酰胺基、Pvd I型 α -酮戊二酰基、Pvd II型琥珀酰基、Pvd II型琥珀酸酰胺基、Pvd II型 α -酮戊二酰基、Pvd III型琥珀酰基、Pvd III型琥珀酸酰胺基和Pvd III型 α -酮戊二酰基。

[0061] 为了处理生成不同类型的绿脓菌荧光素的铜绿假单胞菌,本公开内容提供了针对不同类型的绿脓菌荧光素的hNGAL突变蛋白。公开内容还提供可用于此类突变蛋白的应用、生成本文中公开的结合绿脓菌荧光素的hNGAL突变蛋白的方法及包含此类突变蛋白的组合物。公开内容的结合绿脓菌荧光素的hNGAL突变蛋白及其组合物可在检测样品中的绿脓菌荧光素的方法中或者在结合受试者中的绿脓菌荧光素的方法中使用。先前尚未描述伴随由本公开内容提供的用途的具有这些特征的此类hNGAL突变蛋白。

[0062] 绿脓菌荧光素不结合天然野生型hNGAL,而hNGAL的天然配体肠菌素以高亲和力对接于(dock into)hNGAL的萼体(calyx)中。因此,绿脓菌荧光素是毒力因子和隐性铁载体,其避免hNGAL识别,从而允许铜绿假单胞菌建立感染(Peek等,Pyoverdine,the Major Siderophore in Pseudomonas aeruginosa,Evades NGAL Recognition,Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases,2012)。

[0063] 因而,本公开内容的目的是提供源自人嗜中性粒细胞明胶酶相关的脂蛋白(NGAL)(又称为人脂蛋白2)的突变蛋白,该突变蛋白与天然的野生型hNGAL相比对绿脓菌荧光素具有高特异性。

[0064] 对绿脓菌荧光素特异性的例示性突变蛋白。

[0065] 在一个方面,本公开内容涉及对一类绿脓菌荧光素(如Pvd I型、Pvd II型或Pvd III型)特异性的新的特异性结合人脂蛋白2(人Lcn2或hNGAL)突变蛋白。

[0066] 本公开内容的一个实施方案涉及突变蛋白,其能够以可检出的亲和力结合一类绿脓菌荧光素,如通过约200nM以下,如约150nM以下的 K_D 测量的亲和力。

[0067] 在一个方面,本公开内容提供了hNGAL突变蛋白,其能够以约20nM以下,如15nM以下的 K_D 结合与铁复合的Pvd I型,例如在基本上在实施例6中描述的测定法中通过Biacore T200仪测量时。

[0068] 在一些另外的实施方案中,本公开内容的一种或多种hNGAL突变蛋白能够以通过约200nM以下的 IC_{50} 值测量的亲和力结合具有和没有复合的铁的Pvd I型琥珀酰基、Pvd I型琥珀酸酰胺基和Pvd I型 α -酮戊二酰基,例如在基本上在实施例5中描述的ELISA测定法中测量时。

[0069] 在一些实施方案中,在基本上在实施例7中描述的竞争ELISA形式中,突变蛋白能

够以约150nM以下的IC50值抑制由绿脓菌荧光素I型琥珀酰基介导的铁摄取。

[0070] 在一些实施方案中,在基本上在实施例8中描述的测定法中,突变蛋白能够抑制Pvd I菌株的细菌生长。

[0071] 在这点上,公开内容涉及多肽,其中所述多肽包括hNGAL突变蛋白,并且所述hNGAL与成熟hNGAL的线性多肽序列相比在序列位置28、36、39-41、46、49、52、54-55、59、65、68、70、72-75、77、79-81、87、96、100、103、106、125、127、132、134和136处包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、或甚至更多个突变氨基酸残基,且其中所述多肽结合Pvd I型,包括Pvd I型琥珀酰基、Pvd I型琥珀酸酰胺基和Pvd I型 α -酮戊二酰基。

[0072] 在一些实施方案中,公开内容的结合Pvd I型的hNGAL突变蛋白在成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的序列位置36、40-41、49、52、68、70、72-73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132和134中的任何一个或多个包含下列突变的氨基酸残基中的一个或多个:Leu 36→Asn、Thr、Val、Trp或Phe;Ala 40→Gly、Asn、Thr或Phe;Ile 41→Arg、Ala、Thr、Phe或Trp;Gln 49→Ile、Leu、Val、Ala或Pro;Tyr 52→Met、Trp或Pro;Ser 68→Asp、Val或Glu;Leu 70→Gln、Trp、Asp或Thr;Arg 72→Trp、Ala、Ser、Leu、Pro或Glu;Lys 73→Asp、Leu、Ala、Glu或Asn;Asp 77→Arg、Leu、Tyr、Ser、Gln、Thr、Ile或Asn;Trp 79→Gln、Asp、Ser、Arg、Met或Glu;Arg 81→Gln、Gly、Ile、Glu、His或Asp;Asn 96→His、Ile、Gly、Tyr或Asp;Tyr 100→Lys、Glu、Asn、Ser、Phe或Tyr;Leu 103→Lys、Pro、Gln、His、Asp、Tyr、Glu、Trp或Asn;Tyr 106→His、Gln或Phe;Lys 125→Arg、Ser、Trp、Tyr、Val或Gly;Ser 127→Trp、Asn、Ala、Thr、Tyr、His、Ile、Val或Asp;Tyr 132→Trp、Asn、Gly或Lys;和Lys 134→Asn、His、Trp、Gly、Gln或Asp。在一些实施方案中,公开内容的hNGAL突变蛋白在成熟hNGAL的这些序列位置处包含两个或更多个,如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、或甚至更多或所有突变的氨基酸残基。

[0073] 另外,与成熟hNGAL的线性多肽序列相比,根据公开内容的结合Pvd I型的hNGAL突变蛋白也可以包含下述取代:Gln 28→His;Lys 46→Glu;Thr 54→Val或Ala;Ile 55→Val;Lys 59→Arg;Asn 65→Asp或Gln;Ile 80→Thr;Cys 87→Ser或Asn;和Thr 136→Ala。

[0074] 在一些别的实施方案中,公开内容的hNGAL突变蛋白(其结合Pvd I型)与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含下述氨基酸替换:

[0075] Gln 28→His;Leu 36→Asn;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Gln 49→Ile;Tyr 52→Met;Ser 68→Val;Leu 70→Gln;Arg 72→Trp;Lys 73→Asp;Asp 77→Leu;Trp 79→Gln;Arg 81→Gln;Cys 87→Ser;Asn 96→His;Tyr 100→Lys;Leu 103→His;Tyr 106→His;Lys 125→Arg;Ser 127→Trp;Tyr 132→Trp;Lys 134→Asp;

[0076] Gln 28→His;Leu 36→Thr;Ala 40→Gly;Ile 41→Phe;Gln 49→Leu;Tyr 52→Trp;Leu 70→Trp;Arg 72→Ala;Lys 73→Leu;Asp 77→Tyr;Trp 79→Asp;Arg 81→Gly;Cys 87→Ser;Asn 96→Ile;Tyr 100→Glu;Leu 103→His;Tyr 106→Gln;Lys 125→Trp;Ser 127→Asn;Tyr 132→Asn;Lys 134→Gln;

[0077] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Asn;Leu 103→Lys;Tyr 106→His;

Lys 125→Tyr;Ser 127→Ala;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0078] Gln 28→His;Leu 36→Phe;Ala 40→Asn;Ile 41→Arg;Gln 49→Pro;Tyr 52→Met;Ser 68→Asp;Leu 70→Thr;Arg 72→Glu;Lys 73→Ala;Asp 77→Arg;Trp 79→Arg;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Tyr;Tyr 100→Lys;Leu 103→Pro;Tyr 106→Phe;Lys 125→Ser;Ser 127→Thr;Tyr 132→Trp;Lys 134→Gly;

[0079] Gln 28→His;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Gln 49→Val;Tyr 52→Met;Ser 68→Val;Leu 70→Asp;Arg 72→Glu;Lys 73→Leu;Asp 77→Arg;Trp 79→Met;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Asp;Tyr 100→Phe;Leu 103→Trp;Tyr 106→Gln;Lys 125→Gly;Ser 127→Tyr;Tyr 132→Trp;Lys 134→His;

[0080] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Phe;Ile 41→Phe;Gln 49→Ala;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Trp;Arg 72→Leu;Lys 73→Asn;Asp 77→Gln;Trp 79→Glu;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Asn 96→Tyr;Leu 103→Tyr;Tyr 106→His;Lys 125→Val;Ser 127→His;Tyr 132→Lys;Lys 134→Trp;

[0081] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Ile 80→Thr;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Ser;Leu 103→Gln;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Ile;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0082] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Asp;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Asn;Leu 103→Asp;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Val;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0083] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Asp 77→Thr;Trp 79→Ser;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Asp;Tyr 100→Asn;Leu 103→Glu;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Asp;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0084] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Asp;Asp 77→Val;Trp 79→Ser;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Asn;Leu 103→Asn;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Val;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0085] Gln 28→His;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Gln 49→Leu;Tyr 52→Met;Ser 68→Val;Leu 70→Asp;Arg 72→Glu;Lys 73→Leu;Asp 77→Arg;Trp 79→Met;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Asp;Tyr 100→Ser;Leu 103→Trp;Tyr 106→Gln;Lys 125→Gly;Ser 127→Tyr;Tyr 132→Trp;Lys 134→His;

[0086] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Thr 54→Val;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Ile 80→Thr;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Ser;Leu 103→Gln;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Thr;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0087] Gln 28→His;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Lys 46→Glu;Gln 49→Leu;Tyr 52→

Met;Thr 54→Ala;Ile 55→Val;Lys 59→Arg;Ser 68→Val;Leu 70→Asp;Arg 72→Glu;Lys 73→Leu;Lys 74→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Arg;Trp 79→Met;Ile 80→Thr;Arg 81→Glu;Ser 87→Asn;Asn 96→Asp;Tyr 100→sER;Leu 103→Trp;Tyr 106→Gln;Lys 125→Gly;Ser 127→Tyr;Tyr 132→Trp;Lys 134→His;

[0088] Leu 36→Trp;Asn 39→Asp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Thr 54→Val;Asn 65→Asp;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Ile 80→Thr;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Ser;Leu 103→Gln;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Thr;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;Thr 136→Ala;

[0089] Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Ala;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Thr 54→Val;Asn 65→Asp;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Ile 80→Thr;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Ser;Leu 103→Gln;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Thr;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;Thr 136→Ala;

[0090] Gln 28→His;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Lys 46→Glu;Gln 49→Leu;Tyr 52→Met;Thr 54→Ala;Ile 55→Val;Lys 59→Arg;Asn 65→Asp;Ser 68→Val;Leu 70→Asp;Arg 72→Glu;Lys 73→Leu;Lys 74→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Arg;Trp 79→Met;Ile 80→Thr;Arg 81→Glu;Ser 87→Asn;Asn 96→Asp;Tyr 100→sER;Leu 103→Trp;Tyr 106→Gln;Lys 125→Gly;Ser 127→Tyr;Tyr 132→Trp;Lys 134→His;or

[0091] Gln 28→His;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Lys 46→Glu;Gln 49→Leu;Tyr 52→Met;Thr 54→Ala;Ile 55→Val;Lys 59→Arg;Asn 65→Gln;Ser 68→Val;Leu 70→Asp;Arg 72→Glu;Lys 73→Leu;Lys 74→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Arg;Trp 79→Met;Ile 80→Thr;Arg 81→Glu;Ser 87→Asn;Asn 96→Asp;Tyr 100→sER;Leu 103→Trp;Tyr 106→Gln;Lys 125→Gly;Ser 127→Tyr;Tyr 132→Trp;Lys 134→His。

[0092] 在残留区(即与序列位置28、36、39-41、46、49、52、54-55、59、65、68、70、72-75、77、79-81、87、96、100、103、106、125、127、132、134和136不同的区域)中,公开内容的hNGAL突变蛋白可包含突变的氨基酸序列位置外部的野生型(天然)氨基酸序列。

[0093] 在另外的具体的实施方案中,根据本公开内容的突变蛋白包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2-18或其片段或变体。

[0094] 公开内容的结合Pvd I的hNGAL突变蛋白的氨基酸序列可以与选自SEQ ID NO:2-18的序列具有高序列同一性,如至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少87%、至少90%同一性,包括至少95%同一性。

[0095] 公开内容还包括具有选自SEQ ID NO:2-18的氨基酸序列的hNGAL突变蛋白的结构同源物,该结构同源物相对于所述hNGAL突变蛋白具有超过约60%,优选超过65%,超过70%,超过75%,超过80%,超过85%,超过90%,超过92%,且最优选超过95%的氨基酸序列同源性或序列同一性。

[0096] 可通过诱变人脂笼蛋白2的天然存在形式获得根据本公开内容的结合Pvd I型的hNGAL突变蛋白。在诱变的一些实施方案中,取代(或替换)是保守取代。虽然如此,涵盖任何取代(包括非保守取代或来自下文的例示性取代的一种或多种),只要突变蛋白保留其结合

Pvd I型的能力,和/或由于它与成熟人脂蛋白2的氨基酸序列(SWISS-PROT数据库登录号P80188)是至少60%,如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或更高的同一性,它与然后取代的序列具有同一性。

[0097] 在另一个方面中,本公开内容提供了hNGAL突变蛋白,其以约20nM以下,如15nM以下的K_d结合与铁复合的Pvd II型,例如在通过基本上在实施例6中描述的测定法中的Biacore T200仪测量时。

[0098] 在又一些另外的实施方案中,本公开内容的一种或多种hNGAL突变蛋白能够通过约200nM以下的IC₅₀值测量的亲和力结合具有和没有复合的铁的Pvd II型琥珀酰基、Pvd II型琥珀酸酰胺基和Pvd II型α-酮戊二酰基,例如在基本上在实施例5中描述的ELISA测定法中测量时。

[0099] 在一些实施方案中,突变蛋白能够在基本上在实施例7中描述的竞争ELISA形式中以约150nM以下的IC₅₀值抑制由绿脓菌荧光素II型琥珀酰基介导的铁摄取。

[0100] 在一些实施方案中,突变蛋白能够在基本上在实施例8中描述的测定法中抑制Pvd II菌株的细菌生长。

[0101] 在一些其它实施方案中,突变蛋白能够在基本上在实施例10中描述的测定法中抑制或降低表达绿脓菌荧光素II型的铜绿假单胞菌菌株的生长。

[0102] 在这点上,公开内容涉及多肽,其中所述多肽包含hNGAL突变蛋白,并且所述hNGAL与成熟hNGAL的线性多肽序列相比在序列位置28、36、40-41、49、52、54、65、68、70、72-75、77、79、81、87、96、100、103、106、125、127、132和134处包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或甚至更多个突变的氨基酸残基,且其中所述多肽结合Pvd II型。

[0103] 在一些实施方案中,公开内容的结合Pvd II型的hNGAL突变蛋白在成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的序列位置36、40-41、49、52、68、70、72-73、77、79、81、87、96、100、103、106、125、127、132和134的任何一个或多个包含下列突变的氨基酸残基中的一个或多个:Leu 36→Asn、Ile或Val;Ala 40→Glu、Gly、Asn、Thr或His;Ile 41→Arg、Val或Thr;Gln 49→Gly、Ala或Pro;Tyr 52→Asn、Gly、Trp或Pro;Ser 68→Asp、Arg或Glu;Leu 70→Arg或Trp;Arg 72→His、Ile、Ala、Ser或Gly;Lys 73→Asn、Met、Pro、Phe、Gln或Arg;Asp 77→His、Ile、Met、Lys、Gly或Asn;Trp 79→Ser、Tyr、Ala、Asp、Phe或Trp;Arg 81→Glu、Ser、Tyr或Asp;Asn 96→Met、Ile、Arg、Asp、Lys、Asn或Ala;Tyr 100→Lys、Glu、Asn、Ser、Phe或Tyr;Leu 103→Thr、Ile、Gln、Gly、Met、His、Trp或Val;Tyr 106→Met、Gln、Ala、Ile、Asn、Gly、Met或Phe;Lys 125→Ala、Ile或Asn;Ser 127→Lys、Arg、Ser、Met、Asp或Asn;Tyr 132→Met、Phe、Asn、Ala、Ile、Gly或Val;和Lys 134→Trp或Tyr。在一些实施方案中,公开内容的hNGAL突变蛋白在成熟hNGAL的这些序列位置处包含2或更多个,如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、或甚至更多个或所有突变的氨基酸残基。

[0104] 此外,根据公开内容的结合Pvd II型的hNGAL突变蛋白与成熟hNGAL的线性多肽序列相比还可以包含下述取代:Gln 28→His;Thr 54→Ala;Asn 65→Asp或Gln和Cys87→Ser。

[0105] 在一些额外的实施方案中,公开内容的hNGAL突变蛋白(其结合Pvd II型)与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含下述氨基酸替换:

[0106] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Glu;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Ser;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Tyr 100→Asn;Leu 103→Gln;Tyr 106→Met;Ser 127→Lys;Tyr 132→Gly;Lys 134→Trp;

[0107] Gln 28→His;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Met;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Ile;Tyr 100→Asn;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Met;Lys 134→Trp;

[0108] Gln 28→His;Leu 36→Ile;Ala 40→Thr;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→Ala;Lys 73→Pro;Asp 77→Ile;Trp 79→Ser;Arg 81→Ser;Cys 87→Ser;Asn 96→Met;Tyr 100→Ser;Leu 103→Gly;Tyr 106→Ala;Lys 125→Lys;Tyr 132→Val;Lys 134→Trp;

[0109] Gln 28→His;Ala 40→Asn;Gln 49→Ala;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→Ser;Lys 73→Gln;Asp 77→Met;Trp 79→Ala;Arg 81→Tyr;Cys 87→Ser;Asn 96→Arg;Tyr 100→Pro;Leu 103→Thr;Tyr 106→Ile;Lys 125→Lys;Ser 127→Met;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0110] Gln 28→His;Ala 40→His;Gln 49→Ala;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Asp;Arg 72→Gly;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Trp;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Arg;Tyr 100→Asp;Leu 103→Met;Tyr 106→Phe;Lys 125→Ala;Ser 127→Asp;Tyr 132→Asn;Lys 134→Trp;

[0111] Gln 28→His;Leu 36→Asn;Ala 40→Gly;Ile 41→Arg;Gln 49→Pro;Tyr 52→Trp;Ser 68→Arg;Leu 70→Trp;Arg 72→Asn;Lys 73→Gln;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Asp;Tyr 100→Thr;Leu 103→Trp;Tyr 106→Asn;Lys 125→Asn;Ser 127→Met;Tyr 132→Ile;Lys 134→Tyr;

[0112] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Gly;Tyr 52→Gly;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→Gly;Lys 73→Arg;Asp 77→Gly;Trp 79→Trp;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Ala;Tyr 100→Trp;Leu 103→Ile;Tyr 106→Gly;Lys 125→Lys;Ser 127→Asn;Tyr 132→Val;Lys 134→Trp;

[0113] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Glu;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Ser;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Lys;Tyr 100→Asn;Leu 103→Val;Tyr 106→Met;Lys 125→Asn;Ser 127→Lys;Tyr 132→Gly;Lys 134→Trp;

[0114] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Ser;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Leu 103→Gln;Tyr 106→Met;Ser 127→Lys;Tyr 132→Val;Lys 134→Trp;

[0115] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Asp 77→Asn;Trp 79→Phe;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Lys;Tyr 100→His;Leu 103→Gln;Tyr 106→Met;Ser 127→Lys;

Tyr 132→Ala;Lys 134→Trp;

[0116] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Gly;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Trp;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Tyr 100→Asn;Leu 103→His;Tyr 106→Met;Ser 127→Lys;Tyr 132→Gly;Lys 134→Trp;

[0117] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Phe;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Met;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp;

[0118] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp;

[0119] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Glu;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Asn 65→Asp;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Phe;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Lys;Tyr 100→Asn;Leu 103→Val;Tyr 106→Met;Lys 125→Asn;Ser 127→Lys;Tyr 132→Gly;Lys 134→Trp;

[0120] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Glu;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Asn 65→Gln;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Phe;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Lys;Tyr 100→Asn;Leu 103→Val;Tyr 106→Met;Lys 125→Asn;Ser 127→Lys;Tyr 132→Gly;Lys 134→Trp;

[0121] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Thr 54→Ala;Asn 65→Asp;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp;

[0122] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Thr 54→Ala;Asn 65→Gln;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp;

[0123] Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Thr 54→Ala;Asn 65→Asp;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp;或

[0124] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Asn 65→Gln;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp。

[0125] 在残留区(即与序列位置28、36、40-41、49、52、54、65、68、70、72-75、77、79、81、87、96、100、103、106、125、127、132和134不同的区域)中,公开内容的hNGAL突变蛋白可以包含

在突变的氨基酸序列位置外的野生型(天然)氨基酸序列。

[0126] 在其它具体的实施方案中,根据本公开内容的突变蛋白包含选自SEQ ID NO:19-37的氨基酸序列或其片段或变体。

[0127] 公开内容的结合Pvd II型的hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与选自SEQ ID NO:19-37的序列可具有高序列同一性,如至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少87%、至少90%同一性,包括至少95%同一性。

[0128] 公开内容还包括具有选自SEQ ID NO:19-37的氨基酸序列的hNGAL突变蛋白的结构同源物,该结构同源物相对于所述hNGAL突变蛋白具有超过约60%,优选超过65%,超过70%,超过75%,超过80%,超过85%,超过90%,超过92%且最优选超过95%的氨基酸序列同源性或序列同一性。

[0129] 可通过诱变人脂笼蛋白2的天然存在形式获得根据本公开内容的结合Pvd II型的hNGAL突变蛋白。在诱变的一些实施方案中,取代(或替换)是保守取代。虽然如此,涵盖任何取代(包括非保守取代或来自下文的例示性取代的一个或多个),只要突变蛋白保留其结合Pvd I型的能力,和/或由于它与成熟人脂笼蛋白2的氨基酸序列(SWISS-PROT数据库登录号P80188)是至少60%,如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或更高的同一性,它与然后取代的序列具有同一性。

[0130] 在另一个方面中,本公开内容提供了hNGAL突变蛋白,其以约20nM以下,如10nM以下的 K_D 结合与铁复合的Pvd III型,例如在基本上在实施例6中描述的测定法中通过Biacore T200仪测量时。

[0131] 在又一些实施方案中,本公开内容的一种或多种hNGAL突变蛋白能够以通过约200nM以下的 IC_{50} 值测量的亲和力结合具有和没有复合的铁的Pvd III型琥珀酰基、Pvd III型琥珀酸酰胺基和Pvd III型 α -酮戊二酰基,例如在基本上在实施例5中描述的ELISA测定法中测量时。

[0132] 在一些实施方案中,突变蛋白能够在基本上在实施例7中描述的竞争ELISA形式中以约150nM以下的 IC_{50} 值抑制由绿脓菌荧光素III型介导的铁摄取。

[0133] 在一些实施方案中,突变蛋白能够在基本上在实施例8中描述的测定法中抑制Pvd III菌株的细菌生长。

[0134] 在这点上,公开内容涉及多肽,其中所述多肽包含hNGAL突变蛋白,并且所述hNGAL与成熟hNGAL的线性多肽序列相比在序列位置28、36、40-42、45-47、49、52、65、68、70、72-73、77、79、81、87、96、100、103、105-106、125、127、132、134和145处包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、或甚至更多个突变的氨基酸残基,且其中所述多肽结合Pvd III型。

[0135] 在一些实施方案中,公开内容的结合Pvd III型的hNGAL突变蛋白在成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的序列位置36、40-41、49、52、68、70、72-73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132和134中的任何一个或多个包括下列突变的氨基酸残基中的一个或多个:Leu 36→Phe或Glu;Ala 40→Trp、Leu或Arg;Ile 41→Met、Arg、Ala、Leu或Trp;Gln 49→His、Ile、Arg、Lys、Met或Pro;Tyr 52→Asn、Tyr、Arg、Ser或Met;Ser 68→Asp、Asn、Glu或Gln;Leu 70→Lys、Asn或Arg;Arg 72→Leu、Arg、Gln或Tyr;Lys 73→His、Leu、Ala、Pro、Gln或Tyr;Asp 77→Ala、Ile、Lys、Gln或Arg;Trp 79→Ser或Asp;Arg 81→His、

Ala、Ser或Val;Asn 96→Met、Ile、Arg、Gly、Leu或Val;Tyr 100→Ala、Ile、Asn、Pro或Asp;Leu 103→Gln、Gly、Phe或Pro;Tyr 106→Glu;Lys 125→Trp或Thr;Ser 127→Val、His、Ile、Phe或Ala;Tyr 132→Phe;和Lys 134→Trp、Gln或Glu。在一些实施方案中,公开内容的hNGAL突变蛋白在成熟hNGAL的这些序列位置处包含两个或更多个,如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、或甚至更多个或所有突变的氨基酸残基。

[0136] 另外,根据公开内容的结合Pvd III型的hNGAL突变蛋白与成熟hNGAL的线性多肽序列相比还可以包含下述取代:Gln 28→His;Leu 42→Arg;Asp 45→Gly;Lys 46→Arg;Asp 47→Asn;Asn 65→Asp;Cys 87→Ser;Ser 105→Pro和Thr 145→Pro。

[0137] 在一些其它实施方案中,公开内容的结合Pvd III型的hNGAL突变蛋白与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含下述氨基酸替换:

[0138] Gln 28→His;Leu 36→Phe;Ala 40→Trp;Ile 41→Met;Gln 49→His;Tyr 52→Asn;Ser 68→Glu;Leu 70→Lys;Arg 72→Gln;Lys 73→Ala;Asp 77→Ile;Trp 79→Ser;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Asn 96→Ile;Tyr 100→Asn;Leu 103→Gly;Tyr 106→Glu;Lys 125→Trp;Ser 127→His;Tyr 132→Phe;Lys 134→Gln;

[0139] Gln 28→His;Leu 36→Phe;Ala 40→Arg;Ile 41→Trp;Gln 49→Ile;Tyr 52→Tyr;Ser 68→Gln;Leu 70→Asn;Arg 72→Trp;Lys 73→Leu;Asp 77→Ala;Trp 79→Ser;Arg 81→Ser;Cys 87→Ser;Asn 96→Arg;Tyr 100→Ile;Leu 103→Pro;Tyr 106→Glu;Lys 125→Thr;Ser 127→Ile;Tyr 132→Phe;Lys 134→Glu;

[0140] Gln 28→His;Leu 36→Phe;Ala 40→Leu;Ile 41→Leu;Gln 49→Arg;Tyr 52→Arg;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Leu;Lys 73→Tyr;Asp 77→Ile;Trp 79→Ser;Arg 81→Ala;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Ala;Leu 103→Phe;Tyr 106→Glu;Lys 125→Trp;Ser 127→Ala;Lys 134→Glu;

[0141] Gln 28→His;Leu 36→Phe;Ala 40→Trp;Ile 41→Arg;Gln 49→Pro;Tyr 52→Ser;Ser 68→Asn;Leu 70→Arg;Arg 72→Trp;Lys 73→Pro;Asp 77→Arg;Trp 79→Ser;Arg 81→Ser;Cys 87→Ser;Asn 96→Met;Tyr 100→Pro;Leu 103→Gly;Tyr 106→Glu;Lys 125→Trp;Ser 127→Phe;Tyr 132→Phe;Lys 134→Glu;

[0142] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Gln 49→Lys;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Gln;Trp 79→Asp;Arg 81→Ala;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0143] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→Gln;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0144] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Thr;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→Arg;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Val;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0145] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Gln 49→Met;Tyr 52→

Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;
Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;
Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0146] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Gln 49→Lys;Tyr 52→
Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→Tyr;Asp 77→Gln;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;
Cys 87→Ser;Asn 96→-;Tyr 100→Glu;Leu103→Gln;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr
132→Phe;Lys 134→Trp;

[0147] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Leu 42→Arg;Gln 49→
Met;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;
Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser 105→Pro;
Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0148] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Asp 47→Asn;Gln 49→
Met;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;
Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser 105→Pro;
Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;Thr 145→Pro;

[0149] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Asp 45→Gly;Lys 46→
Arg;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;
Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser
105→Pro;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0150] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Leu 42→Arg;Gln 49→
Met;Tyr 52→Met;Asn 65→Asp;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;
Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser
105→Pro;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0151] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Asp 47→Asn;Gln 49→
Met;Tyr 52→Met;Asn 65→Asp;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;
Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser
105→Pro;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;Thr 145→Pro;

[0152] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Asp 45→Gly;Lys 46→
Arg;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Asn 65→Asp;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;
Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu
103→Gln;Ser 105→Pro;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;或

[0153] Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Leu 42→Arg;Gln 49→Met;Tyr 52→
Met;Asn 65→Asp;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;
Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser 105→Pro;
Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp。

[0154] 在残留区(即与序列位置28、36、40-42、45-47、49、52、65、68、70、72-73、77、79、81、
87、96、100、103、105-106、125、127、132、134和145不同的区域)中,公开内容的hNGAL突变蛋
白可以包含突变的氨基酸序列位置外部的野生型(天然)氨基酸序列。

[0155] 在另外的具体实施方案中,根据本公开内容的突变蛋白包含选自SEQ ID NO:38-

53的氨基酸序列或其片段或变体。

[0156] 公开内容的结合Pvd III型的hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与选自SEQ ID NO:38-53的序列可以具有高序列同一性,如至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少87%、至少90%同一性,包括至少95%同一性。

[0157] 公开内容还包括具有选自SEQ ID NO:38-53的氨基酸序列的hNGAL突变蛋白的结构同源物,该结构同源物相对于所述hNGAL突变蛋白具有超过约60%,优选超过65%,超过70%,超过75%,超过80%,超过85%,超过90%,超过92%且最优选超过95%的氨基酸序列同源性或序列同一性。

[0158] 可通过诱变人脂蛋白2的天然存在形式获得根据本公开内容的结合Pvd III型的hNGAL突变蛋白。在诱变的一些实施方案中,取代(或替换)是保守取代。虽然如此,涵盖任何取代(包括非保守取代或来自下文的例示性取代的一种或多种),只要突变蛋白保留其结合Pvd I型的能力,和/或由于它与成熟人脂蛋白2的氨基酸序列(SWISS-PROT数据库登录号P80188)是至少60%,如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或更高的同一性,它与然后取代的序列具有同一性。

[0159] 对绿脓菌荧光素特异性的突变蛋白的应用

[0160] 绿脓菌荧光素是假单胞菌属,如铜绿假单胞菌的主要铁载体。体外实验指示铜绿假单胞菌绿脓菌荧光素在从铁转铁蛋白释放铁中的潜在作用,但是绿脓菌荧光素在体内竞争铁的能力最近才得到证明(Meyer等,1996,Infection and Immunity,64,p.518-523)。使用烧伤小鼠模型观察到自有毒力的亲本菌株产生的突变体中绿脓菌荧光素生成的缺乏与这些突变体的毒力丧失相关联,并且毒力在补充源自野生型菌株的同源绿脓菌荧光素时恢复。此外,补充异源绿脓菌荧光素没有恢复后一种突变体的毒力。如此,对感染期间由给定铜绿假单胞菌隔离群使用的绿脓菌荧光素介导的铁摄取系统的精确知识看起来是开发经由细菌铁代谢(例如通过阻断绿脓菌荧光素生物合成或绿脓菌荧光素介导的铁转运)治疗铜绿假单胞菌感染的新方式的前提。

[0161] 因此,医学中存在本公开内容的结合绿脓菌荧光素的突变蛋白的许多可能的应用。在一个另外的方面中,公开内容涉及本文中公开的结合绿脓菌荧光素的突变蛋白用于检测样品中的绿脓菌荧光素(I、II或III型)的用途以及相应的诊断方法。

[0162] 本公开内容还牵涉如描述的一种或多种结合绿脓菌荧光素的突变蛋白用于与绿脓菌荧光素(I、II或III型)形成复合物的用途。

[0163] 因此,在公开内容的另一个方面中,使用公开的突变蛋白检测绿脓菌荧光素(I、II或III型)。此类用途可包括下述步骤:在合适的条件下使一种或多种所述突变蛋白与怀疑含有绿脓菌荧光素的样品接触,由此允许在突变蛋白和绿脓菌荧光素(I、II或III型)之间形成复合物,并通过合适的信号检测复合物。

[0164] 可检测信号可为通过如上文解释的标记物,或者通过由于自身结合(即复合物形成)所致的物理性质变化引起的。一个例子是表面等离子共振,其数值在结合配偶体的结合期间是变化的,所述结合配偶体中的一种固定化在表面(如金箔)上。

[0165] 本文中公开的结合绿脓菌荧光素的突变蛋白也可用于分离绿脓菌荧光素(I、II或III型)。此类用途可包括下述步骤:在合适的条件下使一种或多种所述突变蛋白与认为含有绿脓菌荧光素(I、II或III型)的样品接触,由此允许形成突变蛋白和绿脓菌荧光素(I、II

或III型)之间的复合物,并自样品分离复合物。

[0166] 在公开的突变蛋白用于检测绿脓菌荧光素及分离绿脓菌荧光素(I、II或III型)的用途中,突变蛋白和/或绿脓菌荧光素或其域或片段可以在合适的固相上固定化。

[0167] 在又一个方面中,本公开内容特征在于诊断或分析套盒,其包含根据公开内容的结合绿脓菌荧光素的突变蛋白。

[0168] 除了它们在诊断学中的用途外,在又一个方面中,公开内容涵盖公开内容的结合绿脓菌荧光素的突变蛋白或包含此类突变蛋白的组合物用于结合受试者中的绿脓菌荧光素(I、II或III型)和/或抑制或降低受试者中的铜绿假单胞菌生长的用途。

[0169] 在又一个方面中,本公开内容特征在于结合受试者中的绿脓菌荧光素(I、II或III型)的方法,其包括对所述受试者施用有效量的公开内容的一种或多种结合绿脓菌荧光素的突变蛋白或包含此类突变蛋白的一种或多种组合物。

[0170] 在又一个方面中,本公开内容牵涉用于抑制或降低受试者中的铜绿假单胞菌生长的方法,其包括对所述受试者施用有效量的公开内容的一种或多种结合绿脓菌荧光素的突变蛋白或包含此类突变蛋白的一种或多种组合物。

[0171] 对绿脓菌螯铁蛋白特异性的突变蛋白

[0172] 另外,本公开内容满足下述需要:通过提供结合绿脓菌螯铁蛋白的hNGAL突变蛋白得到的绿脓菌螯铁蛋白的备选抑制剂及其有用的应用。因而,公开内容还提供了生成和使用本文中描述的结合绿脓菌螯铁蛋白的突变蛋白的方法以及可在检测样品中的绿脓菌螯铁蛋白的方法中或在结合受试者中的绿脓菌螯铁蛋白的方法中使用的组合物。先前尚未描述具有伴随由本公开内容提供的用途的这些特征的此类hNGAL突变蛋白。

[0173] 对绿脓菌螯铁蛋白特异性的例示性突变蛋白

[0174] 在一个方面,本公开内容涉及hNGAL突变蛋白,其以约20nM以下,如1nM以下的 K_D 结合与铁复合的绿脓菌螯铁蛋白,例如,例如在通过基本上在实施例6中描述的测定法中的Biacore T200仪测量时。

[0175] 在又一些另外的实施方案中,本公开内容的一种或多种hNGAL突变蛋白能够以由约500nM以下的 IC_{50} 值测量的亲和力结合具有复合的铁的绿脓菌螯铁蛋白,例如在基本上在实施例5中描述的ELISA测定法中测量时。

[0176] 在又一些其它实施方案中,本公开内容的一种或多种hNGAL突变蛋白能够以由约200nM以下的 IC_{50} 值测量的亲和力结合没有复合的铁的绿脓菌螯铁蛋白,例如在基本上在实施例5中描述的ELISA测定法中测量时。

[0177] 在又一些其它实施方案中,本公开内容的一种或多种hNGAL突变蛋白能够以由约200nM以下的 IC_{50} 值测量的亲和力结合具有和没有复合的铁的绿脓菌螯铁蛋白,例如在基本上在实施例5中描述的ELISA测定法中测量时。

[0178] 在一些实施方案中,突变蛋白能够在基本上在实施例7中描述的竞争ELISA形式中以约150nM以下的 IC_{50} 值抑制由绿脓菌螯铁蛋白介导的铁摄取。

[0179] 在一些实施方案中,突变蛋白能够在基本上在实施例8中描述的测定法中抑制Pvd I敲除($\Delta pvdA$)的细菌生长。

[0180] 在这点上,公开内容涉及多肽,其中所述多肽包含hNGAL突变蛋白,并且所述hNGAL与成熟hNGAL的线性多肽序列相比在序列位置28、34、36、40-41、44-46、49、52、54、65、68、

70、72-74、77、79-81、87、96、100、103、106、108、123、125、127、132、134和141处包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、或甚至更多个突变的氨基酸残基,且其中所述多肽结合绿脓菌螯铁蛋白。

[0181] 在一些实施方案中,公开内容的结合绿脓菌螯铁蛋白的hNGAL突变蛋白在成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的序列位置36、40-41、49、52、68、70、72-73、77、79、81、87、96、100、103、106、125、127、132和134中的任何一处或多处包含下述突变氨基酸残基中的一个或多个:Leu 36→His、Met或Val;Ala 40→Ile、Gln、Tyr或Phe;Ile 41→Leu、His或Trp;Gln 49→His、Arg、Ser或Ala;Tyr 52→Leu、Trp或Pro;Ser 68→Asp或His;Leu 70→Arg或Trp;Arg 72→His、Ile、Ala、Ser或Gly;Lys 73→Asn、Met、Pro、Phe、Gln或Arg;Asp 77→Arg、Thr、Pro或Asp;Trp 79→Ala、Arg、Lys或Asp;Arg 81→Thr、Ile或Trp;Asn 96→Met、Asn、Pro或Ala;Tyr 100→Gly、His或Glu;Leu 103→Gly、Met、His或Gln;Tyr 106→Met、Gly、Arg或Trp;Lys 125→Trp、Phe、Gly或Leu;Ser 127→Arg、Trp、Asp或Ile;Tyr 132→Ala、Glu或Thr;和Lys 134→Leu、Val、Asn或Phe。在一些实施方案中,公开内容的hNGAL突变蛋白在成熟hNGAL的这些序列位置处包含两个或更多个,如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、或甚至更多个或所有突变的氨基酸残基。

[0182] 此外,根据公开内容的结合绿脓菌螯铁蛋白的hNGAL突变蛋白与成熟hNGAL的线性多肽序列相比还可以包含下述取代:Gln 28→His;Val 34→Leu;Glu 44→Gly;Asp 45→Gly;Lys→Arg或Tyr;Asn 65→Asp;Ile 80→Thr;Cys 87→Ser;Leu 94→Phe;Val 108→Ala;Phe 123→Ser和Thr 141→Ala。

[0183] 在一些额外的实施方案中,公开内容的结合绿脓菌螯铁蛋白的hNGAL突变蛋白与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含下述氨基酸替换:

[0184] Gln 28→His;Ala 40→Ile;Ile 41→Leu;Gln 49→His;Tyr 52→Leu;Ser 68→His;Leu 70→Thr;Arg 72→Lys;Lys 73→Trp;Asp 77→Ile;Trp 79→Ser;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Asn 96→Met;Tyr 100→Asn;Leu 103→His;Tyr 106→Met;Lys 125→Trp;Ser 127→Asp;Tyr 132→Glu;Lys 134→Leu;

[0185] Gln 28→His;Leu 36→His;Ala 40→Gln;Ile 41→Trp;Gln 49→Arg;Tyr 52→Trp;Ser 68→Asp;Leu 70→Asp;Arg 72→Ala;Lys 73→Ile;Asp 77→His;Trp 79→Arg;Arg 81→Thr;Cys 87→Ser;Tyr 100→His;Leu 103→Gly;Tyr 106→Gly;Lys 125→Phe;Ser 127→Ile;Tyr 132→Ala;Lys 134→Phe;

[0186] Gln 28→His;Leu 36→Met;Ala 40→Phe;Ile 41→His;Gln 49→Ser;Tyr 52→Pro;Ser 68→His;Leu 70→Pro;Arg 72→Trp;Lys 73→Ala;Asp 77→Ala;Trp 79→Lys;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Ala;Tyr 100→Gly;Leu 103→Met;Tyr 106→Trp;Lys 125→Gly;Ser 127→Trp;Tyr 132→Thru;Lys 134→Val;

[0187] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Tyr;Ile 41→Trp;Gln 49→Ala;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Trp;Lys 73→Arg;Asp 77→Arg;Trp 79→Asp;Arg 81→Trp;Cys 87→Ser;Asn 96→Pro;Tyr 100→Glu;Leu 103→Gln;Tyr 106→Arg;Lys 125→Leu;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ala;Lys 134→Asn;

[0188] Gln 28→His;Val 34→Leu;Leu 36→Met;Ala 40→Phe;Ile 41→His;Gln 49→Ser;Tyr 52→Pro;Ser 68→His;Leu 70→Pro;Arg 72→Trp;Lys 73→Ala;Asp 77→Ala;

Trp 79→Lys; Ile 80→Thr; Arg 81→Ile; Cys 87→Ser; Asn 96→Ala; Tyr 100→Gly; Leu 103→Met; Tyr 106→Trp; Phe 123→Ser; Lys 125→Gly; Ser 127→Trp; Tyr 132→Thru; Lys 134→Val; Thr 141→Ala;

[0189] Gln 28→His; Leu 36→Met; Ala 40→Phe; Ile 41→His; Gln 49→Ser; Tyr 52→Pro; Ser 68→His; Leu 70→Pro; Arg 72→Trp; Lys 73→Ala; Asp 77→Ala; Trp 79→Lys; Ile 80→Thr; Arg 81→Ile; Cys 87→Ser; Asn 96→Ala; Tyr 100→Gly; Leu 103→Met; Tyr 106→Trp; Phe 123→Ser; Lys 125→Gly; Ser 127→Trp; Tyr 132→Thru; Lys 134→Val;

[0190] Gln 28→His; Leu 36→His; Ala 40→Gln; Ile 41→Trp; Asp 45→Gly; Lys 46→Arg; Gln 49→Arg; Tyr 52→Trp; Ser 68→Asp; Leu 70→Asp; Arg 72→Ala; Lys 73→Ile; Asp 77→Leu; Trp 79→Arg; Arg 81→Thr; Cys 87→Ser; Tyr 100→His; Leu 103→Gly; Tyr 106→Gly; Lys 125→Phe; Ser 127→Ile; Tyr 132→Ala; Lys 134→Phe;

[0191] Gln 28→His; Leu 36→His; Ala 40→Gln; Ile 41→Trp; Glu 44→Gly; Lys 46→Tyr; Gln 49→Arg; Tyr 52→Trp; Ser 68→Asp; Leu 70→Asp; Arg 72→Ala; Lys 73→Ile; Lys 74→Glu; Asp 77→His; Trp 79→Arg; Arg 81→Thr; Cys 87→Ser; Leu 94→Phe; Tyr 100→His; Leu 103→Gly; Tyr 106→Gly; Val 108→Ala; Lys 125→Phe; Ser 127→Ile; Tyr 132→Ala; Lys 134→Phe; 或

[0192] Leu 36→His; Ala 40→Gln; Ile 41→Trp; Asp 45→Gly; Lys 46→Arg; Gln 49→Arg; Tyr 52→Trp; Asn 65→Asp; Ser 68→Asp; Leu 70→Asp; Arg 72→Ala; Lys 73→Ile; Asp 77→Leu; Trp 79→Arg; Arg 81→Thr; Cys 87→Ser; Tyr 100→His; Leu 103→Gly; Tyr 106→Gly; Lys 125→Phe; Ser 127→Ile; Tyr 132→Ala; Lys 134→Phe。

[0193] 在残留区(即与序列位置28、34、36、40-41、44-46、49、52、54、65、68、70、72-74、77、79-81、87、96、100、103、106、108、123、125、127、132、134和141不同的区域)中,公开内容的hNGAL突变蛋白可包含突变的氨基酸序列位置外部的野生型(天然)氨基酸序列。

[0194] 在其它具体的实施方案中,根据本公开内容的突变蛋白包含选自SEQ ID NO:54-63的氨基酸序列或其片段或变体。

[0195] 公开内容的结合绿脓菌螯铁蛋白的hNGAL突变蛋白的氨基酸序列可与选自SEQ ID NO:54-63的序列具有高序列同一性,如至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少87%、至少90%同一性,包括至少95%同一性。

[0196] 公开内容还包括具有选自SEQ ID NO:54-63的氨基酸序列的hNGAL突变蛋白的结构同源物,该结构同源物相对于所述hNGAL突变蛋白具有超过约60%,优选超过65%,超过70%,超过75%,超过80%,超过85%,超过90%,超过92%,且最优选超过95%的氨基酸序列同源性或序列同一性。

[0197] 可通过诱变人脂笼蛋白2的天然存在形式获得根据本公开内容的结合绿脓菌螯铁蛋白的hNGAL突变蛋白。在诱变的一些实施方案中,取代(或替换)是保守取代。虽然如此,涵盖任何取代(包括非保守取代或来自下文的例示性取代的一种或多种),只要突变蛋白保留其结合Pvd I型的能力,和/或由于它与成熟人脂笼蛋白2的氨基酸序列(SWISS-PROT数据库登录号P80188)是至少60%,如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或更高的同一性,它与然后取代的序列具有同一性。

[0198] 2.对绿脓菌螯铁蛋白特异性的突变蛋白的应用

[0199] 绿脓菌螯铁蛋白 (Pch) 是由铜绿假单胞菌生成并分泌的以同化铁的两种主要的铁载体之一。它螯合胞外介质中的铁, 并且经由特定的外膜转运蛋白 FptA 将它转运到细胞中。Pch 强烈螯合二价金属, 如 Zn (II) (于 $p[H] 7.4$, $pZn = 11.8$) 和 Cu (II) (于 $p[H] 7.4$, $pCu = 14.9$), 并且主要形成 1:2 (M^{2+}/Pch) 复合物。铁载体不仅专用于铁 (III) 穿梭, 而且更可能在微生物中的微妙金属稳态中展现其它特定的生物学作用。

[0200] 因此, 医学中存在公开内容的对绿脓菌螯铁蛋白具有结合亲和力的突变蛋白的许多可能的应用。在一个另外的方面中, 公开内容涉及本文中公开的此类突变蛋白用于检测样品中的绿脓菌螯铁蛋白的用途以及相应的诊断方法。

[0201] 本公开内容还牵涉如描述的对绿脓菌螯铁蛋白具有结合亲和力的一种或多种突变蛋白用于与绿脓菌螯铁蛋白形成复合物的用途。

[0202] 因此, 在公开内容的另一个方面中, 使用公开的突变蛋白来检测绿脓菌螯铁蛋白。此类用途可以包括下述步骤: 在合适的条件下使一种或多种所述突变蛋白与怀疑含有绿脓菌螯铁蛋白的样品接触, 由此允许在突变蛋白和绿脓菌螯铁蛋白之间形成复合物, 并通过合适的信号检测复合物。

[0203] 可检测信号可以是如上文解释的标记物, 或者通过由于自身结合 (即复合物形成) 所致的物理性质变化引起。一个例子是表面等离子共振, 其数值在结合配偶体的结合期间是变化的, 所述结合配偶体中的一种固定化在表面 (如金箔) 上。

[0204] 也可以使用本文中公开的突变蛋白来分离绿脓菌螯铁蛋白。此类用途可以包括下述步骤: 在合适的条件下使一种或多种所述突变蛋白与认为含有绿脓菌螯铁蛋白的样品接触, 由此允许在突变蛋白和绿脓菌螯铁蛋白之间形成复合物, 并自样品分离复合物。

[0205] 在公开的突变蛋白用于检测绿脓菌螯铁蛋白以及分离绿脓菌螯铁蛋白的用途中, 突变蛋白和/或绿脓菌螯铁蛋白或其域或片段可以在合适的固相上固定化。

[0206] 因而, 可测定例如样品中的分子 (如绿脓菌螯铁蛋白) 的存在或缺乏及其浓度或水平。

[0207] 在又一个方面中, 本公开内容特征在于诊断或分析套盒, 其包含根据公开内容的对绿脓菌螯铁蛋白具有结合亲和力的突变蛋白。

[0208] 除了它们在诊断学中的用途外, 在又一个方面中, 公开内容涵盖公开内容的此类突变蛋白或包含此类突变蛋白的组合物用于结合受试者中的绿脓菌螯铁蛋白和/或抑制或降低受试者中的铜绿假单胞菌生长的用途。

[0209] 在又一个方面中, 本公开内容特征在于结合受试者中的绿脓菌螯铁蛋白的方法, 其包括对所述受试者施用有效量的公开内容的对绿脓菌螯铁蛋白具有结合亲和力的一种或多种突变蛋白或包含此类突变蛋白的一种或多种组合物。

[0210] 在又一个方面中, 本公开内容牵涉用于抑制或降低受试者中的铜绿假单胞菌生长的方法, 其包括对所述受试者施用有效量的公开内容的对绿脓菌螯铁蛋白具有结合亲和力的一种或多种突变蛋白或包含此类突变蛋白的一种或多种组合物。

[0211] C. 包含结合绿脓菌荧光素的突变蛋白和/或结合绿脓菌螯铁蛋白的突变蛋白以及突变蛋白的组合物

[0212] 铜绿假单胞菌是一种细菌物种, 其广泛分布于环境中, 并且能够在具有素因病况 (如囊性纤维化) 的患者中引起非常严重的感染。铜绿假单胞菌合成两种主要铁载体, 即绿

脓菌荧光素 (Pvd) 和绿脓菌螯铁蛋白 (Pch), 以覆盖其对铁 (III) 的需要。认为生长的生物膜模式对于持续性铜绿假单胞菌感染是关键的 (Costerton等, 1999; Singh等, 2000), 并且Pvd和Pch基因的双重表达对于正常生物膜形成是必需的 (Banin等, 2005)。

[0213] 考虑到铜绿假单胞菌生成可观的一批毒力因子 (均在其致病性中发挥作用), 有效抑制铜绿假单胞菌毒力的优选策略是靶向几种毒力因子。

[0214] 为此目的, 本公开内容涵盖 (i) 对绿脓菌荧光素I型特异性的第一突变蛋白或其多肽, (ii) 对绿脓菌荧光素II型特异性的第二突变蛋白或其多肽, (iii) 对绿脓菌荧光素III型特异性的第三突变蛋白或其多肽和/或 (iv) 对绿脓菌螯铁蛋白特异性的第四突变蛋白或其多肽用于结合受试者中的绿脓菌荧光素I、II、III型和/或绿脓菌螯铁蛋白的用途。此类用途包括下述步骤: 对受试者施用有效量的 (i) 对绿脓菌荧光素I型特异性的第一突变蛋白或其多肽, (ii) 对绿脓菌荧光素II型特异性的第二突变蛋白或其多肽, (iii) 对绿脓菌荧光素III型特异性的第三突变蛋白或其多肽和/或 (iv) 对绿脓菌螯铁蛋白特异性的第四突变蛋白或其多肽。本公开内容还涵盖 (i) 对绿脓菌荧光素I型特异性的第一突变蛋白或其多肽, (ii) 对绿脓菌荧光素II型特异性的第二突变蛋白或其多肽, (iii) 对绿脓菌荧光素III型特异性的第三突变蛋白或其多肽和/或 (iv) 对绿脓菌螯铁蛋白特异性的第四突变蛋白或其多肽用于在受试者中防止或降低铜绿假单胞菌经由绿脓菌螯铁蛋白和/或绿脓菌荧光素摄取铁的用途。类似地, 本公开内容公开了 (i) 对绿脓菌荧光素I型特异性的第一突变蛋白或其多肽, (ii) 对绿脓菌荧光素II型特异性的第二突变蛋白或其多肽, (iii) 对绿脓菌荧光素III型特异性的第三突变蛋白或其多肽和/或 (iv) 对绿脓菌螯铁蛋白特异性的第四突变蛋白或其多肽用于治疗或减轻受试者中的铜绿假单胞菌感染和/或生物膜形成的用途。在一些另外的实施方案中, 铜绿假单胞菌感染可以是急性或慢性感染。

[0215] 可组合施用第一、第二、第三和/或第四突变蛋白或其多肽, 包括同时 (concurrently)、伴随 (concomitantly) 或连续 (in series)。在一些实施方案中, 可以在可施用的组合物中包含第一、第二、第三和/或第四突变蛋白或其多肽。组合物可包含结合至少一种药学可接受佐剂、稀释剂或载体的有效量的作为活性成分的第一、第二、第三和/或第四突变蛋白或其多肽。第一、第二、第三和/或第四突变蛋白或其多肽也可彼此独立施用, 包括在独立的时间点时以个别的时间间隔。

[0216] 在一些实施方案中, 如本公开内容中使用的对绿脓菌荧光素 (I、II或III型) 特异性的突变蛋白能够以可检出的亲和力, 即以至少200nM, 包括约100nM、约50nM、约25nM或约15nM的解离常数结合绿脓菌荧光素 (分别为I、II或III型)。在一些实施方案中, 如本公开内容中使用的对绿脓菌螯铁蛋白特异性的突变蛋白能够以可检出的亲和力, 即以至少200nM, 包括约100nM、约50nM、约25nM或约15nM的解离常数结合绿脓菌螯铁蛋白。在一些另外的优选实施方案中, 根据公开内容的组合的突变蛋白分别以至少约10nM、约1nM、约0.1nM、约10pM或甚至更低的对绿脓菌荧光素 (I、II或III型) 或绿脓菌螯铁蛋白的解离常数结合绿脓菌荧光素 (I、II或III型) 或绿脓菌螯铁蛋白。如此, 本公开内容提供了 (i) 对绿脓菌荧光素I型 (Pvd I s、sa、aKG+/-Fe) 具有可检出的亲和力的hNGAL突变蛋白, (ii) 对绿脓菌荧光素II型 (Pvd II s、sa、aKG+/-Fe) 具有可检出的亲和力的hNGAL突变蛋白, (iii) 对绿脓菌荧光素III型 (Pvd III s、sa、aKG+/-Fe) 具有可检出的亲和力的hNGAL突变蛋白和/或 (iv) 对绿脓菌螯铁蛋白 (Pch+/-Fe) 具有可检出的亲和力的hNGAL突变蛋白的组合。

[0217] 关于对绿脓菌荧光素具有可检出的亲和力的hNGAL突变蛋白的更多详情可参见本公开内容的A部分中。

[0218] 在一个特别优选的实施方案中,对绿脓菌荧光素I型特异性的突变蛋白在SEQ ID NO:2-18中的任一项中显示。在一个特别优选的实施方案中,对绿脓菌荧光素II型特异性的突变蛋白在SEQ ID NO:19-37中的任一项中显示。在一个特别优选的实施方案中,对绿脓菌荧光素III型特异性的突变蛋白在SEQ ID NO:38-53中的任一项中显示。

[0219] 对绿脓菌螯铁蛋白具有可检出的亲和力的hNGAL突变蛋白的更多详情已经在本公开内容的B部分中公开。

[0220] 在一个特别优选的实施方案中,对绿脓菌螯铁蛋白特异性的突变蛋白在SEQ ID NO:54-63中任一项中显示。

[0221] 本公开内容还涉及组合物,其包含下列至少一项:(i)对绿脓菌荧光素I型特异性的第一突变蛋白或其多肽,(ii)对绿脓菌荧光素II型特异性的第二突变蛋白或其多肽,(iii)对绿脓菌荧光素III型特异性的第三突变蛋白或其多肽和/或(iv)对绿脓菌螯铁蛋白特异性的第四突变蛋白或其多肽,该组合物可以在结合绿脓菌荧光素I、II、III型和/或绿脓菌螯铁蛋白的方法中使用。

[0222] 本公开内容涉及第一突变蛋白或其多肽或组合物、第二突变蛋白或其多肽或组合物、第三突变蛋白或其多肽或组合物和/或第四突变蛋白或其多肽或组合物的组合。这些突变蛋白之一可以以可检出的亲和力结合作为给定的非天然靶物的绿脓菌荧光素(I、II或III型)。这些突变蛋白之一可以以可检出的亲和力结合作为给定的非天然靶物的绿脓菌螯铁蛋白。如此,相应的突变蛋白分别结合作为给定的非天然靶物的绿脓菌荧光素I、II或III型或绿脓菌螯铁蛋白。术语“非天然靶物”指在生理学条件下不结合相应的脂笼蛋白(野生型hNGAL)的化合物。例如,第一突变蛋白或其多肽或组合物可以结合一类绿脓菌荧光素(I、II或III型)或绿脓菌螯铁蛋白,并且第二、第三或第四突变蛋白或其多肽或组合物可以分别结合绿脓菌螯铁蛋白或另一类绿脓菌荧光素,或者反之亦然。可以以各种形式和取向提供第一、第二、第三和/或第四突变蛋白或其多肽或组合物的组合。

[0223] 在又一个方面中,本公开内容特征在于结合受试者中的绿脓菌荧光素I、II、III型和/或绿脓菌螯铁蛋白的方法,其包括对所述受试者施用有效量的包含下列至少一项的组合物:(i)对绿脓菌荧光素I型特异性的第一突变蛋白或其多肽,(ii)对绿脓菌荧光素II型特异性的第二突变蛋白或其多肽,(iii)对绿脓菌荧光素III型特异性的第三突变蛋白或其多肽和(iv)对绿脓菌螯铁蛋白特异性的第四突变蛋白或其多肽。在一些实施方案中,此类组合物包含(i)-(iv)的两种或更多种,例如三种或甚至全部。

[0224] 在又一个方面中,本公开内容牵涉抑制或降低受试者中的铜绿假单胞菌生长的方法,其包括对所述受试者施用有效量的包含下列至少一项的组合物:(i)对绿脓菌荧光素I型特异性的第一突变蛋白或其多肽,(ii)对绿脓菌荧光素II型特异性的第二突变蛋白或其多肽,(iii)对绿脓菌荧光素III型特异性的第三突变蛋白或其多肽和(iv)对绿脓菌螯铁蛋白特异性的第四突变蛋白或其多肽。在一些实施方案中,此类组合物包含(i)-(iv)的两种或更多种,例如三种或甚至全部。

[0225] 本公开内容还牵涉(i)对绿脓菌荧光素I型特异性的第一突变蛋白或其多肽,(ii)对绿脓菌荧光素II型特异性的第二突变蛋白或其多肽,(iii)对绿脓菌荧光素III型特异性

的第三突变蛋白或其多肽和/或(iv)对绿脓菌螯铁蛋白特异性的第四突变蛋白或其多肽用于与绿脓菌荧光素I、II、III型和/或绿脓菌螯铁蛋白形成复合物的用途。

[0226] 因此,在公开内容的另一个方面中,可使用公开的突变蛋白或多肽检测绿脓菌荧光素和绿脓菌螯铁蛋白。此类用途可包括下述步骤:在合适的条件下使一种或多种所述突变蛋白或多肽与怀疑含有绿脓菌荧光素和/或绿脓菌螯铁蛋白的样品接触,由此分别允许在突变蛋白或多肽和绿脓菌荧光素之间和/或在突变蛋白和绿脓菌螯铁蛋白之间形成复合物,并通过合适的信号检测复合物。

[0227] 可检测信号可以是如上文解释的标记物,或者通过由于自身结合(即复合物形成)所致的物理性质变化引起的。一个例子是表面等离共振,其数值在结合配偶体的结合期间是变化的,所述结合配偶体中的一种固定化在表面(如金箔)上。

[0228] 本文中公开的突变蛋白或多肽也可以用于分离绿脓菌荧光素和/或绿脓菌螯铁蛋白。此类用途可以包括下述步骤:在合适的条件下使一种或多种所述突变蛋白与认为含有绿脓菌荧光素和/或绿脓菌螯铁蛋白的样品接触,由此分别允许在突变蛋白和绿脓菌荧光素之间和/或在突变蛋白和绿脓菌螯铁蛋白之间形成复合物,并自样品分离复合物。

[0229] 在公开的突变蛋白或多肽用于检测绿脓菌荧光素和/或绿脓菌螯铁蛋白以及分离绿脓菌荧光素和/或绿脓菌螯铁蛋白的用途中,可在合适的固相上固定化突变蛋白和/或绿脓菌荧光素和绿脓菌螯铁蛋白或其域或片段。

[0230] 因而,可测定例如样品中的绿脓菌荧光素和/或绿脓菌螯铁蛋白的存在或缺乏以及其浓度或水平。

[0231] 在另一个方面中,公开内容提供了多个部分的套盒(kit)。套盒在一个或多个容器中分开或混合包含对绿脓菌荧光素I型特异性的突变蛋白或多肽或其组合物、对绿脓菌荧光素II型特异性的突变蛋白或多肽或其组合物、对绿脓菌荧光素III型特异性的突变蛋白或多肽或其组合物、和/或对绿脓菌螯铁蛋白特异性的突变蛋白或多肽或其组合物。在一些进一步优选的实施方案中,套盒包含包括对绿脓菌荧光素I型特异性的第一突变蛋白或多肽或其组合物的第一容器、包括对绿脓菌荧光素II型特异性的第二突变蛋白或多肽或其组合物的第二容器、包括对绿脓菌荧光素III型特异性的第三突变蛋白或多肽或其组合物的第三容器、和/或包括对绿脓菌螯铁蛋白特异性的第四突变蛋白或多肽或其组合物的第四容器。在一些实施方案中,套盒进一步与其整合地或作为一个或多个分开文件包含关于内容物或套盒和突变蛋白或其多肽的用途的信息。在一些实施方案中,套盒可包含一种或多种经配制以在稀释剂中重构的组合物。此类稀释剂(例如无菌稀释剂)也可以包含在套盒中,例如在容器内。

[0232] D. 公开内容的突变蛋白

[0233] 当本文中在本公开内容的结合绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白的突变蛋白的语境使用时,术语“对…特异性”包括突变蛋白分别为针对、结合于或者与绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白起反应。如此,针对、结合或起反应包括突变蛋白分别特异性结合绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白。术语“特异(性)地”在此语境中意指突变蛋白与如本文中描述的绿脓菌荧光素蛋白或绿脓菌螯铁蛋白蛋白质起反应,而基本上不与另一种蛋白质起反应。术语“另一种蛋白质”分别包括任何非绿脓菌荧光素或非绿脓菌螯铁蛋白蛋白质,包括与本文中公开的突变蛋白所针对的绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白紧密相关或同源的蛋白质。然

而,术语“另一种蛋白质”不排除来自除了人外的物种(如定义“受试者”的语境中描述的那些物种)的绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白蛋白质、片段和/或变体。术语“基本上不结合”意指本公开内容的突变蛋白不结合另一种蛋白质,即显示小于30%,优选20%,更优选10%,特别优选小于9、8、7、6或5%的交叉反应性。特别是可通过比较本公开内容的脂笼蛋白突变蛋白与绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白的反应和所述突变蛋白与其它蛋白质的反应而容易地测试突变蛋白是否特异性起反应,如上文描述的。例如也可以根据Western印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-测试、FACS、IHC和肽扫描测定“特异性结合”。

[0234] 根据公开内容的突变蛋白的氨基酸序列当与同另一种脂笼蛋白的序列同一性相比时与人脂笼蛋白2具有高序列同一性(还可参见上文)。在此一般语境中,根据公开内容的组合的突变蛋白的氨基酸序列与相应脂笼蛋白(野生型hNGAL)的氨基酸序列是至少基本上相似的。根据公开内容的组合的突变蛋白的相应序列与成熟hNGAL的序列基本上相似,如与成熟hNGAL的序列至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少87%、至少90%同一性,包括至少95%同一性。在这点上,比较而言,公开内容的突变蛋白当然可含有如本文中描述的取代,其使突变蛋白能够分别结合绿脓菌荧光素I、II、III型或绿脓菌螯铁蛋白。通常,相对于hNGAL的天然序列,hNGAL的突变蛋白包含hNGAL的配体结合位点的开放末端处的4个环中的氨基酸的一个或多个突变。如上文解释,这些区域在决定突变蛋白对绿脓菌荧光素I、II、III型或绿脓菌螯铁蛋白的结合特异性中是必需的。突变蛋白衍生hNGAL或其同源物可在N端区中和/或在位于天然结合袋(natural binding pocket)对面的 β -桶结构末端安排的3个肽环BC、DE和FG中的任何序列位置处具有1、2、3、4或更多个突变的氨基酸残基。

[0235] 根据公开内容的突变蛋白与相应的天然hNGAL相比包含一个或多个,如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或甚至20个取代,条件是此类突变蛋白应当能够分别结合绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白。例如,突变蛋白可在与hNGAL的独特位置对应的位置处(即在相应的位置处)具有取代。在一些实施方案中,根据公开内容的组合的突变蛋白包含至少两个氨基酸取代,包括2、3、4、5或甚至更多个由精氨酸残基对天然氨基酸的氨基酸取代。因而,如本文中描述的蛋白质“参照”支架的核酸经受诱变,目的在于生成能够分别结合绿脓菌荧光素I、II、III型或绿脓菌螯铁蛋白的突变蛋白。

[0236] 还有,本公开内容的突变蛋白可包含在其N或C端,优选C端的异源氨基酸序列,如Strep-标签,例如Strep II标签,而不影响突变蛋白的生物学活性(分别结合其靶物,例如绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白)。

[0237] 具体地,为了测定与野生型hNGAL不同的突变蛋白的氨基酸序列的氨基酸残基是否对应于野生型hNGAL的氨基酸序列中的某个位置,熟练技术人员可使用本领域中公知的手段和方法,例如比对,手动或通过使用计算机程序,如BLAST2.0,其代表基本局部比对搜索工具或ClustalW或适合于产生序列比对的任何其它合适的程序。因而,野生型hNGAL可充当“主题序列”或“参照序列”,而与本文中描述的野生型hNGAL不同的突变蛋白的氨基酸序列充当“查询序列”。术语“参照序列”和“野生型序列”在本文中可互换使用。

[0238] 在一些实施方案中,取代(或替换)是保守取代。虽然如此,涵盖任何取代(包括非保守取代或来自下文列出的例示性取代的一种或多种),只要突变蛋白保留其分别结合绿脓菌荧光素I、II、III型或绿脓菌螯铁蛋白的能力和/或由于它与“初始”序列是至少60%,

如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或更高相同,它与然后取代的序列具有同一性。

[0239] 保守取代一般是根据要突变的氨基酸列出的下列取代,每个后面为可理解为保守的一个或多个替换:Ala→Gly、Ser、Val;Arg→Lys;Asn→Gln、His;Asp→Glu;Cys→Ser;Gln→Asn;Glu→Asp;Gly→Ala;His→Arg、Asn、Gln;Ile→Leu、Val;Leu→Ile、Val;Lys→Arg、Gln、Glu;Met→Leu、Tyr、Ile;Phe→Met、Leu、Tyr;Ser→Thr;Thr→Ser;Trp→Tyr;Tyr→Trp、Phe;Val→Ile、Leu。其它取代也是可允许的,并且可以凭经验或者根据其它已知的保守或非保守取代确定。作为进一步的方向,下述8组各含有通常可以理解为限定彼此保守取代的氨基酸:

[0240] 丙氨酸(Ala),甘氨酸(Gly);

[0241] 天冬氨酸(Asp),谷氨酸(Glu);

[0242] 天冬酰胺(Asn),谷氨酰胺(Gln);

[0243] 精氨酸(Arg),赖氨酸(Lys);

[0244] 异亮氨酸(Ile),亮氨酸(Leu),甲硫氨酸(Met),缬氨酸(Val);

[0245] 苯丙氨酸(Phe),酪氨酸(Tyr),色氨酸(Trp);

[0246] 丝氨酸(Ser),苏氨酸(Thr);和

[0247] 半胱氨酸(Cys),甲硫氨酸(Met)。

[0248] 若此类取代导致生物学活性的变化,则可以引入更多实质性变化,如下述,或如下文参照氨基酸类别进一步描述,并且对产物筛选期望的特征。此类更多实质性变化的例子是:Ala→Leu、Ile;Arg→Gln;Asn→Asp、Lys、Arg、His;Asp→Asn;Cys→Ala;Gln→Glu;Glu→Gln;His→Lys;Ile→Met、Ala、Phe;Leu→Ala、Met、正亮氨酸;Lys→Asn;Met→Phe;Phe→Val、Ile、Ala;Trp→Phe;Tyr→Thr、Ser;Val→Met、Phe、Ala。

[0249] 通过选择取代实现hNGAL的生物学特性的实质性修饰,所述取代在它们对维持(a)取代区中的多肽主链的结构(例如作为片层或螺旋构象), (b)靶位点处的分子的电荷或疏水性,或(c)侧链的体积(bulk)的作用上显著不同。基于共同的侧链特性,将天然存在的残基分为下组:(1)疏水性:正亮氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸;(2)中性亲水性:半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸;(3)酸性:天冬氨酸、谷氨酸;(4)碱性:天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸;(5)影响链取向的残基:甘氨酸、脯氨酸;和(6)芳香族:色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。

[0250] 非保守取代会需要用这些类别之一的成员替代另一类。不参与维持hNGAL的正确构象的任何半胱氨酸残基也可以一般用丝氨酸取代以改善分子的氧化稳定性并阻止异常交联。相反,可添加半胱氨酸键以改善其稳定性。

[0251] 可使用建立的标准方法在核酸(例如DNA水平)上非常容易地实现任何突变,包括如上文讨论的插入。氨基酸序列的改变的例示性例子是插入或缺失以及氨基酸取代。此类取代可以是保守的,即氨基酸残基用化学上相似特性(特别就极性大小而言)的氨基酸残基替换。保守替代的例子是下组成员间的替换:1)丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸;2)天冬氨酸和谷氨酸;3)天冬酰胺和谷氨酰胺;4)精氨酸和赖氨酸;5)异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸;和6)苯丙氨酸、酪氨酸、和色氨酸。另一方面,也可在氨基酸序列中引入非保守改变。另外,替代替换单一氨基酸残基,也可以插入或缺失hNGAL的一级结构的一个或多个连续氨基

酸,只要这些缺失或插入产生稳定的折迭/功能性突变蛋白。

[0252] 氨基酸序列的修饰包括单一氨基酸位置的定向诱变以通过掺入某些限制酶的切割位点而简化突变的hNGAL基因或其部分的亚克隆。另外,也可掺入这些突变以进一步改善突变蛋白对给定靶物(如绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白)的亲和力。此外,可引入突变以调控突变蛋白的某些特征,从而改善折迭稳定性、血清稳定性、蛋白质抗性或水溶解度或降低聚集趋势(若必要的话)。例如,可将天然存在的半胱氨酸残基突变成其它氨基酸以阻止二硫化物桥形成。也可将其它氨基酸序列位置有意突变为半胱氨酸以引入新的反应性基团,例如用于与其它化合物(如聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、生物素、肽或蛋白质)缀合或用于形成非天然存在的二硫化物连接。可使用生成的硫醇模块来将突变蛋白进行PEG化或HES化,例如以提高相应突变蛋白的血清半衰期。

[0253] 也可将其它氨基酸序列位置突变为半胱氨酸以引入新的反应性基团,例如用于与其它化合物(如聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、生物素、肽或蛋白质)缀合或用于形成非天然存在的二硫化物连接。

[0254] 在一些实施方案中,若将上述模块之一与公开内容的突变蛋白缀合,则与氨基酸侧链的缀合可以是有利的。合适的氨基酸侧链可以天然存在于hNGAL的氨基酸序列中或者可以通过诱变引入。在经由诱变引入合适的结合位点的情况中,一种可能性是用半胱氨酸残基替换合适位置处的氨基酸。

[0255] 就人脂笼蛋白2的突变蛋白而言,例示性的可能性是此类突变将半胱氨酸残基引入脂笼蛋白(包括人脂笼蛋白2突变蛋白)的氨基酸序列中,以包括至少在与hNGAL的野生型序列的序列位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146或158对应的序列位置之一处引入半胱氨酸(Cys)残基。在公开内容的人脂笼蛋白2突变蛋白具有与SWISS-PROT/UniProt数据库登录号P80188的序列相比半胱氨酸已经用另一种氨基酸残基替换的序列的一些实施方案中,可将相应的半胱氨酸再引入序列中。作为说明性例子,在此类情况中可通过恢复成半胱氨酸(如SWISS-PROT登录号P80188的序列中最初存在的)引入氨基酸位置87处的半胱氨酸残基。可使用氨基酸位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146和/或158中任一个的侧链上生成的硫醇模块来对突变蛋白进行PEG化或HES化,例如以延长相应人脂笼蛋白2突变蛋白的血清半衰期。

[0256] 在另一个实施方案中,为了提供合适的氨基酸侧链以将上述化合物之一与根据本公开内容的突变蛋白缀合,可通过诱变引入人工氨基酸。一般地,此类人工氨基酸设计为更具反应性,并且因而促进与期望化合物的缀合。可经由人工tRNA引入的此类人工氨基酸的一个例子是对乙酰基苯丙氨酸。

[0257] 对于本文中公开的突变蛋白的几个应用,可为有利的是以融合蛋白的形式使用它们。在一些实施方案中,公开内容的突变蛋白在其N端或其C端与蛋白质、蛋白质域或肽,例如信号序列和/或亲和标签融合。

[0258] 亲和标签,如**Strep-tag®**或**Strep-tag® II**(Schmidt, T.G.M.等(1996) J.Mol.Biol.255,753-766)、myc-标签、FLAG-标签、His₆-标签或HA-标签或蛋白质,如谷胱甘肽-S-转移酶也允许容易检测和/或纯化重组蛋白,其是合适的融合配偶体的进一步例子。最后,具有生色或荧光特性的蛋白质,如绿色荧光蛋白(GFP)或黄色荧光蛋白(YFP)也是公开内容的突变蛋白的合适的融合配偶体。

[0259] 一般地,可用任何合适的化学物质或酶标记公开内容的突变蛋白,所述化学物质或酶在化学、物理、光学或酶促反应中直接或间接产生可检测的化合物或信号。物理反应和同时光学反应/标记物的一个例子是在使用放射性标记物时在X射线照射或发射后的荧光发射。碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶和 β -半乳糖苷酶是催化生色反应产物形成的酶标记物(和同时的光学标记物)的例子。一般地,通常用于抗体的所有标记物(除专门与免疫球蛋白的Fc部分中的糖模块一起使用的那些标记物外)也可用于与公开内容的突变蛋白缀合。公开内容的突变蛋白也可与任何合适的治疗活性剂缀合,例如以将此类药剂靶向递送到给定细胞、组织或器官或选择性靶向细胞(例如肿瘤细胞)而不影响周围的正常细胞。此类治疗活性剂的例子包括放射性核素、毒素、小有机分子、和治疗肽(如作用为细胞表面受体的激动剂/拮抗剂的肽或竞争给定细胞靶物上的蛋白质结合位点的肽)。然而,公开内容的突变蛋白也可与治疗活性核酸,如反义核酸分子、小干扰RNA、微小RNA或核酶缀合。可通过本领域中公知的方法生成此类缀合物。

[0260] 如上文指示,在一些实施方案中,公开内容的突变蛋白可与延长突变蛋白的血清半衰期的模块缀合(在这点上,还可参见PCT公开文本W0 2006/56464,其中通过提及对CTLA-4具有结合亲和力的人嗜中性粒细胞明胶酶相关的脂蛋白的突变蛋白描述了此类缀合策略)。延长血清半衰期的模块可为聚亚烷基二醇分子、羟乙基淀粉、脂肪酸分子,如棕榈酸(Vajo&Duckworth 2000, Pharmacol. Rev. 52, 1-9)、免疫球蛋白的Fc部分、免疫球蛋白的CH3域、免疫球蛋白的CH4域、清蛋白结合肽、或清蛋白结合蛋白、转铁蛋白等等。清蛋白结合蛋白可为细菌清蛋白结合蛋白、抗体、抗体片段,包括域抗体(例如,参见美国专利6,696,245)、或对清蛋白具有结合活性的突变蛋白。因而,适合于延长公开内容的突变蛋白的半衰期的缀合配偶体包括清蛋白结合蛋白,例如细菌清蛋白结合域,如链球菌蛋白G的(König, T., & Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83)。可用作缀合配偶体的清蛋白结合肽的其它例子是例如具有Cys-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Cys共有序列的那些,其中Xaa1是Asp、Asn、Ser、Thr或Trp;Xaa2是Asn、Gln、His、Ile、Leu或Lys;Xaa3是Ala、Asp、Phe、Trp或Tyr;并且Xaa4是Asp、Gly、Leu、Phe、Ser或Thr,如记载于美国专利申请2003/0069395或Dennis等(SEQ ID NO:131; Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) J Biol Chem 277, 35035-35043)。

[0261] 在其它实施方案中,清蛋白自身(Osborn, B. L. 等, 2002, J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548),或清蛋白的生物学活性片段可以用作公开内容的突变蛋白的缀合配偶体。术语“清蛋白”包括所有哺乳动物清蛋白,如人血清清蛋白或牛血清清蛋白或大鼠清蛋白。可以重组生成清蛋白或其片段,如记载于美国专利5,728,553或欧洲专利申请EP 0 330 451和EP 0 361 991。可以将重组人清蛋白(Recombunin®)Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK)与公开内容的突变蛋白缀合或融合以延长突变蛋白的半衰期。

[0262] 若清蛋白结合蛋白是抗体片段,则它可为域抗体。域抗体(dAb)工程化改造为允许对生物物理特性和体内半衰期的精确控制以创建最佳安全性和效力产物概貌。例如,域抗体可购自Domantis Ltd. (Cambridge, UK and MA, USA)。

[0263] 使用转铁蛋白作为模块来延长公开内容的突变蛋白的血清半衰期,突变蛋白可以与非糖基化转铁蛋白的N或C端或两者在遗传上融合。非糖基化转铁蛋白具有14-17天的半

衰期,并且类似地,转铁蛋白融合蛋白会具有延长的半衰期。转铁蛋白载体还提供高生物利用度、生物分布和循环稳定性。此技术可购自BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA)。用作蛋白质稳定剂/半衰期延长配偶体的重组人转铁蛋白(DeltaFerrin™)也可购自Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK)。

[0264] 若为了延长公开内容的突变蛋白的血清半衰期而使用免疫球蛋白的Fc部分,可以使用可购自Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, USA) 的SynFusion™技术。此Fc-融合技术的使用允许创建更长效生物药物,并且可以例如由与抗体的Fc区连接的两个拷贝的突变蛋白组成以改善药动力学、溶解度和生成效率。

[0265] 延长公开内容的突变蛋白的半衰期的又一种备选是与突变蛋白的N或C端融合长的、非结构化的、柔性的富含甘氨酸的序列(例如具有约20至80个连续甘氨酸残基的多聚甘氨酸)。例如,WO2007/038619中公开的此方法也已经称作“rPEG”(重组PEG)。

[0266] 若使用聚亚烷基二醇作为缀合配偶体,则聚亚烷基二醇可以是取代的、未取代的、线性或分支的。它也可以是活化的聚亚烷基衍生物。合适的化合物的例子是聚乙二醇(PEG)分子,如记载于WO 99/64016,美国专利6,177,074或涉及干扰素的美国专利6,403,564,或如对其它蛋白质描述,如经PEG修饰的门冬酰胺酶,PEG-腺苷脱氨酶(PEG-ADA)或PEG-超氧化物歧化酶(参见例如Fuertges等(1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11,139-148)。此类聚合物(如聚乙二醇)的分子量的范围可以为约300至约70,000道尔顿,包括例如具有约10,000,约20,000,约30,000或约40,000道尔顿的分子量的聚乙二醇。此外,如例如记载于美国专利6,500,930或6,620,413,为了血清半衰期延长,可以将碳水化合物寡聚物和聚合物,如淀粉或羟乙基淀粉(HES)与公开内容的突变蛋白缀合。

[0267] 另外,本文中公开的突变蛋白可以与模块融合,其可以对公开内容的突变蛋白赋予新的特征,如酶促活性或对其它分子的结合亲和力。合适的融合配偶体的例子是碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、谷胱甘肽-S-转移酶、蛋白G的清蛋白结合域、蛋白A、抗体片段、寡聚化域或毒素。

[0268] 特别地,可将本文中公开的突变蛋白与分开的酶活性位点融合,从而所得的融合蛋白的这两种“组分”一起作用于给定的治疗靶物。突变蛋白的结合域附着于致病性靶物,从而允许酶域消除靶物的生物学功能。

[0269] 本公开内容还涉及核酸分子(DNA和RNA),其包含编码公开内容的突变蛋白的核苷酸序列。由于遗传密码的简并性允许某些密码子被阐明同一氨基酸的其它密码子取代,公开内容不限于编码如本文中描述的突变蛋白的具体核酸分子,而是涵盖包括编码功能性突变蛋白的核苷酸序列的所有核酸分子。在这点上,本公开内容提供了编码公开内容的一些突变蛋白的核苷酸序列,如SEQ ID NO:65-126中所示。

[0270] 在公开内容的一个实施方案中,方法包括在核苷酸三联体处使核酸分子经受诱变,所示核苷酸三联体编码与人NGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:2)的序列位置28、34、36、39-42、44-47、49、52、54-55、65、68、70、72-75、77、79-81、87、96、100、103、106、108、123、125、127、132、134、141和145对应的至少一个或甚至更多个序列位置。

[0271] 公开内容还包括编码公开内容的突变蛋白的核酸分子,其包括在实验诱变的指示序列位置外部的额外突变。此类突变经常是允许的或者甚至可以证明是有利的,例如如果

它们有助于突变蛋白的改善的折迭效率、血清稳定性、热稳定性或配体结合亲和力。

[0272] 本申请中公开的核酸分子可以与一个或多个调节序列“可操作连接”以允许此核酸分子的表达。

[0273] 若核酸分子包含含有关于转录和/或翻译调节的信息的序列元件,并且此类序列与编码多肽的核苷酸序列“可操作连接”,则它(如DNA)称为“能够表达核酸分子”或能够“允许表达核苷酸序列”。可操作连接是调节序列元件和要表达的序列以实现基因表达的方式相连的连接。对于基因表达必需的调节区的精确性质可以在物种间变化,但是一般地,这些区域包含启动子,其在原核生物中含有启动子本身(即指导转录的启动的DNA元件)以及在转录成RNA时会对翻译启动发信号的DNA元件两者。此类启动子区通常包含参与转录和翻译启动的5'非编码序列,如原核生物中的-35/-10框和Shine-Dalgarno元件或真核生物中的TATA框、CAAT序列和5'加帽元件。这些区域还可以包含增强子或阻抑物元件以及翻译的信号和前导序列,用于将天然多肽靶向到宿主细胞的特定区室。

[0274] 另外,3'非编码序列可以含有参与转录终止、多聚腺苷酸化等的调节元件。然而,如果这些终止序列在特定的宿主细胞中没有令人满意的功能,那么它们可以用在所述细胞中功能性的信号取代。

[0275] 因此,公开内容的核酸分子可以包含调节序列,如启动子序列。在一些实施方案中,公开内容的核酸分子包含启动子序列和转录终止序列。合适的原核启动子是例如tet启动子、lacUV5启动子或T7启动子。可用于在真核细胞中表达的启动子的例子是SV40启动子或CMV启动子。

[0276] 公开内容的核酸分子也可以是载体的一部分或者任何其它种类的克隆运载体,如质粒、噬菌粒、噬菌体、杆状病毒、粘粒或人工染色体。

[0277] 在一个实施方案中,质粒中包含核酸分子。质粒载体意指编码与感兴趣cDNA融合的调和的(temperent)噬菌体(如M13或f1)的基因间区域,或其功能性部分的载体。在用此类噬菌粒载体和合适的辅助噬菌体(例如M13K07、VCS-M13或R408)二重感染细菌宿主细胞后,生成完整的噬菌体颗粒,由此实现编码的异源cDNA与其在噬菌体表面上展示的相应多肽的物理偶联(参见例如Lowman,H.B. (1997) Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.26,401-424,或Rodi,D.J.和Makowski,L. (1999) Curr.Opin.Biotechnol.10,87-93)。

[0278] 除了上文描述的调节序列和编码如本文中描述的突变蛋白的核酸序列外,此类克隆运载体可以包含源自与用于表达的宿主细胞相容的物种的复制和控制序列及对经转化或转染的细胞赋予选择性表型的选择标志物。大量的合适的克隆载体是本领域中已知的,并且是商品化的。

[0279] 可以将编码如本文中描述的突变蛋白的DNA分子,和特别是含有此类突变蛋白的编码序列的克隆载体转化到能够表达基因的宿主细胞中。可以使用标准技术进行转化。如此,公开内容还涉及含有如本文中公开的核酸分子的宿主细胞。

[0280] 在适合于表达编码公开内容的融合蛋白的核苷酸序列的条件下培养经转化的宿主细胞。合适的宿主细胞可以是原核的,如大肠杆菌(*Escherichia coli*,E.coli)或枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),或真核的,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、SF9或High5昆虫细胞、永生化哺乳动物细胞系(例如HeLa细胞或CHO细胞)或原代哺乳动物细胞。

[0281] 公开内容还涉及用于生成如本文中描述的突变蛋白或其多肽的方法,其中通过遗传工程方法从编码突变蛋白或多肽的核酸开始生成突变蛋白或多肽、突变蛋白的片段或多肽或突变蛋白或多肽和另一种多肽的融合蛋白。该方法可以在体内实施,突变蛋白或多肽可以例如在细菌或真核宿主生物体中生成,然后从此宿主生物体或其培养物中分离。也可以在体外生成蛋白质,例如通过使用体外翻译系统。

[0282] 在体内生成突变蛋白或其多肽时,依靠重组DNA技术(如上文已经概述)将编码此类突变蛋白或多肽的核酸导入合适的细菌或真核宿主生物体中。为此目的,首先使用建立的标准方法用包含编码如本文中描述的突变蛋白的核酸分子的克隆载体转化宿主细胞。然后,在允许异源DNA表达和由此合成相应多肽的条件下培养宿主细胞。随后,从细胞中或从培养基中回收多肽。

[0283] 在一些实施方案中,本申请中公开的核酸分子(如DNA)可以与公开内容的另一种核酸分子“可操作连接”以允许表达公开内容的融合蛋白。在这点上,可操作连接是第一核酸分子的序列元件和第二核酸分子的序列元件以使融合蛋白能够作为单一多肽表达的方式相连的连接。

[0284] 另外,在一些实施方案中,可以在公开内容的hNGAL突变蛋白中除去Cys 76和Cys 175之间的天然存在的二硫键。因而,可以在具有还原性氧化还原环境的细胞区室中,例如在革兰氏阴性菌的细胞质中生成此类突变蛋白。

[0285] 若公开内容的突变蛋白包含分子内二硫键,则可优选使用合适的信号序列将新生多肽引导到具有氧化性氧化还原环境的细胞区室中。此类氧化性环境可由革兰氏阴性细菌(如大肠杆菌)的周质,在革兰氏阳性细菌的胞外环境中或者在真核细胞的内质网的腔室中提供,并且通常有利于结构性二硫键的形成。

[0286] 然而,也可以在宿主细胞(优选大肠杆菌)的胞质溶胶(cytosol)中生成公开内容的突变蛋白或其多肽。在此情况中,突变蛋白或多肽可以直接以可溶且折迭的状态获得或者以包含体形式回收,接着在体外复性。进一步的选项是使用具有氧化性胞内环境的特定宿主菌株,其由此可以允许在胞质溶胶中形成二硫键(Venturi等(2002) J.Mol.Biol.315, 1-8.)。

[0287] 然而,如本文中描述的突变蛋白或多肽可不一定仅通过使用遗传工程生成或产生。相反,也可以通过化学合成(如Merrifield固相多肽合成)或者通过体外转录和翻译而获得此类突变蛋白或多肽。例如,可能的是使用分子建模鉴定有希望的突变,然后在体外合成想要的(设计的)多肽,并且调查对绿脓菌荧光素I、II、III型或绿脓菌螯铁蛋白的结合活性。用于蛋白质的固相和/或溶液相合成的方法是本领域中公知的(参见例如Bruckdorfer, T.等(2004) Curr.Pharm.Biotechnol.5, 29-43)。

[0288] 在另一个实施方案中,可以采用本领域技术人员已知的完善建立的方法通过体外转录/翻译生成公开内容的突变蛋白或多肽。

[0289] 技术人员会理解可用于制备由本公开内容涵盖但是其蛋白质或核酸序列在本文中没有明确公开的突变蛋白或其多肽的方法。作为概述,氨基酸序列的此类修饰包括例如单个氨基酸位置的定向诱变以通过并入某些限制酶的切割位点简化突变hNGAL基因或其部分的亚克隆。另外,也可并入这些突变以进一步改善突变蛋白对其靶物(如绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白)的亲合力。此外,可引入突变以调控突变蛋白的某些特征,从而改善折迭

稳定性、血清稳定性、蛋白质抗性或水溶解度或降低聚集趋势(若必要的话)。例如,可以将天然存在的半胱氨酸残基突变成其它氨基酸以阻止二硫化物桥形成。

[0290] 本文中公开的突变蛋白或其多肽及其衍生物可以在与抗体或其片段类似的许多领域中使用。例如,突变蛋白可以用于用酶、抗体、放射性物质或任何其它具有生物化学活性或限定结合特征的基团标记。通过这样做,可检测其相应的靶物或其缀合物或融合蛋白或使其相应的靶物或其缀合物或融合蛋白与它们接触。另外,公开内容的突变蛋白或其多肽可用来依靠建立的分析方法(例如ELISA或Western印迹)或者通过显微术或免疫传感学检测化学结构。在这点上,可通过使用合适的突变蛋白缀合物或融合蛋白直接产生或者通过经由抗体免疫化学检测结合的突变蛋白间接产生检测信号。

[0291] 本公开内容的其它目的、优点和特征在检查下述实施例及其附图后对于本领域技术人员会变得明显,所述实施例及其附图并不意图是限制性的。因此,应当理解的是虽然本公开内容由例示性的实施方案明确公开,本领域技术人员可以诉诸于本文中公开的其中体现的公开内容的任选特征、修改和变型,并且认为此类修改和变型在本公开内容的范围内。

V. 实施例

[0292] 实施例1:铜绿假单胞菌铁载体的纯化和生物素化

[0293] 铜绿假单胞菌生成三组绿脓菌荧光素,即绿脓菌荧光素I型、绿脓菌荧光素II型和绿脓菌荧光素III型。每组具有在作为琥珀酰基、琥珀酸酰胺基或 α -酮戊二酰基的侧链上不同的三种形式。另外,铜绿假单胞菌生成绿脓菌螯铁蛋白。所有10种铁载体可复合作为 Fe^{3+} 的铁。

[0294] 为了选择和筛选感兴趣的突变蛋白,可以将铁载体进行生物素化。对绿脓菌荧光素I琥珀酰基变体在琥珀酰基侧链,对绿脓菌荧光素II琥珀酰基变体在L-鸟氨酸侧链以及对绿脓菌荧光素III琥珀酰基变体主要在甘氨酸侧链上进行生物素化。绿脓菌螯铁蛋白在酚环上生物素化。

[0295] 实施例2:选择特异性结合铜绿假单胞菌铁载体的突变蛋白

[0296] 使用通过随机诱变成熟hNGAL生成的基于hNGAL的文库来选择特异性结合铜绿假单胞菌的不同铁载体的突变蛋白。在独立的噬菌体展示和选择过程中使用生物素化且加载有铁的Pvd I琥珀酰基、Pvd II琥珀酰基和Pvd III琥珀酰基及生物素化的非加载有铁的绿脓菌螯铁蛋白。

[0297] 将 2×10^{12} 个来自这些文库的噬菌粒与200nM或500nM或1 μ M生物素化的靶物一起温育。使用用中性亲合素(neutravidin)或链霉亲合素涂覆的顺磁性珠捕捉靶物/噬菌粒复合物,随后将其用磁体分离。通过用PBST或PBS清洗珠除去未结合的噬菌粒。首先,用300 μ l 70mM三乙胺洗脱结合的噬菌粒10分钟,接着用100 μ l 1M Tris-Cl pH 6.0立即中和上清液。在一次立即清洗循环后,用100mM甘氨酸pH2.2洗脱剩余的噬菌粒10分钟,接着用50 μ l 0.5M Tris-碱立即中和。将这两个洗脱级份合并,并且用于感染4ml大肠杆菌XL1-blue培养物(OD_{550} 0.45-0.6)以进行再扩增。在搅拌下温育30分钟后,通过以5000xg离心2分钟收集细菌,在1ml 2xYT培养基中重悬,并且在三个大LB/Amp琼脂板(10g/l细菌用胰蛋白胨,5g/l酵母提取物,5g/l NaCl, pH 7.5, 15g/l琼脂, 100 μ g/ml氨苄青霉素)上铺板。于32 $^{\circ}\text{C}$ 将板温育过夜。使用50ml补充有100 μ g/ml氨苄青霉素的2xYT培养基(2xYT/Amp)从琼脂板刮下经感染

的细胞。用合适体积的细菌悬浮液接种50ml 2xYT/Amp培养基以达到0.08的OD₅₅₀。于37℃在摇动器(160rpm)上温育培养物,直到达到0.5的OD₅₅₀,然后用辅助噬菌体(1.5×10^{11} pfu)通过于37℃在温和搅拌的情况下温育15分钟,并且在摇动器上温育45分钟感染。随后,添加卡那霉素到终浓度70μg/ml以选择被辅助噬菌体感染的细菌。最后,通过添加25ng/ml无水四环素诱导pIII-hNGAL突变蛋白的表达。

[0298] 在于24℃温育15小时后,通过离心(5000xg持续20分钟)使培养物的上清液澄清。随后,将20ml上清液通过具有0.22μm孔径的聚醚砜膜。对滤液添加5ml含有水中的20% (w/v) PEG-8000和15% (w/v) NaCl的溶液,并且温和混合。在冰上温育溶液30分钟,之后于4℃和5000xg离心20分钟。在含有200mM硼酸、160mM NaCl和1mM EDTA的1ml缓冲液中溶解含有噬菌粒的团粒。通过离心(5000xg持续5分钟)除去不溶性颗粒。将上清液转移到新鲜管,并且与含有水中的20% (w/v) PEG-8000和15% (w/v) NaCl的200μl溶液混合。在冰上温育溶液30分钟,随后通过离心(5000xg持续5分钟)收集沉淀的噬菌粒。在补充有50mM苯甲脒的PBS中重悬噬菌粒,并且用于下一轮噬菌粒选择。

[0299] 进行连续的4轮选择。应用不同清洗条件:i)在所有4个循环轮次中对于每个清洗步骤,8次与1ml PBS/T温育5分钟,ii)从轮次1至4增加的清洗循环的数目,iii)用5分钟温育清洗步骤改变快速清洗步骤,并且清洗步骤的数目在轮次之间增加。

[0300] 由用第四次选择轮次的输出感染的大肠杆菌细胞制备噬菌粒DNA,并且通过用BstX1消化DNA和随后使用标准方法(Sambrook等,(1989) Molecular cloning:a laboratory manual)经由琼脂糖凝胶电泳纯化分离hNGAL突变蛋白盒。将hNGAL突变蛋白盒插入类似切割的载体,其允许在四环素启动子的控制下的hNGAL突变蛋白的细菌生成。用连接混合物转化CaCl₂感受态TG1-F'细胞,并在LB/Amp板上铺板。

[0301] 为了优化Pvd I、Pvd II、Pvd III和Pch特异性突变蛋白,基于突变蛋白SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和随后SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:45产生额外的文库。使用选择位置的偏爱随机化或基于易错聚合酶链式反应(PCR)的方法产生文库。突变蛋白的选择如所述但以增加的严格性进行。

[0302] 为了促进在真核细胞中表达,除去潜在的N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)。

[0303] 此外,引入突变以进一步优化稳定性。

[0304] 实施例3:使用高通量ELISA筛选鉴定特异性结合相应的铜绿假单胞菌铁载体的突变蛋白

[0305] 使用个别的菌落接种2xYT/Amp培养基,并且培养过夜(14-18小时)至静止期。随后,从静止期培养物中接种50μl 2xYT/Amp,并且于37℃温育3小时,然后转变成22℃,直到达到0.6-0.8的OD₅₉₅。通过添加补充有1.2μg/ml无水四环素的10μl 2xYT/Amp诱导突变蛋白的生成。于22℃温育培养物到次日。在添加PBS/T中的40μl 5% (w/v) BSA并且于25℃温育1小时后,培养物准备好用于筛选测定法。

[0306] 通过在微量滴定板上于4℃涂覆中性亲合素和链霉亲合素(在PBS中的5μg/ml)的1:1混合物过夜来测试分离的突变蛋白对相应的铁载体靶物的特异性结合。在用PBST中的2%BSA封闭板1小时后,在经涂覆的微量滴定板上以PBS/T中的1.5-2.5μg/ml的浓度捕获用于选择的相应的生物素化的铁载体靶物。在筛选中使用用生物素化的醛固酮

(aldosterone)以相同的方式涂覆的板作为阴性对照靶物。随后,将20 μ l经BSA封闭的培养物添加到含有捕获的靶物或醛固酮的经涂覆的微量滴定板,并且于25 $^{\circ}$ C温育1小时。在用与辣根过氧化物酶缀合的抗T7抗体(Merck KgaA,Darmstadt)或与辣根过氧化物酶缀合的抗-Strep标签抗体(IBA,Boettingen)温育1小时后检测结合的突变蛋白。为了量化,添加20 μ l QuantaBlu荧光过氧化物酶底物,并且在320nm的激发波长和430nm的发射波长测定荧光。然后,对特异性结合相应铁载体靶物的突变蛋白测序。

[0307] 为了选择具有增加的亲和力的突变蛋白,并且如下进行稳定性筛选:i)降低的抗原浓度和/或ii)与未生物素化的靶物竞争和/或iii)在添加到靶物板前于65 $^{\circ}$ C或70 $^{\circ}$ C温育筛选上清液和/或iv)使用反向筛选形式,在用抗Strep标签抗体涂覆的微量滴定板上经由Strep标签捕捉突变蛋白,并且添加不同浓度的生物素化的靶物,并且经由Extravidin-HRP(Sigma Aldrich,St.Louis,MO)检测。

[0308] 实施例4:突变蛋白的表达

[0309] 在2YT-Amp培养基中在大肠杆菌中表达具有C端序列SAWSHPQFEK(SEQ ID NO:127;包括SA接头和Strep-tag®II,WSHPQFEK(SEQ ID NO:128))的独特突变蛋白以在表达后使用Streptactin亲和层析纯化突变蛋白,并且制备型大小排阻层析是适用的。

[0310] 实施例5:在基于ELISA的背景中测定的突变蛋白对可溶性铜绿假单胞菌铁载体的亲和力

[0311] 通过“溶液结合ELISA”测定突变蛋白的溶液结合,所述溶液结合ELISA的原理如下:将恒定浓度的测试突变蛋白与可变浓度的配体(Pvd I s,sa,aKG+/-Fe/Pvd II s,sa,aKG+/-Fe/Pvd III s,sa,aKG+/-Fe/Pch+/-Fe)一起温育1小时。在溶液中进行此预温育后,将突变蛋白/配体混合物的等分试样转移到经由中性亲合素固定化的生物素化的Pvd I s(+Fe)、Pvd II s(+Fe)、Pvd III s(+Fe)或Pch的ELISA板以测量游离突变蛋白的剩余浓度。经由定量ELISA设置测定游离(非配体结合)突变蛋白的浓度。

[0312] 详细地,于4 $^{\circ}$ C以在PBS中的5 μ g/ml的浓度用20 μ l中性亲合素涂覆适合于荧光测量的384孔板(Greiner FLUOTRAC™ 600,黑色平底,高结合)过夜。在清洗后,于室温用100 μ l含有0,1%Tween 20和2%BSA的封闭缓冲液(PBS-T/BSA)封闭经中性亲合素涂覆的孔1小时。再次清洗后,于室温添加1 μ g/mL浓度的封闭缓冲液中的20 μ l生物素化的绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白达1小时,并且除去过多的试剂。

[0313] 在溶液中将固定浓度的突变蛋白与不同浓度的配体(Pvd I s,sa,aKG+/-Fe/Pvd II s,sa,aKG+/-Fe/Pvd III s,sa,aKG+/-Fe/Pch+/-Fe)(使用合适的起始浓度,其以1:3比率在PBS-T/BSA中连续向下稀释到皮摩尔范围)一起温育。于室温温育1小时后,于RT将20 μ l反应混合物转移到其上固定化有生物素化的绿脓菌荧光素或绿脓菌螯铁蛋白的384孔板以捕捉未结合的(游离)突变蛋白达20分钟。为了允许将ELISA读出结果转化成绝对游离突变蛋白浓度,在PBS-T/BSA中制备含有不同浓度的突变蛋白的标准曲线,并且也在相同的ELISA板上温育20分钟。

[0314] 弃去残留的上清液,并且以PBS-T/BSA中的预先确定的最佳浓度添加20 μ l经HRP标记的抗hNGAL抗体,并且于RT温育1小时。已经通过用突变蛋白的混合物免疫兔获得抗hNGAL抗体,随后使用套盒(EZ-link Plus Activated Peroxidase,Thermo Scientific)根据制造商的用法说明将抗hNGAL抗体与HRP偶联以获得抗体-HRP缀合物。在清洗后,将20 μ l荧光

HRP底物 (QuantaBlu, Thermo) 添加到每孔, 并且允许反应进行15至60分钟。使用荧光微板阅读器 (Tecan或Molecular Devices) 读出板上的每孔的荧光强度。为了评估数据, 基于标准曲线结果计算游离的突变蛋白浓度 $c(\text{突变蛋白})_{\text{游离}}$, 并且相对于配体浓度 $c(\text{配体})$ 绘图。为了获得配体/突变蛋白复合物的形成被阻断50%的配体浓度 (IC50), 通过用单位点结合模型的非线性回归根据 $c(\text{突变蛋白})_{\text{游离}} = c(\text{突变蛋白})_{\text{tot}} / (1 + c(\text{配体}) / \text{IC50})$ 拟合曲线, 其中总示踪剂浓度 $c(\text{突变蛋白})_{\text{tot}}$ 和IC50值为自由参数。使用GraphPad Prism 4软件进行曲线拟合。

[0315] 表1A-D中汇总了所得的IC₅₀值。针对生物素化的且加载有铁的Pvd I琥珀酰基、Pvd II琥珀酰基和Pvd III琥珀酰基选择的突变蛋白分别结合相应Pvd组的所有亚型, 即针对生物素化的且加载有铁的Pvd I琥珀酰基选择的突变蛋白以相似的亲和力结合具有或没有复合铁离子的Pvd I琥珀酰基、-琥珀酸酰胺基、-α-酮戊二酰基, 针对生物素化的且加载有铁的Pvd II琥珀酰基选择的突变蛋白以相似的亲和力结合具有或没有复合铁离子的Pvd II琥珀酰基、-琥珀酸酰胺基、-α-酮戊二酰基, 并且针对生物素化的且加载有铁的Pvd III琥珀酰基选择的突变蛋白以相似的亲和力结合具有或没有复合铁离子的Pvd III琥珀酰基、-琥珀酸酰胺基、-α-酮戊二酰基。大多数选择的突变蛋白以相当的亲和力结合具有或没有复合铁离子的相应组的所有亚型。

[0316] 针对生物素化的非加载有铁的绿脓菌螯铁蛋白的选择导致优选结合非加载有铁的绿脓菌螯铁蛋白的脂笼蛋白突变蛋白, 如以二位数至三位数nM亲和力结合加载有铁的Pch而以弱亲和力结合或根本不结合非加载有铁的Pch的脂笼蛋白突变蛋白SEQ ID NO: 56和57, 和脂笼蛋白突变蛋白, 如优选结合加载铁的绿脓菌螯铁蛋白的SEQ ID NO: 55。

[0317] SEQ ID NO: 56的亲和力优化产生以改善的亲和力结合非加载有铁的Pch并且仍以无或弱亲和力结合加载有铁的Pch的脂笼蛋白突变蛋白, 而SEQ ID NO: 55的亲和力优化产生以超过75倍改善的亲和力结合非加载有铁的Pch, 而且还以单位数nM亲和力结合加载有铁的Pch的脂笼蛋白突变蛋白。

[0318] 如此, 通过脂笼蛋白突变蛋白选择和优化, 实现了仅四种不同突变蛋白足以结合具有和没有复合铁离子的铜绿假单胞菌铁载体的所有10种亚型 (Pvd I s、sa、αKG+/-Fe; Pvd II s、sa、αKG+/-Fe; Pvd III s、sa、αKG+/-Fe; Pch+/-Fe)。

[0319] 表1A: 突变蛋白对溶液中的铜绿假单胞菌铁载体绿脓菌荧光素I琥珀酰基、-琥珀酸酰胺基、-α-酮戊二酰基+/-Fe³⁺的结合

[0320]

	溶液结合ELISA					
	IC ₅₀ : nM					
	Pvd I s (+Fe)	Pvd I sa (+Fe)	Pvd I aKG (+Fe)	Pvd I s (-Fe)	Pvd I sa (-Fe)	Pvd I aKG (-Fe)
SEQ ID NO: 2	24	19	13	26	19	13

[0321]

SEQ ID NO: 4	97	43	91	57	28	50
SEQ ID NO: 5	97	49	73	57	32	42
SEQ ID NO: 6	44	30	37	48	31	36
SEQ ID NO: 7	173	126	59	290	129	53
SEQ ID NO: 8	2.38	1.33	2.15	2.3	0.98	1.8
SEQ ID NO: 9	3.3	1.37	2.4	3.7	1.6	2.9
SEQ ID NO: 10	3.4	1.1	2.87	3.8	0.92	2.9
SEQ ID NO: 11	2.97	1.9	2.57	4	2	3.1
SEQ ID NO: 12	6.8	4.7	6.4	6.9	4.8	5.6
SEQ ID NO: 13	0.5	0.27	0.37	0.36	0.2	0.24
SEQ ID NO: 14	2.4	1.7	3.1	2.4	1.1	2.2
SEQ ID NO: 15	1.1	0.59	1.2	0.86	0.42	0.69
SEQ ID NO: 16	1.3	0.84	1.6	1	0.63	0.83
SEQ ID NO: 18	5.3	2.2	3.9	2.8	1.8	2.5

[0322] 表1B:突变蛋白对溶液中的可溶性铜绿假单胞菌铁载体绿脓菌荧光素II琥珀酰基、-琥珀酸酰胺基、- α -酮戊二酰基+/-Fe³⁺的结合

[0323]

	溶液结合ELISA					
	IC ₅₀ : nM					
	Pvd II s (+ Fe)	Pvd II sa (+Fe)	Pvd II aKG (+Fe)	Pvd II s (- Fe)	Pvd II sa (-Fe)	Pvd II aKG (-Fe)
SEQ ID NO: 19	30	36	21	23	42	34
SEQ ID NO: 20	48	40	85	63	40	89
SEQ ID NO: 26	0.34	0.39	1.3	0.45	0.45	0.75
SEQ ID NO: 27	0.78	1.53	1.97	1.02	1.12	1.4
SEQ ID NO: 28	0.91	1.75	2.25	1.14	1.5	1.65
SEQ ID NO: 29	0.68	1.5	1.9	0.95	1.2	1.6
SEQ ID NO: 30	0.29	0.53	3	0.4	0.3	2.85
SEQ ID NO: 31	0.29	0.29	1.1	0.38	0.35	0.64
SEQ ID NO: 32	0.27	0.32	1.25	0.42	0.37	0.72
SEQ ID NO: 33	0.28	0.32	1.3	0.4	0.32	0.7
SEQ ID NO: 34	0.29	0.32	1.6	0.27	0.32	1.2
SEQ ID NO: 35	0.33	0.39	0.76	0.34	0.42	0.99
SEQ ID NO: 36	0.33	0.39	0.76	0.34	0.42	0.99
SEQ ID NO: 37	0.19	0.28	2.1	0.2	0.3	1.4

[0324] 表1C:突变蛋白对溶液中的铜绿假单胞菌铁载体绿脓菌荧光素III琥珀酰基、-琥

珀酸酰胺基、- α -酮戊二酰基+/-Fe³⁺的结合

[0325]

溶液结合ELISA

[0326]

	IC50 : nM					
	Pvd III s	Pvd III sa	Pvd III aKG	Pvd III s	Pvd III sa	Pvd III aKG
	(+ Fe)	(+Fe)	(+Fe)	(- Fe)	(-Fe)	(-Fe)
SEQ ID NO: 39	146	147	23	95	94	23
SEQ ID NO: 42	35	15	78	25	7.2	69
SEQ ID NO: 43	0.31	0.25	1.4	0.6	0.46	1.90
SEQ ID NO: 44	0.35	0.26	0.93	0.35	0.21	1.10
SEQ ID NO: 45	0.75	0.43	1.50	0.41	0.46	1.70
SEQ ID NO: 46	0.69	0.30	1.02	0.44	0.30	1.20
SEQ ID NO: 47	0.37	0.30	0.82	0.17	0.28	0.58
SEQ ID NO: 48	0.28	0.22	0.95	0.29	0.24	0.64
SEQ ID NO: 49	0.32	0.27	0.79	0.21	0.27	0.62
SEQ ID NO: 50	0.29	0.35	0.95	0.29	0.37	0.82
SEQ ID NO: 51	0.37	0.37	0.97	0.35	0.34	1.1
SEQ ID NO: 52	0.32	0.31	1	0.31	0.31	1
SEQ ID NO: 53	0.21	0.25	0.54	0.19	0.63	0.33

[0327] 表1D:突变蛋白对溶液中的铜绿假单胞菌铁载体绿脓菌螯铁蛋白+/-Fe³⁺的结合

[0328]

	溶液结合ELISA	
	IC50:nM	
	pch (+Fe)	pch (-Fe)
SEQ ID NO: 55	361	N/A
SEQ ID NO: 56	N/A	51
SEQ ID NO: 57	N/A	147
SEQ ID NO: 58	N/A	10
SEQ ID NO: 59	N/A	11
SEQ ID NO: 60	8.6	45
SEQ ID NO: 61	5.1	42
SEQ ID NO: 62	4.7	26
SEQ ID NO: 63	5.6	26

[0329] 对于高通量亲和力排序,然而以差异不大的配体浓度使用相同测定法。

[0330] 实施例6:Biacore中测定的突变蛋白结合铜绿假单胞菌铁载体的亲和力

[0331] 在基于表面等离子共振 (SPR) 的测定法中,使用Biacore T200仪器 (GE Healthcare) 测量突变蛋白对具有复合铁离子的绿脓菌荧光素I琥珀酰基、-琥珀酸酰胺基、- α -酮戊二酰基或者对具有复合铁离子的绿脓菌荧光素II琥珀酰基、-琥珀酸酰胺基、- α -酮戊二酰基或对具有复合铁离子的绿脓菌荧光素III琥珀酰基、-琥珀酸酰胺基、- α -酮戊二酰基的结合亲和力。应用适当过量的EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Thermo, Cat#21329) 于

室温将选择用于结合绿脓菌荧光素和阴性对照 (SEQ ID NO:64) 的突变蛋白生物素化2小时,然后是使用Zeba Spin Desalting Plate (Thermo, Cat#21329) 根据制造商的说明分离非起反应的生物素。

[0332] 在SPR亲和力测定法中,使用生物素捕捉套盒 (GE Healthcare) 在传感器芯片CAP上捕捉生物素化的突变蛋白和阴性对照:传感器芯片CAP预先固定化有ssDNA寡聚物。以2μl/分钟的流速应用未稀释的生物素捕捉试剂 (与互补的ss-DNA寡聚物缀合的链霉亲和素) 达300秒。随后,以5μl/分钟的流速应用1μg/ml至100μg/mL生物素化的突变蛋白或阴性对照300秒。仅用生物素捕捉试剂加载参照通道。

[0333] 为了测定结合亲和力,在HBS-EP+缓冲液 (GE Healthcare) 中制备范围为5-2000nM的浓度的相应Pvd代表 (Pvd I、II、III,包括琥珀酰基、琥珀酸酰胺基、-α-酮戊二酰基+Fe) 的4至5个稀释,并且应用到制备的芯片表面,应用30μl/分钟的流速,以120-180秒的样品接触时间和900-2400秒的解离时间使用单个循环或多个循环动力学方法。使用高浓度 (例如1200nM) 的相应Pvd确认对阴性对照SEQ ID NO:64的结合的缺乏。在配体固定化后,对于使用单一循环动力学分析,在监测解离前以上升次序连续应用Pvd的所有4-5个浓度。对于使用多循环动力学分析,应用Pvd的4个稀释,各自接着解离阶段。于25℃进行所有测量。通过注射6M Gua-HCl及0.25M NaOH,接着是用运行缓冲液的额外清洗和120秒的稳定期实现传感器芯片CAP表面的再生。用Biacore T200评估软件 (V 1.0) 评估数据。使用双重参照。使用1:1结合模型来拟合原始数据。

[0334] 表2A-C中汇总了用于选择脂笼蛋白突变蛋白的所得动力学常数。可以对每个Pvd组生成脂笼蛋白突变蛋白,其以亚nM至低的个位数nM范围结合相应Pvd组的所有亚型。然而,Pvd特异性脂笼蛋白突变蛋白不结合野生型hNGAL的天然配体Fe-肠菌素。

[0335] 表2A:Pvd I特异性脂笼蛋白突变蛋白对复合有Fe³⁺的Pvd I琥珀酰基、-琥珀酸酰胺基和-α-酮戊二酰基的动力学常数。

[0336]

	Pvd I s (+ Fe)			Pvd I sa (+Fe)			Pvd I k (+Fe)			Fe-肠菌素
SEQ ID	k _{on} [1/Ms]	k _{off} [1/s]	K _D [nM]	k _{on} [1/Ms]	k _{off} [1/s]	K _D [nM]	k _{on} [1/Ms]	k _{off} [1/s]	K _D [nM]	K _D [nM]
SEQ ID NO: 8	5.37E+04	1.79E-04	3.33	1.11E+05	1.20E-04	1.08	4.74E+04	2.35E-04	4.95	无 bdg.
SEQ ID NO: 9	3.31E+04	3.30E-04	9.97	8.02E+04	2.57E-04	3.20	3.80E+04	5.32E-04	14.03	无 bdg.
SEQ ID NO: 10	3.47E+04	4.78E-04	13.78	8.63E+04	3.04E-04	3.52	5.02E+04	6.31E-04	12.57	无 bdg.
SEQ ID NO: 11	2.84E+04	4.04E-04	14.22	6.78E+04	2.97E-04	4.40	3.48E+04	5.86E-04	16.84	无 bdg.
SEQ ID NO: 13	1.17E+05	6.15E-05	0.53	1.85E+05	4.24E-05	0.26	9.51E+04	8.37E-05	0.88	无 bdg.
SEQ ID NO: 18	3.56E+04	1.88E-04	5.28	5.43E+04	1.56E-04	2.67	3.14E+04	2.54E-04	8.10	无 bdg.

[0337] 表2B:Pvd II特异性脂笼蛋白突变蛋白对复合有Fe³⁺的Pvd II琥珀酰基、-琥珀酸酰胺基和-α-酮戊二酰基的动力学常数。

[0338]

	Pvd II s (+ Fe)			Pvd II sa (+Fe)			Pvd II k (+Fe)			Fe-肠菌素
SEQ ID	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]	K_D [nM]
SEQ ID NO: 32	1.15E+06	1.09E-03	0.94	1.37E+06	9.55E-04	0.7	1.09E+05	3.74E-04	3.44	无 bdg.
SEQ ID NO: 33	1.23E+06	1.25E-03	1.02	1.41E+06	1.04E-03	0.74	9.93E+04	4.16E-04	4.19	无 bdg.
SEQ ID NO: 35	1.31E+05	4.59E-05	0.35	2.48E+05	4.58E-05	0.18	4.35E+04	1.49E-04	3.42	无 bdg.
SEQ ID NO: 36	1.10E+05	4.30E-05	0.38	1.38E+05	3.67E-05	0.27	2.86E+04	5.62E-05	1.97	无 bdg.

[0339] 表2C:Pvd III特异性脂笼蛋白突变蛋白对复合有 Fe^{3+} 的Pvd III琥珀酰基、-琥珀酸酰胺基和- α -酮戊二酰基的动力学常数。

[0340]

	Pvd III s (+ Fe)			Pvd III sa (+Fe)			Pvd III k (+Fe)			Fe-肠菌素
SEQ ID	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]	K_D [nM]
SEQ ID NO: 43	7.05E+04	1.58E-04	2.24	3.52E+04	1.07E-04	3.04	5.73E+04	3.03E-04	5.29	未检测
SEQ ID NO: 44	5.62E+04	1.42E-04	2.53	3.03E+04	8.90E-05	2.94	4.82E+04	2.71E-04	5.64	未检测
SEQ ID NO: 45	5.90E+04	1.59E-04	2.70	3.27E+04	8.91E-05	3.03	4.73E+04	3.30E-04	8.99	未检测
SEQ ID NO: 46	8.32E+04	1.68E-04	2.00	4.38E+04	8.90E-05	1.58	7.67E+04	2.41E-04	3.15	未检测
SEQ ID NO: 47	7.89E+04	7.91E-05	1.00	1.28E+05	2.52E-05	0.20	2.92E+04	2.62E-04	8.97	未检测
SEQ ID NO: 48	6.70E+04	1.06E-04	1.58	1.48E+05	9.51E-05	0.64	2.72E+04	1.58E-04	5.81	未检测
SEQ ID NO: 49	6.88E+04	1.05E-04	1.52	1.34E+05	1.12E-04	0.84	2.81E+04	4.29E-05	1.53	未检测
SEQ ID NO: 53	5.10E+04	4.19E-05	0.82	6.73E+04	3.90E-05	0.58	3.88E+04	1.40E-04	3.60	无 bdg.

[0341] 另外,使用上文描述的测定法通过对固定化突变蛋白应用高浓度($\geq 1\mu M$)的下述分析物确认对不属相应绿脓菌荧光素亚组(I、II、III)的各种铁载体及对MMP-9的结合的缺乏:Fe-肠菌素、去铁胺、绿脓菌螯铁蛋白、来自相应的其它亚组的绿脓菌荧光素、MMP-9原形式(proform)和活化的MMP-9。表3中提供了此分析的概述。

[0342] 为了测定突变蛋白SEQ ID NO:62与Pch+Fe的相互作用的动力学常数和所得的 K_D ,使用标准胺化学将突变蛋白或阴性对照SEQ ID NO:64在CM5芯片的表面上固定化。使用EDC和NHS活化芯片的表面。随后,以 $10\mu l$ /分钟的流速应用 $10mM$ 乙酸盐 $pH 4.0$ 中的 $5\mu g/mL$ 突变蛋白或阴性对照溶液,直到实现约2000RU的高固定化水平。用乙醇胺淬灭残留的活化基团。在乙醇胺后用EDC/NHS处理参照通道(空白固定化)。

[0343] 为了测定亲和力,在HBS-P+缓冲液中制备绿脓菌螯铁蛋白(+Fe)的5个稀释,并且应用到准备好的芯片表面。以接触时间180秒,解离时间1200-1800秒并且应用 $30\mu l$ /分钟的流速进行结合测定法。于 $25^\circ C$ 进行测量。通过三次连续注射 $10mM$ Gly-HCl $pH 1.5$ (120秒),接着是用运行缓冲液的额外清洗和稳定期实现固定化突变蛋白表面的再生。用Biacore T200Evaluation软件(V1.0)评估数据。使用双重参照。使用1:1结合模型拟合原始数据。

[0344] 表2D中显示了SEQ ID NO:62所得的动力学常数。

[0345] 使用相同测定法,通过对固定化突变蛋白SEQ ID NO:62应用高浓度($\geq 1\mu M$)下述分析物确认对不同于绿脓菌螯铁蛋白的铁载体及对MMP-9的结合的缺乏:Fe-肠菌素、去铁胺、绿脓菌荧光素、MMP-9原形式和活化的MMP-9。表3中显示了结果的概述。

[0346] 表2D:绿脓菌螯铁蛋白特异性脂笼蛋白突变蛋白SEQ ID NO:62对复合有 Fe^{3+} 的绿

脓菌螯铁蛋白的动力学常数。

[0347]		pch (+Fe)		
		k_{on}	k_{off}	K_D
	SEQ ID	[1/Ms]	[1/s]	[nM]
	SEQ ID NO: 62	2,25E+06	6,43E-04	0,29

[0348] 表3:脂笼蛋白突变蛋白结合Pvd I、Pvd II、Pvd III或绿脓菌螯铁蛋白的特异性。

[0349]

	Pvd I s (+Fe)	Pvd II s (+Fe)	Pvd III s (+Fe)	pch (+Fe)	肠菌素 (+Fe)	去铁胺	原形式 MMP-9	活化的 MMP-9
SEQ ID NO: 16	+	-	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 36	-	+	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 53	-	-	+	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 62	-	-	-	+	-	-	-	-
SEQ ID NO: 64	-	-	-	-	+	-	-	-

[0350] 实施例7:结合铜绿假单胞菌铁载体的突变蛋白的功能性测试;抑制铁摄取

[0351] 为了测定活细菌中的功能性铁摄取抑制,一定剂量范围浓度的结合铜绿假单胞菌铁载体的脂笼蛋白突变蛋白与Tris.HCl 50mM pH 8.0缓冲液中的100nM加载有放射性铁的铁载体温育1小时,之后与96孔板中于595nm终浓度为OD=1的细菌一起温育30分钟。随后,将细菌用细胞收获器过滤通过与5%的聚乙烯亚胺溶液预温育的96孔板GF/B滤器,并且用Tris缓冲液清洗3次。在过滤和干燥后,在计数前在每个滤器中添加30μl闪烁体混合物。对于铁加载绿脓菌荧光素,将铁载体在200μM最终溶液中以4比1的绿脓菌荧光素和铁的比率与Tris缓冲液中的 $^{55}\text{Fe-Cl}_3$ 一起温育15分钟。对于用放射性铁加载绿脓菌螯铁蛋白,将HCl 0.5N中的40μl 0.25mM的 $^{55}\text{FeCl}_3$ 溶液添加到1mM的绿脓菌螯铁蛋白的甲醇溶液。在15分钟温育时间后,添加940μl Tris HCl 50mM pH 8.0以获得具有绿脓菌螯铁蛋白和铁之间2比1比率的20μM $^{55}\text{Fe-Pch}$ 溶液。如下制备细菌:将接种有分离的克隆的Mueller Hinton培养基中的10ml过夜培养物离心,并且在25ml琥珀酸盐培养基中重悬清洗过的团粒,并且在摇动下温育2小时。平行地,给20ml Mueller Hinton培养基接种5ml过夜培养物,并且在摇动下温育2小时以用作背景铁摄取水平。然后,离心25ml细菌培养物,并且用相应的培养基清洗,然后将团粒在Tris.HCl 50mM pH8.0缓冲液中重悬,并且测量595nm的OD以在测定法中具有OD=1的终浓度。

[0352] 对每个浓度点计算掺入百分比,并且用内部软件计算抑制。对于此计算,铁摄取的最大水平基于没有任何脂笼蛋白突变蛋白的基本琥珀酸盐培养基中获得的数值,并且在

表达铁载体受体的富Mueller Hinton培养基中获得背景数值。

[0353] 表4:脂笼蛋白突变蛋白阻断铜绿假单胞菌的铁摄取,如对脂笼蛋白突变蛋白SEQ ID NO:16、37、53和62例示性显示的。

[0354]

SEQ ID	铁摄取IC ₅₀ : nM			
	Pvd I s	Pvd I sa	Pvd I aKG	
SEQ ID NO: 16	121	123	183	
	Pvd II s	Pvd II sa	Pvd II aKG	
SEQ ID NO: 37	118	107	51	
	Pvd III s	Pvd III sa	Pvd III aKG	
SEQ ID NO: 53	74	32	8	

[0355]

				Pch
SEQ ID NO: 62				54

[0356] 实施例8:结合铜绿假单胞菌铁载体的突变蛋白的功能性测试;生长抑制

[0357] 通过在具有透明底部的黑色96孔板中将补充有痕量元素溶液和0.1mg/ml BSA的经Chelex处理的琥珀酸盐培养基中的结合铜绿假单胞菌铁载体的突变蛋白与在595nm稀释为0.05的最终OD的MS细菌培养物一起温育测定细菌生长抑制。于37℃将板温育过夜,每20分钟摇动,并且在来自Thermo Labsystem的IEMS阅读器MF中于595nm读出OD。生长抑制在图4A中对Pvd I菌株和Pvd I特异性突变蛋白SEQ ID NO:16,在图4B中对Pvd II菌株和Pvd II特异性突变蛋白SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:36,在图4C中对Pvd III菌株和Pvd III特异性突变蛋白SEQ ID NO:53以及在图4D中对依赖绿脓菌螯铁蛋白摄取铁以生长的Pvd I敲除(Δ pvdA)菌株和绿脓菌螯铁蛋白特异性突变蛋白SEQ ID NO:62例示性显示。对照是没有脂笼蛋白突变蛋白情况下的细菌生长。

[0358] 实施例9:突变蛋白的稳定性评估

[0359] 为测定熔解温度作为总体稳定性的一般指示,于1℃/分钟使用毛细管nanoDSC仪(CSC 6300,TA Instruments)扫描PBS(Gibco)中蛋白质浓度1mg/ml的铁载体特异性突变蛋白(SEQ ID NO:13-18;26,31-36;47-53;58-62)(25-100℃)。使用整合的Nano Analyze软件从显示的热分析图计算熔解温度(T_m)。

[0360] 下文表5A-D中列出了脂笼蛋白突变蛋白(SEQ ID NO:13-18;26,31-36;47-53;58-62)的所得熔解温度以及熔解的开始。对于所有Pvd组以及对于具有70℃的范围中的T_m的pch脂笼蛋白突变蛋白,可以选择范围为68至74℃的针对每种Pvd类型和pch的最佳脂笼蛋白突变蛋白,指示良好的分子稳定性。

[0361] 表5A:如通过Pvd I特异性脂笼蛋白突变蛋白的nanoDSC测定的T_m和熔解的开始

[0362]		nanoDSC	
	SEQ ID	Tm °C	开始
	SEQ ID NO: 13	59	51
	SEQ ID NO: 14	61	51
	SEQ ID NO: 15	68	59

[0363]	SEQ ID NO: 16	69	60
	SEQ ID NO: 17	61	53
	SEQ ID NO: 18	61	54

[0364] 表5B: 如通过Pvd II特异性脂笼蛋白突变蛋白的nanoDSC测定的Tm和熔解开始

[0365]		nanoDSC	
	SEQ ID	Tm °C	开始
	SEQ ID NO: 26	65	58
	SEQ ID NO: 31	67	60
	SEQ ID NO: 32	64	56
	SEQ ID NO: 33	67	61
	SEQ ID NO: 34	67	56
	SEQ ID NO: 35	71	63
	SEQ ID NO: 36	70	61

[0366] 表5C: 如通过Pvd III特异性脂笼蛋白突变蛋白的nanoDSC测定的Tm和熔解开始

[0367]		nanoDSC	
	SEQ ID	Tm °C	开始
	SEQ ID NO: 47	62	53
	SEQ ID NO: 48	64	55
	SEQ ID NO: 49	59	50
	SEQ ID NO: 50	61	52
	SEQ ID NO: 51	62	53
	SEQ ID NO: 52	59	49
	SEQ ID NO: 53	68	59

[0368] 表5D: 如通过pch特异性脂笼蛋白突变蛋白的nanoDSC测定的Tm和熔解开始

[0369]	nanoDSC	
	SEQ ID	Tm °C 开始
	SEQ ID NO: 58	63 51
	SEQ ID NO: 59	60 54
	SEQ ID NO: 60	68 56
	SEQ ID NO: 61	69 63
	SEQ ID NO: 62	74 63

[0370] 为了评估贮存和冷冻/融化稳定性,将PBS中浓度1mg/ml的突变蛋白于37℃温育1周或者进行3个冷冻/融化循环。在定量ELISA背景中测量活性突变蛋白。在分析型大小排阻层析中测量单体蛋白质。表6中显示了SEQ ID NO:16、36、53、62的例示性数据。

[0371] 为了测定蛋白质活性,应用下述ELISA:于4℃用PBS中5μg/ml浓度的20μL中性亲合素(Thermo Scientific)涂覆适合于荧光测量的384孔板(Greiner FLUOTRAC™ 600,黑色平底,高结合)过夜。在清洗后,用100μl封闭缓冲液(含有0.1%v/v Tween-20的PBS中的2%w/v BSA)将经中性亲合素涂覆的孔封闭1小时。再次清洗后,添加封闭缓冲液中的1μg/ml浓度的20μl生物素化的且加载有铁的绿脓菌荧光素I琥珀酰基、绿脓菌荧光素II琥珀酰基、绿脓菌荧光素III琥珀酰基或生物素化的绿脓菌螯铁蛋白。清洗板并将20μl适当稀释的蛋白质标准品,非应激(unstressed)参照样品或应激(stressed)样品转移到ELISA板,并温育。为了定量板结合的蛋白质,清洗ELISA板,弃去残留的上清液,并且在封闭缓冲液中以预先确定的最佳浓度添加20μl经HRP标记的抗hNGAL抗体,并温育。在清洗后,将20μl发荧光的HRP底物(QuantaBlu,Pierce)添加到每孔,并且允许反应进行20-30分钟。使用荧光微板阅读器(Tecan)阅读板上的每孔的荧光强度。

[0372] 除了另有叙述,所有温育步骤于室温进行1小时,并且在每个温育步骤后,使用Biotek ELx405Select CW清洗器用100μl PBS-T缓冲液(PBS,0.05%Tween 20)将板清洗5次。

[0373] 对于上文描述的ELISA,制备校正曲线,包括通常范围为0.008-500ng/mL的11个稀释,并且对每个样品制备校正曲线的线性范围内的三个不同的独立稀释。使用任选补充有1%人或鼠血浆的封闭缓冲液进行稀释。

[0374] 使用4参数逻辑(4PL)非线性回归模型拟合校正曲线,并且用于计算测试样品的活性蛋白浓度。相对于在相同浓度并且在相同基质中贮存的非应激样品参照测定的活性蛋白浓度。

[0375] 以0.3mL/分钟的流速使用PBS(Gibco)作为洗脱剂,在具有成排的两个Superdex 75 5/150GL柱(GE Healthcare)的Agilent HPLC系统上进行分析型大小排阻层析。

[0376] 为了评估血浆中的贮存稳定性,于37℃在人、小鼠和大鼠血浆中温育0.5mg/ml浓度的突变蛋白1周。在如描述的定量ELISA背景中测量活性突变蛋白。

[0377] 证明了所有测试的脂笼蛋白突变蛋白在所有测试条件下是稳定的。

[0378] 表6:在3个冷冻/融化循环(F/T)后;在PBS中于37℃贮存1周和在人(hu)、小鼠(mu)或大鼠血浆中贮存1周的稳定性,通过qELISA中的活性回收和分析型SEC中的单体含量评估:在qELISA中稳定=100+/-15%;在aSEC中稳定=100+/-5%(与非应激参照样品相比单

体峰面积的回收);对于包括参照的所有样品,已经检测到100面积百分比的单体含量。

[0379]

突变蛋白	铁载体	3xF/T, -20°C 1mg/ml		1 周 PBS, 37°C, 1mg/ml		1 周 hu 血浆, 37°C	1 周 mu 血浆, 37°C	1周大鼠 血浆, 37°C
		qELISA 中的活性%回收	aSEA 中的%单体	qELISA 中的活性%回收	aSEA 中的%单体	qELISA中的活性%回收		
SEQ ID NO: 16	Pvd I	102	98	86	98	86	100	100
SEQ ID NO: 36	Pvd II	99	101	104	98	93	91	110
SEQ ID NO: 53	Pvd III	98	99	107	102	92	83	101
SEQ ID NO: 62	pch	107	100	95	104	97	102	95

[0380] 实施例10:小鼠模型中的脂笼蛋白突变蛋白的体内效力

[0381] 研究静脉内(i.v.)施用后的SEQ ID NO:19在小鼠的铜绿假单胞菌诱导的肺感染中的预防效果。

[0382] 感染前1小时和感染时施用SEQ ID NO:19。在感染后24小时评估肺细菌载量。

[0383] 本研究中使用的菌株是铜绿假单胞菌(ATCC27853)。从于-80°C贮存于PBS/15%甘油中的铜绿假单胞菌开始,于37°C在摇动下在Mueller-Hinton培养基中进行过夜培养,并且接着进行额外的传代培养(100μl过夜培养物+100ml MHB),直到对数生长期结束。将培养物清洗两次,并且在磷酸盐缓冲液盐水中重悬,之后以1E+09CFU/ml冷冻。对于每个实验,融化新的管形瓶,并且通过活菌计数确认接种物。

[0384] 在使用前允许购自Janvier laboratories,(Route des chênes secs,53940Le Genest Saint Ile,France)的7至8周龄雄性Swiss小鼠(5只动物/组)驯化至少5天。于22±2°C的温度以40-70%的相对湿度和12-15空气新鲜交换/小时维持动物。光周期12/12小时:光照7a.m.至7p.m.(正常周期)。连续记录温度和相对湿度偏差。每笼容纳5只动物,并且允许它们任意获得水和标准饮食(A04C标准饮食(SAFE))。所有实验在得到Sanofi R&D(CEPAL)的伦理委员会批准下进行。

[0385] 通过用50μl NaCl 0.9%中的1.E+07CFU/小鼠的铜绿假单胞菌鼻内攻击雄性Swiss小鼠诱导肺感染。

[0386] 在感染前1小时和感染时通过i.v.推注施用200、400、1000或2000μg/小鼠浓度的SEQ ID NO:19。

[0387] 感染后24小时,对动物实施安乐死,并且测定来自肺匀浆物的细菌计数,并且以log10CFU/ml作为均值±sem表示。

[0388] 使用SAS v9.2进行统计学分析.Excel软件2003用于图呈现。SEQ ID NO:19剂量与

媒介物的比较用单因素方差分析,接着是Dunnett检验评估(ZAR J.H.,《Biostatistical Analysis》,Prentice Hall International Editions,4ème édition,1999.;C.W.Dunnett,“A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control”,J.Amer.Statist.Assoc.,50 (1955),pp.1096-1121,1955)。

[0389] 在铜绿假单胞菌诱导的小鼠肺感染模型中,在细菌攻击前1小时和当时施用SEQ ID NO:19,并且SEQ ID NO:19以剂量依赖性方式阻止小鼠中的感染形成。从200 μ g/小鼠开始,对SEQ ID NO:19观察到显著的预防效果,最大效果在2000 μ g/小鼠。

[0390] 实施例11:结晶

[0391] 为测定与Pvd-Fe复合的SEQ ID NO:31蛋白质的三维结构,应用下述方法。

[0392] 在pET-24a质粒中克隆图6中描绘的蛋白质序列,并且以有N端标签的6His-TEV蛋白酶识别位点构建体表达。

[0393] 使用质粒来转化BL21 (DE3) Star大肠杆菌细胞,并且将所得的克隆在Overnight Express Instant TB培养基(Novagen)中接种,并且于18 $^{\circ}$ C以200RPM搅拌温育47小时后在最终OD₆₀₀ 4.7时收获细胞。在含有500mM NaCl、10mM咪唑、1mM MgCl₂、1mM TCEP、5%甘油和20mM Tris pH7.4的缓冲液中重悬细胞团粒,并且通过标准超声处理方法裂解该细胞团粒。通过低速度离心使所得的提取物澄清,并且将上清液过滤通过22nm膜,之后加载到用100mM NaCl、10mM咪唑、100mM HEPES pH 8缓冲液预先平衡的Ni NTA (Qiagen) 5ml柱。通过咪唑10mM至300mM的线性梯度洗脱蛋白质,并且进一步过夜透析到100mM NaCl、10mM咪唑、100mM HEPES pH 8缓冲液。将蛋白质浓缩到20mg/ml,并且加载到凝胶过滤Superdex 75柱(GE)。在存在TEV蛋白酶(1/50比率)的情况下将所得的蛋白质过夜透析到100mM NaCl、10mM HEPES pH 8缓冲液以除去6His N-端标签,接着进行如上文描述的负Ni NTA纯化步骤以分离切割的蛋白质。将最终的蛋白质在100mM NaCl,50mM HEPES pH 7.5中浓缩到12mg/ml,等分取样,在液氮中速冻,并且于-80 $^{\circ}$ C贮存以进一步使用。

[0394] 对于结晶,将蛋白质与10x倍高的摩尔浓度的Pvd-Fe一起温育过夜,并且铺板以在SBS形式板中进行结晶筛选,其中在蒸汽扩散坐滴形式实验中于20 $^{\circ}$ C和4 $^{\circ}$ C混合100nL蛋白质液滴与100nL结晶筛选溶液。检出许多结晶命中,并且进一步优化结晶条件以获得完全衍射x-射线质量晶体。

[0395] 使用同步加速器x-射线源评估晶体衍射质量,并且在20%PEG3350和0.2M LiSO₄条件下于20 $^{\circ}$ C获得最佳衍射晶体。通过将PEG3350浓度提高到35%低温保护最佳晶体,然后在液氮中速冻,并且在100K温度收集1.8 $\text{\AA}$ 数据集。

[0396] 通过MOSFLM处理X-射线数据,并且通过使用pdb 1LKE作为搜索工具的分子替换方法测定蛋白质结构,并且将结构模型进一步精修到P41212中的R自由=0.233-R=0.200质量,每个不对称单元具有2个三重蛋白质复合物。

[0397] 蛋白质结构呈现具有与不对称单元中存在的两个突变蛋白蛋白质结合的Pvd-Fe的经典脂笼蛋白支架,图7。图8中分析并呈现了参与Pvd-Fe结合的氨基酸残基。图9中鉴定并呈现了直接结合Fe的Pvd的氧。

[0398] 本发明涉及对绿脓菌荧光素I、II、III型或绿脓菌螯铁蛋白具有结合特异性的多肽,其中多肽包含以可检出的亲和力结合绿脓菌荧光素I、II、III型或绿脓菌螯铁蛋白的hNGAL突变蛋白。

[0399] 在一个实施方案中,hNGAL突变蛋白在与成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的位置28、34、36、39-42、44-47、49、52、54-55、65、68、70、72-75、77、79-81、87、96、100、103、106、108、123、125、127、132、134、141和145对应的一个或多个位置处包含突变氨基酸残基。

[0400] 在另一个实施方案中,所述突变蛋白能够以约20nM以下的K_D结合与铁复合的绿脓菌荧光素I型,例如在通过基本上在实施例6中描述的测定法中的Biacore T200仪器测量时。

[0401] 在另一个实施方案中,所述hNGAL突变蛋白能够以由约200nM以下的IC₅₀值测量的亲和力结合具有和没有复合铁的PvdI型琥珀酰基、PvdI型琥珀酸酰胺基和PvdI型α-酮戊二酰基,在基本上在实施例5中描述的ELISA测定法中测量时。

[0402] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白能够在基本上在实施例7中描述的竞争ELISA形式中以约150nM以下的IC₅₀值抑制由绿脓菌荧光素I型介导的铁摄取。

[0403] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白能够在基本上在实施例8中描述的测定法中抑制Pvd I菌株的细菌生长。

[0404] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白在与成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的位置28、36、39-41、46、49、52、54-55、59、65、68、70、72-75、77、79-81、87、96、100、103、106、125、127、132、134和136对应的一个或多个位置处包含突变氨基酸残基。

[0405] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含至少一种下述突变氨基酸残基:Leu 36→Asn、Thr、Val、Trp或Phe;Ala 40→Gly、Asn、Thr或Phe;Ile 41→Arg、Ala、Thr、Phe或Trp;Gln 49→Ile、Leu、Val、Ala或Pro;Tyr 52→Met、Trp或Pro;Ser 68→Asp、Val或Glu;Leu 70→Gln、Trp、Asp或Thr;Arg 72→Trp、Ala、Ser、Leu、Pro或Glu;Lys 73→Asp、Leu、Ala、Glu或Asn;Asp 77→Arg、Leu、Tyr、Ser、Gln、Thr、Ile或Asn;Trp 79→Gln、Asp、Ser、Arg、Met或Glu;Arg 81→Gln、Gly、Ile、Glu、His或Asp;Asn 96→His、Ile、Gly、Tyr或Asp;Tyr 100→Lys、Glu、Asn、Ser、Phe或Tyr;Leu 103→Lys、Pro、Gln、His、Asp、Tyr、Glu、Trp或Asn;Tyr 106→His、Gln或Phe;Lys 125→Arg、Ser、Trp、Tyr、Val或Gly;Ser 127→Trp、Asn、Ala、Thr、Tyr、His、Ile、Val或Asp;Tyr 132→Trp、Asn、Gly或Lys;和Lys 134→Asn、His、Trp、Gly、Gln或Asp。

[0406] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含下述取代:Gln 28→His;Lys 46→Glu;Thr 54→Val或Ala;Ile 55→Val;Lys 59→Arg;Asn 65→Asp或Gln;Ile 80→Thr;Cys 87→Ser或Asn;和Thr 136→Ala。

[0407] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白在成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的序列位置28、36、39-41、46、49、52、54-55、59、65、68、70、72-75、77、79-81、87、96、100、103、106、125、127、132、134和136处包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个突变氨基酸残基。

[0408] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含下组氨基酸取代之一:

[0409] Gln 28→His;Leu 36→Asn;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Gln 49→Ile;Tyr 52→Met;Ser 68→Val;Leu 70→Gln;Arg 72→Trp;Lys 73→Asp;Asp 77→Leu;Trp 79→Gln;Arg 81→Gln;Cys 87→Ser;Asn 96→His;Tyr 100→Lys;Leu 103→His;Tyr 106→His;

Lys 125→Arg;Ser 127→Trp;Tyr 132→Trp;Lys 134→Asp;

[0410] Gln 28→His;Leu 36→Thr;Ala 40→Gly;Ile 41→Phe;Gln 49→Leu;Tyr 52→Trp;Leu 70→Trp;Arg 72→Ala;Lys 73→Leu;Asp 77→Tyr;Trp 79→Asp;Arg 81→Gly;Cys 87→Ser;Asn 96→Ile;Tyr 100→Glu;Leu 103→His;Tyr 106→Gln;Lys 125→Trp;Ser 127→Asn;Tyr 132→Asn;Lys 134→Gln;

[0411] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Asn;Leu 103→Lys;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Ala;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0412] Gln 28→His;Leu 36→Phe;Ala 40→Asn;Ile 41→Arg;Gln 49→Pro;Tyr 52→Met;Ser 68→Asp;Leu 70→Thr;Arg 72→Glu;Lys 73→Ala;Asp 77→Arg;Trp 79→Arg;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Tyr;Tyr 100→Lys;Leu 103→Pro;Tyr 106→Phe;Lys 125→Ser;Ser 127→Thr;Tyr 132→Trp;Lys 134→Gly;

[0413] Gln 28→His;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Gln 49→Val;Tyr 52→Met;Ser 68→Val;Leu 70→Asp;Arg 72→Glu;Lys 73→Leu;Asp 77→Arg;Trp 79→Met;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Asp;Tyr 100→Phe;Leu 103→Trp;Tyr 106→Gln;Lys 125→Gly;Ser 127→Tyr;Tyr 132→Trp;Lys 134→His;

[0414] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Phe;Ile 41→Phe;Gln 49→Ala;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Trp;Arg 72→Leu;Lys 73→Asn;Asp 77→Gln;Trp 79→Glu;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Asn 96→Tyr;Leu 103→Tyr;Tyr 106→His;Lys 125→Val;Ser 127→His;Tyr 132→Lys;Lys 134→Trp;

[0415] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Ile 80→Thr;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Ser;Leu 103→Gln;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Ile;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0416] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Asp;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Asn;Leu 103→Asp;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Val;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0417] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Asp 77→Thr;Trp 79→Ser;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Asp;Tyr 100→Asn;Leu 103→Glu;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Asp;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0418] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Asp;Asp 77→Val;Trp 79→Ser;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Asn;Leu 103→Asn;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Val;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0419] Gln 28→His;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Gln 49→Leu;Tyr 52→Met;Ser 68→Val;Leu 70→Asp;Arg 72→Glu;Lys 73→Leu;Asp 77→Arg;Trp 79→Met;Arg 81→Glu;

Cys 87→Ser;Asn 96→Asp;Tyr 100→Ser;Leu 103→Trp;Tyr 106→Gln;Lys 125→Gly;Ser 127→Tyr;Tyr 132→Trp;Lys 134→His;

[0420] Gln 28→His;Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Thr 54→Val;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Ile 80→Thr;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Ser;Leu 103→Gln;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Thr;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;

[0421] Gln 28→His;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Lys 46→Glu;Gln 49→Leu;Tyr 52→Met;Thr 54→Ala;Ile 55→Val;Lys 59→Arg;Ser 68→Val;Leu 70→Asp;Arg 72→Glu;Lys 73→Leu;Lys 74→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Arg;Trp 79→Met;Ile 80→Thr;Arg 81→Glu;Ser 87→Asn;Asn 96→Asp;Tyr 100→Ser;Leu 103→Trp;Tyr 106→Gln;Lys 125→Gly;Ser 127→Tyr;Tyr 132→Trp;Lys 134→His;

[0422] Leu 36→Trp;Asn 39→Asp;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Thr 54→Val;Asn 65→Asp;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Ile 80→Thr;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Ser;Leu 103→Gln;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Thr;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;Thr 136→Ala;

[0423] Leu 36→Trp;Ala 40→Thr;Ile 41→Ala;Gln 49→Pro;Tyr 52→Pro;Thr 54→Val;Asn 65→Asp;Ser 68→Asp;Leu 70→Gln;Arg 72→Ser;Lys 73→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Ser;Trp 79→Ser;Ile 80→Thr;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Ser;Leu 103→Gln;Tyr 106→His;Lys 125→Tyr;Ser 127→Thr;Tyr 132→Gly;Lys 134→Asn;Thr 136→Ala;

[0424] Gln 28→His;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Lys 46→Glu;Gln 49→Leu;Tyr 52→Met;Thr 54→Ala;Ile 55→Val;Lys 59→Arg;Asn 65→Asp;Ser 68→Val;Leu 70→Asp;Arg 72→Glu;Lys 73→Leu;Lys 74→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Arg;Trp 79→Met;Ile 80→Thr;Arg 81→Glu;Ser 87→Asn;Asn 96→Asp;Tyr 100→Ser;Leu 103→Trp;Tyr 106→Gln;Lys 125→Gly;Ser 127→Tyr;Tyr 132→Trp;Lys 134→His;或

[0425] Gln 28→His;Ala 40→Gly;Ile 41→Trp;Lys 46→Glu;Gln 49→Leu;Tyr 52→Met;Thr 54→Ala;Ile 55→Val;Lys 59→Arg;Asn 65→Gln;Ser 68→Val;Leu 70→Asp;Arg 72→Glu;Lys 73→Leu;Lys 74→Glu;Lys 75→Glu;Asp 77→Arg;Trp 79→Met;Ile 80→Thr;Arg 81→Glu;Ser 87→Asn;Asn 96→Asp;Tyr 100→Ser;Leu 103→Trp;Tyr 106→Gln;Lys 125→Gly;Ser 127→Tyr;Tyr 132→Trp;Lys 134→His。

[0426] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白包含选自SEQ ID NO:2-18的氨基酸序列或其片段或变体。

[0427] 在另一个实施方案中,所述突变蛋白能够以约20nM以下的K_d结合与铁复合的绿脓菌荧光素II型,例如在通过基本上在实施例6中描述的测定法中的Biacore T200仪器测量时。

[0428] 在另一个实施方案中,所述hNGAL突变蛋白能够以由约200nM以下的IC₅₀值测量的亲和力结合具有和没有复合铁的PvdII型琥珀酰基、PvdII型琥珀酸酰胺基和PvdII型α-酮

戊二酰基,在基本上在实施例5中描述的ELISA测定法中测量时。

[0429] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白能够在基本上在实施例7中描述的竞争ELISA形式中以约150nM以下的IC50值抑制由绿脓菌荧光素II型介导的铁摄取。

[0430] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白能够在基本上在实施例8中描述的测定法中抑制Pvd II菌株的细菌生长。

[0431] 在另一个实施方案中,所述hNGAL突变蛋白能够在基本上在实施例9中描述的测定法中抑制表达绿脓菌荧光素II型的铜绿假单胞菌菌株的生长。

[0432] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白在与成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的位置28、36、40-41、49、52、54、65、68、70、72-75、77、79、81、87、96、100、103、106、125、127、132和134对应的一个或多个位置处包含突变氨基酸残基。

[0433] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含至少一种下述突变氨基酸残基:Leu 36→Asn、Ile或Val;Ala 40→Glu、Gly、Asn、Thr或His;Ile 41→Arg、Val或Thr;Gln 49→Gly、Ala或Pro;Tyr 52→Asn、Gly、Trp或Pro;Ser 68→Asp、Arg或Glu;Leu 70→Arg或Trp;Arg 72→His、Ile、Ala、Ser或Gly;Lys 73→Asn、Met、Pro、Phe、Gln或Arg;Asp 77→His、Ile、Met、Lys、Gly或Asn;Trp 79→Ser、Tyr、Ala、Asp、Phe或Trp;Arg 81→Glu、Ser、Tyr或Asp;Asn 96→Met、Ile、Arg、Asp、Lys、Asn或Ala;Tyr 100→Lys、Glu、Asn、Ser、Phe或Tyr;Leu 103→Thr、Ile、Gln、Gly、Met、His、Trp或Val;Tyr 106→Met、Gln、Ala、Ile、Asn、Gly、Met或Phe;Lys 125→Ala、Ile或Asn;Ser 127→Lys、Arg、Ser、Met、Asp或Asn;Tyr 132→Met、Phe、Asn、Ala、Ile、Gly或Val;和Lys 134→Trp或Tyr。

[0434] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含下述取代:Gln 28→His;Thr 54→Ala;Asn 65→Asp或Gln和Cys 87→Ser。

[0435] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白在成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的序列位置28、36、40-41、49、52、54、65、68、70、72-75、77、79、81、87、96、100、103、106、125、127、132和134处包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个突变氨基酸残基。

[0436] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白与天然野生型hNGAL的线性多肽序列相比包含下组氨基酸取代之一:

[0437] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Glu;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Ser;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Tyr 100→Asn;Leu 103→Gln;Tyr 106→Met;Ser 127→Lys;Tyr 132→Gly;Lys 134→Trp;

[0438] Gln 28→His;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Met;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Ile;Tyr 100→Asn;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Met;Lys 134→Trp;

[0439] Gln 28→His;Leu 36→Ile;Ala 40→Thr;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→Ala;Lys 73→Pro;Asp 77→Ile;Trp 79→Ser;Arg 81→Ser;Cys 87→Ser;Asn 96→Met;Tyr 100→Ser;Leu 103→Gly;Tyr 106→Ala;

Lys 125→Lys;Tyr 132→Val;Lys 134→Trp;

[0440] Gln 28→His;Ala 40→Asn;Gln 49→Ala;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→Ser;Lys 73→Gln;Asp 77→Met;Trp 79→Ala;Arg 81→Tyr;Cys 87→Ser;Asn 96→Arg;Tyr 100→Pro;Leu 103→Thr;Tyr 106→Ile;Lys 125→Lys;Ser 127→Met;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0441] Gln 28→His;Ala 40→His;Gln 49→Ala;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Asp;Arg 72→Gly;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Trp;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Arg;Tyr 100→Asp;Leu 103→Met;Tyr 106→Phe;Lys 125→Ala;Ser 127→Asp;Tyr 132→Asn;Lys 134→Trp;

[0442] Gln 28→His;Leu 36→Asn;Ala 40→Gly;Ile 41→Arg;Gln 49→Pro;Tyr 52→Trp;Ser 68→Arg;Leu 70→Trp;Arg 72→Asn;Lys 73→Gln;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Asp;Tyr 100→Thr;Leu 103→Trp;Tyr 106→Asn;Lys 125→Asn;Ser 127→Met;Tyr 132→Ile;Lys 134→Tyr;

[0443] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Thr;Gln 49→Gly;Tyr 52→Gly;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→Gly;Lys 73→Arg;Asp 77→Gly;Trp 79→Trp;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Ala;Tyr 100→Trp;Leu 103→Ile;Tyr 106→Gly;Lys 125→Lys;Ser 127→Asn;Tyr 132→Val;Lys 134→Trp;

[0444] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Glu;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Ser;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Lys;Tyr 100→Asn;Leu 103→Val;Tyr 106→Met;Lys 125→Asn;Ser 127→Lys;Tyr 132→Gly;Lys 134→Trp;

[0445] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Ser;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Leu 103→Gln;Tyr 106→Met;Ser 127→Lys;Tyr 132→Val;Lys 134→Trp;

[0446] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Asp 77→Asn;Trp 79→Phe;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Lys;Tyr 100→His;Leu 103→Gln;Tyr 106→Met;Ser 127→Lys;Tyr 132→Ala;Lys 134→Trp;

[0447] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Gly;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Trp;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Tyr 100→Asn;Leu 103→His;Tyr 106→Met;Ser 127→Lys;Tyr 132→Gly;Lys 134→Trp;

[0448] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Phe;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Met;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp;

[0449] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;

Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp;

[0450] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Glu;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Asn 65→Asp;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Phe;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Lys;Tyr 100→Asn;Leu 103→Val;Tyr 106→Met;Lys 125→Asn;Ser 127→Lys;Tyr 132→Gly;Lys 134→Trp;

[0451] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Glu;Ile 41→Val;Gln 49→Gly;Tyr 52→Pro;Asn 65→Gln;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Arg 72→His;Lys 73→Asn;Asp 77→Asn;Trp 79→Phe;Arg 81→Glu;Cys 87→Ser;Asn 96→Lys;Tyr 100→Asn;Leu 103→Val;Tyr 106→Met;Lys 125→Asn;Ser 127→Lys;Tyr 132→Gly;Lys 134→Trp;

[0452] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Thr 54→Ala;Asn 65→Asp;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp;

[0453] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Thr 54→Ala;Asn 65→Gln;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp;

[0454] Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Thr 54→Ala;Asn 65→Asp;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp;或

[0455] Leu 36→Val;Ala 40→Thr;Ile 41→Ile;Gln 49→Gly;Tyr 52→Asn;Thr 54→Ala;Asn 65→Gln;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Ile;Lys 73→Arg;Asp 77→His;Trp 79→Tyr;Arg 81→Asp;Cys 87→Ser;Leu 103→Thr;Tyr 106→Gln;Lys 125→Ile;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ile;Lys 134→Trp。

[0456] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白包含选自SEQ ID NO:19-37的氨基酸序列或其片段或变体。

[0457] 在另一个实施方案中,所述突变蛋白能够以约20nM以下的K_d结合与铁复合的绿脓菌荧光素III型,例如在通过基本上在实施例6中描述的测定法中的Biacore T200仪器测量时。

[0458] 在另一个实施方案中,所述hNGAL突变蛋白能够以由约200nM以下的IC₅₀值测量的亲和力结合具有和没有复合铁的PvdIII型琥珀酰基、PvdIII型琥珀酸酰胺基和PvdIII型α-酮戊二酰基,在基本上在实施例5中描述的ELISA测定法中测量时。

[0459] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白能够在基本上在实施例7中描述的竞争ELISA形式中以约150nM以下的IC₅₀值抑制由绿脓菌荧光素III型介导的铁摄取。

[0460] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白能够在基本上在实施例8中描述的测定法中抑制Pvd III菌株的细菌生长。

[0461] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白在与成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID

NO:1) 的位置28、36、40-42、45-47、49、52、65、68、70、72-73、77、79、81、87、96、100、103、105-106、125、127、132、134和145对应的一个或多个位置处包含突变氨基酸残基。

[0462] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含至少一种下述突变氨基酸残基:Leu 36→Phe或Glu;Ala 40→Trp、Leu或Arg;Ile 41→Met、Arg、Ala、Leu or Trp;Gln 49→His、Ile、Arg、Lys、Met或Pro;Tyr 52→Asn、Tyr、Arg、Ser或Met;Ser 68→Asp、Asn、Glu或Gln;Leu 70→Lys、Asn或Arg;Arg 72→Leu、Arg、Gln或Tyr;Lys 73→His、Leu、Ala、Pro、Gln或Tyr;Asp 77→Ala、Ile、Lys、Gln或Arg;Trp 79→Ser或Asp;Arg 81→His、Ala、Ser或Val;Asn 96→Met、Ile、Arg、Gly、Leu或Val;Tyr 100→Ala、Ile、Asn、Pro或Asp;Leu 103→Gln、Gly、Phe或Pro;Tyr 106→Glu;Lys 125→Trp或Thr;Ser 127→Val、His、Ile、Phe或Ala;Tyr 132→Phe;and Lys 134→Trp、Gln或Glu。

[0463] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含下述取代:Gln 28→His;Leu 42→Arg;Asp 45→Gly;Lys 46→Arg;Asp 47→Asn;Asn 65→Asp;Cys 87→Ser;Ser 105→Pro和Thr 145→Pro。

[0464] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白在成熟人NGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1) 的序列位置28、36、40-42、45-47、49、52、65、68、70、72-73、77、79、81、87、96、100、103、105-106、125、127、132、134和145处包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个突变氨基酸残基。

[0465] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含下组氨基酸取代之一:

[0466] Gln 28→His;Leu 36→Phe;Ala 40→Trp;Ile 41→Met;Gln 49→His;Tyr 52→Asn;Ser 68→Glu;Leu 70→Lys;Arg 72→Gln;Lys 73→Ala;Asp 77→Ile;Trp 79→Ser;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Asn 96→Ile;Tyr 100→Asn;Leu 103→Gly;Tyr 106→Glu;Lys 125→Trp;Ser 127→His;Tyr 132→Phe;Lys 134→Gln;

[0467] Gln 28→His;Leu 36→Phe;Ala 40→Arg;Ile 41→Trp;Gln 49→Ile;Tyr 52→Tyr;Ser 68→Gln;Leu 70→Asn;Arg 72→Trp;Lys 73→Leu;Asp 77→Ala;Trp 79→Ser;Arg 81→Ser;Cys 87→Ser;Asn 96→Arg;Tyr 100→Ile;Leu 103→Pro;Tyr 106→Glu;Lys 125→Thr;Ser 127→Ile;Tyr 132→Phe;Lys 134→Glu;

[0468] Gln 28→His;Leu 36→Phe;Ala 40→Leu;Ile 41→Leu;Gln 49→Arg;Tyr 52→Arg;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Leu;Lys 73→Tyr;Asp 77→Ile;Trp 79→Ser;Arg 81→Ala;Cys 87→Ser;Asn 96→Gly;Tyr 100→Ala;Leu 103→Phe;Tyr 106→Glu;Lys 125→Trp;Ser 127→Ala;Lys 134→Glu;

[0469] Gln 28→His;Leu 36→Phe;Ala 40→Trp;Ile 41→Arg;Gln 49→Pro;Tyr 52→Ser;Ser 68→Asn;Leu 70→Arg;Arg 72→Trp;Lys 73→Pro;Asp 77→Arg;Trp 79→Ser;Arg 81→Ser;Cys 87→Ser;Asn 96→Met;Tyr 100→Pro;Leu 103→Gly;Tyr 106→Glu;Lys 125→Trp;Ser 127→Phe;Tyr 132→Phe;Lys 134→Glu;

[0470] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Gln 49→Lys;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Gln;Trp 79→Asp;Arg 81→Ala;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0471] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→Gln;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0472] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Thr;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→Arg;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Val;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0473] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0474] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Gln 49→Lys;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→Tyr;Asp 77→Gln;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→-;Tyr 100→Glu;Leu 103→Gln;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0475] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Leu 42→Arg;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser 105→Pro;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0476] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Asp 47→Asn;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser 105→Pro;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;Thr 145→Pro;

[0477] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Asp 45→Gly;Lys 46→Arg;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser 105→Pro;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0478] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Leu 42→Arg;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Asn 65→Asp;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser 105→Pro;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;

[0479] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Asp 47→Asn;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Asn 65→Asp;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser 105→Pro;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;Thr 145→Pro;

[0480] Gln 28→His;Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Asp 45→Gly;Lys 46→Arg;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Asn 65→Asp;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu

103→Gln;Ser 105→Pro;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp;或
[0481] Leu 36→Glu;Ala 40→Leu;Ile 41→Ala;Leu 42→Arg;Gln 49→Met;Tyr 52→Met;Asn 65→Asp;Ser 68→Glu;Leu 70→Arg;Lys 73→His;Asp 77→Lys;Trp 79→Asp;Arg 81→Val;Cys 87→Ser;Asn 96→Leu;Tyr 100→Asp;Leu 103→Gln;Ser 105→Pro;Tyr 106→Glu;Ser 127→Val;Tyr 132→Phe;Lys 134→Trp。

[0482] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白包含选自SEQ ID NO:38-53的氨基酸序列或其片段或变体。

[0483] 在另一个实施方案中,所述hNGAL突变蛋白能够以约20nM以下的K_d结合与铁复合的绿脓菌螯铁蛋白,例如在通过基本上在实施例6中描述的测定法中的Biacore T200仪器测量时。

[0484] 在另一个实施方案中,所述hNGAL突变蛋白能够以由约500nM以下的IC₅₀值测量的亲和力结合具有复合铁的绿脓菌螯铁蛋白,在基本上在实施例5中描述的测定法中测量时。

[0485] 在另一个实施方案中,所述hNGAL突变蛋白能够以由约200nM以下的IC₅₀值测量的亲和力结合没有复合铁的绿脓菌螯铁蛋白,在基本上在实施例5中描述的测定法中测量时。

[0486] 在另一个实施方案中,所述hNGAL突变蛋白能够以由约200nM以下的IC₅₀值测量的亲和力结合具有和没有复合铁的绿脓菌螯铁蛋白,在基本上在实施例5中描述的测定法中测量时。

[0487] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白能够在基本上在实施例7中描述的竞争ELISA形式中以约150nM以下的IC₅₀值抑制由绿脓菌螯铁蛋白介导的铁摄取。

[0488] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白能够在基本上在实施例8中描述的测定法中抑制Pvd I敲除(Δ pvdA)的细菌生长。

[0489] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白在与成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的位置28、34、36、40-41、44-46、49、52、54、65、68、70、72-74、77、79-81、87、96、100、103、106、108、123、125、127、132、134和141对应的一个或多个位置处包含突变氨基酸残基。

[0490] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含至少一种下述突变氨基酸残基:Leu 36→His、Met或Val;Ala 40→Ile、Gln、Tyr或Phe;Ile 41→Leu、His或Trp;Gln 49→His、Arg、Ser或Ala;Tyr 52→Leu、Trp或Pro;Ser 68→Asp或His;Leu 70→Arg或Trp;Arg 72→His、Ile、Ala、Ser或Gly;Lys 73→Asn、Met、Pro、Phe、Gln或Arg;Asp 77→Arg、Thr、Pro或Asp;Trp 79→Ala、Arg、Lys或Asp;Arg 81→Thr、Ile或Trp;Asn 96→Met、Asn、Pro或Ala;Tyr 100→Gly、His或Glu;Leu 103→Gly、Met、His或Gln;Tyr 106→Met、Gly、Arg或Trp;Lys 125→Trp、Phe、Gly或Leu;Ser 127→Arg、Trp、Asp或Ile;Tyr 132→Ala、Glu或Thr;and Lys 134→Leu、Val、Asn或Phe。

[0491] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白的氨基酸序列与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含下述取代:Gln 28→His;Val 34→Leu;Glu 44→Gly;Asp 45→Gly;Lys→Arg或Tyr;Asn 65→Asp;Ile 80→Thr;Cys 87→Ser;Leu 94→Phe;Val 108→Ala;Phe 123→Ser和Thr 141→Ala。

[0492] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白在成熟hNGAL的线性多肽序列(SEQ ID NO:1)的序列位置28、34、36、40-41、44-46、49、52、54、65、68、70、72-74、77、79-81、87、96、100、103、106、108、123、125、127、132、134和141处包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、

14、15、16、17、18、19、20或21个突变氨基酸残基。

[0493] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白与成熟hNGAL的线性多肽序列相比包含下组氨基酸取代之一:

[0494] Gln 28→His;Ala 40→Ile;Ile 41→Leu;Gln 49→His;Tyr 52→Leu;Ser 68→His;Leu 70→Thr;Arg 72→Lys;Lys 73→Trp;Asp 77→Ile;Trp 79→Ser;Arg 81→His;Cys 87→Ser;Asn 96→Met;Tyr 100→Asn;Leu 103→His;Tyr 106→Met;Lys 125→Trp;Ser 127→Asp;Tyr 132→Glu;Lys 134→Leu;

[0495] Gln 28→His;Leu 36→His;Ala 40→Gln;Ile 41→Trp;Gln 49→Arg;Tyr 52→Trp;Ser 68→Asp;Leu 70→Asp;Arg 72→Ala;Lys 73→Ile;Asp 77→His;Trp 79→Arg;Arg 81→Thr;Cys 87→Ser;Tyr 100→His;Leu 103→Gly;Tyr 106→Gly;Lys 125→Phe;Ser 127→Ile;Tyr 132→Ala;Lys 134→Phe;

[0496] Gln 28→His;Leu 36→Met;Ala 40→Phe;Ile 41→His;Gln 49→Ser;Tyr 52→Pro;Ser 68→His;Leu 70→Pro;Arg 72→Trp;Lys 73→Ala;Asp 77→Ala;Trp 79→Lys;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Ala;Tyr 100→Gly;Leu 103→Met;Tyr 106→Trp;Lys 125→Gly;Ser 127→Trp;Tyr 132→Thru;Lys 134→Val;

[0497] Gln 28→His;Leu 36→Val;Ala 40→Tyr;Ile 41→Trp;Gln 49→Ala;Ser 68→Asp;Leu 70→Arg;Arg 72→Trp;Lys 73→Arg;Asp 77→Arg;Trp 79→Asp;Arg 81→Trp;Cys 87→Ser;Asn 96→Pro;Tyr 100→Glu;Leu 103→Gln;Tyr 106→Arg;Lys 125→Leu;Ser 127→Arg;Tyr 132→Ala;Lys 134→Asn;

[0498] Gln 28→His;Val 34→Leu;Leu 36→Met;Ala 40→Phe;Ile 41→His;Gln 49→Ser;Tyr 52→Pro;Ser 68→His;Leu 70→Pro;Arg 72→Trp;Lys 73→Ala;Asp 77→Ala;Trp 79→Lys;Ile 80→Thr;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Ala;Tyr 100→Gly;Leu 103→Met;Tyr 106→Trp;Phe 123→Ser;Lys 125→Gly;Ser 127→Trp;Tyr 132→Thru;Lys 134→Val;Thr 141→Ala;

[0499] Gln 28→His;Leu 36→Met;Ala 40→Phe;Ile 41→His;Gln 49→Ser;Tyr 52→Pro;Ser 68→His;Leu 70→Pro;Arg 72→Trp;Lys 73→Ala;Asp 77→Ala;Trp 79→Lys;Ile 80→Thr;Arg 81→Ile;Cys 87→Ser;Asn 96→Ala;Tyr 100→Gly;Leu 103→Met;Tyr 106→Trp;Phe 123→Ser;Lys 125→Gly;Ser 127→Trp;Tyr 132→Thru;Lys 134→Val;

[0500] Gln 28→His;Leu 36→His;Ala 40→Gln;Ile 41→Trp;Asp 45→Gly;Lys 46→Arg;Gln 49→Arg;Tyr 52→Trp;Ser 68→Asp;Leu 70→Asp;Arg 72→Ala;Lys 73→Ile;Asp 77→Leu;Trp 79→Arg;Arg 81→Thr;Cys 87→Ser;Tyr 100→His;Leu 103→Gly;Tyr 106→Gly;Lys 125→Phe;Ser 127→Ile;Tyr 132→Ala;Lys 134→Phe;

[0501] Gln 28→His;Leu 36→His;Ala 40→Gln;Ile 41→Trp;Glu 44→Gly;Lys 46→Tyr;Gln 49→Arg;Tyr 52→Trp;Ser 68→Asp;Leu 70→Asp;Arg 72→Ala;Lys 73→Ile;Lys 74→Glu;Asp 77→His;Trp 79→Arg;Arg 81→Thr;Cys 87→Ser;Leu 94→Phe;Tyr 100→His;Leu 103→Gly;Tyr 106→Gly;Val 108→Ala;Lys 125→Phe;Ser 127→Ile;Tyr 132→Ala;Lys 134→Phe;或

[0502] Leu 36→His;Ala 40→Gln;Ile 41→Trp;Asp 45→Gly;Lys 46→Arg;Gln 49→Arg;Tyr 52→Trp;Asn 65→Asp;Ser 68→Asp;Leu 70→Asp;Arg 72→Ala;Lys 73→Ile;

Asp 77→Leu;Trp 79→Arg;Arg 81→Thr;Cys 87→Ser;Tyr 100→His;Leu 103→Gly;Tyr 106→Gly;Lys 125→Phe;Ser 127→Ile;Tyr 132→Ala;Lys 134→Phe。

[0503] 在另一个实施方案中,多肽包含选自SEQ ID NO:54-63的氨基酸序列或其片段或变体。

[0504] 在另一个实施方案中,多肽包含选自SEQ ID NO:2-63的氨基酸序列或其片段或变体。

[0505] 在另一个实施方案中,所述hNGAL突变蛋白包含取代野生型hNGAL的一个或多个氨基酸的一个或多个非天然半胱氨酸残基。

[0506] 在另一个实施方案中,所述hNGAL突变蛋白包含天然半胱氨酸残基被另一种氨基酸的至少一个氨基酸取代。

[0507] 在另一个实施方案中,所述另一种氨基酸是丝氨酸残基。

[0508] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白与选自下组的化合物缀合:有机分子、酶标记物、放射性标记物、有色标记物、荧光标记物、生色标记物、发光标记物、半抗原、洋地黄毒苷(digoxigenin)、生物素、细胞抑制剂、毒素、金属复合物、金属、和胶体金。

[0509] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白在其N端和/或其C端与融合配偶体融合,所述融合配偶体是蛋白质或蛋白质域或肽。

[0510] 在另一个实施方案中,hNGAL突变蛋白与延长多肽的血清半衰期的化合物缀合。

[0511] 在另一个实施方案中,多肽包含选自下组的延长血清半衰期的化合物:聚亚烷基二醇分子、羟乙基淀粉、免疫球蛋白的Fc部分、免疫球蛋白的CH3域、免疫球蛋白的CH4域、清蛋白结合肽、和清蛋白结合蛋白。

[0512] 在另一个实施方案中,聚亚烷基二醇是聚乙烯(PEG)或其活化的衍生物。

[0513] 在另一个实施方案中,涵盖包含编码本文中提及的任何多肽的核苷酸序列的核酸分子。

[0514] 在另一个实施方案中,核酸分子与调节序列可操作连接以允许所述核酸分子的表达。

[0515] 在另一个实施方案中,核酸分子包含于载体中或噬菌粒载体中。

[0516] 在另一个实施方案中,涵盖含有本文中提及的任一种核酸分子的宿主细胞。

[0517] 在另一个实施方案中,涵盖生成本文中描述的任何多肽的方法,其中通过遗传工程方法,从编码多肽的核酸开始生成多肽。

[0518] 在另一个实施方案中,在细菌或真核宿主生物体中生成多肽,并且从此宿主生物体或其培养物中分离多肽。

[0519] 在另一个实施方案中,涵盖组合物,其包含一个或多个选自下组的多肽:(i)对绿脓菌荧光素I型特异性的多肽、(ii)对绿脓菌荧光素II型特异性的多肽、(iii)对绿脓菌荧光素III型特异性的多肽和(iv)对绿脓菌螯铁蛋白特异性的多肽。

[0520] 在另一个实施方案中,组合物包含两种以上选自下组的多肽:(i)对绿脓菌荧光素I型特异性的多肽、(ii)对绿脓菌荧光素II型特异性的多肽、(iii)对绿脓菌荧光素III型特异性的多肽和(iv)对绿脓菌螯铁蛋白特异性的多肽。

[0521] 在另一个实施方案中,组合物包含三种或四种选自下组的多肽:(i)对绿脓菌荧光素I型特异性的多肽、(ii)对绿脓菌荧光素II型特异性的多肽、(iii)对绿脓菌荧光素III型

特异性的多肽和(iv)对绿脓菌螯铁蛋白特异性的多肽。

[0522] 在另一个实施方案中,组合物包含对绿脓菌荧光素I型特异性的多肽。

[0523] 在另一个实施方案中,组合物包含对绿脓菌荧光素II型特异性的多肽。

[0524] 在另一个实施方案中,组合物包含对绿脓菌荧光素III型特异性的多肽。

[0525] 在另一个实施方案中,组合物包含对绿脓菌螯铁蛋白特异性的多肽。

[0526] 在另一个实施方案中,所述组合物进一步包含至少一种药学可接受佐剂、稀释剂或载体。

[0527] 在另一个实施方案中,结合受试者中的绿脓菌荧光素I、II、III型和/或绿脓菌螯铁蛋白的方法包括对所述受试者施用有效量的本文中提及的任何组合物。

[0528] 在另一个实施方案中,涵盖用于抑制或降低受试者中的铜绿假单胞菌生长的方法,包括对所述受试者施用有效量的本文中提及的任何组合物。

[0529] 在另一个实施方案中,涵盖套盒,其包含一个或多个容器(分开或混合)和本文中提及的任何组合物。

[0530] 在另一个实施方案中,涵盖(i)根据能够结合绿脓菌荧光素I型的本文中提及的任何多肽的多肽、(ii)根据能够结合绿脓菌荧光素II型的本文中提及的任何多肽的多肽、(iii)根据能够结合绿脓菌荧光素III型的本文中提及的任何多肽的多肽和/或(iv)根据能够结合绿脓菌螯铁蛋白的本文中提及的任何多肽的多肽,用于结合受试者中的绿脓菌荧光素I、II、III型和/或绿脓菌螯铁蛋白的用途。

[0531] 在另一个实施方案中,涵盖(i)根据能够结合绿脓菌荧光素I型的本文中提及的任何多肽的多肽、(ii)根据能够结合绿脓菌荧光素II型的本文中提及的任何多肽的多肽、(iii)根据能够结合绿脓菌荧光素III型的本文中提及的任何多肽的多肽和/或(iv)根据能够结合绿脓菌螯铁蛋白的本文中提及的任何多肽的多肽,用于防止或降低受试者中由铜绿假单胞菌经由绿脓菌螯铁蛋白和/或绿脓菌荧光素的铁摄取的用途。

[0532] 在另一个实施方案中,涵盖(i)根据能够结合绿脓菌荧光素I型的本文中提及的任何多肽的多肽、(ii)根据能够结合绿脓菌荧光素II型的本文中提及的任何多肽的多肽、(iii)根据能够结合绿脓菌荧光素III型的本文中提及的任何多肽的多肽和/或(iv)根据能够结合绿脓菌螯铁蛋白的本文中提及的任何多肽的多肽,用于治疗或减轻受试者中的铜绿假单胞菌生物膜感染的用途。

[0533] 在另一个实施方案中,铜绿假单胞菌生物膜感染是急性或慢性感染。

[0534] 在另一个实施方案中,组合施用所述第一、第二、第三和/或第四多肽,包括同时、伴随或连续。

[0535] 在另一个实施方案中,所述第一、第二、第三和/或第四多肽彼此独立施用,包括在独立的时间点时以个别的时间间隔。

[0536] 在另一个实施方案中,组合包含(i)根据能够结合绿脓菌荧光素I型的本文中提及的任何多肽的多肽、(ii)根据能够结合绿脓菌荧光素II型的本文中提及的任何多肽的多肽、(iii)根据能够结合绿脓菌荧光素III型的本文中提及的任何多肽的多肽和/或(iv)根据能够结合绿脓菌螯铁蛋白的本文中提及的任何多肽的多肽。

[0537] 本文中例示性描述的实施方案可以在缺乏本文中明确公开的任何一种要素、限制的情况下适当实施。如此,例如,术语“包含”、“包括”、“含有”等应当广泛且不受限阅

读。另外,本文中采用的术语和表述已经作为描述的术语使用而不是限制的,并且在使用此类术语和表述中不意图排除显示和描述的特征或其部分的任何等同物,但是认可各种修改在要求保护的发明的范围内是可能的。如此,应当理解,虽然本实施方案已经通过优选的实施方案具体公开,本领域技术人员会诉诸于其任选的特征、修改和变型,并且认为此类修改和变型在发明的范围内。本文中描述的所有专利、专利申请、教科书和同行评审出版物在此通过提及完整并入。此外,在参考文献(其通过提及收入本文)的定义和术语使用与本文中提供的该术语的定义不一致或冲突的情况下,适用本文中提供的该术语的定义,并且不适用参考文献中的该术语的定义。落入一般公开内的每个较窄的种类和子类分组也形成本发明的部分。这包括本发明的一般描述,具有从类别除去任何主题的条件或负面限制,不管本文中明确叙述除去的材料与否。另外,在特征按马库斯组描述的情况下,本领域技术人员会认可公开内容因此也按照马库斯组的任何个别成员或成员亚组描述。其它实施方案从所附权利要求书会变得明显。

序列表

<110> 赛诺菲 (Sanofi)

<120> 新的对绿脓菌荧光素和绿脓菌螯铁蛋白特异性的蛋白质

<130> DE2015/028

<160> 133

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NGAL wt

<400> 1

```

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

```

Asp Gly

<210> 2

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.12C05

<400> 2

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

<210> 3

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.02P05

<400> 3

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

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

Asp Gly

<210> 4

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.09A08

<400> 4

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

100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Tyr Val Ala Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Gly Phe Asn Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175
Asp Gly		
<210> 5		
<211> 178		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> S0466.09M05		
<400> 5		
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val		
1	5	10
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr		
20	25	30
Val Val Gly Phe Ala Gly Asn Asn Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro		
35	40	45
Pro Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr		
50	55	60
Asn Val Thr Asp Val Thr Phe Glu Ala Lys Lys Cys Arg Tyr Arg Ile		
65	70	75
Ile Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Tyr		
85	90	95
Ile Lys Ser Lys Pro Gly Pro Thr Ser Phe Leu Val Arg Val Val Ser		
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ser Val Thr Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Trp Phe Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175

Asp Gly

<210> 6

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.09E05

<400> 6

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Gly Trp Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

Val Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asn Val Thr Val Val Asp Phe Glu Leu Lys Lys Cys Arg Tyr Met Ile

65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asp

85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly Trp Thr Ser Gln Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Tyr Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe His Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 7

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.09E13

<400> 7

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

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

Asp Gly

<210> 8

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0512.17L07

<400> 8

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

Ile Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly		
	85	90 95
Ile Lys Ser Ser Pro Gly Gln Thr Ser His Leu Val Arg Val Val Ser		
	100	105 110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Tyr Val Ile Gln		
	115	120 125
Asn Arg Glu Gly Phe Asn Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
	130	135 140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155 160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
	165	170 175

Asp Gly

<210> 9

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0512.17010

<400> 9

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

145	150	155	160
Leu Pro Glu Asn His	Ile Val Phe Pro Val	Pro Ile Asp Gln Cys	Ile
	165	170	175
Asp Gly			
<210> 10			
<211> 178			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> S0512.19M08			
<400> 10			
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val			
1	5	10	15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr			
	20	25	30
Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Thr Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro			
	35	40	45
Pro Lys Met Pro Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr			
	50	55	60
Asn Val Thr Asp Val Gln Phe Pro Glu Lys Lys Cys Thr Tyr Ser Ile			
65	70	75	80
Ile Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asp			
	85	90	95
Ile Lys Ser Asn Pro Gly Glu Thr Ser His Leu Val Arg Val Met Ser			
	100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Tyr Val Asp Gln			
	115	120	125
Asn Arg Glu Gly Phe Asn Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu			
	130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly			
145	150	155	160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile			
	165	170	175
Asp Gly			
<210> 11			
<211> 178			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			

<223> S0512.17003

<400> 11

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

Asp Gly

<210> 12

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0510.05H10

<400> 12

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

50	55	60
Asn Val Thr Val Val	Asp Phe Glu Leu Lys Lys	Cys Arg Tyr Met Ile
65	70	75
Glu Thr Phe Val Pro	Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr	Leu Gly Asp
85	90	95
Ile Lys Ser Ser Pro	Gly Trp Thr Ser Gln Leu Val Arg	Val Val Ser
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln	His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly	Val Tyr Gln
115	120	125
Asn Arg Glu Trp Phe	His Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr	Lys Glu Leu
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys	Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys	Ser Leu Gly
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His	Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp	Gln Cys Ile
165	170	175
Asp Gly		
<210> 13		
<211> 178		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> S0530.06H10		
<400> 13		
Gln Asp Ser Thr Ser	Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro	Leu Ser Lys Val
1	5	10
Pro Leu Gln Gln Asn	Phe Gln Asp Asn Gln Phe His	Gly Lys Trp Tyr
20	25	30
Val Val Gly Trp Ala	Gly Asn Thr Thr Leu Arg Glu	Asp Lys Asp Pro
35	40	45
Pro Lys Met Pro Ala	Val Ile Tyr Glu Leu Lys Glu	Asp Lys Ser Tyr
50	55	60
Asn Val Thr Asp Val	Gln Phe Pro Glu Lys Glu Cys	Ile Tyr Ser Thr
65	70	75
Ile Thr Phe Val Pro	Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr	Leu Gly Gly
85	90	95
Ile Lys Ser Ser Pro	Gly Gln Thr Ser His Leu Val Arg	Val Val Ser
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln	His Ala Met Val Phe Phe Lys Tyr	Val Thr Gln
115	120	125

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

Asp Gly

<210> 14

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.04N16

<400> 14

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

Asp Gly

<210> 15

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0544.01B06_H28Q_N65D

<400> 15

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

<210> 16

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0544.04C04_H28Q_N65D

<400> 16

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

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

Asp Gly

<210> 17

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.04N16_N65D

<400> 17

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

100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Tyr Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Trp Phe His Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175
Asp Gly		
<210> 18		
<211> 178		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> S0530.04N16_N65Q		
<400> 18		
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val		
1	5	10
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr		
20	25	30
Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Gly Trp Leu Arg Glu Asp Glu Asp Pro		
35	40	45
Leu Lys Met Met Ala Ala Val Tyr Glu Leu Arg Glu Asp Lys Ser Tyr		
50	55	60
Gln Val Thr Val Val Asp Phe Glu Leu Glu Glu Cys Arg Tyr Met Thr		
65	70	75
Glu Thr Phe Val Pro Gly Asn Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asp		
85	90	95
Ile Lys Ser Ser Pro Gly Trp Thr Ser Gln Leu Val Arg Val Val Ser		
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Tyr Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Trp Phe His Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175

Asp Gly

<210> 19

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S447.3 M1.1_N4

<400> 19

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe His Asn Lys Lys Cys Asn Tyr Ser Ile

65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn

85 90 95

Ile Lys Ser Asn Pro Gly Gln Thr Ser Met Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Lys Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Gly Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 20

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S449.1 M1.1_M5

<400> 20

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

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

Asp Gly

<210> 21

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S449.5 M1.1_L10

<400> 21

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

Ser	Thr	Phe	Val	Pro	Gly	Ser	Gln	Pro	Gly	Glu	Phe	Thr	Leu	Gly	Met
				85					90					95	
Ile	Lys	Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Ser	Ala	Leu	Val	Arg	Val	Val	Ser
				100					105					110	
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	Lys	Val	Ser	Gln
				115					120					125	
Asn	Arg	Glu	Val	Phe	Trp	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu
				130					135					140	
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly
145						150					155				160
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile
				165					170					175	

Asp Gly

<210> 22

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S449.8 M1.1_F3

<400> 22

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

145	150	155	160
Leu Pro Glu Asn His	Ile Val Phe Pro Val	Pro Ile Asp Gln Cys	Ile
	165	170	175
Asp Gly			
<210> 23			
<211> 178			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> S449.5 M1.1_E8			
<400> 23			
Gln Asp Ser Thr Ser Asp	Leu Ile Pro Ala Pro Pro	Leu Ser Lys Val	
1	5	10	15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe	Gln Asp Asn Gln Phe His	Gly Lys Trp Tyr	
	20	25	30
Val Val Gly Leu Ala Gly	Asn His Ile Leu Arg Glu	Asp Lys Asp Pro	
	35	40	45
Ala Lys Met Pro Ala Thr	Ile Tyr Glu Leu Lys Glu	Asp Lys Ser Tyr	
	50	55	60
Asn Val Thr Glu Val Arg	Phe Gly Arg Lys Lys Cys	His Tyr Trp Ile	
65	70	75	80
Glu Thr Phe Val Pro Gly	Ser Gln Pro Gly Glu Phe	Thr Leu Gly Arg	
	85	90	95
Ile Lys Ser Asp Pro Gly	Met Thr Ser Phe Leu Val	Arg Val Val Ser	
	100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His	Ala Met Val Phe Phe Lys	Ala Val Asp Gln	
	115	120	125
Asn Arg Glu Asn Phe Trp	Ile Thr Leu Tyr Gly Arg	Thr Lys Glu Leu	
	130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu	Asn Phe Ile Arg Phe Ser	Lys Ser Leu Gly	
145	150	155	160
Leu Pro Glu Asn His	Ile Val Phe Pro Val	Pro Ile Asp Gln Cys	Ile
	165	170	175
Asp Gly			
<210> 24			
<211> 178			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			

<223> S437.1 M1.1_P2

<400> 24

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

Asp Gly

<210> 25

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S449.1 M1.1_I7

<400> 25

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

50	55	60
Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Gly Arg Lys Lys Cys Gly Tyr Trp Ile		
65	70	75
Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Ala		
85	90	95
Ile Lys Ser Trp Pro Gly Ile Thr Ser Gly Leu Val Arg Val Val Ser		
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Asn Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Val Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175
Asp Gly		
<210> 26		
<211> 178		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> S0475.06L06		
<400> 26		
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val		
1	5	10
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr		
20	25	30
Val Val Gly Val Ala Gly Asn Glu Val Leu Arg Asp Asp Lys Asp Pro		
35	40	45
Gly Lys Met Pro Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr		
50	55	60
Asn Val Thr Glu Val Arg Phe His Asn Lys Lys Cys Asn Tyr Ser Ile		
65	70	75
Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys		
85	90	95
Ile Lys Ser Asn Pro Gly Val Thr Ser Met Leu Val Arg Val Val Ser		
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Asn Val Lys Gln		
115	120	125

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

Asp Gly

<210> 27

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0475.08G23

<400> 27

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

Asp Gly

<210> 28

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0475.06G17

<400> 28

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

<210> 29

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0475.03N20

<400> 29

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

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

Asp Gly

<210> 30

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0474.05F20

<400> 30

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

100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ile Val Arg Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Ile Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175
Asp Gly		
<210> 31		
<211> 178		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> S0474.01H22		
<400> 31		
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val		
1	5	10
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr		
20	25	30
Val Val Gly Val Ala Gly Asn Thr Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro		
35	40	45
Gly Lys Met Asn Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr		
50	55	60
Asn Val Thr Asp Val Arg Phe Ile Arg Lys Lys Cys His Tyr Tyr Ile		
65	70	75
Asp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn		
85	90	95
Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Thr Ser Gln Leu Val Arg Val Val Ser		
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ile Val Arg Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Ile Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175

Asp Gly

<210> 32

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0475.06L06_N65D_S79F

<400> 32

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asp Val Thr Glu Val Arg Phe His Asn Lys Lys Cys Asn Tyr Phe Ile

65 70 75 80

Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys

85 90 95

Ile Lys Ser Asn Pro Gly Val Thr Ser Met Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Asn Val Lys Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Gly Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 33

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0475.06L06_N65Q_S79F

<400> 33

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

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

Asp Gly

<210> 34

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0474.01H22_T54A_N65D

<400> 34

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

Asp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn		
85	90	95
Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Thr Ser Gln Leu Val Arg Val Val Ser		
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ile Val Arg Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Ile Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175

Asp Gly

<210> 35

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0474.01H22_T54A_N65Q

<400> 35

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val		
1	5	10
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr		
20	25	30
Val Val Gly Val Ala Gly Asn Thr Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro		
35	40	45
Gly Lys Met Asn Ala Ala Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr		
50	55	60
Gln Val Thr Asp Val Arg Phe Ile Arg Lys Lys Cys His Tyr Tyr Ile		
65	70	75
Asp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn		
85	90	95
Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Thr Ser Gln Leu Val Arg Val Val Ser		
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ile Val Arg Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Ile Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		

145	150	155	160
Leu Pro Glu Asn His	Ile Val Phe Pro Val	Pro Ile Asp Gln Cys	Ile
	165	170	175
Asp Gly			
<210> 36			
<211> 178			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> S0474.01H22_H28Q_T54A_N65D			
<400> 36			
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val			
1	5	10	15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr			
	20	25	30
Val Val Gly Val Ala Gly Asn Thr Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro			
	35	40	45
Gly Lys Met Asn Ala Ala Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr			
	50	55	60
Asp Val Thr Asp Val Arg Phe Ile Arg Lys Lys Cys His Tyr Tyr Ile			
65	70	75	80
Asp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn			
	85	90	95
Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Thr Ser Gln Leu Val Arg Val Val Ser			
	100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ile Val Arg Gln			
	115	120	125
Asn Arg Glu Ile Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu			
	130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly			
145	150	155	160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile			
	165	170	175
Asp Gly			
<210> 37			
<211> 178			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			

<223> S0474.01H22_N65Q

<400> 37

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

Asp Gly

<210> 38

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.14D07

<400> 38

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

50	55	60
Asn Val Thr Glu Val Lys Phe Gln Ala Lys Lys Cys Ile Tyr Ser Ile		
65	70	75
His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Ile		80
	85	90
Ile Lys Ser Asn Pro Gly Gly Thr Ser Glu Leu Val Arg Val Val Ser		95
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Trp Val His Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Phe Phe Gln Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
	165	170
		175
Asp Gly		
<210> 39		
<211> 178		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> S0466.05N20		
<400> 39		
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val		
1	5	10
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr		15
	20	25
Val Val Gly Phe Ala Gly Asn Arg Trp Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro		30
35	40	45
Ile Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr		
50	55	60
Asn Val Thr Gln Val Asn Phe Trp Leu Lys Lys Cys Ala Tyr Ser Ile		
65	70	75
Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Arg		80
	85	90
Ile Lys Ser Ile Pro Gly Pro Thr Ser Glu Leu Val Arg Val Val Ser		95
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Thr Val Ile Gln		
115	120	125

Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly
 <210> 40
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> S0466.16B14
 <400> 40
 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30
 Val Val Gly Phe Ala Gly Asn Leu Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45
 Arg Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Val Thr Asp Val Arg Phe Leu Tyr Lys Lys Cys Ile Tyr Ser Ile
 65 70 75 80
 Ala Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly
 85 90 95
 Ile Lys Ser Ala Pro Gly Phe Thr Ser Glu Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Trp Val Ala Gln
 115 120 125
 Asn Arg Glu Tyr Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly
 <210> 41
 <211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.15E20

<400> 41

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

<210> 42

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.13C10

<400> 42

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

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

Asp Gly

<210> 43

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0510.11H24

<400> 43

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

100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Val Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Tyr Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175
Asp Gly		
<210> 44		
<211> 178		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> S0512.01M12_x103Q		
<400> 44		
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val		
1	5	10
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr		
20	25	30
Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Thr Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro		
35	40	45
Met Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr		
50	55	60
Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Arg Arg Lys Lys Cys Lys Tyr Asp Ile		
65	70	75
Val Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Val		
85	90	95
Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gln Thr Ser Glu Leu Val Arg Val Val Ser		
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Val Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Tyr Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175

Asp Gly

<210> 45

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0512.01F10_x103Q

<400> 45

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Arg His Lys Lys Cys Lys Tyr Asp Ile

65 70 75 80

Val Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Leu

85 90 95

Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gln Thr Ser Glu Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Val Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 46

<211> 174

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0510.10A04_x103Q

<400> 46

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

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

<210> 47

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.07G09

<400> 47

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

	85		90		95
Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gln Thr	Pro Glu Leu Val Arg Val Val Ser				
100	105	110			
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Val Gln					
115	120	125			
Asn Arg Glu Tyr Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu					
130	135	140			
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly					
145	150	155	160		
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile					
165	170	175			
Asp Gly					
<210> 48					
<211> 178					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> S0530.07K20					
<400> 48					
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val					
1	5	10	15		
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr					
20	25	30			
Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Ala Leu Arg Glu Asp Lys Asn Pro					
35	40	45			
Met Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr					
50	55	60			
Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Arg His Lys Lys Cys Lys Tyr Asp Ile					
65	70	75	80		
Val Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Leu					
85	90	95			
Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gln Thr Pro Glu Leu Val Arg Val Val Ser					
100	105	110			
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Val Gln					
115	120	125			
Asn Arg Glu Tyr Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu					
130	135	140			
Pro Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly					
145	150	155	160		

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 49

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.07K21

<400> 49

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Ala Leu Arg Glu Gly Arg Asp Pro
 35 40 45

Met Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Arg His Lys Lys Cys Lys Tyr Asp Ile
 65 70 75 80

Val Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Leu
 85 90 95

Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gln Thr Pro Glu Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Val Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 50

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.07G09_N65D

<400> 50

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

Asp Gly

<210> 51

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.07K20_N65D

<400> 51

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

Asn Arg Glu Tyr Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		160
165	170	175
Asp Gly		
<210> 53		
<211> 178		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> S0530.07G09_H28Q_N65D		
<400> 53		
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val		
1	5	10
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr		
20	25	30
Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Ala Arg Arg Glu Asp Lys Asp Pro		
35	40	45
Met Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr		
50	55	60
Asp Val Thr Glu Val Arg Phe Arg His Lys Lys Cys Lys Tyr Asp Ile		
65	70	75
Val Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Leu		
85	90	95
Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gln Thr Pro Glu Leu Val Arg Val Val Ser		
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Val Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Tyr Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		160
165	170	175
Asp Gly		
<210> 54		
<211> 178		
<212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> S0455.04F12

<400> 54

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

Asp Gly

<210> 55

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0455.04F23

<400> 55

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

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

Asp Gly

$\langle 210 \rangle$ 56

⟨211⟩ 178

⟨212⟩ PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> S0455.04F09

<400> 56

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

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

Asp Gly

<210> 57

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0455.04M08

<400> 57

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

Asp Gly

<210> 58

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0522.15K24

<400> 58

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

<210> 59

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0527.05N11

<400> 59

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15

```

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

```

Asp Gly

<210> 60

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0522.05A05

<400> 60

```

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

```

	85		90		95
Ile Lys Ser His Pro Gly Gly Thr Ser Gly Leu Val Arg Val Val Ser					
100		105		110	
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Ile Gln					
115		120		125	
Asn Arg Glu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu					
130		135		140	
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly					
145		150		155	
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile					
165		170		175	
Asp Gly					
<210> 61					
<211> 178					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> S0522.05M06					
<400> 61					
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val					
1	5	10		15	
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr					
20		25		30	
Val Val Gly His Ala Gly Asn Gln Trp Leu Arg Gly Asp Tyr Asp Pro					
35		40		45	
Arg Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr					
50		55		60	
Asn Val Thr Asp Val Asp Phe Ala Ile Glu Lys Cys His Tyr Arg Ile					
65	70		75		80
Thr Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Phe Gly Asn					
85		90		95	
Ile Lys Ser His Pro Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ala Arg Val Val Ser					
100		105		110	
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Ile Gln					
115		120		125	
Asn Arg Glu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu					
130		135		140	
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly					
145		150		155	
				160	

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 62

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0522.05A05_H28Q_N65D

<400> 62

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Val Gly His Ala Gly Asn Gln Trp Leu Arg Glu Gly Arg Asp Pro
 35 40 45

Arg Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asp Val Thr Asp Val Asp Phe Ala Ile Lys Lys Cys Leu Tyr Arg Ile
 65 70 75 80

Thr Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
 85 90 95

Ile Lys Ser His Pro Gly Gly Thr Ser Gly Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Ile Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 63

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> S0522.05M06_N65D

<400> 63

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

Asp Gly

<210> 64

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 3004wt = NGAL98

<400> 64

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

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtecc tctgcagcag 60

```

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcaccgc cggaaatgga 120
ttcctgcgtg aggataagga tccgctgaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cagcgtgtgg tttgactga agaaatgcta ctacgacatt 240
ggaacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatcat taaaagttag 300
ccgggccaca catcacaatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agtgggtgaa tcagaaccgc gagaattttc aaatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc      534

```

<210> 67

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.09A08

<400> 67

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggctgggc cggaaatacc 120
accctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgacgtgcaa tttagcgaga agaaatgcag ctacagcatt 240
atcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggaat taaaagtaat 300
ccgggcaaaa catcacactt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agtacgtggc acagaaccgc gagggattta atatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc      534

```

<210> 68

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.09M05

<400> 68

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcttcgc cggaaataat 120
cgtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgacgtgacc tttgaggcaa agaaatgccg ttaccgtatt 240
atcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggctacat taaaagtaaa 300
ccgggcccta catcattctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agagcgtgac ccagaaccgc gagtggtttg gaatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

```

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 69

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.09E05

<400> 69

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcctggc cggaaatgga 120
tggctgcgtg aggataagga tccgggttaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgttgtggac tttgagctga agaaatgccg ttacatgatt 240
gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgacat taaaagtttc 300
ccgggctgga catcacaatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agggagtgtg ccagaaccgc gagtggtttc acatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 70

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.09E13

<400> 70

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaatttc 120
ttcctgcgtg aggataagga tccggcaaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgtgg tttctgaata agaaatgcca atacgagatt 240
cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggctacat taaaagttac 300
ccgggctaca catcacactt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca aggttgtgca ccagaaccgc gataaat tttt ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 71

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0512.17L07

<400> 71

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggctgggc cggaataacg 120
acgctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgcag tttcctgaga agaaatgcat ttactctact 240
attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtagt 300
ccgggccaga catcacattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agtatgtgat tcagaaccgc gaggggttta atatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc      534

```

<210> 72

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0512.17010

<400> 72

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggctgggc cggaataacg 120
acgctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgcag tttccggata agaaatgcat ttactcgatt 240
attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggat taaaagtaat 300
ccgggcgata catcacattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agtatgtggt gcagaaccgc gaggggttta atatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc      534

```

<210> 73

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0512.19M08

<400> 73

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggctgggc cggaataacg 120
acgctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgcag tttcctgaga agaaatgcac gtactcgatt 240
attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagtaat 300
ccgggcgaga catcacattt ggtccgcgtc atgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

```

gtgtttcttca agtatgtgga tcagaaccgc gaggggttta atatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 74

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0512.17003

<400> 74

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggctgggc cggaaatact 120
 acgctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgatgtgcag tttccggata agaaatgcgt gtactcgatt 240
 attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggat taaaagtaat 300
 ccgggcaata catcacattt ggtccgcgtc gtgagacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agtatgtggt gcagaaccgc gaggggttta atatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 75

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0510.05H10

<400> 75

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggccttgc cggaaatggt 120
 tggctgcgtg aggataagga tccgcttaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgtggtggat tttgagetta agaaatgcag gtacatgatt 240
 gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagttct 300
 ccgggctgga catcacagtt ggtccgcgtc gtgagacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agggggtgta tcagaaccgc gagggttttc atatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 76

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.06H10

<400> 76

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggctgggc cggaaatacg 120
acgctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcgg tcatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgcag tttcccgaga aggaatgcat ttactctact 240
attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtagt 300
ccggggccaga catcacattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agtatgtgac tcagaaccgc gaggggttta atatcacgct gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

```

<210> 77

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.04N16

<400> 77

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggccttgc cggaaatggt 120
tggctgcgtg aggatgagga tccgcttaaa atgatggcgg ccgtttacga gttgagagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgtggtggat tttgagcttg aggaatgcag gtacatgact 240
gagacctttg tgccggggaa ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagttct 300
ccgggctgga catcacagct ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca aggggggtgta tcagaaccgc gagtggtttc atatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

```

<210> 78

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0544.01B06_H28Q_N65D

<400> 78

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtcg tgggctgggc cggagatacg 120
acgctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcgg tcatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgatgtcac cgatgtgcag tttcccgaga aggaatgcat ttactctact 240

```

attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtagt 300
 ccgggccaga catcacattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agtatgtgac tcagaaccgc gaggggttta atatcgcgct gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 79

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0544.04C04_H28Q_N65D

<400> 79

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctetga gcaaggtecc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtcg tgggctgggc cggaaatacg 120
 gctctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcgg tcatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat atgatgtcac cgatgtgcag tttcccgaga aggaatgcat ttactctact 240
 attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtagt 300
 ccgggccaga catcacattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agtatgtgac tcagaaccgc gaggggttta atatcgctct gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 80

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.04N16_N65D

<400> 80

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctetga gcaaggtecc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggccttgc cggaaatggt 120
 tggctgcgtg aggatgagga tccgcttaaa atgatggcgg ccgtttacga gttgagagaa 180
 gataaatcat atgacgtcac cgtggtggat tttgagcttg aggaatgcag gtacatgact 240
 gagacctttg tgccggggaa ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagttct 300
 ccgggctgga catcacagct ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agggggtgta tcagaaccgc gagtggtttc atatacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 81

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.04N16_N65Q

<400> 81

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggccttgc cggaaatggt 120
tggctgcgtg aggatgagga tccgcttaaa atgatggcgg ccgtttacga gttgagagaa 180
gataaatcat atcaggtcac cgtggtggat tttgagcttg aggaatgcag gtacatgact 240
gagacctttg tgccggggaa ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagtctt 300
ccgggctgga catcacagct ggtccgcgtc gtgagacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgttcttca aggggggtgta tcagaaccgc gagggttttc atatcacact gtacggggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 82

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S447.3 M1.1_N4

<400> 82

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaatgag 120
gttctgcgtg aggataagga tccgggaaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgaggcgtc tttcacaata agaaatgcaa ttacagcatt 240
gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtaat 300
ccgggccaaa catcaatgtt ggtccgcgtc gtgagacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgttcttca agaaagtga acagaaccgc gagggatttt ggatcacact gtacggggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 83

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S449.1 M1.1_M5

<400> 83

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggccttgc cggaaatacc 120
```

atcctgcgtg aggataagga tccgggaaaa atgaatgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgacgtgcgt tttatcatga agaaatgcca ctactacatt 240
 gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatcat taaaagtaat 300
 ccgggcacca catcacaatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agatcgtgcg tcagaaccgc gagatgtttt ggatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 84

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S449.5 M1.1_L10

<400> 84

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtecc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcatcgc cggaaatacc 120
 gttctgcgtg aggataagga tccgggaaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgt tttgcaccta agaaatgcat ctacagcatt 240
 agcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatgat taaaagtagc 300
 ccgggcggaa catcagcatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agaaagtgcg ccagaaccgc gaggtttttt ggatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 85

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S449.8 M1.1_F3

<400> 85

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtecc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcctggc cggaaataat 120
 atcctgcgtg aggataagga tccggcaaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgt tttagccaaa agaaatgcat gtacgcaatt 240
 tacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccgtat taaaagtcct 300
 ccgggcacca catcaatctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agaaagtgcg gcagaaccgc gagttctttt ggatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 86

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S449.5 M1.1_E8

<400> 86

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtatgtcg tgggcctggc cggaaatcac 120
atcctgcgtg aggataagga tccggcaaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgt tttggacgta agaaatgcca ctactggatt 240
gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcctat taaaagtac 300
ccgggcatga catcattctt ggtccgcgtc gtgagacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca aggcagtgga ccagaaccgc gagaattttt ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 87

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S437.1 M1.1_P2

<400> 87

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtatgtcg tgggcaatgc cggaaatgga 120
cgtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac ccgtgtgtgg tttaatcaaa agaaatgcaa atacgacatt 240
gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgacat taaaagtacc 300
ccgggctgga catcaaattt ggtccgcgtc gtgagacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agaattgtat gcagaaccgc gagatctttt acatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 88

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S449.1 M1.1_I7

<400> 88

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaatacc 120
 accctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgggagcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgt tttggacgta agaaatgcgg atactggatt 240
 gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgcaat taaaagttgg 300
 ccgggcatca catcaggatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agaaagtga tcagaaccgc gaggtttttt ggatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 89

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0475.06L06

<400> 89

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaatgag 120
 gtgctgcgtg atgataagga tccggggaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttcataata agaaatgcaa ttactcgatt 240
 gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtaat 300
 ccgggcgtga catcaatgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agaattgtga gcagaaccgc gaggggtttt ggatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 90

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0475.08G23

<400> 90

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaatact 120
 gtgctgcgtg atgataagga tccggggaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttcataata agaaatgcaa ttactctatt 240
 gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagttat 300
 ccgggccaga catcaatgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agaagtgaa gcagaaccgc gaggtgtttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 91

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0475.06G17

<400> 91

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaatacg 120
gtgctgcgtg acgataagga tccgggtaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgg ttccataaga agaaatgcaa ttactttatt 240
gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtcac 300
ccgggccaga catcaatggt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agaaggtgaa gcagaaccgc gaggcgtttt ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 92

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0475.03N20

<400> 92

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaatcag 120
gtgctgcgtg atgataagga tccgggtaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg ttccataata agaaatgcaa ttactggatt 240
gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtaat 300
ccgggccata catcaatggt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agaaggtgaa gcagaaccgc gaggggtttt ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 93

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0474.05F20

<400> 93

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaatacg 120
attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgaatgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgagg tttattttta agaaatgcca ttactatatt 240
gataacctttg tgccgggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtatt 300
ccgggcatga catcacagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agattgtgag gcagaaccgc gagatttttt ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 94

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0474.01H22

<400> 94

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaatact 120
attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgaatgcaa ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgatgtgagg tttatttagga agaaatgcca ttactatatt 240
gataacctttg tgccgggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtatt 300
ccgggcacta catcacagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agattgtgag gcagaaccgc gagatttttt ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 95

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0475.06L06_N65D_S79F

<400> 95

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaatag 120
gtgctgcgtg atgataagga tccggggaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgatgtcac cgaggtgagg tttcataata agaaatgcaa ttacttcatt 240
gagacctttg tgccgggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtaat 300
```

ccgggcgtga catcaatgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agaattgtgaa gcagaaccgc gaggggtttt ggatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 96

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0475.06L06_N65Q_S79F

<400> 96

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtecc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtc tgggcgtggc cggaaatgag 120
 gtgctgcgtg atgataagga tccggggaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat atcaggtcac cgaggtgagg tttcataata agaatgcaa ttacttcatt 240
 gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtaat 300
 ccgggcgtga catcaatgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agaattgtgaa gcagaaccgc gaggggtttt ggatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 97

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0474.01H22_T54A_N65D

<400> 97

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtecc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtc tgggcgtggc cggaaatact 120
 attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgaatgcag ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat atgatgtcac cgatgtgagg tttattagga agaatgcca ttactatatt 240
 gataaccttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtatt 300
 ccgggcacta catcacagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agattgtgag gcagaaccgc gagatttttt ggatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 98

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0474.01H22_T54A_N65Q

<400> 98

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtatgtcg tgggcgtggc cggaaatact 120
attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgaatgcag ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atcaggtcac cgatgtgagg tttattagga agaaatgcca ttactatatt 240
gataaccttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtatt 300
ccgggcacta catcacagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agattgtgag gcagaaccgc gagatttttt ggatcacact gtacggggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 99

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0474.01H22_H28Q_T54A_N65D

<400> 99

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggtatgtcg tgggcgtggc cggaaatact 120
attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgaatgcag ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgatgtcac cgatgtgagg tttattagga agaaatgcca ttactatatt 240
gataaccttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtatt 300
ccgggcacta catcacagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agattgtgag gcagaaccgc gagatttttt ggatcacact gtacggggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 100

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0474.01H22_N65Q

<400> 100

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtatgtcg tgggcgtggc cggaaatact 120
attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgaatgcaa ccatttacga gttgaaagaa 180
```

gataaatcat atcaggtcac cgatgtgagg tttatttagga agaaatgcca ttactatatt 240
 gatacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagttat 300
 ccgggcacta catcacagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agattgtgag gcagaaccgc gagatttttt ggatcacact gtacggggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 101

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.14D07

<400> 101

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctetga gcaaggtecc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcttcgc cggaaattgg 120
 atgctgcgtg aggataagga tccgcacaaa atgaatgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgaggtgaaa tttcaagcaa agaaatgcat ctacagcatt 240
 cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatcat taaaagtaat 300
 ccgggcggaa catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agtgggtgca ccagaaccgc gagttctttc aaatcacact gtacggggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 102

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.05N20

<400> 102

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctetga gcaaggtecc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcttcgc cggaaatcgt 120
 tggctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgtacgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac ccaagtgaat ttttggetga agaaatgcgc atacagcatt 240
 agcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccgtat taaaagtatc 300
 ccgggcccta catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agaccgtgat ccagaaccgc gagttctttg agatcacact gtacggggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 103

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.16B14

<400> 103

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcttcgc cggaaatctg 120
ctgctgcgtg aggataagga tccgcgtaaa atgcgtgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgacgtgcgt tttctgtaca agaaatgcat ctacagcatt 240
gcaacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggaat taaaagtgcg 300
ccgggcttca catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgttcttca agtgggtggc acagaaccgc gagtactttg agatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 104

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.15E20

<400> 104

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcttcgc cggaaattgg 120
cgtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgagcgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac caatgtgcgt ttttggccta agaaatgccg ttacagcatt 240
agcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatgat taaaagtcct 300
ccgggcggaa catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgttcttca agtgggtgtt ccagaaccgc gagttctttg agatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 105

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0466.13C10

<400> 105

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
```

```

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgaggc cggaaatctg 120
gcactgcgtg aggataagga tccgaaaaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgt tttcgtcaca agaaatgcca atacgacatt 240
gcaacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcctgat taaaagtgac 300
ccgggccaaa catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agaaagtggg tcagaaccgc gagttctttt ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc      534

```

<210> 106

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0510.11H24

<400> 106

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120
gctctgcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcaga agaaatgcaa gtacgatatt 240
gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300
ccgggccaga catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agaaggtggg tcagaaccgc gagtatTTTT ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc      534

```

<210> 107

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0512.01M12_X103Q

<400> 107

```

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120
actctgcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcgta agaaatgcaa gtacgatatt 240
gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgtgat taaaagtgat 300
ccgggccaga catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agaaggtggg tcagaaccgc gagtatTTTT ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

```

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 108

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0512.01F10_X103Q

<400> 108

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120

gctctgcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240

gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300

ccgggccaga catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttcttca agaagtggtg tcagaaccgc gagtatTTTT ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 109

<211> 522

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0510.10A04_X103Q

<400> 109

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120

gctctgcgtg aggataagga tccgaagaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttcgggtata agaaatgccca gtacgatatt 240

gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taagttagcc gggccagaca 300

tcagagttgg tccgcgtcgt gagcaccaac tacaaccage atgcatggt gttcttcaag 360

aaggtggtgc agaaccgcga gtttttttgg atcacactgt acgggcgcac gaaagaactg 420

acaagcgagc tgaaggaaaa ttttatccgc ttttccaaat ctctgggcct ccctgaaaac 480

cacatcgtct tccctgtccc aatcgaccag tgtatcgacg gc 522

<210> 110

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.07G09

<400> 110

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtatgtcg tgggcgaggc cggaatctt 120
gctcggcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240
gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300
ccgggccaga caccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agaaggtggt ccagaaccgc gagtatTTTT ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 111

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.07K20

<400> 111

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtatgtcg tgggcgaggc cggaatctt 120
gctctgcgtg aggataagaa tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240
gttaccttcg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300
ccgggccaga cgccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agaaggtggt tcagaaccgc gagtatTTTT ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgccaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 112

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.07K21

<400> 112

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtatgtcg tgggcgaggc cggaatctt 120
gctctgcgtg agggtaggga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240
gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300
ccgggccaga caccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
```

gtgtttcttca agaaggtggt tcagaaccgc gagtattttt ggatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 113

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.07G09_N65D

<400> 113

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120
 gctcggcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat atgacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240
 gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300
 ccgggccaga caccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agaaggtggt ccagaaccgc gagtattttt ggatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 114

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.07K20_N65D

<400> 114

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120
 gctctgcgtg aggataagaa tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat atgacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240
 gttaccttcg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300
 ccgggccaga cgccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agaaggtggt tcagaaccgc gagtattttt ggatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgccaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 115

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.07K21_N65D

<400> 115

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120
gctctgcgtg agggtaggga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240
gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300
ccgggccaga caccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agaaggtggt tcagaaccgc gagtatTTTT ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 116

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0530.07G09_H28Q_N65D

<400> 116

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120
gctcggcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240
gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300
ccgggccaga caccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agaaggtggt ccagaaccgc gagtatTTTT ggatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 117

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0455.04F12

<400> 117

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcctggc cggaaatctt 120
ctgctgcgtg aggataagga tccgcacaaa atgctggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac ccacgtgacc tttaaatgga agaaatgcta ctacgcaatt 240
```

cgtacctttg tgccgggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatgat taaaagttag 300
 ccgggccaca catcaatgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agtgggtgga ccagaaccgc gaggagtttc tgatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 118

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0455.04F23

<400> 118

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctetga gcaaggtecc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtc tgggccacgc cggaaatcaa 120
 tggctgcgtg aggataagga tccgcgtaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgacgtggac tttgcaatca agaaatgcca ctaccgtatt 240
 accacctttg tgccgggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtcac 300
 ccgggcggaa catcaggatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agttcgtgat ccagaaccgc gaggcatttt tcatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 119

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0455.04F09

<400> 119

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctetga gcaaggtecc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtc tgggcatggc cggaaatttc 120
 cacctgcgtg aggataagga tccgagcaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac ccacgtgcct ttttgggcaa agaaatgcgc atacaaaatt 240
 atcacctttg tgccgggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgcaat taaaagtgga 300
 ccgggcatga catcatggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agggagtgtg gcagaaccgc gagacctttg ttatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 120

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0455.04M08

<400> 120

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaattac 120
tggctgcgtg aggataagga tccggcaaaa atgtacgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac cgacgtgcgt ttttggcgta agaaatgccg ttacgacatt 240
tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcctat taaaagtgag 300
ccgggccaaa catcacggtt ggtccgcgtc gtgagacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttctca agctggtgcg tcagaaccgc gaggcattta atatcacact gtacggggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gtttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 121

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0522.15K24

<400> 121

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtc tgggcatggc cggaaatttc 120
cacctgcgtg aggataagga tccgagcaag atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat ataacgtcac ccacgtgcct ttttgggcaa agaaatgcgc atacaaaact 240
atcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgcaat taaaagtgga 300
ccgggcatga catcatggtt ggtccgcgtc gtgagacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttctca agggagtgtg gcagaaccgc gagacctttg ttatcacact gtacggggcgc 420
gcgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gtttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 122

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0527.05N11

<400> 122

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtc tgggcatggc cggaaatttc 120
```

cacctgcgtg aggataagga tccgagcaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac ccacgtgcct ttttgggcaa agaaatgcgc atacaaaact 240
 atcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgcaat taaaagtgga 300
 ccgggcatga catcatggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttctcca agggagtggt gcagaaccgt gagacctttg ttatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 123

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0522.05A05

<400> 123

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggccacgc cggaaatcaa 120
 tggctgcgtg agggtaggga tccgcgtaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgacgtggac tttgcaatca agaaatgcct ctaccgtatt 240
 accacctttg tgccaggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtcac 300
 ccgggcggaa catcaggatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agttcgtgat ccagaaccgc gaggcatttt tcatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 124

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0522.05M06

<400> 124

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggccacgc cggaaatcaa 120
 tggctgcgtg gggattacga tccgcgtaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac cgacgtggac tttgcaatcg agaaatgcca ctaccgtatt 240
 accacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt ttggcaatat aaaaagtcac 300
 ccgggcggaa catcaggatt ggcccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgtttcttca agttcgtgat ccagaaccgc gaggcatttt tcatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 125

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0522.05A05_H28Q_N65D

<400> 125

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtcg tgggccacgc cggaaatcaa 120
tggctgcgtg agggtaggga tccgcgtaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgacgtcac cgacgtggac tttgcaatca agaaatgcct ctaccgtatt 240
accacctttg tgccagggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtcac 300
ccgggcggaa catcaggatt ggtccgcgtc gtgagacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agttcgtgat ccagaaccgc gaggcatttt tcatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 126

<211> 534

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> S0522.05M06_N65D

<400> 126

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggccacgc cggaaatcaa 120
tggctgcgtg gggattacga tccgcgtaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgacgtcac cgacgtggac tttgcaatcg agaaatgcca ctaccgtatt 240
accacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt ttggcaatat aaaaagtcac 300
ccgggcggaa catcaggatt ggcccgcgtc gtgagacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agttcgtgat ccagaaccgc gaggcatttt tcatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534
```

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白的C-末端序列

<400> 127

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5 10

<210> 128

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SA接头和Strep标签II

<400> 128

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 129

<211> 200

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 表达的蛋白氨基酸序列

<400> 129

Met Lys His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln

35 40 45

Phe His Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Val Ala Gly Asn Thr Ile Leu

50 55 60

Arg Glu Asp Lys Asp Pro Gly Lys Met Asn Ala Thr Ile Tyr Glu Leu

65 70 75 80

Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asn Val Thr Asp Val Arg Phe Ile Arg Lys

85 90 95

Lys Cys His Tyr Tyr Ile Asp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly

100 105 110

Glu Phe Thr Leu Gly Asn Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Thr Ser Gln

115 120 125

Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe

130 135 140

Phe Lys Ile Val Arg Gln Asn Arg Glu Ile Phe Trp Ile Thr Leu Tyr

145 150 155 160

Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg

	165		170		175										
Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val
			180					185						190	
Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile	Asp	Gly								
			195					200							

<210> 130

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 位置95-98

<400> 130

Gly Asn Ile Lys

1

<210> 131

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 清蛋白结合肽的例子

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa可以是下列任一种:Asp, Asn, Ser, Thr, 或Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa可以是下列任一种:Asn, Gln, His, Ile, Leu, 或Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa可以是下列任一种:Ala, Asp, Phe, Trp, 或Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa可以是下列任一种:Asp, Gly, Leu, Phe, Ser, 或Thr

<400> 131

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys

1

5

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 132

Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr

1 5

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

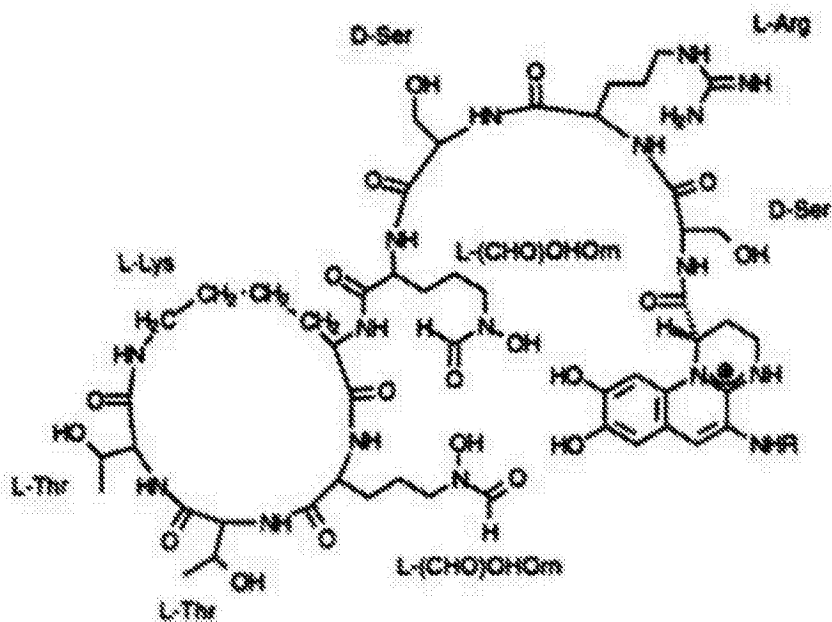
<223> 蛋白酶切割位点

<400> 133

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

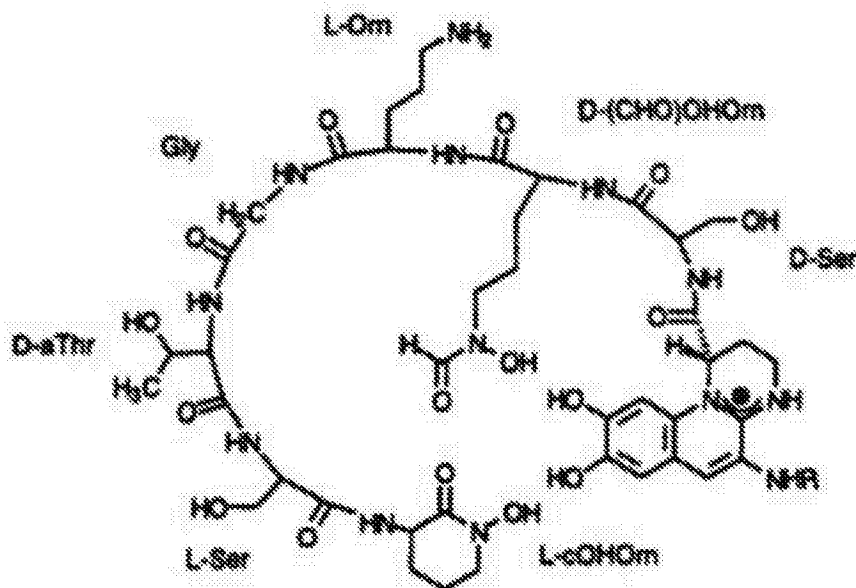
A



PVD组 I

铜绿假单胞菌 ATCC 15692 (PAO1)

B

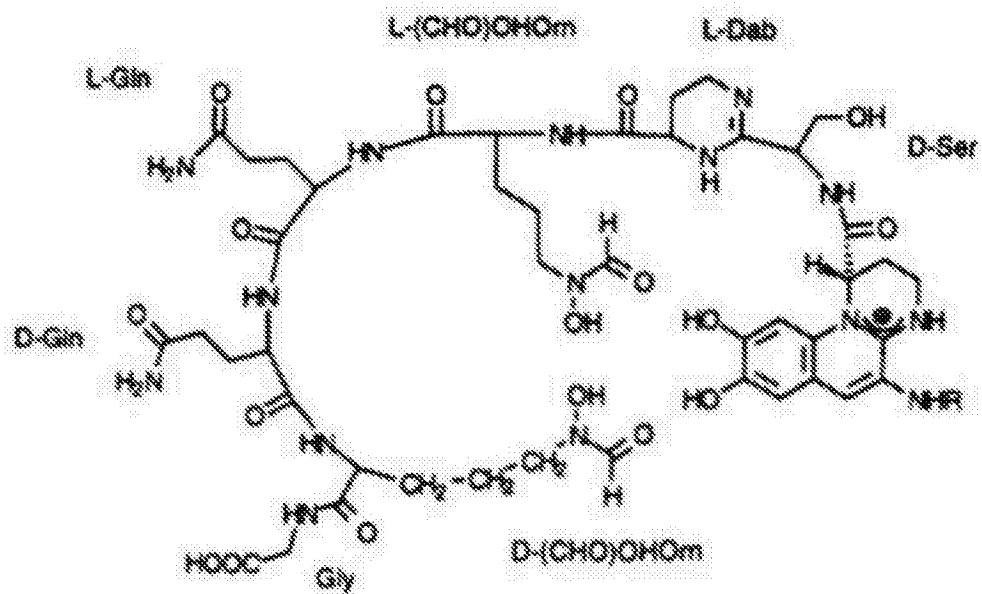


PVD组 II

铜绿假单胞菌 ATCC 27853

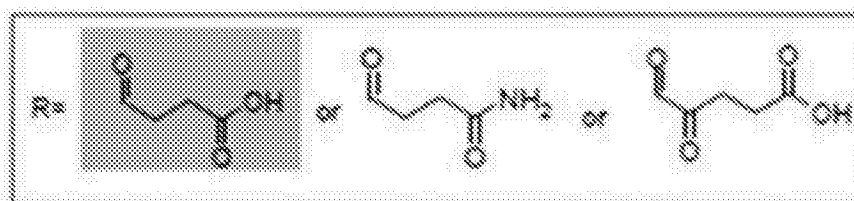
图1

C



PVD组Ⅲ
铜绿假单胞菌R和IPa6

D



E

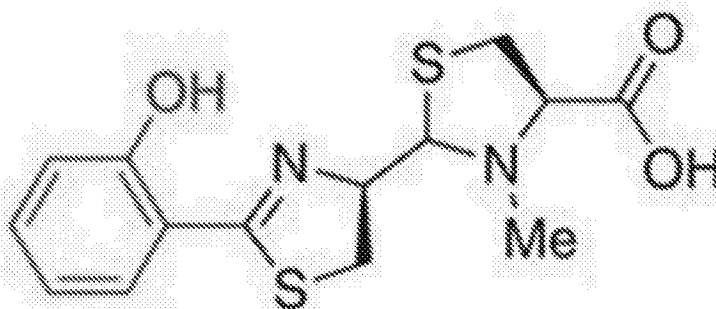


图1 (续)

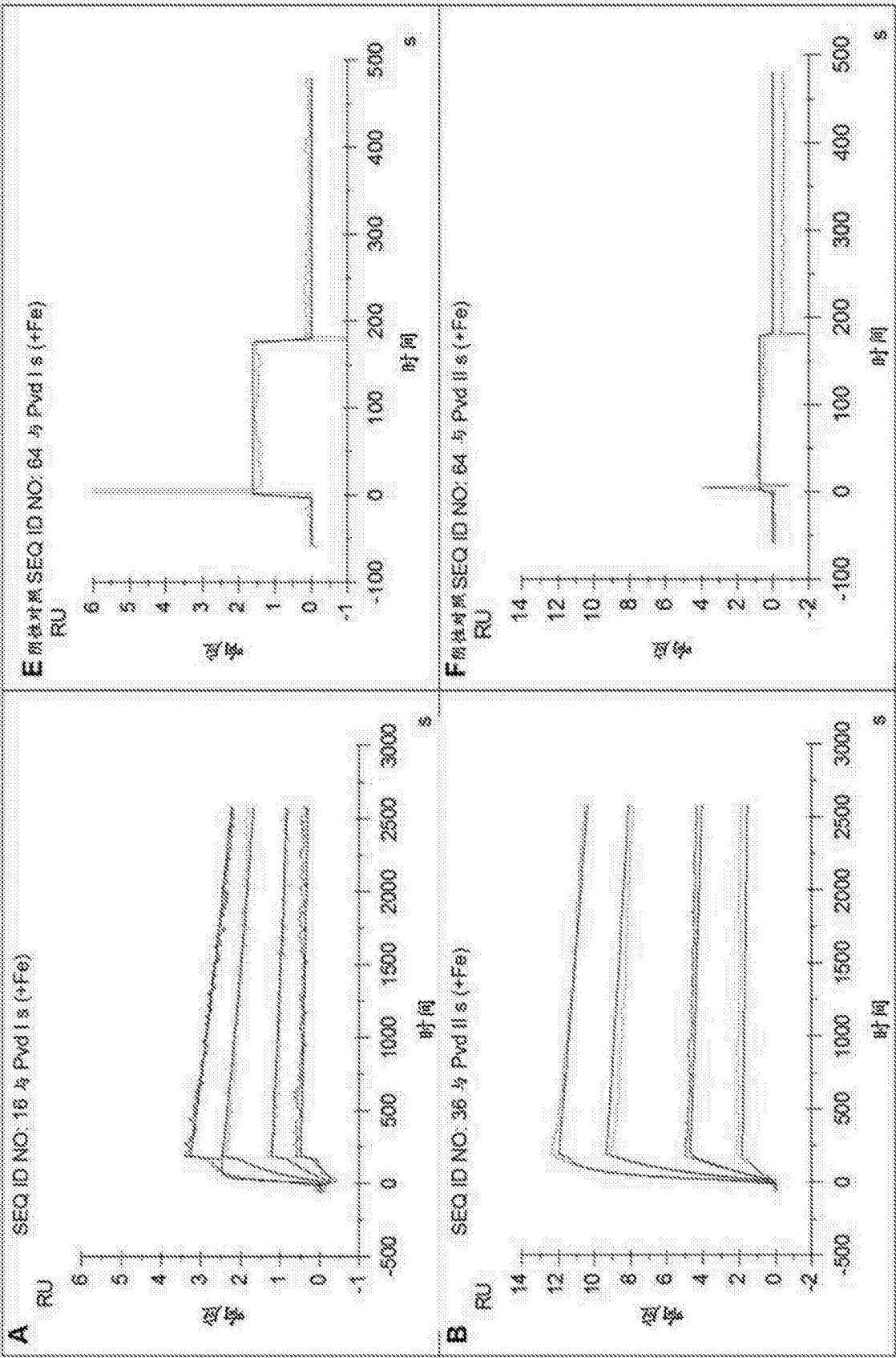


图2

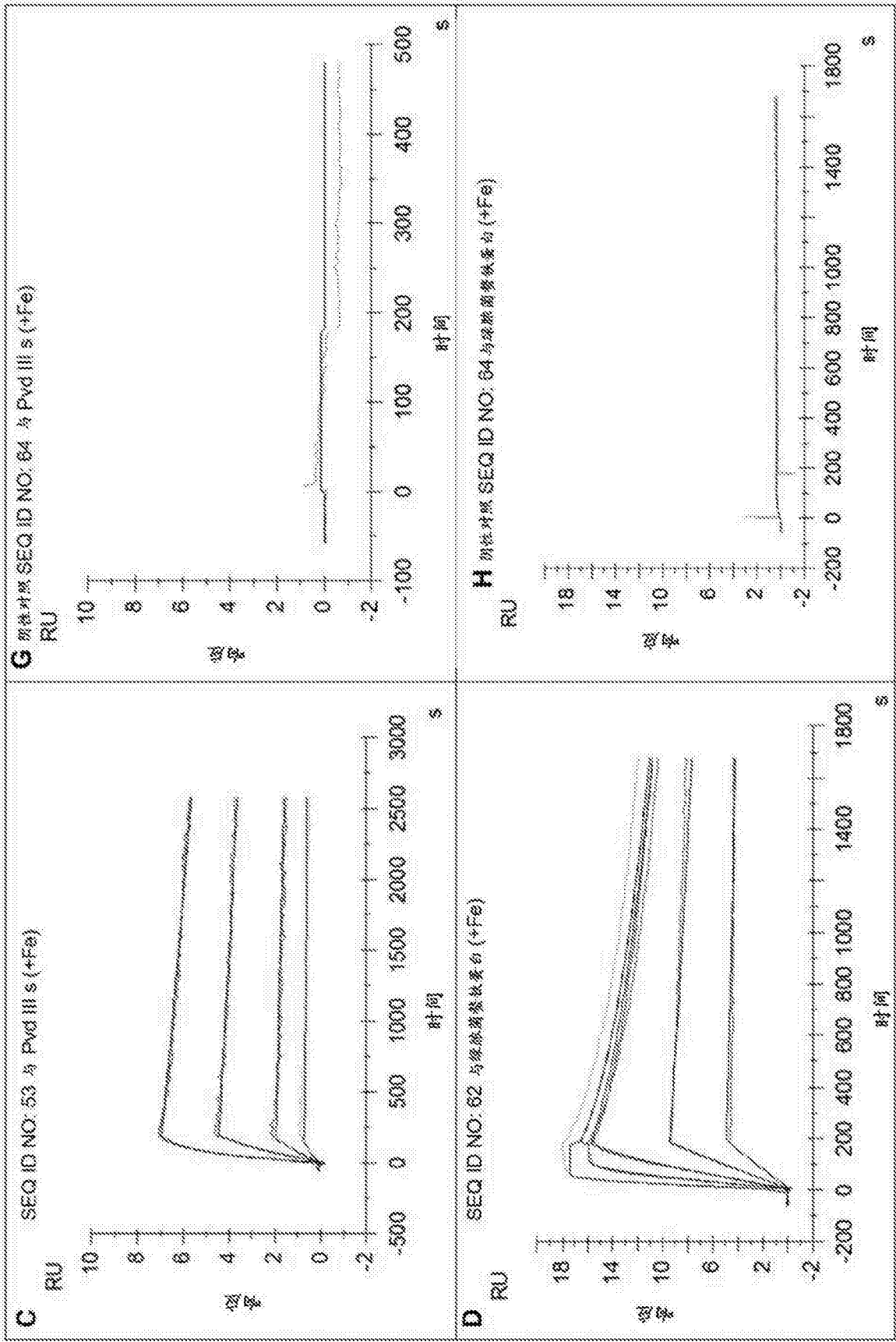


图2(续)

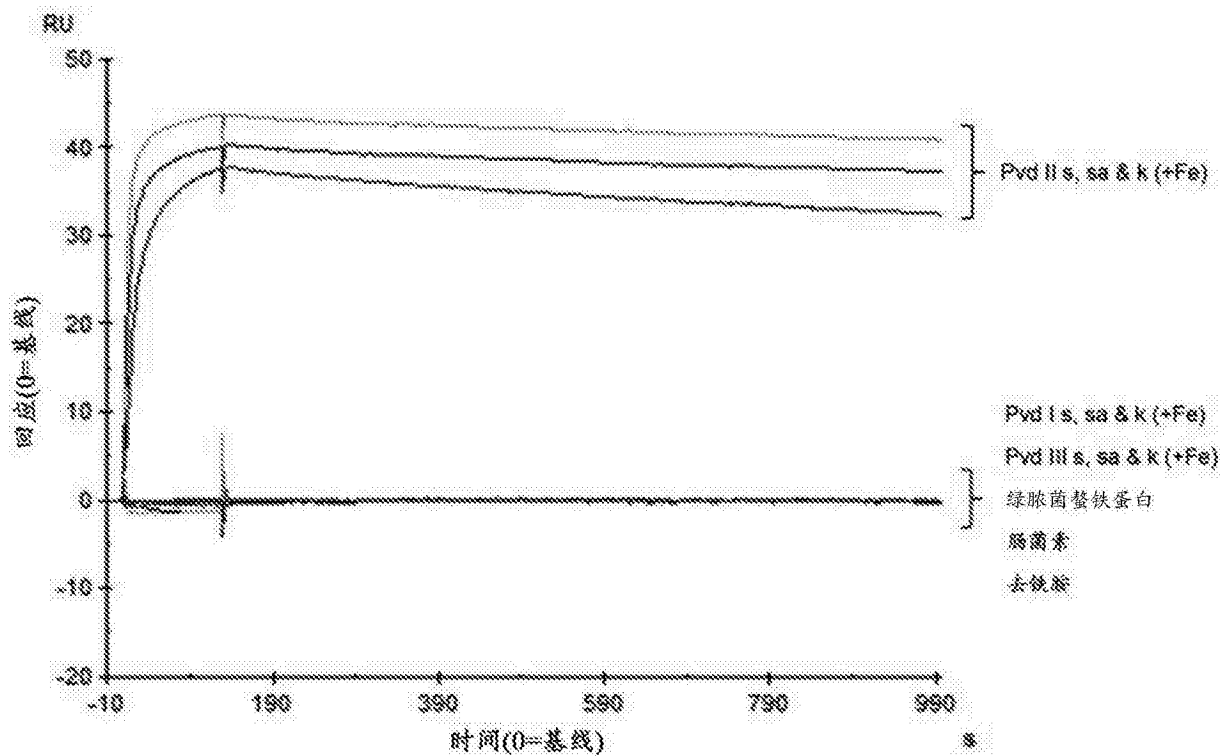


图3

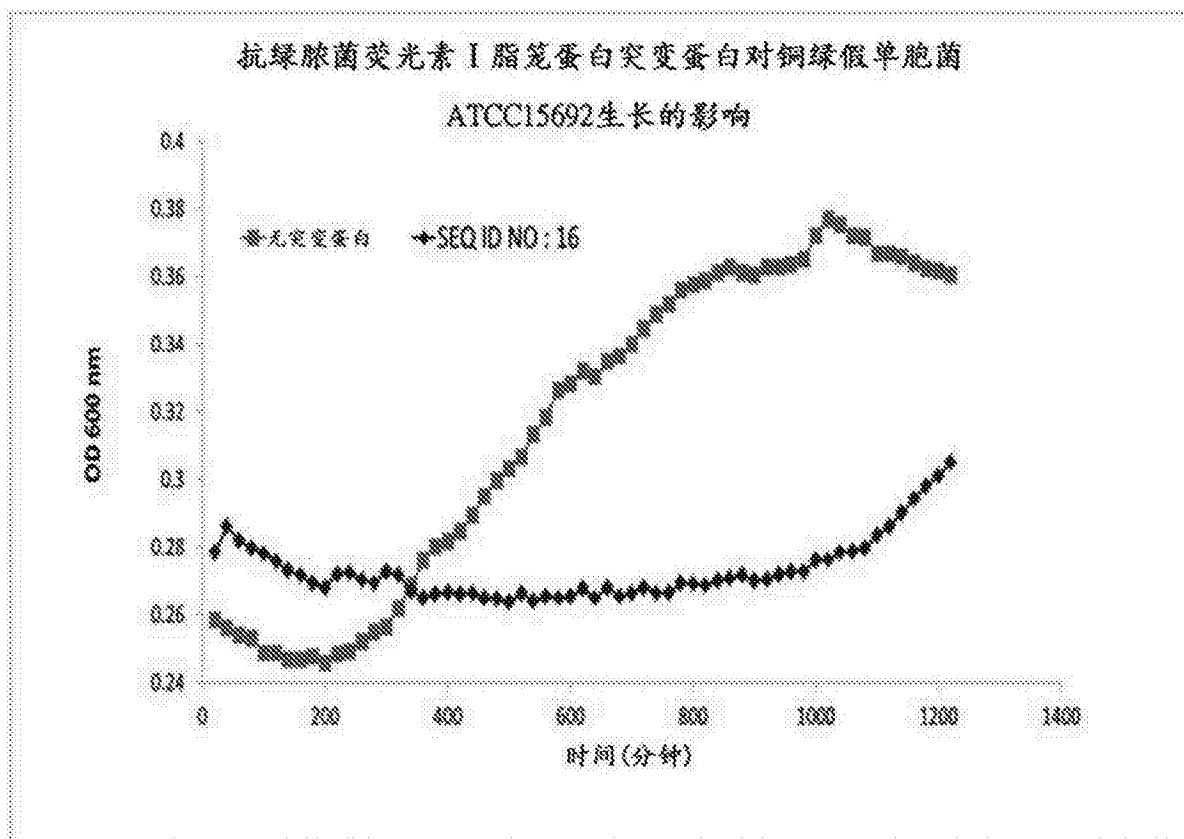


图4A

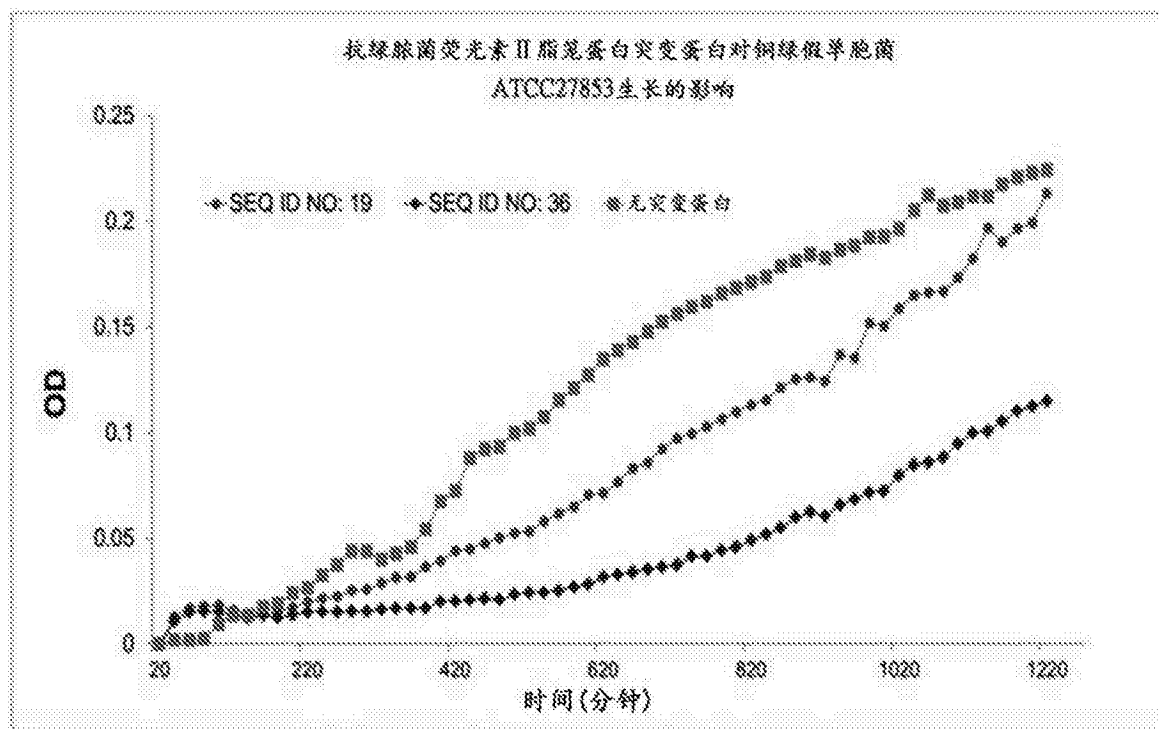


图4B

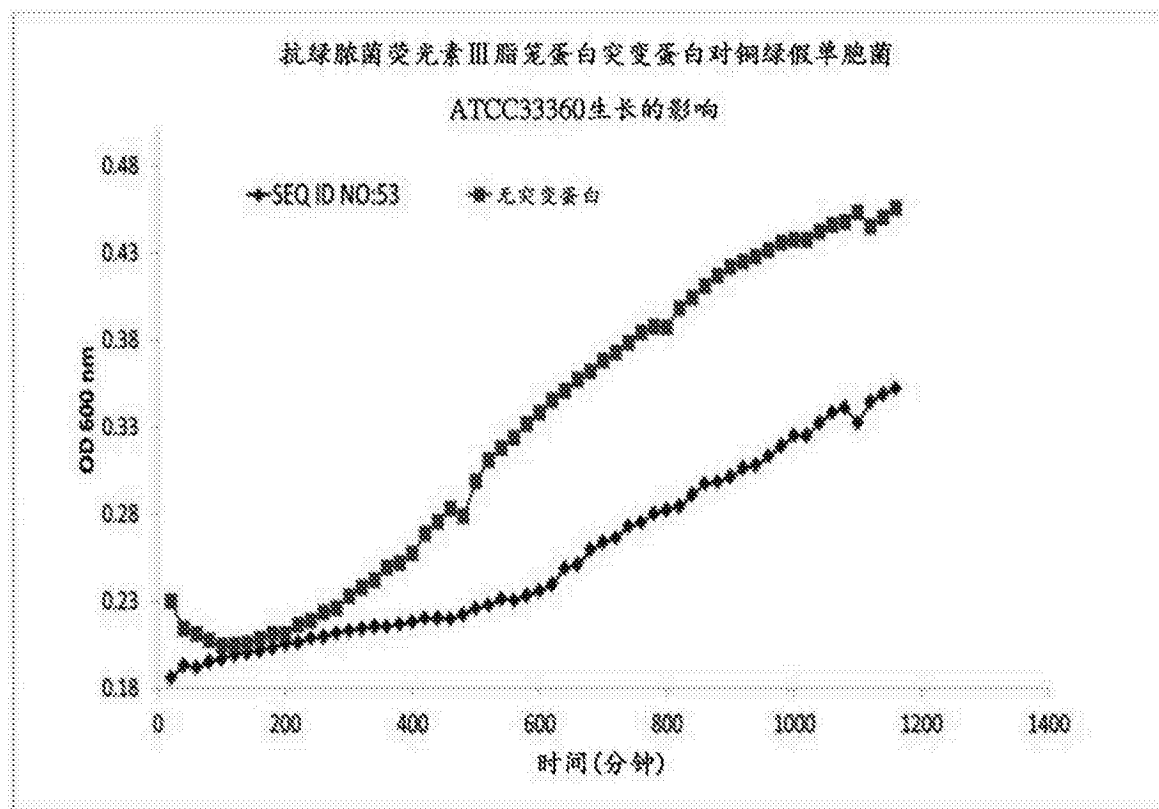


图4C

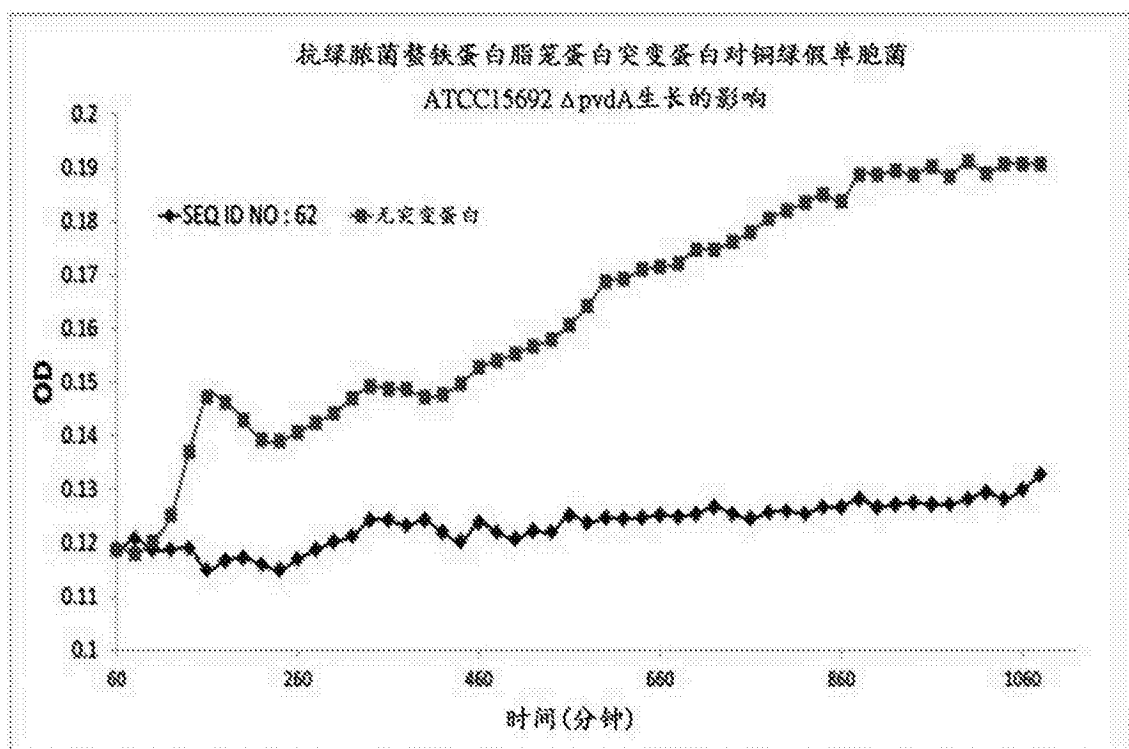


图4D

SEQ ID NO: 19在小鼠中铜绿假单胞菌诱导的肺感染中的剂量效应

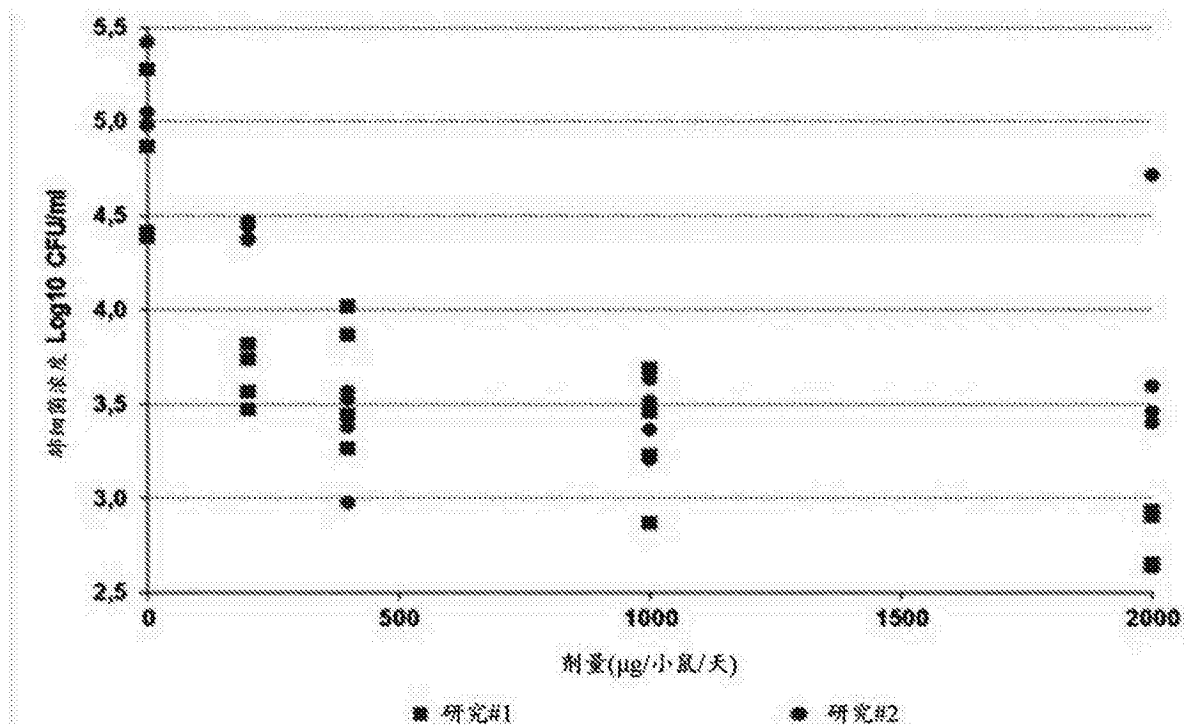


图5

表达的蛋白质氨基酸序列 (SEQ ID NO: 129)

MKHHHHHDYDIPTTENLYFQGQDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHG
KWYVVG VAGNTILREDKDPGKM NATIYELKEDKSYNVTDVRFIRKKCHYYIDT
FVPGSQPG EFTLGNIKSYPGTTSQLVRV VSTNYNQHAMVFFKIVRQNREIFW
ITLYGR TKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG

图6

Pvd-Fc复合物结构，来自不对称单元的两个SEQ ID NO:31分子，即链A和链B是重叠的。

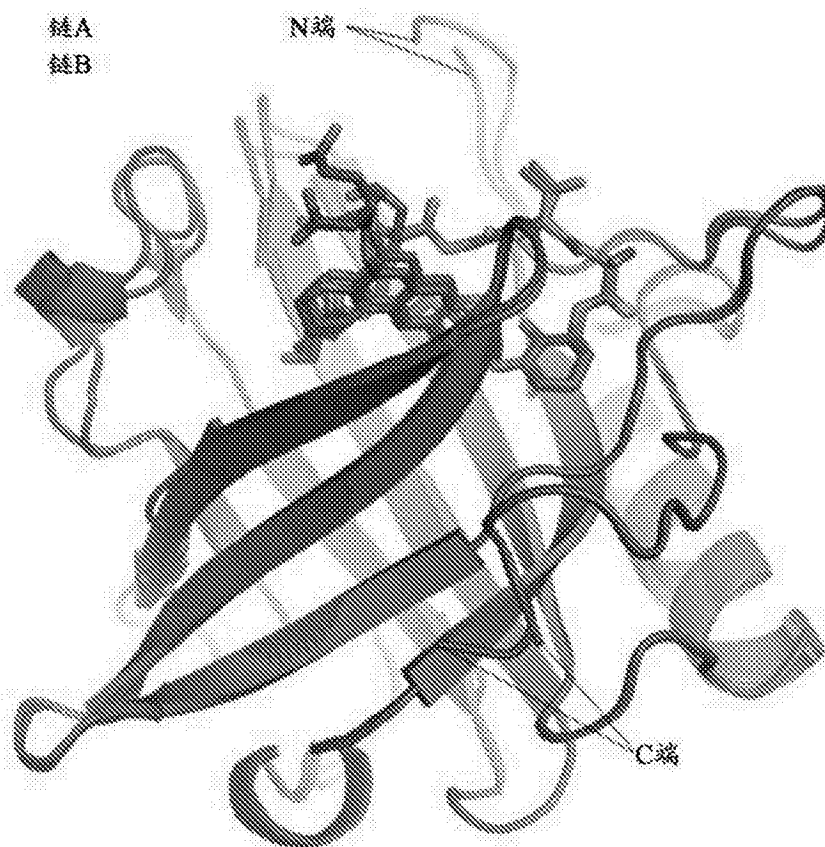


图7

SEQ ID NO:31和Pvd-Fe相互作用,来自不对称单元的两个分子是重叠的。
描述了与Pvd-Fe相互作用的侧链

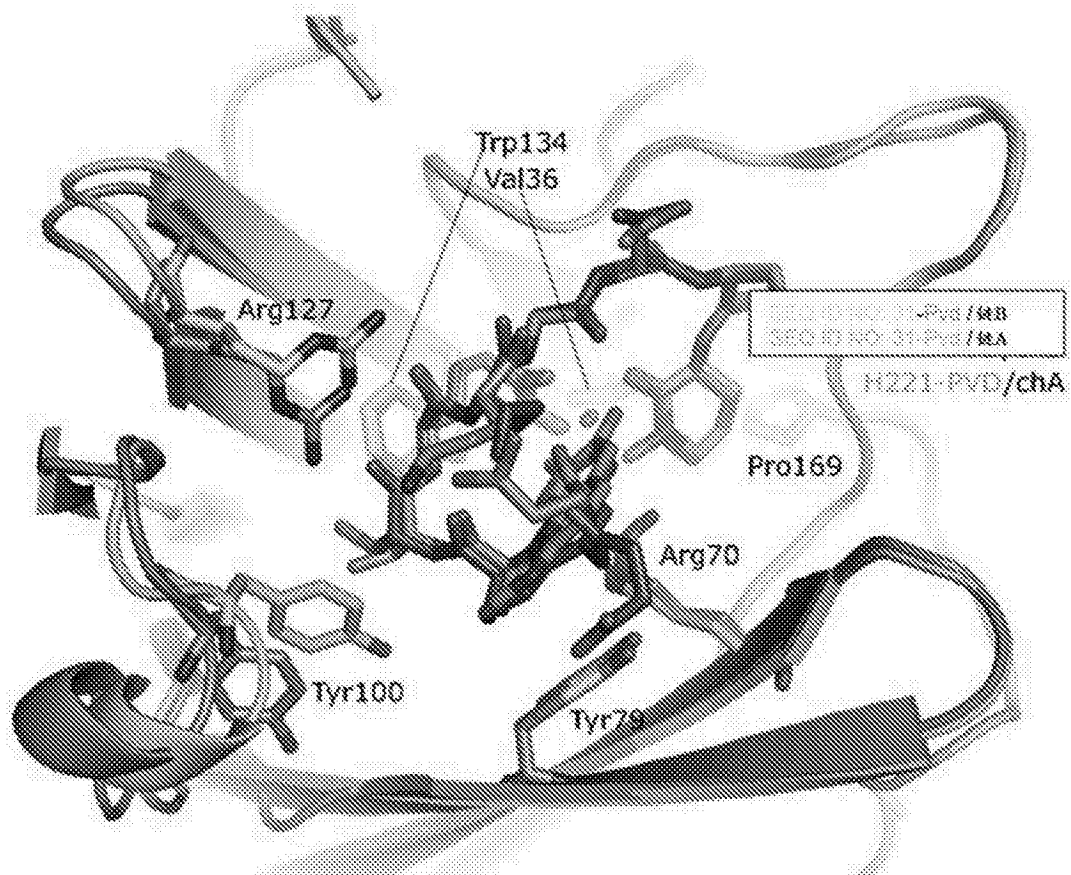


图8

Pvd组成,参与铁结合的氧原子被框出

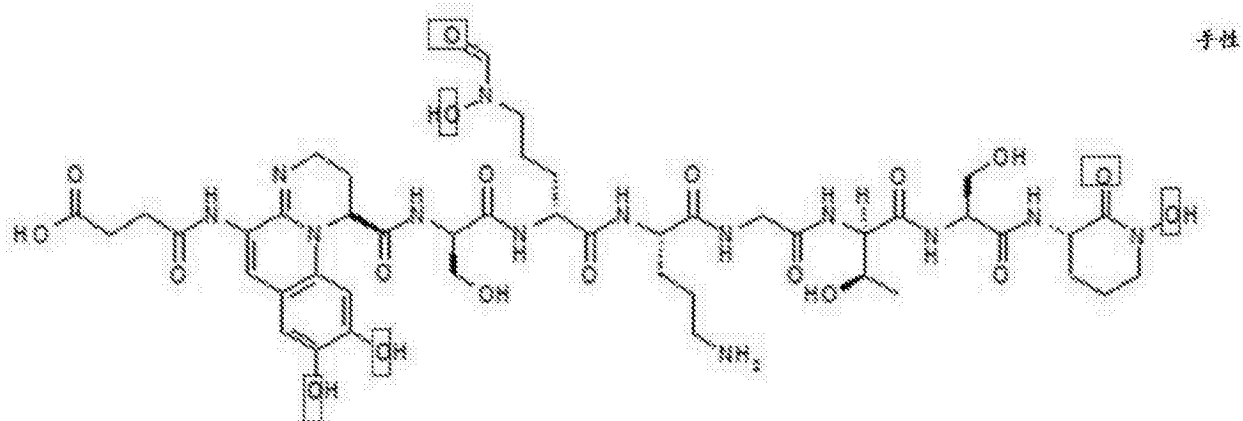


图9