

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780003623.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 2 月 25 日

[11] 公开号 CN 101375161A

[22] 申请日 2007.1.23

[21] 申请号 200780003623.2

[30] 优先权

[32] 2006.1.27 [33] US [31] 60/763,023

[86] 国际申请 PCT/US2007/001687 2007.1.23

[87] 国际公布 WO2007/089470 英 2007.8.9

[85] 进入国家阶段日期 2008.7.25

[71] 申请人 默克公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 M·J·布朗 A·S·安德森

L·D·科普 K·U·延森

T·麦尼利 B·哈维 E·杜尔

R·埃恩斯特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 刘玥

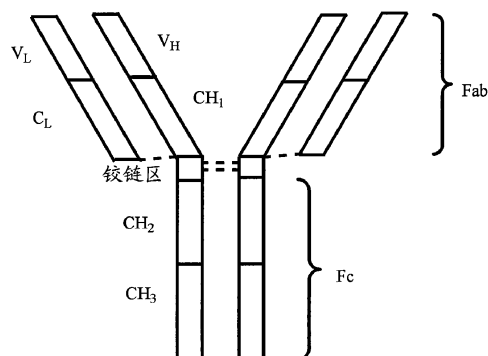
权利要求书 4 页 说明书 45 页 序列表 36 页
附图 5 页

[54] 发明名称

靶定金黄色葡萄球菌 ORF0657n 的抗原结合蛋白

[57] 摘要

本发明表征了与 ORF0657n 靶区域 (SEQ ID NO: 1) 结合的抗原结合蛋白。ORF0657n 是一种金黄色葡萄球菌蛋白。通过 mAb 1G3. BD4、mAb 2H2. BE11、mAb 13C7. BC1 和 mAb 13G11. BF3 结合位点提供 ORF0657n 靶区域。在致死模型攻击中, 提供了 mAb 2H2. BE11 和 mAb13C7. BC1, 用于增加抗金黄色葡萄球菌感染的存活率。也在离体模型中用 IgG1 或 IgG2b 形式的 mAb 2H2 证明了保护作用; 并且用 mAb2H2. BE11 在被动免疫鼠留置导管模型中证明了保护作用。



1. 分离的抗原结合蛋白，其包含第一可变区和第二可变区，其中所述结合蛋白结合于选自下组的靶区域： mAb 1G3.BD4 靶区域、mAb 2H2.BE11 靶区域、mAb 13C7.BC1 和 mAb 13G11.BF3 靶区域。

2. 权利要求 1 的结合蛋白，其中所述靶区域是 mAb 2H2.BE11 靶区域，并且所述第一可变区是包含以下成分的 V_h 区：

第一 V_h CDR，其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 36 - 45 或与氨基酸 36 - 45 有一个氨基酸不同的序列；

第二 V_h CDR，其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 50 - 65 或与氨基酸 50 - 65 有一个氨基酸不同的序列；和

第三 V_h CDR，其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 98-107 或与氨基酸 98-107 有一个氨基酸不同的序列。

3. 权利要求 2 的结合蛋白，其中所述第二可变区是包含以下成分的 V_l 区：

第一 V_l CDR，其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 24-33 或与氨基酸 24-33 有一个氨基酸不同的序列；

第二 V_l CDR，其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 49-55 或与氨基酸 49-55 有一个氨基酸不同的序列；和

第三 V_l CDR，其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 88-96 或与氨基酸 88-96 有一个氨基酸不同的序列。

4. 权利要求 3 的结合蛋白，其中所述结合蛋白是抗体。

5. 权利要求 4 的结合蛋白，其中所述抗体是单克隆抗体。

6. 权利要求 4 的结合蛋白，其中所述 V_h 区是 SEQ ID NO: 20、人源化的 SEQ ID NO: 20 或脱免疫的 SEQ ID NO: 20；并且所述 V_l 区是 SEQ ID NO: 21、人源化的 SEQ ID NO: 21 或脱免疫的 SEQ ID NO: 21。

7. 权利要求 6 的结合蛋白，其中所述结合蛋白是包含以下成分的抗体：(a)重链，其包含所述 V_h 区和来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型的人铰链区、CH₁ 区、CH₂ 区和 CH₃ 区，和(b)轻链，其包含所述 V_l 区和人 κ CL 或人 λ CL。

8. 权利要求 3 的结合蛋白，其中

所述 V_h 区包含：由 SEQ ID NO:20 的氨基酸 36 - 45 组成的所述第一 V_h CDR，由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 50 - 65 组成的所述第二 V_h

CDR, 和 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 98 - 107 组成的所述第三 V_h CDR;

所述第一 V_l 区包含: 由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 24 - 33 组成的所述第一 V_l CDR, 由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 49-55 组成的所述第二 V_l CDR, 和由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 88-96 组成的所述第三 V_l CDR。

9. 权利要求 8 的结合蛋白, 其中所述结合蛋白是抗体。

10. 权利要求 9 的结合蛋白, 其中所述抗体是单克隆抗体。

11. 权利要求 9 的结合蛋白, 其中所述 V_h 区是 SEQ ID NO: 20、人源化的 SEQ ID NO: 20 或脱免疫的 SEQ ID NO: 20; 并且所述 V_l 区是 SEQ ID NO: 21、人源化的 SEQ ID NO: 21 或脱免疫的 SEQ ID NO: 21。

12. 权利要求 8 的结合蛋白, 其中所述结合蛋白是包含以下成分的抗体: (a)重链, 其包含所述 V_h 区和来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型的人铰链区、CH₁ 区、CH₂ 区和 CH₃ 区, 和(b)轻链, 其包含所述 V_l 区和人 κ CL 或人 λ CL。

13. 权利要求 12 的结合蛋白, 其中所述重链基本由 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列组成; 并且所述轻链基本由 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列组成。

14. 包含重组基因的核酸, 所述基因包含编码抗体可变区的核苷酸序列, 所述抗体可变区结合于选自下组的靶区域: mAb IG3.BD4 靶区域、mAb 2H2.BE11 靶区域、mAb 13C7.BC1 和 mAb 13G11.BF3 靶区域。

15. 权利要求 14 的核酸, 其中所述靶区域是 mAb 2H2.BE11 靶区域, 并且所述可变区是包含以下成分的 V_h 区:

第一 V_h CDR, 其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 36 - 45 或与氨基酸 36 - 45 有一个氨基酸不同的序列;

第二 V_h CDR, 其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 50 - 65 或与氨基酸 50 - 65 有一个氨基酸不同的序列; 和

第三 V_h CDR, 其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 98-107 或与氨基酸 98-107 有一个氨基酸不同的序列。

16. 权利要求 15 的核酸, 其中所述 V_h 区包含: 由 SEQ ID NO:20 的氨基酸 36 - 45 组成的所述第一 V_h CDR; 由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 50 - 65 组成的所述第二 V_h CDR, 和由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 98 - 107 组成的所述第三 V_h CDR。

17. 权利要求 14 的核酸, 其中所述可变区是 SEQ ID NO: 20、人源

化的 SEQ ID NO: 20 或脱免疫的 SEQ ID NO: 20。

18. 权利要求 17 的核酸，其中所述重组基因编码抗体重链，所述重链包含所述可变区和来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型的人铰链区、CH1 区、CH2 区和 CH3 区。

19. 权利要求 14 的核酸，其中所述可变区是包含以下成分的 V_H 区：

第一 V_H CDR，其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 24-33 或与氨基酸 24-33 有一个氨基酸不同的序列；

第二 V_H CDR，其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 49-55 或与氨基酸 49-55 有一个氨基酸不同的序列；和

第三 V_H CDR，其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 88-96 或与氨基酸 88-96 有一个氨基酸不同的序列。

20. 权利要求 19 的核酸，其中所述第一 V_H 区包含：由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 24 - 33 组成的所述第一 V_H CDR，由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 49-55 组成的所述第二 V_H CDR，和由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 88-96 组成的所述第三 V_H CDR。

21. 权利要求 14 的核酸，其中所述可变区是 SEQ ID NO: 21、人源化的 SEQ ID NO: 21 或脱免疫的 SEQ ID NO: 21。

22. 权利要求 17 的核酸，其中所述重组基因编码抗体轻链，所述抗体轻链包含所述可变区和人 κ 或 λCL。

23. 重组细胞，包含一个或多个权利要求 14 - 22 的任一项的核酸。

24. 权利要求 23 的重组细胞，其中所述细胞包含权利要求 18 的核酸和权利要求 22 的核酸。

25. 生产包含抗体可变区的蛋白的方法，包括以下步骤：

- a) 在表达所述蛋白的条件下培养权利要求 23 的重组细胞；和
- b) 纯化所述蛋白。

26. 生产包含抗体可变区的蛋白的方法，包括以下步骤：

- a) 在表达所述蛋白的条件下培养权利要求 24 的重组细胞；和
- b) 纯化所述蛋白。

27. 药物组合物，包含权利要求 1 - 13 的任一项的结合蛋白和药学可接受的载体。

28. 检测溶液中或细胞上 OFR0657n 抗原的存在的方法，该方法包括以下步骤：(a)给所述溶液或所述细胞提供权利要求 1 - 13 的任一项的

结合蛋白；和(b)测量所述结合蛋白与所述溶液中存在的所述抗原或与所述细胞结合的能力。

29. 对患者进行抗金黄色葡萄球菌感染治疗的方法，该方法包括给所述患者施用治疗有效量的权利要求 1 - 13 的任一项的结合蛋白的步骤。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述抗原结合蛋白与手术或异物植入联合施用。

31. 生产蛋白的细胞系，所述蛋白是 mAb 1G3.B3、mAb 2H2.B8、mAb 13C7.D12 或 mAb 13G11.C11，或与 mAb 1G3.B3、mAb 2H2.B8、mAb 13C7.D12 或 mAb 13G11.C11 竞争结合 ORF0657n。

32. 权利要求 31 的细胞系，其中所述细胞系是 ATCC No: PTA-7124、ATCC No: PTA-7125、ATCC No: PTA-7126 或 ATCC No: PTA-7127。

靶定金黄色葡萄球菌 ORF0657n 的抗原结合蛋白

相关申请

本申请要求 2006 年 1 月 27 日提交的美国临时申请 No. 60/763,023 的优先权, 该申请在此引入作为参考。

发明背景

不承认本申请中引用的参考文献是要求保护的本发明的现有技术。

金黄色葡萄球菌是导致多种疾病和状况的病原体。由金黄色葡萄球菌导致的疾病和状况的实例包括菌血症、感染性心内膜炎、毛囊炎、疖、疔、天疱疮、大疱性天疱疮、蜂窝织炎、葡萄状菌病、毒性休克综合征、皮肤烫伤综合征、中枢神经系统感染、感染性和炎性眼病、骨髓炎以及关节和骨的其它感染, 和呼吸道感染(*The Staphylococci in Human Disease*, Crossley and Archer (eds.), Churchill Livingstone Inc. 1997)。

可以用基于免疫的策略控制金黄色葡萄球菌感染和金黄色葡萄球菌的传播。基于免疫的策略包括被动和主动免疫。被动免疫采用靶定金黄色葡萄球菌的免疫球蛋白。主动免疫诱导抗金黄色葡萄球菌的免疫应答。

发明概述

本发明表征了结合 ORF0657n 靶区域(SEQ ID NO: 1)的抗原结合蛋白。ORF0657n 是一种金黄色葡萄球菌蛋白。ORF0657n 靶区域由 mAb 1G3.BD4、mAb 2H2.BE11、mAb 13C7.BC1 和 mAb 13G11.BF3 结合位点提供。在致死模型攻击中, mAb 2H2.BE11 和 mAb 13C7.BC1 提供了抗金黄色葡萄球菌感染的增加的存活率。也用 mAb 2H2 的 IgG1 或 IgG2b 形式在离体模型中证明了保护作用; 并且用 mAb 2H2.BE11 在被动免疫鼠留置导管模型中证明了保护作用。

按照布达佩斯条约, 在 2005 年 9 月 30 日, 将产生 mAb 1G3.BD4、mAb 2H2.BE11、mAb 13C7.BC1 和 mAb 13G11.BF3 的小鼠杂交瘤细胞系保藏在美国典型培养物保藏中心, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209。这些细胞系命名为: ATCC No. PTA-7124 (产

生 mAb 2H2.BE11), ATCC No. PTA-7125 (产生 mAb 13C7.BC1), ATCC No. PTA-7126 (产生 mAb 1G3.BD4)和 ATCC No. PTA-7127 (产生 mAb 13G11.BF3)。

因此,本发明的一方面表征了分离的抗原结合蛋白,其包含第一可变区和第二可变区。第一和第二可变区结合一个或多个选自下组的靶区域: mAb 1G3.BD4 靶区域、mAb 2H2.BE11 靶区域、mAb 13C7.BC1 靶区域和 mAb 13G11.BF3 靶区域。

“分离的”表示与天然不同的形式。不同的形式可以是例如与天然不同的纯度和/或天然不存在的结构。天然不存在的结构包括重组结构,其中不同的区域组合在一起,例如,人源化抗体,其中一个或多个鼠互补决定区插入人构架区支架,或鼠抗体用新表面覆盖,以模拟人抗体的表面残基;杂合抗体,其中将来自一个抗原结合蛋白的一个或多个互补决定区插入不同的构架区支架;以及来源于天然人序列的抗体,其中将编码轻链可变区和重链可变区的基因随机组合在一起。

分离的蛋白优选基本不含血清蛋白。基本不含血清蛋白的蛋白存在于缺乏大多数或所有血清蛋白的环境中。

“可变区”具有来自重链或轻链的抗体可变区的结构。抗体重链和轻链可变区含有插入构架区上的三个互补决定区。互补决定区主要负责识别特定表位。

根据 mAb 1G3.BD4、mAb 2H2.BE11、mAb 13C7.BC1 或 mAb 13G11.BF3 结合的 ORF0657n 区(SEQ ID NO: 1)定义靶区域。例如, mAb 1G3.BD4 靶区域是 mAb 1G3.BD4 结合的 ORF0657n 区。

结合鉴定的靶区域的蛋白与 mAb 1G3.BD4、mAb 2H2.BE11、mAb 13C7.BC1 或 mAb 13G11.BF3 竞争结合靶区域。例如,与 mAb 1G3.BD4 竞争结合 ORF0657n 的蛋白结合于 mAb 1G3.BD4 靶区域。

当采用过量和等量竞争性蛋白和单克隆抗体时,与单克隆抗体 mAb 1G3.B3、mAb 2H2.B8、mAb 13C7.D12 或 mAb 13G11.C11 竞争的蛋白使单克隆抗体与 ORF0657n 的结合减少至少约 20%,优选至少约 50%。

“蛋白”表明连续氨基酸序列,并且不提供最小或最大的大小限制。蛋白中存在的一个或多个氨基酸可以含有翻译后修饰,如糖基化或二硫键形成。

优选的抗原结合蛋白是单克隆抗体。“单克隆抗体”表明具有相同或

基本相同的互补决定区和结合特异性的抗体的集合。抗体的变异是当从相同构建体生产抗体时将存在的变异。

例如，可以从特定杂交瘤和从含有一个或多个编码抗体的重组基因的重组细胞生产单克隆抗体。可以由一个以上重组基因编码抗体，其中，例如，一个基因编码重链，一个基因编码轻链。

本发明的另一方面描述含有重组基因的核酸，该基因包含编码抗体可变区的核苷酸序列。抗体可变区可以结合选自下组的靶区域：mAb IG3.BD4 靶区域、mAb 2H2.BE11 靶区域、mAb 13C7.BC1 和 mAb 13G11.BF3 靶区域。

重组基因含有编码蛋白的重组核酸和用于进行适当转录和加工的调节元件(其可以包括翻译和翻译后的元件)。重组核酸是序列和/或形式不会天然存在的核酸。重组核酸的实例包括纯化的核酸，组合到一起、提供与天然存在的不同的核酸的两个或更多个核酸区,和缺少一个或多个天然地彼此相关的核酸区(例如，上游或下游区)。

本发明的另一个方面描述了重组的细胞。该细胞包含一个或多个编码与选自下组的靶区域结合的抗体可变区的重组基因：mAb IG3.BD4 靶区域、mAb 2H2.BE11 靶区域、mAb 13C7.BC1 和 mAb 13G11.BF3 靶区域。多种重组基因是有用的，例如，其中一个基因编码抗体重链或其含有 V_H 区的片段，另一个核酸编码抗体轻链或其含有 V_L 区的片段。

本发明的另一方面包括生产包含抗体可变区的蛋白的方法。该方法包含以下步骤：(a)在表达蛋白的条件下培养包含编码该蛋白的重组核苷酸的重组细胞；和(b)纯化蛋白。

本发明的另一方面描述了药物组合物。该组合物包含治疗有效量的抗原结合蛋白和药学可接受的载体。

治疗有效量是足够提供有用的治疗或预防作用的量。对于感染金黄色葡萄球菌的患者，有效量是足够实现以下一种或多种作用的量：降低金黄色葡萄球菌在患者中增殖的能力或减少患者中金黄色葡萄球菌的量。对于未感染金黄色葡萄球菌的患者，有效量是足够实现以下一种或多种作用的量：降低对金黄色葡萄球菌感染的易感性或感染性细菌建立慢性疾病的持续感染的能力。

本发明的另一方面描述了检测溶液或细胞上 OFR0657n 抗原的存在的方法。该方法包括给溶液或细胞提供本文描述的结合蛋白，并且测

量结合蛋白与溶液或细胞中的抗原结合的能力。测量可以是定量或定性的。

ORF0657n 抗原包括全长 ORF0657n 或其具有被 mAb 1G3.B3、mAb 2H2.B8、mAb 13C7.D12 或 mAb 13G11.C11 识别的表位的衍生物。衍生物的实例包括截短的形式；和包含一个或多个以下氨基酸改变的 ORF0657n 的全长或截短形式：一个或多个添加、一个或多个取代，和一个或多个缺失。

本发明的另一方面表征了对患者进行抗金黄色葡萄球菌感染治疗的方法。该方法包括给患者施用治疗有效量的本发明描述的抗原结合蛋白的步骤。治疗的患者可以是或不是金黄色葡萄球菌感染的。优选地，患者是人。

本发明的另一方面描述生产蛋白的细胞系，所述蛋白是 mAb 1G3.B3、mAb 2H2.B8、mAb 13C7.D12 或 mAb 13G11.C11，或与 mAb 1G3.B3、mAb 2H2.B8、mAb 13C7.D12 或 mAb 13G11.C11 竞争结合 ORF0657n。优选的细胞系是杂交瘤，和含有编码蛋白的重组核酸的重组细胞系。

开放式的术语如“包含”允许有额外的成分或步骤。有时用带有或不带有开放式术语的短语如“一个或多个”强调有额外的成分或步骤的可能性。

除非明确指出，术语如“一个”或“一种”不限于一个。例如，“一个细胞”不排除“多个细胞”。有时用短语如一个或多个强调存在多个的可能性。

本发明的其它特征和优点从此处提供的额外说明，包括不同实施例中可以显而易见。提供的实施例举例说明了用于实施本发明的不同成分和方法。实施例不限制要求保护的发明。基于本公开内容，本领域技术人员可以鉴定和使用其它成分和方法，用于实施本发明。

附图简述

图 1 描述了 IgG 分子的结构。“VL”是指轻链可变区。“VH”是指重链可变区。“CL”是指轻链恒定区。“CH1”、“CH2”和“CH3”是重链恒定区。虚线表示二硫键。

图 2 描述了逐对结合研究中概括不同单克隆抗体的反应性的矩阵。

该组单克隆抗体通过 BIACORE®方法落入三个反应区。

图 3A-3C: 细菌攻击前 20 小时, 通过腹膜内注射以下物质, 处理各组 BALB/c 小鼠($n=20$): ■, mAb 13C7.BC1; □, mAb 6G6.A8 (同种型对照); 或 ○, PBS。通过静脉内注射, 用金黄色葡萄球菌攻击小鼠, 监测存活。图 3A-0.49 mg mAb 13C7.BC1; 0.45 mg mAb 6G6.A8; 和 9.8×10^8 CFU 金黄色葡萄球菌 Becker。图 3B-0.49 mg mAb 13C7.BC1; 0.45 mg mAb 6G6.A8; 和 9.6×10^8 CFU 金黄色葡萄球菌 Becker。图 3C-0.50 mg mAb 13C7.BC1; 0.45 mg mAb 6G6; 和 9.9×10^8 CFU 金黄色葡萄球菌 Becker。

图 4A 和 4B: 细菌攻击前 20 小时, 通过腹膜内注射以下物质, 处理各组 BALB/c 小鼠($n=20$): ■, mAb 13C7.BC1(0.5mg); □, mAb 6G6.A8 (同种型对照)(0.5mg); 或 ○, PBS(0.5ml)。图 4A 描述了采用 2.09×10^8 CFU 金黄色葡萄球菌 UK58 的结果。图 4B 描述了采用 2.15×10^8 金黄色葡萄球菌 UK 58 的结果。

图 5A-5C: 细菌攻击前 20 小时, 通过腹膜内注射以下物质, 处理各组 BALB/c 小鼠($n=20$): ■, mAb 13C7.BC1; □, mAb 6G6.A8 (同种型对照); ○, PBS。通过静脉内注射, 用金黄色葡萄球菌攻击小鼠, 监测存活。图 5A-0.43 mg mAb 2H2.BE11; 0.5 mg mAb 6G6.A8; 和 9.8×10^8 CFU 金黄色葡萄球菌 Becker。图 5B-0.43 mg mAb 2H2.BE11; 0.5 mg mAb 6G6.A8; 和 8.3×10^8 CFU 金黄色葡萄球菌 Becker。图 5C- 0.43 mg mAb 2H2.BE11; 0.5 mg mAb 6G6.A8; 和 9.3×10^8 CFU 金黄色葡萄球菌 Becker。

发明详述

ORF0657n 是位于金黄色葡萄球菌外膜的金黄色葡萄球菌蛋白。发现 ORF0657n 在金黄色葡萄球菌的不同株中是非常保守的(Anderson 等, 国际公开号 WO 2005/009379, 国际公开日是 2005 年 2 月 3 日)。可以用不同的 ORF0657n 衍生物产生抗金黄色葡萄球菌感染的保护性免疫应答(Anderson 等, 国际公开号 WO 2005/009379, 国际公开日 2005 年 2 月 3 日)。

由于识别 ORF0657n 的能力, 本发明的抗原结合蛋白可以用于例如, 作为生产、表征或研究基于 ORF0657n 的抗原的工具。识别合适的 ORF0657n 表位的抗原结合蛋白也可以用作治疗金黄色葡萄球菌感染的

试剂。

I. 抗原结合蛋白

抗原结合蛋白包含抗体可变区，其提供对表位的特异性结合。抗体可变区可以存在于例如完整抗体、抗体片段和抗体或抗体片段的重组衍生物中。

不同类型的抗体具有不同的结构。可以参照 IgG（图 1）说明不同的抗体区。IgG 分子包含四个氨基酸链：两个较长的重链和两个较短的轻链。重链和轻链均含有恒定区和可变区。可变区中存在三个负责抗原特异性的高变区。（参见例如 Breitling *et al.*, *Recombinant Antibodies*, John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, 1999; 和 Lewin, *Genes IV*, Oxford University Press and Cell Press, 1990。）

高变区（也称作互补决定区）存在于更保守的侧翼区（也称作构架区）之间。与构架区和互补决定区相关的氨基酸可以按照 Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 美国健康和人类服务部门, 1991 的描述进行编号并且进行比对。

两个重链羧基区是通过二硫键结合而连接产生 Fc 区的恒定区。Fc 区对提供诸如补体和巨噬细胞激活的抗体生物活性是重要的。这两个重链的每一个都构成 Fc 区，该区通过铰链区延伸到不同的 Fab 区。

在高等脊椎动物中，存在两类轻链和 5 类重链。轻链是 κ 或 λ 。重链确定抗体类型，并且是 α , δ , ϵ , γ 或 μ 。对于不同类型的重链，也存在亚类，如人 γ_1 , γ_2 , γ_3 , 和 γ_4 。重链给铰链区和尾区赋予独特构象。(Lewin, *Genes IV*, Oxford University Press and Cell Press, 1990.)

含有抗体可变区的抗体片段包括 Fv, Fab 和 Fab₂ 区。每个 Fab 区包含由可变区和恒定区组成的轻链，以及含有可变区和恒定区的重链。由二硫键通过恒定区将轻链连接于重链。Fab 区的轻链可变区和重链可变区提供了参与抗原结合的 Fv 区。

抗体可变区可以存在于重组衍生物中。重组衍生物的实例包括单链抗体、双抗体（diabody）、三抗体（triabody）、四抗体（tetrabody）和微抗体（miniantibody）。(Kipriyanov *et al.*, *Molecular Biotechnology* 26:39-60, 2004.)

抗原结合蛋白可以包含一个或多个识别相同或不同表位的可变区。

(Kipriyanov *et al.*, *Molecular Biotechnology* 26:39-60, 2004.)

II. 制备针对鉴定的靶区域的抗原结合蛋白

可以从各个单克隆抗体开始,制备针对 mAb 1G3.BD4 靶区域、mAb 2H2.BE11 靶区域、mAb 13C7.BC1 靶区域或 mAb 13G11.BF3 靶区域的不同抗原结合蛋白。或者,由结合蛋白识别的表位可以用于选择额外的结合蛋白。

mAb 2H2.BE11 靶区域似乎位于 ORF0657n 的大约氨基酸 76-357。含有 ORF0657n 的氨基酸 76-357 的多肽或全长 ORF0657n 可以用作选择抗体的靶抗原。可以确定制备的抗体的靶区域。

可以用多种技术选择识别抗原的蛋白。所述技术的实例包括使用噬菌体展示技术和杂交瘤生产。可以用嵌合小鼠,如异种移植小鼠(XenoMouse)或转染色体小鼠(Trans-Chromo mouse)生产人抗体。(例如 Azzazy *et al.*, *Clinical Biochemistry* 35:425-445, 2002, Berger *et al.*, *Am. J. Med. Sci.* 324(1):14-40, 2002.)

单克隆抗体 mAb 1G3.BD4、mAb 2H2.BE11、mAb 13C7.BC1 和 mAb 13G11.BF3 含有识别 ORF0657n 的可变区。可以基于抗体可变区生产其它识别 ORF0657n 的结合蛋白。其它结合蛋白可以例如通过修饰存在的单克隆抗体或通过使用可变区序列信息来生产。可以用重组核酸技术进行蛋白构建和序列操作。

单克隆抗体 mAb 1G3.BD4、mAb 2H2.BE11、mAb 13C7.BC1 和 mAb 13G11.BF3 是鼠抗体。对于人类治疗应用,设计基于所述 mAb 的优选结合蛋白,用于减少识别鼠区域的人抗小鼠抗体的可能产生。

采用诸如鼠抗体人源化、脱免疫(de-immunization)和嵌合抗体生产的技术,可以减少人抗小鼠抗体的可能产生。(参见,例如 Brien *et al.*, *Humanization of Monoclonal Antibodies by CDR Grafting*, p 81-100, *From Methods in Molecular Biology* Vol. 207: Recombinant antibodies for Cancer Therapy: Methods and Protocols (Eds. Welschof and Krauss) Humana Press, Totowa, New Jersey, 2003; Kipriyanov *et al.*, *Molecular Biotechnology* 26:39-60, 2004; Gonzales *et al.*, *Tumor Biol.* 26:31-43, 2005, Presta, *Advanced Drug Delivery Reviews* 58:640-656, 2006, Tsurushita *et al.*, *Methods* 36:69-83, 2005, Roque *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654,

2004.)

可以用例如嫁接互补决定区到构架区或用新表面覆盖的技术,对鼠抗体进行人源化。用新表面覆盖(也称作表面装饰)包括修饰可变区,使得表面暴露的区域人源化。

嫁接互补决定区包括从例如鼠来源取出所述区域或所述区域的一部分,并且将该区域插入人可变区构架区。用于嫁接的人构建体可以基于与获得该区域的可变区(如鼠)的序列同源性而选择。与嫁接的互补决定区相关的关键构架区残基也应该在新构架区中提供。

脱免疫包括改变抗体中存在的可能的线性 T 细胞表位。可以基于已知人 HLA I 类和/或 II 类表位的生物信息学扫描,鉴定表位。(Presta, *Advanced Drug Delivery Reviews* 58:640-656, 2006.)

嵌合抗体含有人恒定区以及来自不同生物,如小鼠的可变区。人恒定区提供 Fc 区。

改变的其它实例包括在例如单链抗体、双抗体、三抗体、四抗体和微抗体中提供可变区。(Kipriyanov *et al.*, *Molecular Biotechnology* 26:39-60, 2004.)抗原结合蛋白可以含有一个或多个识别相同或不同表位的可变区。(Id.)本发明的其它实施方案涉及针对 mAb 1G3.BD4、mAb 2H2.BE11、mAb 13C7.BC1 或 mAb 13G11.BF3 结合位点的单链抗体、双抗体、三抗体。

III. 针对 mAb 2H2.BE11 靶区域的结合蛋白

如下文实施例的描述,进一步表征 mAb 2H2.BE11 靶区域,并且确定可变区的氨基酸序列。鉴定的靶区域和序列信息促进获得针对 mAb 2H2.BE11 靶区域的不同结合蛋白。

在本发明的一个实施方案中,所述结合蛋白与 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 76-357 组成的多肽结合。优选地,结合蛋白是人抗体、人源化抗体、脱免疫的抗体或嵌合抗体。优选的抗体是分离的抗体和单克隆抗体。

mAb 2H2.BE11 可变区的氨基酸序列由 SEQ ID NO: 20 (V_h)和 SEQ ID NO: 21 (V_l)提供。V_h 内的互补决定区(CDR)鉴定在氨基酸 36-45, 50-65 和 98-107。V_l 内的 CDR 鉴定在 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 24-33, 49-55 和 88-96。

在针对 V_h 区的不同实施方案中,结合蛋白与 mAb 2H2.BE11 靶区

域结合,并且包含以下成分、由以下成分组成、或基本由以下成分组成:第一 V_h CDR,其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 36-45 或与氨基酸 36-45 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 36-45 或与氨基酸 36-45 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 36-45 或与氨基酸 36-45 有一个氨基酸不同的序列组成;第二 V_h CDR,其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 50-65 或与氨基酸 50-65 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 50-65 或与氨基酸 50-65 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 50-65 或与氨基酸 50-65 有一个氨基酸不同的序列组成;和第三 V_h CDR,其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 98-107 或与氨基酸 98-107 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 98-107 或与氨基酸 98-107 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 98-107 或与氨基酸 98-107 有一个氨基酸不同的序列组成。

在针对 V_l 区的不同实施方案中,结合蛋白与 mAb 2H2.BE11 靶区域结合,并且包含以下成分、由以下成分组成、或基本由以下成分组成:第一 V_l CDR,其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 24-33 或与氨基酸 24-33 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 24-33 或与氨基酸 24-33 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 24-33 或与氨基酸 24-33 有一个氨基酸不同的序列组成;第二 V_l CDR,其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 49-55 或与氨基酸 49-55 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 49-55 或与氨基酸 49-55 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 49-55 或与氨基酸 49-55 有一个氨基酸不同的序列组成;第三 V_l CDR,其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 88-96 或与氨基酸 88-96 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 88-96 或与氨基酸 88-96 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 88-96 或与氨基酸 88-96 有一个氨基酸不同的序列组成。

关于可变区、CDR 区或抗体序列的“基本由...组成”表明可能存在一个或多个额外的氨基酸,其中所述氨基酸不显著减少与靶的结合。

氨基酸不同可以是氨基酸缺失、插入或取代。在取代氨基酸以保持活性的过程中,取代的氨基酸应该具有一种或多种相似的性质,如大约相同的电荷、大小、极性和/或疏水性。

优选地，氨基酸取代是保守取代。保守取代用具有相似性质的氨基酸取代另一氨基酸。表 1 提供了各组氨基酸的列表，其中该组的一个成员是另一成员的保守取代。

表 1：保守取代

Ala, Val, Ile, Leu, Met
Ser, Thr,
Tyr, Trp
Asn, Gln
Asp, Glu
Lys, Arg, His

在另外的实施方案中，V_h 区是 SEQ ID NO: 20、人源化的 SEQ ID NO: 20 或脱免疫的 SEQ ID NO: 20；并且/或者 V_l 区是 SEQ ID NO: 21、人源化的 SEQ ID NO: 21 或脱免疫的 SEQ ID NO: 21。

在针对抗体的不同实施方案中，抗体包含以下成分、由以下成分组成、或基本由以下成分组成：(a)重链，其包含此第 III 部分描述的 V_h 区和来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的人铰链区、CH₁ 区、CH₂ 区和 CH₃ 区，和(b)轻链，其包含此第 III 部分描述的 V_l 区和人 κ CL 或人 λ CL。在进一步的实施方案中，抗体包含以下成分、由以下成分组成、或基本由以下成分组成：(a)重链，其包含此第 III 部分描述的 V_h 区和来自 IgG1 或 IgG2 的人铰链区、CH₁ 区、CH₂ 区和 CH₃ 区，和(b)轻链，其包含此第 III 部分描述的 V_l 区和人 κ CL；并且所述重链基本由 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列组成，并且/或者轻链基本由 SEQ ID NO: 23 组成。

在另外的实施方案中，本文表述的抗原结合蛋白具有 V_h 和 V_l 区，它们提供与靶抗原的至少约 100 nM 的 K_D，优选至少约 30 nM。可以按照实施例 11 的描述，用氨基酸 42-486 的 ORF0657n 片段确定与靶抗原的结合。

用于不同实施方案的优选结合蛋白是抗体。更优选地，抗体是分离的或单克隆抗体。

IV. 蛋白生产

优选用重组核酸技术或通过使用杂交瘤来生产抗原结合蛋白。重组核酸技术包括构建用于蛋白合成的核酸模板。杂交瘤技术包括使用永生化的细胞系来生产抗原结合蛋白。合适的重组核酸和杂交瘤技术是本领域公知的。（参见例如 Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley, 2005, Harlow *et al.*, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.）。

可以在实际上作为编码的蛋白的制造厂的宿主细胞中表达编码抗原结合蛋白的重组核酸。重组核酸可以提供编码抗原结合蛋白的重组基因，其自主地存在于宿主基因组中或作为宿主细胞基因组的一部分。

重组基因含有编码蛋白的核酸和用于蛋白表达的调节元件。通常，存在于重组基因中的调节元件包括转录启动子、核糖体结合位点、终止子和任选存在的操纵子。用于在真核细胞中加工的优选元件是聚腺苷酸化信号。也可以存在抗体相关的内含子。用于抗体或抗体片段生产的表达盒的实例是本领域公知的。（例如 Persic *et al.*, *Gene* 187:9-18, 1997, Boel *et al.*, *J. Immunol. Methods* 239:153-166, 2000, Liang *et al.*, *J. Immunol. Methods* 247:119-130, 2001, Tsurushita *et al.*, *Methods* 36:69-83, 2005.）。

由于遗传密码的简并性，可以使用大量不同的编码核酸序列来编码特定的多肽。产生遗传密码的简并性的原因是，几乎所有的氨基酸都由不同组合的核苷酸三联体或“密码子”编码。由密码子编码的氨基酸如下：

A=Ala=丙氨酸：密码子 GCA、GCC、GCG、GCU

C=Cys=半胱氨酸：密码子 UGC、UGU

D=Asp=天冬氨酸：密码子 GAC、GAU

E=Glu=谷氨酸：密码子 GAA、GAG

F=Phe=苯丙氨酸：密码子 UUC、UUU

G=Gly=甘氨酸：密码子 GGA、GGC、GGG、GGU

H=His=组氨酸：密码子 CAC、CAU

I=Ile=异亮氨酸：密码子 AUA、AUC、AUU

K=Lys=赖氨酸：密码子 AAA、AAG

L=Leu=亮氨酸：密码子 UUA、UUG、CUA、CUC、CUG、CUU

M=Met=甲硫氨酸：密码子 AUG

N=Asn=天冬酰胺: 密码子 AAC、AAU

P=Pro=脯氨酸: 密码子 CCA、CCC、CCG、CCU

Q=Gln=谷氨酰胺: 密码子 CAA、CAG

R=Arg=精氨酸: 密码子 AGA、AGG、CGA、CGC、CGG、CGU

S=Ser=丝氨酸: 密码子 AGC、AGU、UCA、UCC、UCG、UCU

T=Thr=苏氨酸: 密码子 ACA、ACC、ACG、ACU

V=Val=缬氨酸: 密码子 GUA、GUC、GUG、GUU

W=Trp=色氨酸: 密码子 UGG

Y=Tyr=酪氨酸: 密码子 UAC、UAU

用表达载体促进重组基因在细胞中的表达。优选地,除重组基因外,表达载体还包含用于在宿主细胞中自主复制的复制起点、选择标记、有限数目的有有限制酶位点,和高拷贝数目的潜能。用于抗体和抗体片段生产的表达载体的实例是本领域公知的。(例如 Persic *et al.*, *Gene* 187:9-18, 1997, Boel *et al.*, *J. Immunol. Methods* 239:153-166, 2000, Liang *et al.*, *J. Immunol. Methods* 247:119-130, 2001, Tsurushita *et al.*, *Methods* 36:69-83, 2005.)

如果需要,编码抗体的核酸可以用本领域公知的技术整合到宿主染色体中。(例如, Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley, 2005, Marks *et al.*, 国际申请号 WO 95/17516, 国际公开日 1995 年 6 月 29 日)

多种不同的细胞系可以用于重组抗原结合蛋白表达,包括来自原核生物(如大肠杆菌、芽孢杆菌种和链霉菌种和真核生物(如酵母、杆状病毒和哺乳动物)的那些。(Breitling *et al.*, *Recombinant Antibodies*, John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, 1999, Kipriyanov *et al.*, *Molecular Biotechnology* 26:39-60, 2004, Tsurushita *et al.*, *Methods* 36:69-83, 2005.)

用于重组抗原结合蛋白表达的优选宿主提供哺乳动物翻译后修饰。翻译后修饰可以是化学修饰,如糖基化和二硫键形成。另一类型的翻译后修饰是信号肽切割。

合适的糖基化对于抗体功能可以是重要的。(Yoo *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 261:1-20, 2002, Li *et al.*, *Nature Biotechnology* 24(2):210-215, 2006.)天然存在的抗体含有至少一个连接于重链的 N-连

接的碳水化合物。(Yoo *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 261:1-20, 2002.)其它 N-连接的碳水化合物和 O-连接的碳水化合物可以存在,并且对于抗体功能可能是重要的。(Id.)

不同类型的宿主细胞可以用于提供有效的翻译后修饰,包括哺乳动物宿主细胞和非哺乳动物细胞。哺乳动物宿主细胞的实例包括但不限于中国仓鼠卵巢(Cho), HeLa, C6, PC12,人胚肾(HEK293)和骨髓瘤细胞。(Yoo *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 261:1-20, 2002, Persic *et al.*, *Gene* 187:9-18, 1997.) 非哺乳动物细胞可以经过修饰,用于复制人的糖基化。(Li *et al.*, *Nature Biotechnology* 24(2):210-215, 2006.)糖工程化的巴斯德毕赤氏酵母是所述修饰的非哺乳动物细胞的一个实例。(Li *et al.*, *Nature Biotechnology* 24(2):210-215, 2006.)

优选的重组基因包含编码抗体可变区的核苷酸序列,所述可变区结合于选自下组的靶区域:mAb IG3.BD4 靶区域、mAb 2H2.BE11 靶区域、mAb 13C7.BC1 和 mAb 13G11.BF3 靶区域。特定的重组基因可以编码含有一个可变区或 V_h 和 V_l 区这二者的蛋白。重组基因也可以编码抗体恒定区和铰链区。如果需要,可以用重组基因的组合生产抗体,其中一个基因编码轻链,第二个基因编码重链。

通过编码上文第 II 部分或第 III 部分描述的蛋白的核酸,提供了不同的实施方案。下文提供了所述实施方案的实例。

在针对 V_h 编码区的实施方案中,该核苷酸序列编码包含以下成分、由以下成分组成、或基本由以下成分组成的可变区:第一 V_h CDR,其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 36-45 或与氨基酸 36-45 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 36-45 或与氨基酸 36-45 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 36-45 或与氨基酸 36-45 有一个氨基酸不同的序列组成;第二 V_h CDR,其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 50-65 或与氨基酸 50-65 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 50-65 或与氨基酸 50-65 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 50-65 或与氨基酸 50-65 有一个氨基酸不同的序列组成;和第三 V_h CDR,其包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 98-107 或与氨基酸 98-107 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 98-107 或与氨基酸 98-107 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 98-107

或与氨基酸 98-107 有一个氨基酸不同的序列组成。

在针对 V_I 编码区的实施方案中, 该核苷酸序列编码包含以下成分、由以下成分组成、或基本由以下成分组成的可变区: 第一 V_I CDR, 其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 24-33 或与氨基酸 24-33 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 24-33 或与氨基酸 24-33 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 24-33 或与氨基酸 24-33 有一个氨基酸不同的序列组成; 第二 V_I CDR, 其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 49-55 或与氨基酸 49-55 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 49-55 或与氨基酸 49-55 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 49-55 或与氨基酸 49-55 有一个氨基酸不同的序列组成; 第三 V_I CDR, 其包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 88-96 或与氨基酸 88-96 有一个氨基酸不同的序列、由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 88-96 或与氨基酸 88-96 有一个氨基酸不同的序列组成、或基本由 SEQ ID NO: 21 的氨基酸 88-96 或与氨基酸 88-96 有一个氨基酸不同的序列组成。

在另外的实施方案中, V_h 区是 SEQ ID NO: 20、人源化的 SEQ ID NO: 20 或脱免疫的 SEQ ID NO: 20; 并且 V_I 区是 SEQ ID NO: 21、人源化的 SEQ ID NO: 21 或脱免疫的 SEQ ID NO: 21。

在针对抗体重链和/或轻链的不同实施方案中, 重组基因编码包含以下成分、由以下成分组成、或基本由以下成分组成的蛋白中的任意一种, 或两者: (a)重链, 其包含上文第 III 部分描述的 V_h 区和来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型的人铰链区、CH₁ 区、CH₂ 区和 CH₃ 区, 或(b)轻链, 其包含上文第 III 部分提供的 V_I 区和人 κ C_L 或 λ C_L。在进一步的实施方案中, 所述重链基本由 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列组成, 轻链基本由 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列组成。

V. 抗原结合蛋白的应用

含有某些 ORF0657n 区的抗原可以用于提供抗金黄色葡萄球菌感染的保护性免疫应答。(Anderson *et al.*, 国际公开号 WO 2005/009379, 国际公开日 2005 年 2 月 3 日)识别 ORF0657n 靶区域的抗原结合蛋白可以用于促进 ORF0657n 抗原和疫苗的生产、表征或研究。识别合适表位的抗原结合蛋白也可以具有治疗应用。

ORF0657n 相关抗原和疫苗的生产、表征或研究的不同应用的实例包括:

- 1) 例如通过蛋白印迹鉴定 ORF0657n 抗原的存在;
- 2) 例如通过流式细胞术鉴定细胞表面 ORF0657n 抗原的存在。这可以用于例如确定金黄色葡萄球菌的多个菌株上的表达以及证实敲除突变体;
- 3) 被动保护实验。抗体可以用于致死模型中, 用于确定 ORF0657n 蛋白的特定区域是否赋予保护作用;
- 4) 免疫测定。该测定可以用于监测抗原质量、产品生产和稳定性;
- 5) 在小鼠效能测定中作为对照, 用于监测抗原疫苗产物的免疫原性; 和
- 6) 血清学测定可以用竞争性形式利用单克隆抗体, 用于鉴定 ORF0657n 来源的抗原接种的患者的免疫应答。

在靶蛋白的生产、表征或研究中利用抗原结合蛋白, 如单克隆抗体的技术是本领域公知的。(参见, 例如 Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley, 2005, Harlow *et al.*, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, Harlow *et al.*, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, Lipman *et al.*, *ILAR Journal* 46:258-268, 2005.)

在本发明的一种实施方案中, 用抗原结合蛋白确定溶液中结合于微球体或细胞的 ORF0657n 抗原的存在。可以用不同的技术, 如蛋白印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、流式细胞术和 Luminex 免疫测定来确定结合蛋白与溶液或细胞中存在的蛋白结合的能力。

VI. 处理

可以用结合于合适靶区域的抗原结合蛋白对患者进行治疗性和预防性处理。在感染金黄色葡萄球菌的患者中进行治疗性处理。预防性处理可以在一般群体或一般群体的亚组中进行预防性处理。一般群体的优选亚组是金黄色葡萄球菌感染的风险增加的人。

“患者”是指能够受到金黄色葡萄球菌感染的哺乳动物。优选地, 患

者是人。但是，其它类型的哺乳动物，如牛、猪、绵羊、山羊、兔、马、狗、猫、猴、大鼠和小鼠，可以受到金黄色葡萄球菌的感染。非人患者的处理可以用于保护宠物和家畜，并且用于评估特定治疗的有效性。

金黄色葡萄球菌感染的风险增加的人包括健康护理工作者；住院患者；免疫系统减弱的患者；进行手术的患者；接受异物植入，如导管或血管装置植入的患者；面临导致免疫减弱的治疗的患者；和从事烧伤或创伤风险增加的职业的人。(The *Staphylococci in Human Disease*, Crossley and Archer (ed.), Churchill Livingstone Inc. 1997.)

在一种实施方案中，给患者联合施用抗原结合蛋白和手术或异物（foreign body）植入物。“手术或异物植入”包括提供或不提供异物植入的手术，和在手术或不手术的条件下提供异物植入。施用的时间可以设计用于实现预防性处理和/或治疗性处理。施用优选大约在手术或植入同时开始。

药物施用的指导通常提供于例如 *Remington's Pharmaceutical Sciences 20th Edition*, Ed. Gennaro, Mack Publishing, 2000; 和 *Modern Pharmaceutics 2nd Edition*, Eds. Banker and Rhodes, Marcel Dekker, Inc., 1990。

药学可接受的载体促进抗原结合蛋白的储存或施用。用于稳定蛋白溶液制剂的物质包括碳水化合物、氨基酸和缓冲盐。(Middaugh *et al.*, *Handbook of Experimental Pharmacology* 137:33-58, 1999.)

可以通过不同的途径施用抗原结合蛋白，如静脉内、皮下、肌肉或粘膜。可以采用例如针头或喷射注射器进行皮下和肌肉施用。粘膜送递，如鼻送递，可以涉及使用增强剂或粘膜粘附剂在吸附位点产生更长的保留时间。(Middaugh *et al.*, *Handbook of Experimental Pharmacology* 137:33-58, 1999.)

合适的施用方案优选考虑本领域公知的因素而确定，包括患者的年龄、体重、性别和医学状况；施用途径；需要的效果；和采用的特定化合物。预期有效剂量范围应该是约 0.1 mg/kg - 20 mg/kg 或 0.5 mg/kg - 5 mg/kg。施用频率可以根据化合物的有效性和稳定性而改变。施用频率的实例包括每两周、每周、每月和每两月。

VII. 实施例

下文提供了进一步说明本发明的不同特征的实施例。实施例也举例说明了用于实施本发明的有用的方法。这些实施例不限制要求保护的发明。

实施例 1:制备 ORF0657n 的单克隆抗体

用 ORF0657n-C/e (SEQ ID NO: 2)或 ORF0657n-H/y (SEQ ID NO: 3)作为抗原制备针对 ORF0657n (SEQ ID NO: 1)的单克隆抗体。鉴定抗体,并且通过 ELISA 和流式细胞术表征。

小鼠和免疫: 从 Taconic (Germantown, N. Y.)购买 4-5 周龄的雌性 BALB/c 小鼠。在第 0、7 和 21 天,用配制在羟基磷酸铝佐剂上的 20 μ g 大肠杆菌产生的 ORF0657n-C/e 抗原或酵母表达的 ORF0657n-H/y 抗原肌肉(i.m.)免疫小鼠。(Anderson *et al.*,国际公开号 WO 2005/009379,国际公开日 2005 年 2 月 3 日.)融合前 3 天,给予小鼠 20 μ g 蛋白在磷酸缓冲液(PBS)中的最终静脉内注射(i.v.)。处死小鼠,取出脾,用于细胞融合。

MAB 制备: 通过聚乙二醇 1500 (Boehringer Mannheim),将从脾制备的淋巴细胞与小鼠骨髓瘤配偶体 SP2/0-Ag14 (ATCC 1581)以 3:1 的比例融合。将融合体铺板在 96 孔平底微量滴定板中的高葡萄糖、丙酮酸 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)中,该培养基含有 20% 胎牛血清、次黄嘌呤(10^{-4} M)、胸苷(10^{-5} M),24 小时后加入氨基喋呤(4×10^{-7} M)。按照下文的描述,通过 ELISA 筛选来自生长中的杂交瘤的上清液与 ORF0657n 的反应性。通过有限稀释克隆阳性孔,并且重新测试 ELISA 反应性。用抗体同种型分析试剂盒(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)对单克隆抗体进行分类。

ELISA: 2-8°C 下用每孔 50 纳克溶于 PBS 中的大肠杆菌表达的 SEQ ID NO: 2 将 Costar 培养基结合微量滴定板包被过夜。用 PBS, 0.05% Tween20 将板洗涤 3 次,用 1% 牛血清白蛋白、PBS、0.05% Tween20 (测定稀释液)封闭至少 1 小时。按照上文洗涤平板,加入来自融合孔或克隆的杂交瘤的上清液,室温下温育 2 小时。按照上文洗涤平板,加入山羊抗小鼠 IgG (H+L)-HRP 缀合物(Zymed) (在测定稀释液中 1:8000),室温下温育 1 小时。用 TMB 底物使测定平板显色,用 2.0 N H_2SO_4 终止反应,OD 450 nm 下在板读数器中读数。450 nm 下的光密度>1.0 的孔认为是阳性的。

流式细胞术：制备的在不含铁条件下（在 RPMI 中）传代的金黄色葡萄球菌甘油储液用于评估 mAb 的 ORF0657n 结合。将冷冻的甘油储存细胞解冻，重悬于 PBS；1%牛血清白蛋白；0.1%叠氮化钠，0.2%猪 IgG (Sigma) (PAAG) 中，达到 5×10^7 CFU/50 μ l 的浓度。每个反应将细胞的 50 μ l 等分物置于 1.5 ml Eppendorf 管中。在每个反应管中加入 50 微升杂交瘤培养物，室温下温育 1 小时。通过在试管中加入 1 mL 磷酸缓冲液；1%牛血清白蛋白；0.1%叠氮化钠(PAA)，洗涤细胞。通过离心(5500 rpm, 5 分钟)沉淀细胞。除去上清液，将细胞与 1:100 稀释于 PAAG 中的 100 μ L 第二抗体(FITC-标记的山羊抗小鼠 Ig (BD Pharmingen)混合。室温下在暗处温育 1 小时。温育后，在反应混合物中加入 1 mL PAA，沉淀细胞(5500 rpm, 5 分钟)，除去上清液。将沉淀物重悬于 1 mL PBS 中，转移到 12 x 75 mm 试管中进行 FAC 分析。

在对细菌细胞进行门控的 BD-FACSCalibur 流式细胞仪上操作试管，测量与细胞相关的 FITC 的量。在每个测定中操作已知与金黄色葡萄球菌的表面结合的标准抗体。阴性对照是单独的细胞和第二缀合物。如果几何平均值大约 30，则认为杂交瘤细胞是阳性的。

两个独立的融合得到了一组 12 种单克隆抗体(mAb)。所有这些 mAbs 在 ELISA 中都是反应性的（表 2）。这 12 种 mAbs 中的 10 种结合细菌的表面，这是通过流式细胞术证实的。采用野生型蛋白，通过蛋白印迹分析，发现所有这些 mAbs 都是阳性的。

表 2

mAbs/细胞系融合#1	mAbs/细胞系融合#2
1) 2H2.B8 IgG1	
2) 8H6.E11.H3 IgG2a*	
3) 7H2.C11 IgG1*	
	4) 2E12.A8 IgG1
	5) 8A8.B4 IgG1
	6) 3G11.D5 IgG1
	7) 13G11.C11 IgG1
	8) 13C7.D12 IgG1
	9) 1G3.B3 IgG1
	10) 9H3.E4 IgG1
	11) 3B7.G8 IgG1
	12) 3G12.A4 IgG1

* 在流式细胞术中不是反应性的。融合#1 是从大肠杆菌产生的 ORF0657n-C/e 抗原建立的。融合#2 是用酵母表达的 ORF0657n-H/y 抗原建立的。

实施例 2:类型转换 mAbs

所有结合于天然抗原的分离的 mAbs 是 IgG1 同种型的。通过选择转换变体, 将这些抗体类型转换为 IgG2b 同种型(Spira *et al*, *J. of Immunological Methods*, 74:307-315, 1985)。用 IgG2b 缀合物对合适的免疫测定进行显色, 以高密度将细胞系铺板。选择体细胞突变, 富集, 然后克隆。转换的 mAb 的结合位点保持与最初的 mAb 相同, 但是转换为 IgG2b 亚型在被动保护研究中得到了更有利的同种型(起始补体级联)。

表 3 类型转换的 mAbs

IgG1 同种型	IgG2b 同种型
2H2.B8	2H2.BE11
2E12.A8	2E12.BG1
8A8.B4	8A8.BF9
3G11.D5	3G11.BE5
13G11.C11	13G11.BF3
13C7.D12	13C7.BC1
1G3.B3	1G3.BD4
9H3.E4	9H3.BE4

实施例 3: 用天然抗原进行的结合抑制研究

根据制造商的说明书, 采用 mAb 标记试剂盒(Molecular Probes), 用 Alexafluor-488 标记纯化的抗体。对标记和未标记的 mAbs 确定正好使 RPMI 上生长的细菌细胞表面饱和的 mAb 的量。表 3 (第 1 列) 中的每种 mAbs 是在标记和未标记的条件下使用的。

通过首先用浓度可以使细胞表面饱和的未标记 mAb 温育 5×10^7 个细胞, 进行抑制测定。将该反应在室温下温育 1 小时。该温育后, 用 1 ml PAA 洗涤反应, 在微量离心机(Hermle)中以 6,000 RPM 旋转 5 分钟。使上清液减少到大约 50 ul, 将细胞重悬于 100 ul PAAG 中, 其中含有将正好使细胞表面饱和的量的直接标记的 mAb。该温育后, 用 1 ml PAA 洗涤反应物, 在微量离心机(Hermle)中以 6,000 RPM 旋转 5 分钟。使上清液减少到大约 50 ul, 将细胞重悬于 1 ml PBS 中, 并且转移到 12 x 75 mm 试管中进行 FAC 分析。作为对照, 用第二 Alexafluor-488 缀合的山羊抗小鼠 IgG (H+L) (Molecular probes, 1:400 稀释于 PAAG)测量具有未标记 mAb 的独立的反应, 以确定该 mAb 结合于表面。也进行了阳性对照, 其伴随细胞仅仅具有标记的 mAb。如果未标记的 mAb 与标记的 mAb 结合相同的表位, 则将没有或只有很低的与细胞相关的荧光反应性。如果未标记的 mAb 与标记的 mAb 结合不同的表位, 则与表面相关的反应性的水平将与仅仅含有标记的 mAb 的对照细胞等同。

通过抑制研究，该组单克隆抗体落入四个反应组中：

表 4

组 I	组 II	组 III	组 IV
2H2.B8	9H3.E4	13G11.C11	2E12.A8
8A8.B4	1G3.B3		13C7.D12
	3G11.D5		

实施例 4: 用变性抗原和改变的抗原进行的结合研究

将 ORF0657n 改变的蛋白用于进一步表征结合。最初将编码 ORF0657n 的核酸克隆到表达载体 pET-28a (Novagen) 中，并且在具有 C 末端 6X 组氨酸标记的大肠杆菌中表达 (SEQ ID NO: 2)。按照制造商的说明，用 Stratagene 的 QuikChange XL 定点诱变试剂盒使具有克隆的基因的表达式载体进行诱变。用特定顺序的氨基酸改变，使基因突变。按照制造商的说明，将得到的质粒转化到 Stratagene 的 XL10-Gold 感受态细胞中。用 Qiagen 的 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒，从转化体分离质粒。通过用 ABI 的 310 DNA 测序仪测序，筛选转化体。将来自具有最大数目碱基改变的转化体的质粒转化到表达宿主 HMS174(DE3) (Novagen) 中。按照 Novagen 的说明书表达转化体。

将不同的 ORF0657n 改变的蛋白用于确定 ORF0657n mAbs (SEQ IDs 4-19) 的多样性。采用标准程序，用 10 种不同的 mAbs 在斑点印迹中筛选这些蛋白。采用标准程序，通过蛋白印迹证明阳性/阴性。通过该方法，根据结合谱对抗体分组。7 种抗体分辨为 3 组；剩余的三种抗体 (2H2.B8, 8A8.E11.H3 和 13G11.C11) 具有与彼此相似但不相同的谱 (表 5)。

表 5: 通过蛋白印迹检测的 ORF0657n 特异性 mAbs 与 ORF0657n 突变蛋白的结合

	组Ⅲ		组Ⅱ			组Ⅳ		组Ⅰ		
SEQ ID NO:	3G11.C11	3G12.A4	3B7.G8	1G3.B3	9H3.E4	2E12.A8	13C7.D12	2H2.B8	8A8.E11.H3	13G11.C11
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
7	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
8	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
9	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
10	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
11	-	-	W	W	W	-	-	-	-	W
12	-	-	W	W	W	-	-	-	-	W
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
19	+	+	+	+	+	W	W	-	-	+

+, 通过蛋白印迹检测的与蛋白结合的抗体; -, 通过蛋白印迹检测的不与蛋白结合的抗体; W, 通过蛋白印迹检测的与抗体弱结合。根据杂交谱对抗体分组。虚线用于表示获得了相似但不相同的谱。

实施例 5: BIAcore 研究

在 BIAcore 研究中, 采用纯化的 ORF0657n-H/y 作为抗原, 通过“足印分析”检验 mAbs。用实时生物分子相互作用分析, 通过 BIACORE[®]

进行逐对结合实验。BIACORE[®]整合了微流体技术和表面等离子共振 (SPR)，用于通过监测直接指向羧甲基右旋糖苷包被的 (CM5) 传感器芯片表面的偏振光的折射率，检测质量的改变。以反应单位测量的反应的变化，可以与结合的分析物（即抗原或抗体）的量相关。

抗葡萄球菌抗体(mAb 13C7.D12)共价结合（固定）在 CM5 传感器芯片的表面。首先将固定的 Ab 暴露于 ORF0657n 蛋白，随后以矩阵形式暴露于的一对抗体。在每轮 ORF0657n 蛋白 + 抗体对之后，用 20 mM HCl 将传感器芯片的表面再生回到固定的 mAb 13C7.D12。以矩阵形式测试抗 ORF0657n 蛋白的 8 种抗体，从而可以分析每对抗体的所有组合。用于本实施例的 mAb 对的矩阵设计概括于表 6。

表 6. 以 8x8 矩阵测试的抗体的概括

循环#	第一抗体	第二抗体			
		流式细胞 1	流式细胞 2	流式细胞 3	流式细胞 4
1	N/A 固定	13C7.D12	13C7.D12	13C7.D12	13C7.D12
2	2H2.B8	2H2.B8	13C7.D12	8A8.B4	9H3.E4
3	2H2.B8	13G11.C11	2E12.A8	1G3.B3	3G11.D5
4	13C7.D12	2H.B82	13C7.D12	8A8.B4	9H3.E4
5	13C7.D12	13G11.C11	2E12.A8	1G3.B3	3G11.D5
6	8A8.B4	2H2.B8	13C7.D12	8A8.B4	9H3.E4
7	8A8.B4	13G11.C11	2E12.A8	1G3.B3	3G11.D5
8	9H3.E4	2H2.B8	13C7.D12	8A8.B4	9H3.E4
9	9H3.E4	13G11.C11	2E12.A8	1G3.B3	3G11.D5
10	13G11.C11	2H2.B8	13C7.D12	8A8.B4	9H3.E4
11	13G11.C11	13G11.C11	2E12.A8	1G3.B3	3G11.D5
12	2E12.A8	2H2.B8	13C7.D12	8A8.B4	9H3.E4
13	2E12.A8	13G11.C11	2E12.A8	1G3.B3	3G11.D5
14	1G3.B3	2H2.B8	13C7.D12	8A8.B4	9H3.E4
15	1G3.B3	13G11.C11	2E12.A8	1G3.B3	3G11.D5
16	3G11.D5	2H2.B8	13C7.D12	8A8.B4	9H3.E4
17	3G11.D5	13G11.C11	2E12.A8	1G3.B3	3G11.D5

为了对每轮中最初结合（捕获）的抗原量进行标准化，计算以下每种测试抗体/抗原复合物的比值：

$$= \frac{\text{测试抗体反应单位} * 1000}{\text{ORF0657n 蛋白反应单位}} \quad \text{或} \quad \frac{\text{mRU}_{\text{Ab}}}{\text{RU}_{\text{Ag}}}$$

可以如下对作图的抗体对计算每种抗体保留的可用表位百分比：

$$= \frac{(\text{mRU}_{\text{Ab}} (\text{当第二 Ab 时}) / \text{RU}_{\text{Ag}}) * 100}{(\text{mRU}_{\text{Ab}} (\text{当第一 Ab 时}) / \text{RU}_{\text{Ag}})} \quad \text{或} \quad \begin{matrix} \text{保留\%} \\ (\text{对每种 Ab 计算}) \end{matrix}$$

图 2 描述了概括逐对结合研究中单克隆抗体的反应性的矩阵。该组单克隆抗体通过 BIACORE®法落入三个反应区（参见表 7）。

表 7

组 I	组 II	组 III
2H2.B8	13G11.C11	13C7.D12
8A8.B4	3G11.D5	2E12.A8
9H3.E4		
1G3.B3		

实施例 6: 用鼠脓毒症模型中的被动免疫进行的保护作用研究

测试单克隆抗体 mAb 2H2.BE11 和 mAb 13C7.BC1 提供抗金黄色葡萄球菌感染的保护作用的能力。这些抗体识别 ORF0657n 蛋白上的不同表位。对照包括同种型匹配的 mAb 和单独的 PBS。

在细菌攻击前 20 小时腹膜内(i.p.)施用 mAbs 或 PBS。然后用金黄色葡萄球菌 Becker 的 LD₈₀₋₉₀ 剂量静脉内攻击小鼠，监测存活。每个实验用 10 或 20 只小鼠的各组重复 3 次，并且监测 10 天。未感染的 BALB/c 小鼠中的单克隆抗体的半衰期是大约 8 天。发现 0.5 mg 的剂量是最优的。用两种单克隆抗体进行的实验的结果示于图 3A-C, 4A, 4B 和 5A-C。

尽管在一个实验中 mAb 13C7.BC1 与对照相比在第 10 天显著改善了存活率,但在其它两次重复中,总体存活率与对照相似(图 3A-3C)。但是,与对照相比,mAb 13C7.BC1 处理的小鼠在该 10 天的阶段中死亡时间延迟了。在三次实验中的两次中也注意到了 mAb 2H2.BE11 处理的小鼠中相似的时间延迟趋势(图 5A - 5C)。

也用最近的金黄色葡萄球菌临床分离物 UK58 检验了 mAb 13C7.BC1 的作用(图 4A 和 4B)。该菌株从患者的脓肿部位的传播最少。在两次独立实验中,结果显示 UK58 攻击后死亡时间延迟。

由于死亡迅速,在 LD₈₀₋₉₀ 模型中不能评估抗体持续研究。因此,进行了亚致死剂量攻击。在亚致死模型中,攻击剂量是 LD₈₀₋₉₀ 模型使用的剂量的 10%。在 4 小时的阶段中监测亚致死攻击模型。每组 22 只小鼠的各组在用 5×10^7 CFU 的金黄色葡萄球菌 Becker 进行静脉内细菌攻击前 20 小时接受 0.5 mg 剂量的 mAb 13C7.BC1 或同种型对照 mAb (6G6)。在即将开始攻击前(T=0)处死每组中的 2 只小鼠,确定攻击时的血清 mAb 水平。在攻击后 2、24、48、72 和 96 小时,处死每组的 4 只小鼠,确定血清 mAb 水平。

对于该亚致死攻击实验,估计金黄色葡萄球菌感染的小鼠中 mAb 13C7.BC1 的半衰期是大约 1 天。相反,估计同种型对照 mAb 的半衰期大于 4 天(数据未示出)。这些数据指向金黄色葡萄球菌攻击的小鼠中 mAb 13C7.BC1 的特异性减少,这似乎在致死模型中在监测的 10 天阶段之前就早已耗尽。

在图 3A-C, 4A, 4B 和 5A-C 中说明的 8 个实验中的 6 个,在接受 mAb 施用的组中在大约 3 天中观察到了改进的存活率。这些结果提供了指示,表明所述 mAbs 对金黄色葡萄球菌攻击的小鼠的存活率具有正作用。

实施例7: 在鼠留置导管模型中用被动免疫进行的保护作用研究

鼠留置导管模型中使用 mAb 2H2.BE11。该模型中使用的金黄色葡萄球菌株是临床分离物 MCL8538。该菌株选择为可以施用的较低剂量的接种物,同时仍然保留与鼠脓毒症模型中使用的菌株 - 金黄色葡萄球菌 Becker 相似的在导管中的可繁殖的集群。

ICR 小鼠具有手术植入颈静脉的导管(PE50 硅橡胶),该导管用缝线固定,具有位于小鼠背部中线的端口。小鼠在手术后休息 9 - 11 天。攻

击前24小时，通过单次腹膜内注射600 mcg鼠单克隆抗体2H2.BE11，对小鼠进行被动免疫。第0天，用静脉内施用的金黄色葡萄球菌MCL8538攻击小鼠。接种剂量是100 µl体积中的2 -8 X 10⁵ CFU（实验1 - 3）。发现该低剂量在4天后自发从导管清除。因此，在攻击后24小时，评估导管中的细菌。此时，处死小鼠，收集导管。通过在TSA上培养整个导管，评估导管上细菌的存在。如果在板上观察到任何生长的迹象，则导管评价为培养物阳性。

在前三个实验中的两个中，与同种型对照抗体相比，培养物阴性导管的数目在用抗体2H2.BE11被动免疫的小鼠中显著更低。用更大的接种剂量进行了第四个实验。在该更强烈的攻击中，确定剂量是100%导管受到可繁殖感染的剂量之一，并且该感染不能被对照小鼠自发清除（在7天中监测）。在采用更大接种剂量的实验4中，与同种型对照抗体相比，在用2H2.BE11抗体注射的小鼠中仍然发现受感染的导管数目显著更少。这4个实验的结果概括于表8。

表 8: 在用鼠留置导管模型进行的 4 个独立的被动转移实验
中获得的培养物阴性导管的数目

	培养物阴性导管的数目					p-值
单克隆抗体	实验#1	实验#2	实验#3	实验#4	总数	
2H2.BE11	3/4 (75%)	6/8 (75%)	4/10 (40%)	4/9 (44%)	17/31 (54%)	0.0187
同种型匹配的对照	1/4 (25%)	3/8 (38%)	4/10 (40%)	0/9 (0%)	8/31 (25%)	
各组具有留置导管的 ICR 小鼠在攻击前 24 小时用 600 mcg 鼠单克隆抗体腹膜内注射，所有单克隆抗体都是 IgG2b 同种型						

实施例 8: 用抗 ORF0657n 的单克隆抗体 2H2.B8 (IgG1)、2H2.BE11 (IgG2b) 或 13C7.IgG2b 或同种型匹配的对照 mAbs 进行的离体细菌预调理

为了测试 ORF0657n 的单克隆抗体是调理性的，进行了被动保护实验，其中用单克隆抗体 2H2.B8、2H2.BE11 或 13C7.IgG2b 或同种型匹配的对照单克隆抗体预调理致死剂量的金黄色葡萄球菌。然后给小鼠腹膜

内施用预调理过的细菌。用于这些实验中的细菌是金黄色葡萄球菌 RN4220 (野生型)或 RN4220.0657n。RN4220.0657n 细菌经过工程化, 在没有 FUR 盒的控制下表达 ORF0657n。因此, 它们可以在存在铁的条件下生长, 并且仍然在它们的表面表达 ORF0657n 抗原。或者, RN4220 (野生型)在低铁培养基 RPMI 中传代两次, 诱导细菌表面 0657n 的表达。

用 800 µg IgG 在 4 °C 下将足够用于 6 只 Balb/c 小鼠(6 X LD₁₀₀)的量温育 1 小时, 同时轻柔摇动。然后使细菌沉淀, 除去任何未结合的 mAb。将抗体调理过的细菌重悬于 2.4 mL PBS 中, 将 0.4 mL (1 X LD₁₀₀)注射到 5 只小鼠中的每一只。攻击后, 通过铺板在 TSA 上, 对每个接种物进行定量, 以确保所有组的小鼠给予相同的 CFU, 并且 mAbs 不使细菌聚集。攻击后, 监测存活率 3 天。由于细菌表面必须存在靶抗原, 才能使该程序有效, 小心确保调理前细菌上表达 0657n。采用 mAb 2H2.B8, 通过流式细胞术监测 ORF0657n 表达。注射到每只小鼠中的调理过的细菌剂量是 2-4 X 10⁹ CFU RN4220.0657n/小鼠, 或 1-2 X 10⁹ CFU RN4220(2X RPMI)/小鼠。

当用 2H2.B8 或 2H2.BE11, 但没有用同种型匹配的对照 mAb 预调理时, 细菌受到保护, 免受由于致死剂量的 RN4220.0657n 葡萄球菌导致的死亡。对 IgG1 同种型重复该实验两次, 对 IgG2b 同种型, 重复三次, 得到相似结果 (表 9A)。

表 9A: 用抗 0657n mAb 的离体保护作用

单克隆抗体	实验 1 存活的小鼠	实验 2 存活的小鼠	实验 3 存活的小鼠	总数
2H2.BE11 (IgG2b)	5	4	5	93% (14/15)
6G6.A8 (IgG2b)	1	0	1	13% (2/15)
PBS	1	2	0	20% (3/15)
2H2.BE11 (IgG1)	ND	4	5	90% (9/10)
10B4.H4 (IgG1)	ND	1	1	20% (2/10)

每个实验用 5 只小鼠。攻击菌株 RN4220.0657n.pYZ119。剂量: $2-4 \times 10^9$ CFU。测试 mAbs: 鼠抗-0657n 2H2.BE11 (IgG2b); 2H2.B8 (IgG1)。

当用任一种 mAb 2H2.B8 预调理, 但没有用同种型匹配的对照 mAb 预调理时, 细菌受到保护, 免受由于致死剂量的 RN4220 (2X RPMI) 葡萄球菌导致的死亡。实验重复 6 次, 具有相似的结果 (表 9B)

表 9B: 用抗 0657n mAb 的离体保护作用

单克隆抗体	# 测试	聚集	% 存活
2H2.B8	6	30/30	100%
10B4.IgG1 同种型对照	6	2/30	7%
13C7.IgG2b	2	0/10	0%
6G6.IgG2b 同种型对照	2	0/10	0%

在该致死模型中, 鼠抗 0657n 2H2 在防止死亡方面非常有效。13C7 mAb 在该模型中无效 (与图 3-6 所示的前面的描述相反)。所有 (2H2.BE11, 2H2.B8 和 13C7.IgG2b) 抗 0657n mAb 都结合 RN4220 (如用流式细胞术所证明的), 并且在体外 OPA 测定中都具有调理活性。该模型反映了小鼠腹膜中用于增强存活的表位特异性的额外要求。

实施例 8: 用 2H2 mAb 进行的表位作图研究

本实施例中描述的实验提供证据证明单克隆抗体 2H2.BE11 识别 ORF0657n 内的构象表位。定位于 ORF0657n 内的最小序列的该实验需要展示 2H2 mAb 识别的三维结构中的构象表位。此外, 该实验鉴定了 ORF0657n 的最小序列内的独特赖氨酸残基, 当 2H2 mAb 结合于 ORF0657n 时, 其受到保护, 避免与小分子反应。

用表位提取, 研究 2H2 mAb 识别 ORF0657n 的序列内长度一般为 9 - 14 个氨基酸的线性表位的潜在能力, 并且从 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 42 - 氨基酸 486 的 ORF0657n 片段 ("ORF0657t") 开始。具体地, 通过化

学交联将 30 ug 2H2 mAb 固定于 10 mg 溴化氰活化的琼脂糖凝胶 (Amersham 目录号 17 0430 01), 从而进行每个表位提取实验。用 GluC (Roche Applied Science 目录号 11 420 3997 001)、Asp-N (Roche Applied Science 目录号 11 054 589 001)或糜蛋白酶(Roche Applied Science 目录号 11 418 467 001)进行 ORF0657t 的蛋白水解消化, 并且通过 1D/LC-MS/MS 在线性离子阱(LTQ – Thermo Electron Inc)中表征。在三个独立的实验中, 使 8.4 μ g 的表征的蛋白酶蛋白水解消化物与固定的抗体反应。从抗体交联珠上洗去未结合的肽。用低 pH 洗脱可能结合的肽, 通过 1D/LC-MS/MS 表征。所有产生的蛋白水解肽都没有被 2H2 mAb 以高效率 and 特异性结合, 提供了强烈的提示, 即 2H2 mAb 不识别线性表位。

2H2 mAb 不识别 ORFO657n 的线性序列的发现通过有限的化学裂解实验证实。用 CNBr 将 ORF0657t 化学裂解 2 小时。通过 SDS-PAGE 分析得到的裂解产物。SDS-PAGE 分析显示 5 个主要的条带, 分子量大约 42 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa 和 10 kDa。用 2H2 mAb 进行的蛋白印迹分析显示 2H2 仅仅识别 42 kDa 的条带。从 SDS-PAGE 切下所有条带, 进行凝胶内消化, 将通过串联质谱鉴定的得到的肽与 ORF0657t 中相应的序列匹配。主要条带的分析结果示于表 10:

表 10

CNBr 裂解	结合于 2H2 mAb	ORFO657t	计算的 MW kDa
条带 42 kDa	是	[001-356]	40.7
条带 35 kDa	否	[001-323]	36.7
条带 25 kDa	否	[001-214]	23.9
		[116-302]	21.9
条带 15 kDa	否	[215-356]	16.8
		[303-446]	16.6
条带 10 kDa	否	[114-214]	11.7
		[215-302]	10.39
		[357-446]	10.28

通过表位切除,证实分子量为大约 42 kDa 的片段的重要性。具体地,通过化学交联将 210 μg 2H2 mAb 固定于 50 mg 溴化氰活化的琼脂糖凝胶(Amersham 目录号 17 0430 01)上,用于每个表位切除实验。然后,使 50 μg 完整的 ORF0657t 与固定的抗体结合,通过用磷酸缓冲液充分洗涤,洗去未结合的 ORF0657t。在三个独立的实验中,在顺序组合中,将蛋白酶 Glu-C、胰蛋白酶,以及 GluC、AspN、胰蛋白酶、糜蛋白酶和羧基肽酶 Y 的顺序组合加入 5 小时或 1 小时/蛋白酶。彻底洗去温育过程中蛋白酶切除的肽,特异性结合于 2H2 mAb 的 ORF0657t 片段用 SDS 加样缓冲液释放。

通过 SDS-PAGE 分析特异性结合于 2H2 mAb 的片段。所有三个表位切除实验证明 SDS-PAGE 分析中仅有一个条带具有 40 - 42 kDa 的分子量。通过蛋白印迹分析证实与 2H2 mAb 结合的条带。对 Glu-C 蛋白酶重复表位切除实验。此时,用酸性条件释放特异性结合于 2H2 mAb 的 ORF0657t 片段,并且通过 1D/LC-MS/MS 在线性离子阱(LTQ, Thermo Electron)上分析。洗脱的样品显示的信号(总离子计数)在 82-87 分钟(40%-45%乙腈)和多电荷状态下($[M+67\text{ H}]^{67+} - ([M+30\text{ H}]^{30+})$)的预期强度解卷积为 42.628 kDa。相应于该特定质量的 ORFO657t 的可能片段是 ORFO657t 的序列[012-382],分子量为 42.6 kDa。

为了确定在与 2H2 mAb 结合时 ORFO657t 的哪个赖氨酸残基受到保护而免受化学反应,用磺基-NHS-乙酸酯(Pierce 目录号 26777),在 2H2 mAb 存在或不存在的条件下用三个不同的实验条件进行化学标记实验。参见表 11。

表 11

实验	1	2	3
分子过量的 2H2 mAb	0 或 3	0 或 3	0 或 3
分子过量的 磺基-NHS 乙酸酯	25	500	75
反应温度 $^{\circ}\text{C}$	室温	15	37
反应时间	1 小时	30 分钟	2 小时

对于每个实验,用三种蛋白酶之一温育以 0 或 3 摩尔过量的 2H2

mAb 产生的反应产物，得到 2×9 反应混合物。实验 1 采用 GluC, AspN 和胰蛋白酶。实验 2 和 3 采用 GluC, AspN 和糜蛋白酶。蛋白水解肽然后通过 1D/LC-MS/MS 进行分析。对于每个反应，基于各个肽的总离子计数 (TIC) 的曲线下面积，计算乙酰化和未乙酰化赖氨酸残基的比。然后在各对 (具有或不具有 2H2 mAb) 之间比较获得的比，得到相同的反应条件。对所有三个反应条件进行总体分析，鉴定 ORF0657t 内在 ORF0657t 与 2H2 mAb 结合时最大遮蔽的赖氨酸残基。上文描述的化学标记实验鉴定了 K76、K257 和可能的 K442 与 2H2 mAb 结合时受到最多的保护。抗化学标记的保护作用可能是由于直接结合。但是，所述保护作用可能是由于紧邻受保护位点的结合，或 ORF0657nI 内的大范围结构改变。

概言之，上文描述的实验提供了明确的证据，即 ORF0657t 内被 2H2 mAb 识别的表位是构象表位。2H2 mAb 识别的 ORF0657t 片段具有位于 ORF0675t 的氨基酸 1 - 115 之间的 N 末端，和位于 ORF0657t 的氨基酸 323 - 357 之间的羧基末端。尽管不能排除结合 2H2 mAb 时抗化学标记的保护作用受到大范围结构改变的影响，但很可能与赖氨酸 76 和赖氨酸 275 紧邻的区域参与直接的抗体相互作用。

实施例 9: 2H2 mAb 序列鉴定

通过组合单链可变片段(scFv)组装物(Krebber *et al. JIM 201(1):35-55*, 1997)的简并引物 PCR/重叠延伸克隆过程，实现表达 2H2 IgG 的杂交瘤的可变轻链 (V_L) 和可变重链(V_H)序列的鉴定，其中通过 Biacore 进行与人 κ 轻链恒定区或 scAb 材料融合的可溶性 scFv 的高通量筛选。这使得能够通过简并引物方法建立对 V_L 构架区 1, 4 和 V_H 构架区 1, 4 中的突变的精密区分。

简言之，用标准方法，通过总 DNA 试剂盒(Total RNA KitTM (Ambion Inc.)) 从杂交瘤细胞系统纯化 RNA 材料。然后将该材料逆转录为 cDNA，并且用作 PCR 中的模板，用于扩增可变区。V_L 和 V_H 链的 PCR 扩增条件是基于 Krebber *et al. JIM 201(1):35-55*, 1997 描述的方法。设计引物，使得能添加(Gly4Ser)₄ 接头(SEQ ID NO: 32)，其提供用于第三 PCR 反应的结构域，在该 PCR 反应中，V_L 和 V_H 重叠，得到 V_L-(Gly4Ser)₄-V_H scFv。

在 100 μl 体积中进行第一组 PCR 反应，用于单独扩增可变链，所

述 100 μ l 体积中含有 5 μ l cDNA 反应,用于扩增 V_I 和 V_h 的正向和反向引物组各 2 μ M, 和高保真 PCR 主混合物。94°C 下将反应变性 4 分钟, 然后是 30 个循环的 94°C 下 30 秒, 50°C 下 30 秒, 72°C 下 1 分钟, 并且在 72°C 下结束于 5 分钟的最终循环。凝胶纯化全长 PCR 产物。

为了构建全长产物, 进行了第三 PCR 反应, 以从扩增的 V_h 和 V_I 材料组装 scFv。在 100 μ l 的体积中, 94°C 下使 V_h 和 V_I DNA 各大约 20 ng 和高保真 PCR 主混合物变性 5 分钟, 然后是 3 个循环的 94°C 下 30 秒, 60°C 下 30 秒, 和在缺乏引物的条件下 72°C 下 30 秒。以 1 μ M 的终浓度加入修饰的 PCR 引物 SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 34, 进行 30 个循环的 94°C 下 30 秒, 60°C 下 1 分钟, 和 72°C 下 1 分钟, 然后是 72°C 下 7 分钟。凝胶纯化预期的全长 scFv PCR 产物。

将扩增的 scFv 材料克隆到 MP16 可溶性表达载体中, 进行 scAb 生产(Hayhurst *et al.*, *JIM* 276(1-2):185-196, 2003)和序列分析。用 SfiI 进行的单限制酶消耗用于定向克隆到 MP16 载体中。然后将具有表观全长可变重链和可变轻链的克隆在 XL1-Blue 细胞中表达为 scAbs, 并且用标准渗透压休克程序从周质中纯化。简言之, 使克隆在 37°C 下在含有 2%葡萄糖和 100 μ g/ml 氨苄青霉素的生长培养基中以 96 孔形式生长过夜。将 20 μ l 过夜培养物转移到含 0.1%葡萄糖和 100 μ g/ml 氨苄青霉素的新培养基中, 生长直到达到 OD₆₀₀ 为 0.6。通过加入终浓度为 0.5 mM 的 IPTG, 并且室温下以 150 rpm 振荡下温育过夜, 对细胞进行温育, 从而进行 scAb 表达。用 Qiagen Ni-NTA 超速流动 (superflow) 自动机械程序, 从细胞纯化 scAbs。

为了分析每种 scAb 周质制剂与 ORF0657t 的结合活性, 利用了 Biacore3000 表面等离子共振 (SPR) 仪器 (Uppsala, Sweden)。采用标准 EDC/NHS 偶联, 将大约 250 个共振单位的 0657t 抗原直接固定到 CM5 传感器芯片的实验流动细胞表面。参照流动细胞表面在不与蛋白偶联的条件下活化和灭活。然后在表面上进行每次沉淀, 测量 scAb 与抗原的缔合和解离。以 20 μ l/分钟的流速单次注射 10 mM HCl 20 秒, 然后是 2 分钟的稳定阶段, 在每次运行之间使表面再生。所有样品以双份测试, 仅含缓冲液的测试用作对照。筛选 95 个克隆后, 基于结合活性选择克隆。基于对 ORF0657t 的相似亲和力选择最终的 2H2 克隆, 作为最初的杂交瘤制备的 IgG 材料, 以及比较性序列分析。

2H2 V_h (SEQ ID NO: 20)和 V_l (SEQ ID NO: 21)的氨基酸序列如下:

2H2 V_h 氨基酸序列(SEQ ID NO: 20)

1 DVHLVESGPG LVAPSQNLSI TCTVSGFSLS RYGVHWVRQP PGKGLEWLGL
51 IWAGGVTIYN STLMSRLSIS KDSSKSQVFL KMNSLQIDDT AIYYCAREAS
101 RDHYFDYWGQ GTTLTVSS

2H2 V_l 氨基酸序列(SEQ ID NO: 21)

1 DIVMTQSPAI MSASPGKIT MTCSASSSVS YIYWYQQKSG TSPKRWIYDT
51 SKLASGVPFR FSGGGSGTSF SLTISSMEAE DAATYYCQQW SSNPLTFGAG
101 TKLEIK

加下划线的部分是 CDR。基于 Kabat 定义鉴定 CDR。编码核酸序列由 SEQ ID NO: 24 (V_h)和 SEQ ID NO: 25 (V_l)提供。

实施例 10: 2H2 IgG 嵌合体表达

按照实施例 9 的描述,从小鼠杂交瘤克隆 2H2 mAb 的可变区。对可变区的序列进行 PCR 扩增,并且将编码重链可变区的 DNA 与编码 IgG1 恒定区的 DNA 符合读码框地融合,而编码轻链可变区的 DNA 与编码 κ 恒定区的 DNA 符合读码框地融合。下文描述了得到的抗体表达载体的克隆程序。

对可变区进行 PCR 扩增。在含有高保真 PCR 主混合物、模板体积 1 μl 以及正向和反向引物各 1 μl 的 25 μl 体积中进行 PCR 反应。PCR 条件是 1 个循环的 94°C, 2 分钟, 25 个循环的 94°C, 1.5 分钟; 60°C, 1.5 分钟; 72°C, 1.5 分钟和 72°C, 7 分钟; 4°C, 直到去除并且用 In-Fusion 策略将前导序列符合读码框地克隆在 5'末端, 并且将恒定区克隆在 3'末端。使用以下引物: 轻链正向, 5'- ACAGATGCCAGATGCGATATTG TGATGACCCAGTCT (SEQ ID NO: 28); 轻链反向, 5'- TGCAGCCA CCGTACGTTTTATTTCAGCTTGGTCCC (SEQ ID NO: 29); 重链正向, 5'- ACAGGTGTCCACTCGGATGTGCACCTGGTGGAGTCA (SEQ ID NO: 30); 和重链反向, 5'- GCCCTTGGTGGATGCCGAGGAGACTGTG AGAGTGGT (SEQ ID NO: 31)。通过测序证实所有克隆的 DNA 序列。

从 DNA 序列推导的氨基酸序列是:

小鼠 2H2 可变区和人 κ 恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO: 22)

```

1   DIVMTQSPAI MSASPGEKIT MTCSASSSVS YIYWYQQKSG TSPKRWIYDT
51  SKLASGVPFR FSGGGSGTSF SLTISSMEAE DAATYYCQQW SSNPLTFGAG
101 TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD
151 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL
201 SSPVTKSFNR GEC

```

小鼠 2H2 可变区和人 IgG1 恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO: 23)

```

1   DVHLVESGPG LVAPSQNLSI TCTVSGFSLS RYGVHWVRQP PGKGLEWLGL
51  IWAGGVTIYN STLMSRLSIS KDSSKSQVFL KMNSLQIDDT AIYYCAREAS
101 RDHYFDYWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
301 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
401 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

```

可变区加下划线。

在 293EBNA 单层细胞中表达抗体。用基于 PEI 的转染试剂转染质粒。转染的细胞在 Opti-MEM 无血清培养基中温育，用蛋白 A/G 亲和层析从培养基纯化分泌的抗体。通过 OD280 nm 确定纯化的抗体的浓度，通过 LabChipTM 毛细管电泳测量纯度。

通过人 CMV 启动子和牛生长激素聚腺苷酸化信号驱动轻链和重链的表达。(Shiver *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 772:198-208, 1995.) 前面的前导序列介导抗体分泌到培养基中。重链的前导序列是 MEWSWVFLFFL SVTTGVHS (SEQ ID NO: 26)，轻链的前导序列是 MSVPTQVLGLLLL WLTDARC (SEQ ID NO: 27)。表达载体携带用于在 293EBNA 细胞中延长表达的来自 EBV 病毒基因组的 oriP、卡那霉素选择标记的细菌序列，和大肠杆菌中的复制起点。

在 293EBNA 单层细胞中表达抗体。用基于 PEI 的转染试剂转染质

粒。转染的细胞在 Opti-MEM 无血清培养基中温育，用蛋白 A/G 亲和层析从培养基纯化分泌的抗体。通过 OD280 nm 确定纯化的抗体的浓度，通过 LabChip™ 毛细管电泳测量纯度。

实施例 11: 亲和力测定

对作为杂交瘤材料、scAb和嵌合抗体的2H2 mAb进行比较分析。克隆2H2 mAb V_h和V_l区，按照实施例10的描述表达为IgG嵌合体。将scAb克隆到MP16载体（实施例9）中，其产生具有与其融合的人κ链标记的scFv。如下文的进一步描述，构建体之间的抗原亲和力没有显著差异。

为了测量结合域和抗原之间的1:1相互作用，根据是否分析了抗体片段或全长IgG，修改设立在Biacore上的实验。为了测量IgG，将IgG捕获在表面上作为配体，将ORF0657t作为分析物。为了进行抗体片段分析，将ORF0657t结合于表面，抗体片段作为分析物。这证明了最初的2H2 mAb杂交瘤材料与ORF0657t抗原的亲和力在重组克隆时没有显示显著改变（表12）。通过表面等离子共振在Biacore 3000上采集数据；每种分析物以多种浓度运行，每个浓度重复两次。用BIAevaluation (Biacore, Inc.)分析数据，其中采用整个浓度系列的同时拟合。拟合参数列于表12。

表 12

	缔合速率 <i>k_a</i> (1/Ms)	解离速率 <i>k_d</i> (1/s)	亲和力, KD	<i>chi</i> ² 总体拟合
2H2 鼠 IgG2b	6.10 E+04	2.01 E-03	33nM	0.902
2H2 scAb	4.91 E+04	1.91 E-03	39nM	0.429
2H2 IgG 嵌合体	1.10 E+05	2.73 E-03	25nM	0.295

实施例 12: 基于 ORF0657n 的序列

存在于 SEQ ID NOs: 4-19 中的强调的氨基酸（通过粗体和下划线表示）显示 ORF0657n 的氨基酸改变：

0657n (SEQ ID NO: 1)

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
NTEAQPKEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
KEVKEVKAPKETKAVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
APNSRPIDFEMKKENGEQQFYHYASSVKPARVIFTDSKPEIELGLQSGQ

FWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRFSVSNGTKAVKIVSSTH
FNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKTL
ERQVYELNKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKALDEQVKSATEFQNV
QPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
MVMETTNDDYWKDFMVEGQRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
DKTPATKPTKGEVESSSTPTKVVSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

0657nC/e (SEQ ID NO: 2)

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
NTEAQPKEA VASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
KEVKEVKAPKETKAVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
APNSRPIDFEMKKENGEQQFYHYASSVKPARVIFTDSKPEIELGLQSGQ
FWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRFSVSNGTKAVKIVSSTH
FNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKTL
ERQVYELNKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKALDEQVKSATEFQNV
QPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
MVMETTNDDYWKDFMVEGQRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
DKTPATKPTKGEVESSSTPTKVVSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKNLEHHHHHH

0657nH/y (SEQ ID NO: 3)

MAEETGGTNTEAQPKEA VASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVE
APTSETKEAKEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKN
PAIKDKDHSAPNSRPIDFEMKKKDGTQQFYHYASSVKPARVIFTDSKPE
IELGLQSGQFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRFSVSNGTK

AVKIVSSTHFNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLA
 PYKKAKTLERQVYELNKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKALDEQVKS
 AITEFQNVQPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTG
 MLNGKKYMMETTNDDYWKDFMVEGQRTISKDAKNNTRTIIFPY
 VEGKTLYDAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQ
 QDNSAKKEATPATPSKPTSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKEND
 ASSESGKDKTPATKPTKGEVESSSTPTKVSTTQNVAKPTTASSKTT
 KDVVQTSAGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKS

SEQ ID NO: 4

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEA VASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
 APNSRPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSVKPARVIFTDSKPEIELGLQSGQ
 FWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRFSVSNGTK**E**VKIVSSTH
 FNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKTL
 ERQVYELNKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKALDEQVKS AITEFQNV
 QPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTPTKVSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 5

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEA VASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
 APN**W**RPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSV**E**PARVIFTDSKPEIELGLQSG
 QFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRFSVSNGTK**E**VKIVSST
 HFNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKT

LERQVYELNKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKALDEQVKSATEFQNV
 QPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTPTKVVSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 6

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
 APNWRPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSVEPARVIFTDSKPEIELGLQSG
 QFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYYIRFSVSNGTKAVKIVSST
 HFNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKT
 LERQVYELEKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKALDEQVKSATEFQNV
 QPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTPTKVVSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 7

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
 APNWRPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSVEPARVIFTDSKPEIELGLQSG
 QFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYYIRFSVSNGTKEVKIVSST
 HFNNKEEKYDYTLMVFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKT

LERQVYELNKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKAL~~A~~EQVKSATEFQNV
 QPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTPTKVSTTQNVAKPTTASSKTTKDVVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 8

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
 APN~~W~~RPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSV~~E~~PARVIFTDSKPEIELGLQSG
 QFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRFSVSNGTK~~E~~VKIVSST
 HFNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKT
 LERQVYEL~~E~~KIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKAL~~A~~EQVKSATEFQNV
 QPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTPTKVSTTQNVAKPTTASSKTTKDVVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 9

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
 APN~~W~~RPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSV~~E~~PARVIFT~~K~~SKPEIELGLQSG
 QFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDT~~D~~KDYAYIRFSVSNGTK~~E~~VKIVSST
 HFNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKT

LERQVYELEKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKALAAEQVKSATEFQNV
 QPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTPTKVVSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 10

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
 APNWRPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSVEPARVIFTKSKPEIELGLQSG
STWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTDKDYAYIRFSVSNGTKEVKIVSST
 HFNNKEEKYDYTLMVFAQPIYNSADKFKTEEDYKA EKLLAPYKKAKT
 LERQVYELEKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKALAAEQVKSATEFQNV
 QPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTPTKVVSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 11

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
 APNWRPIDFEMKNDKGTQQFYHYASSVEPARVIFTKSKPIIELGLQSG
 QFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTDKDYAYIRFSVSNGTKEVKIVSST
 HFNNKEEKYDYTLMVFAQPIYNSADKFKTEEDYKA EKLLAPYKKAKT

LERQVYELEKIQDKLPEKLKA EYKKKLEDTKKALAEQVKS AITEFQNV
 QPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRVRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTTPTKV VSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQN NKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 12

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQP KTEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
 APNWRPIDFEMKNDKGTQQFYHYASSVEPARVIFTKSKPIELGLQSG
 QFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTDKDYAYIRFSVSNGTKEEVKIVSST
 HFNNKEEKYDYTLMVFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKT
 LERQVYELEKIQDKLPEKLKA EYKKKLEQTKKALAEQVKS AITEFQNV
 QPTNEKMTDLQDAHYVVYESVENSESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRVRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTTPTKV VSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQN NKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 13

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQP KTEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHS
 APNWRPIDFEMKNDKGTQQFYHYASSVEPARVIFTKSKPIELGLQSG
 QFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTDKDYAYIRFSVSNGTKEEVKIVSST
 HFNNKEEKYDYTLMVFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKT

LERQVYELEKIQDKLPEKLKA EYKKKLEQTKKALAEQVKS AITEFQNV
 QPTNEKMTDLQDAHYVVYESVENSESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGKRVRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKALY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTTPTKV VSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 14

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEAVASPTTTSEKAPETKPVANA VSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKEHS
 APNSRPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSVKPARVIFTDSKPEIELGLQSGQ
 FWRKFEVYEGDKKLPVKLVSYDTV KDYAYIRFSVSNGTKAVKIVSST
 HFNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKA EKLLAPYKKAKT
 LERQVYELNKLQEKLPEKLKA EYKKKLEDTKKALDEQVKSAVTEFQN
 VQPTNDKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKK
 YMVMETTNDDYWKDFMVEGQSVRTISKDAKNNTRTIIFPYIEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTTPTKV VSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 15

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEAVASPTTTSEKAPETKPVANA VSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELRDAIKNPAIKDKEHS
 APNSRPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASTVKPARVIFTDTKPEIELGLQSG
 QFWRKFEVYEGDKKLPVKLVSYDSV KDYAYIRFSVSNGTRAVKIVSST
 HYNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKYKTEEDYKA EKLLAPYKKAK

TLERQVYELNK**L**QDKLPEKLKAEYKKKL**D**DTKKALD**D**QVKS**A****V**TEF
 QNVQPTNEKMTDLQDTKYVV**E**ESVENNES**V**MDTFVKHPIKTGMLNG
 KK**Y****V**VMETTNDDYWKDF**I**VEGQRVRT**V**SKDAKNNTRTIIFPYVEGKT
 LYDAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSA
 KKEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESG
 KDKTPATKPTKGEVESSSTTPTKVVSTTQNVAKPTTASSKTTKDVVQT
 SAGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGE
 ESNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 16

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAI**I**DKDHS
 APNSRPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSVKPARVIFTDS**G**PEIELGLQSGQ
 FWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRF**P**VSNGTKAVKIVSSTH
 FNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKA EKLLAPYKKAKTL
 ERQVYELNKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKALDEQVKS**A**ITEFQNV
 QPTNEKMTDLQDTKYVV**Y**ESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRVRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTTPTKVVSTTQNVAKPTTASSKTTKDVVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 17

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAI**I**DKDHS
 APNSRPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSVKPARVIFTDS**G**PEIELGLQSGQ
 FWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRF**P**VSNGTKAVKIVSSTH
 FNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKA EKLLAPYKKAKTL

ERQVYELNKIQDKLPEKLLKAEYKKKLEDTKKALDEQVKS AITEFQNV
 QPTNEKMTDLQDTKYVVYESEENNESMMDTFVKHPIYTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRVRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTPTKV VSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNKNKTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 18

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEA VASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIIDKDHS
 APNSRPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSVKPARVIFTDSGPEIELGLQSGQ
 FWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRFPVSNGTKAVKIVSSTH
 FNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKDEEDYKAÆKLLAPYKKA¹TL
 ERQVYELNKIQDKLPEKLLKAEYKKKLEDTKKALDEQVKS AITEFQNV
 QPTNEKMTDLQDTKYVVYESEENNESMMDTFVKHPIYTGMLNGKKY
 MVMETTNDDYWKDFMVEGQRVRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLY
 DAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAK
 KEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGK
 DKTPATKPTKGEVESSSTPTKV VSTTQNVAKPTTASSKTTKD VVQTS
 AGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNKNKTQENKAKSLPQTGEE
 SNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

SEQ ID NO: 19

MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGT
 NTEAQPKEA VASPTTTSEKAPETKPVANAVSVSNKEVEAPTSETKEA
 KEVKEVKAPKETKEVKPAAKATNNTYPILNQELREGSEAIKNPAIKDK
 DHSAPNSRPIDFEMKKKDGTTQQFYHYASSVKPARVIFTDSKPEIELGLQ
 SGQFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRFSVSNGTKAVKIVS
 STHFNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAÆKLLAPYKKA

KTLEQVYELNKKIQDKLPEKLKAEYKKKKLEDTKKALDEQVKSATEFQ
NVQPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGK
KYMVMETTNDDYWKDFMVEGQVRVTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKT
LYDAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDVDKEAFTKANTDKSNKKEQQD
NSAKKEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASS
ESGKDKTPATKPTKGEVSSSTPTKVVSTTQNVAKPTTASSKTTKDV
VQTSAGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQ
TGEESNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLPRKRKN

其它实施方案在以下权利要求的范围内。尽管显示和描述了一些实施方案，但可以进行多种修改，而不背离本发明的精神和范围。

<110> Merck & Co., Inc.

<120> 靶定金黄色葡萄球菌 ORF0657n 的抗原结合蛋白

<130> 21934Y PCT

<150> 60/763,023

<151> 2006-01-27

<160> 34

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 645

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 1

```

Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
1          5          10          15
Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
20        25        30
Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
35        40        45
Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
50        55        60
Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
65        70        75        80
Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
85        90        95
Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Ala Val Lys
100       105       110
Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
115       120       125
Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Asp His Ser
130       135       140
Ala Pro Asn Ser Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Glu Asn Gly
145       150       155       160
Glu Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Arg Val
165       170       175
Ile Phe Thr Asp Ser Lys Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly
180       185       190
Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro
195       200       205
Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg
210       215       220
Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Ala Val Lys Ile Val Ser Ser Thr
225       230       235       240
His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe
245       250       255
Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp
260       265       270
Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu
275       280       285

```

Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu
 290 295 300
 Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln
 325 330 335
 Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val
 340 345 350
 Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys
 355 360 365
 His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
 370 375 380
 Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln
 385 390 395 400
 Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
 405 410 415
 Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
 420 425 430
 Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile
 435 440 445
 Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys
 450 455 460
 Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr
 465 470 475 480
 Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
 485 490 495
 Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
 500 505 510
 Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
 515 520 525
 Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
 530 535 540
 Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
 545 550 555 560
 Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
 565 570 575
 Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
 580 585 590
 His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
 595 600 605
 Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
 610 615 620
 Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
 625 630 635 640
 Arg Lys Arg Lys Asn
 645

<210> 2

<211> 653

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有羧基 His 标记的 0657n

<400> 2

Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys

1	5	10	15
Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu			
20	25	30	
Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr			
35	40	45	
Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr			
50	55	60	
Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser			
65	70	75	80
Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala			
85	90	95	
Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Ala Val Lys			
100	105	110	
Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu			
115	120	125	
Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Asp His Ser			
130	135	140	
Ala Pro Asn Ser Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Glu Asn Gly			
145	150	155	160
Glu Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Arg Val			
165	170	175	
Ile Phe Thr Asp Ser Lys Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly			
180	185	190	
Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro			
195	200	205	
Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg			
210	215	220	
Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Ala Val Lys Ile Val Ser Ser Thr			
225	230	235	240
His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe			
245	250	255	
Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp			
260	265	270	
Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu			
275	280	285	
Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu			
290	295	300	
Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala			
305	310	315	320
Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln			
325	330	335	
Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val			
340	345	350	
Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys			
355	360	365	
His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met			
370	375	380	
Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln			
385	390	395	400
Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile			
405	410	415	
Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys			
420	425	430	
Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile			
435	440	445	
Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys			
450	455	460	
Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr			

```

465          470          475          480
Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
          485          490          495
Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
          500          505          510
Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
          515          520          525
Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
          530          535          540
Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
545          550          555          560
Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
          565          570          575
Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
          580          585          590
His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
          595          600          605
Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
          610          615          620
Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
625          630          635          640
Arg Lys Arg Lys Asn Leu Glu His His His His His His
          645          650

```

<210> 3
 <211> 569
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ORF0657n 的截短形式

<400> 3
 Met Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr
 20 25 30
 Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala
 35 40 45
 Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala
 50 55 60
 Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn
 65 70 75 80
 Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro
 85 90 95
 Ala Ile Lys Asp Lys Asp His Ser Ala Pro Asn Ser Arg Pro Ile Asp
 100 105 110
 Phe Glu Met Lys Lys Lys Asp Gly Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala
 115 120 125
 Ser Ser Val Lys Pro Ala Arg Val Ile Phe Thr Asp Ser Lys Pro Glu
 130 135 140
 Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val
 145 150 155 160
 Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr
 165 170 175
 Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys
 180 185 190

Ala Val Lys Ile Val Ser Ser Thr His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys
 195 200 205
 Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala
 210 215 220
 Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala
 225 230 235 240
 Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn
 245 250 255
 Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys
 260 265 270
 Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala
 275 280 285
 Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp
 290 295 300
 Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu
 305 310 315 320
 Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp
 340 345 350
 Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp
 355 360 365
 Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys
 370 375 380
 Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr
 385 390 395 400
 Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys
 405 410 415
 Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala
 420 425 430
 Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro
 435 440 445
 Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys
 450 455 460
 Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly
 465 470 475 480
 Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser
 485 490 495
 Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala
 500 505 510
 Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr
 515 520 525
 Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala
 530 535 540
 Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys
 545 550 555 560
 Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys Ser
 565

<210> 4

<211> 645

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ORF0657n 突变体

<400> 4

```

Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
 1             5             10             15
Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
      20             25             30
Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
      35             40             45
Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
      50             55             60
Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
65             70             75             80
Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
      85             90             95
Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys
      100            105            110
Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
      115            120            125
Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Asp His Ser
      130            135            140
Ala Pro Asn Ser Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Lys Asp Gly
145             150             155             160
Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Arg Val
      165             170             175
Ile Phe Thr Asp Ser Lys Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly
      180            185            190
Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro
      195            200            205
Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg
      210            215            220
Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Glu Val Lys Ile Val Ser Ser Thr
225             230             235             240
His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe
      245             250             255
Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp
      260            265            270
Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu
      275            280            285
Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu
      290            295            300
Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala
305             310             315             320
Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln
      325             330             335
Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val
      340            345            350
Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys
      355            360            365
His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
      370            375            380
Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln
385             390             395             400
Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
      405             410             415
Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
      420            425            430
Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile
      435            440            445
Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys

```


450	455	460
Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr		
465	470	475
Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln		
	485	490
Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu		495
	500	505
Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys		510
	515	520
Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val		525
	530	535
Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys		540
545	550	555
Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys		
	565	570
Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly		575
	580	585
His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys		590
	595	600
Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro		605
	610	615
Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro		620
625	630	635
Arg Lys Arg Lys Asn		640
	645	

<210> 5

<211> 645

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ORF0657n 突变体

<400> 5

Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys	
1	5
Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu	
	20
Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr	
	35
Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr	
	50
Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser	
65	70
Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala	
	85
Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys	
	100
Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu	
	115
Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Asp His Ser	
	130
Ala Pro Asn Trp Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Lys Asp Gly	
145	150
Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Glu Pro Ala Arg Val	
	165
	170
	175

Ile Phe Thr Asp Ser Lys Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly
 180 185 190
 Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro
 195 200 205
 Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg
 210 215 220
 Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Glu Val Lys Ile Val Ser Ser Thr
 225 230 235 240
 His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe
 245 250 255
 Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp
 260 265 270
 Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu
 275 280 285
 Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu
 290 295 300
 Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln
 325 330 335
 Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val
 340 345 350
 Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys
 355 360 365
 His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
 370 375 380
 Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln
 385 390 395 400
 Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
 405 410 415
 Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
 420 425 430
 Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile
 435 440 445
 Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys
 450 455 460
 Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr
 465 470 475 480
 Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
 485 490 495
 Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
 500 505 510
 Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
 515 520 525
 Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
 530 535 540
 Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
 545 550 555 560
 Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
 565 570 575
 Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
 580 585 590
 His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
 595 600 605
 Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
 610 615 620
 Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
 625 630 635 640

Arg Lys Arg Lys Asn
645

<210> 6
<211> 645
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ORF0657n 突变体

<400> 6
Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
1 5 10 15
Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
20 25 30
Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
35 40 45
Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
50 55 60
Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
65 70 75 80
Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
85 90 95
Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys
100 105 110
Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
115 120 125
Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Asp His Ser
130 135 140
Ala Pro Asn Trp Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Lys Asp Gly
145 150 155 160
Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Glu Pro Ala Arg Val
165 170 175
Ile Phe Thr Asp Ser Lys Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly
180 185 190
Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro
195 200 205
Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg
210 215 220
Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Ala Val Lys Ile Val Ser Ser Thr
225 230 235 240
His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe
245 250 255
Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp
260 265 270
Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu
275 280 285
Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu
290 295 300
Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala
305 310 315 320
Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln
325 330 335
Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val
340 345 350
Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys

```

      355              360              365
His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
      370              375              380
Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln
      385              390              395              400
Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
      405              410              415
Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
      420              425              430
Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile
      435              440              445
Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys
      450              455              460
Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr
      465              470              475              480
Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
      485              490              495
Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
      500              505              510
Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
      515              520              525
Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
      530              535              540
Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
      545              550              555              560
Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
      565              570              575
Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
      580              585              590
His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
      595              600              605
Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
      610              615              620
Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
      625              630              635              640
Arg Lys Arg Lys Asn
      645

```

<210> 7

<211> 645

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ORF0657n 突变体

<400> 7

```

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

```

Val	Ser	Asn	Lys	Glu	Val	Glu	Ala	Pro	Thr	Ser	Glu	Thr	Lys	Glu	Ala	85	90	95
Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Lys	Ala	Pro	Lys	Glu	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	100	105	110
Pro	Ala	Ala	Lys	Ala	Thr	Asn	Asn	Thr	Tyr	Pro	Ile	Leu	Asn	Gln	Glu	115	120	125
Leu	Arg	Glu	Ala	Ile	Lys	Asn	Pro	Ala	Ile	Lys	Asp	Lys	Asp	His	Ser	130	135	140
Ala	Pro	Asn	Trp	Arg	Pro	Ile	Asp	Phe	Glu	Met	Lys	Lys	Lys	Asp	Gly	145	150	155
Thr	Gln	Gln	Phe	Tyr	His	Tyr	Ala	Ser	Ser	Val	Glu	Pro	Ala	Arg	Val	165	170	175
Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Lys	Pro	Glu	Ile	Glu	Leu	Gly	Leu	Gln	Ser	Gly	180	185	190
Gln	Phe	Trp	Arg	Lys	Phe	Glu	Val	Tyr	Glu	Gly	Asp	Lys	Lys	Leu	Pro	195	200	205
Ile	Lys	Leu	Val	Ser	Tyr	Asp	Thr	Val	Lys	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Arg	210	215	220
Phe	Ser	Val	Ser	Asn	Gly	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Ile	Val	Ser	Ser	Thr	225	230	235
His	Phe	Asn	Asn	Lys	Glu	Glu	Lys	Tyr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Met	Val	Phe	245	250	255
Ala	Gln	Pro	Ile	Tyr	Asn	Ser	Ala	Asp	Lys	Phe	Lys	Thr	Glu	Glu	Asp	260	265	270
Tyr	Lys	Ala	Glu	Lys	Leu	Leu	Ala	Pro	Tyr	Lys	Lys	Ala	Lys	Thr	Leu	275	280	285
Glu	Arg	Gln	Val	Tyr	Glu	Leu	Asn	Lys	Ile	Gln	Asp	Lys	Leu	Pro	Glu	290	295	300
Lys	Leu	Lys	Ala	Glu	Tyr	Lys	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Thr	Lys	Lys	Ala	305	310	315
Leu	Ala	Glu	Gln	Val	Lys	Ser	Ala	Ile	Thr	Glu	Phe	Gln	Asn	Val	Gln	325	330	335
Pro	Thr	Asn	Glu	Lys	Met	Thr	Asp	Leu	Gln	Asp	Thr	Lys	Tyr	Val	Val	340	345	350
Tyr	Glu	Ser	Val	Glu	Asn	Asn	Glu	Ser	Met	Met	Asp	Thr	Phe	Val	Lys	355	360	365
His	Pro	Ile	Lys	Thr	Gly	Met	Leu	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Met	Val	Met	370	375	380
Glu	Thr	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Lys	Asp	Phe	Met	Val	Glu	Gly	Gln	385	390	395
Arg	Val	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Asn	Asn	Thr	Arg	Thr	Ile	405	410	415
Ile	Phe	Pro	Tyr	Val	Glu	Gly	Lys	Thr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile	Val	Lys	420	425	430
Val	His	Val	Lys	Thr	Ile	Asp	Tyr	Asp	Gly	Gln	Tyr	His	Val	Arg	Ile	435	440	445
Val	Asp	Lys	Glu	Ala	Phe	Thr	Lys	Ala	Asn	Thr	Asp	Lys	Ser	Asn	Lys	450	455	460
Lys	Glu	Gln	Gln	Asp	Asn	Ser	Ala	Lys	Lys	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala	Thr	465	470	475
Pro	Ser	Lys	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Glu	Lys	Glu	Ser	Gln	Lys	Gln	485	490	495
Asp	Ser	Gln	Lys	Asp	Asp	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Val	Glu	Lys	Glu	500	505	510
Asn	Asp	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Gly	Lys	Asp	Lys	Thr	Pro	Ala	Thr	Lys	515	520	525
Pro	Thr	Lys	Gly	Glu	Val	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Thr	Lys	Val	530	535	540

Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
 545 550 555 560
 Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
 565 570 575
 Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
 580 585 590
 His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
 595 600 605
 Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
 610 615 620
 Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
 625 630 635 640
 Arg Lys Arg Lys Asn
 645

<210> 8
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ORF0657n 突变体

<400> 8
 Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
 35 40 45
 Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
 50 55 60
 Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
 65 70 75 80
 Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
 85 90 95
 Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys
 100 105 110
 Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
 115 120 125
 Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Asp His Ser
 130 135 140
 Ala Pro Asn Trp Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Lys Asp Gly
 145 150 155 160
 Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Glu Pro Ala Arg Val
 165 170 175
 Ile Phe Thr Asp Ser Lys Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly
 180 185 190
 Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro
 195 200 205
 Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg
 210 215 220
 Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Glu Val Lys Ile Val Ser Ser Thr
 225 230 235 240
 His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe
 245 250 255
 Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp

	260		265		270										
Tyr	Lys	Ala	Glu	Lys	Leu	Leu	Ala	Pro	Tyr	Lys	Lys	Ala	Lys	Thr	Leu
	275		280		285										
Glu	Arg	Gln	Val	Tyr	Glu	Leu	Glu	Lys	Ile	Gln	Asp	Lys	Leu	Pro	Glu
	290		295		300										
Lys	Leu	Lys	Ala	Glu	Tyr	Lys	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Thr	Lys	Lys	Ala
305			310		315				320						
Leu	Ala	Glu	Gln	Val	Lys	Ser	Ala	Ile	Thr	Glu	Phe	Gln	Asn	Val	Gln
	325		330		335										
Pro	Thr	Asn	Glu	Lys	Met	Thr	Asp	Leu	Gln	Asp	Thr	Lys	Tyr	Val	Val
	340		345		350										
Tyr	Glu	Ser	Val	Glu	Asn	Asn	Glu	Ser	Met	Met	Asp	Thr	Phe	Val	Lys
	355		360		365										
His	Pro	Ile	Lys	Thr	Gly	Met	Leu	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Met	Val	Met
370			375		380										
Glu	Thr	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Lys	Asp	Phe	Met	Val	Glu	Gly	Gln
385			390		395				400						
Arg	Val	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Asn	Asn	Thr	Arg	Thr	Ile
	405		410		415										
Ile	Phe	Pro	Tyr	Val	Glu	Gly	Lys	Thr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile	Val	Lys
	420		425		430										
Val	His	Val	Lys	Thr	Ile	Asp	Tyr	Asp	Gly	Gln	Tyr	His	Val	Arg	Ile
	435		440		445										
Val	Asp	Lys	Glu	Ala	Phe	Thr	Lys	Ala	Asn	Thr	Asp	Lys	Ser	Asn	Lys
450			455		460										
Lys	Glu	Gln	Gln	Asp	Asn	Ser	Ala	Lys	Lys	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala	Thr
465			470		475				480						
Pro	Ser	Lys	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Glu	Lys	Glu	Ser	Gln	Lys	Gln
	485		490		495										
Asp	Ser	Gln	Lys	Asp	Asp	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Val	Glu	Lys	Glu
	500		505		510										
Asn	Asp	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Gly	Lys	Asp	Lys	Thr	Pro	Ala	Thr	Lys
	515		520		525										
Pro	Thr	Lys	Gly	Glu	Val	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Thr	Lys	Val
530			535		540										
Val	Ser	Thr	Thr	Gln	Asn	Val	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Ala	Ser	Ser	Lys
545			550		555				560						
Thr	Thr	Lys	Asp	Val	Val	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Glu	Ala	Lys
	565		570		575										
Asp	Ser	Ala	Pro	Leu	Gln	Lys	Ala	Asn	Ile	Lys	Asn	Thr	Asn	Asp	Gly
	580		585		590										
His	Thr	Gln	Ser	Gln	Asn	Asn	Lys	Asn	Thr	Gln	Glu	Asn	Lys	Ala	Lys
	595		600		605										
Ser	Leu	Pro	Gln	Thr	Gly	Glu	Glu	Ser	Asn	Lys	Asp	Met	Thr	Leu	Pro
610			615		620										
Leu	Met	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser	Ser	Ile	Val	Ala	Phe	Val	Leu	Pro
625			630		635				640						
Arg	Lys	Arg	Lys	Asn											
	645														

<210> 9

<211> 645

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ORF0657n 突变体

<400> 9

```

Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
 1          5          10          15
Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
 20          25          30
Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
 35          40          45
Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
 50          55          60
Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
 65          70          75          80
Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
 85          90          95
Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys
 100         105         110
Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
 115         120         125
Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Asp His Ser
 130         135         140
Ala Pro Asn Trp Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Lys Asp Gly
 145         150         155         160
Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Glu Pro Ala Arg Val
 165         170         175
Ile Phe Thr Lys Ser Lys Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly
 180         185         190
Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro
 195         200         205
Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Asp Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg
 210         215         220
Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Glu Val Lys Ile Val Ser Ser Thr
 225         230         235         240
His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe
 245         250         255
Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp
 260         265         270
Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu
 275         280         285
Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu
 290         295         300
Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala
 305         310         315         320
Leu Ala Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln
 325         330         335
Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val
 340         345         350
Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys
 355         360         365
His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
 370         375         380
Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln
 385         390         395         400
Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
 405         410         415
Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
 420         425         430
Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile
 435         440         445

```


Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys
 450 455 460
 Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr
 465 470 475 480
 Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
 485 490 495
 Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
 500 505 510
 Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
 515 520 525
 Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
 530 535 540
 Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
 545 550 555 560
 Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
 565 570 575
 Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
 580 585 590
 His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
 595 600 605
 Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
 610 615 620
 Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
 625 630 635 640
 Arg Lys Arg Lys Asn
 645

<210> 10

<211> 645

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ORF0657n 突变体

<400> 10

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

66

625 630 635 640
 Arg Lys Arg Lys Asn
 645

<210> 11
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ORF0657n 突变体

<400> 11
 Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
 35 40 45
 Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
 50 55 60
 Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
 65 70 75 80
 Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
 85 90 95
 Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys
 100 105 110
 Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
 115 120 125
 Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Asp His Ser
 130 135 140
 Ala Pro Asn Trp Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Asn Asp Lys Gly
 145 150 155 160
 Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Glu Pro Ala Arg Val
 165 170 175
 Ile Phe Thr Lys Ser Lys Pro Ile Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly
 180 185 190
 Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro
 195 200 205
 Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Asp Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg
 210 215 220
 Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Glu Val Lys Ile Val Ser Ser Thr
 225 230 235 240
 His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Val Phe
 245 250 255
 Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp
 260 265 270
 Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu
 275 280 285
 Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu
 290 295 300
 Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Ala Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln
 325 330 335
 Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val
 340 345 350

Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys
 355 360 365
 His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
 370 375 380
 Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln
 385 390 395 400
 Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
 405 410 415
 Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
 420 425 430
 Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile
 435 440 445
 Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys
 450 455 460
 Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr
 465 470 475 480
 Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
 485 490 495
 Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
 500 505 510
 Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
 515 520 525
 Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
 530 535 540
 Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
 545 550 555 560
 Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
 565 570 575
 Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
 580 585 590
 His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
 595 600 605
 Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
 610 615 620
 Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
 625 630 635 640
 Arg Lys Arg Lys Asn
 645

<210> 12

<211> 645

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ORF0657n 突变体

<400> 12

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

65					70					75				80
Val	Ser	Asn	Lys	Glu	Val	Glu	Ala	Pro	Thr	Ser	Glu	Thr	Lys	Glu
				85					90					95
Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Lys	Ala	Pro	Lys	Glu	Thr	Lys	Glu	Val
			100					105					110	
Pro	Ala	Ala	Lys	Ala	Thr	Asn	Asn	Thr	Tyr	Pro	Ile	Leu	Asn	Gln
		115					120					125		
Leu	Arg	Glu	Ala	Ile	Lys	Asn	Pro	Ala	Ile	Lys	Asp	Lys	Asp	His
	130						135				140			Ser
Ala	Pro	Asn	Trp	Arg	Pro	Ile	Asp	Phe	Glu	Met	Lys	Asn	Asp	Lys
145				150					155					160
Thr	Gln	Gln	Phe	Tyr	His	Tyr	Ala	Ser	Ser	Val	Glu	Pro	Ala	Arg
			165						170					175
Ile	Phe	Thr	Lys	Ser	Lys	Pro	Ile	Ile	Glu	Leu	Gly	Leu	Gln	Ser
		180						185					190	
Gln	Phe	Trp	Arg	Lys	Phe	Glu	Val	Tyr	Glu	Gly	Asp	Lys	Lys	Leu
		195					200					205		Pro
Ile	Lys	Leu	Val	Ser	Tyr	Asp	Thr	Asp	Lys	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Ile
	210						215				220			Arg
Phe	Ser	Val	Ser	Asn	Gly	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Ile	Val	Ser	Ser
225				230					235					240
His	Phe	Asn	Asn	Lys	Glu	Glu	Lys	Tyr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Met	Val
			245						250					255
Ala	Gln	Pro	Ile	Tyr	Asn	Ser	Ala	Asp	Lys	Phe	Lys	Thr	Glu	Glu
		260						265					270	Asp
Tyr	Lys	Ala	Glu	Lys	Leu	Leu	Ala	Pro	Tyr	Lys	Lys	Ala	Lys	Thr
	275						280					285		Leu
Glu	Arg	Gln	Val	Tyr	Glu	Leu	Glu	Lys	Ile	Gln	Asp	Lys	Leu	Pro
	290					295					300			Glu
Lys	Leu	Lys	Ala	Glu	Tyr	Lys	Lys	Lys	Leu	Glu	Gln	Thr	Lys	Lys
305				310					315					320
Leu	Ala	Glu	Gln	Val	Lys	Ser	Ala	Ile	Thr	Glu	Phe	Gln	Asn	Val
			325						330					335
Pro	Thr	Asn	Glu	Lys	Met	Thr	Asp	Leu	Gln	Asp	Ala	His	Tyr	Val
		340						345					350	Val
Tyr	Glu	Ser	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Ser	Met	Met	Asp	Thr	Phe	Val
	355						360					365		Lys
His	Pro	Ile	Lys	Thr	Gly	Met	Leu	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Met	Val
	370					375					380			Met
Glu	Thr	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Lys	Asp	Phe	Met	Val	Glu	Gly
385				390					395					400
Arg	Val	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Asn	Asn	Thr	Arg	Thr
			405						410					415
Ile	Phe	Pro	Tyr	Val	Glu	Gly	Lys	Thr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile	Val
		420						425					430	Lys
Val	His	Val	Lys	Thr	Ile	Asp	Tyr	Asp	Gly	Gln	Tyr	His	Val	Arg
	435						440					445		Ile
Val	Asp	Lys	Glu	Ala	Phe	Thr	Lys	Ala	Asn	Thr	Asp	Lys	Ser	Asn
	450					455					460			Lys
Lys	Glu	Gln	Gln	Asp	Asn	Ser	Ala	Lys	Lys	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala
465				470					475					480
Pro	Ser	Lys	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Glu	Lys	Glu	Ser	Gln	Lys
			485						490					495
Asp	Ser	Gln	Lys	Asp	Asp	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Val	Glu	Lys
		500					505						510	Glu
Asn	Asp	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Gly	Lys	Asp	Lys	Thr	Pro	Ala	Thr
	515						520					525		Lys
Pro	Thr	Lys	Gly	Glu	Val	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Thr	Lys
														Val

530	535	540
Val Ser Thr Thr Gln Asn	Val Ala Lys Pro Thr	Thr Thr Ala Ser Ser Lys
545	550	555
Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly	Ser Ser Glu Ala Lys	
565	570	575
Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly		
580	585	590
His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys		
595	600	605
Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro		
610	615	620
Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro		
625	630	635
Arg Lys Arg Lys Asn		
645		

<210> 13
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ORF0657n 突变体

<400> 13

Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys	
1	5
Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu	
20	25
Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr	
35	40
Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr	
50	55
Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser	
65	70
Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala	
85	90
Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys	
100	105
Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu	
115	120
Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Asp His Ser	
130	135
Ala Pro Asn Trp Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Asn Asp Lys Gly	
145	150
Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Glu Pro Ala Arg Val	
165	170
Ile Phe Thr Lys Ser Lys Pro Ile Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly	
180	185
Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro	
195	200
Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Asp Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg	
210	215
Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Glu Val Lys Ile Val Ser Ser Thr	
225	230
His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Val Phe	
245	250
	255

Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp
 260 265 270
 Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu
 275 280 285
 Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu
 290 295 300
 Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Gln Thr Lys Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Ala Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln
 325 330 335
 Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Ala His Tyr Val Val
 340 345 350
 Tyr Glu Ser Val Glu Asn Ser Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys
 355 360 365
 His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
 370 375 380
 Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Lys
 385 390 395 400
 Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
 405 410 415
 Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Ala Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
 420 425 430
 Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile
 435 440 445
 Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys
 450 455 460
 Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr
 465 470 475 480
 Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
 485 490 495
 Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
 500 505 510
 Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
 515 520 525
 Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
 530 535 540
 Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
 545 550 555 560
 Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
 565 570 575
 Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
 580 585 590
 His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
 595 600 605
 Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
 610 615 620
 Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
 625 630 635 640
 Arg Lys Arg Lys Asn
 645

<210> 14

<211> 645

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ORF0657n 突变体

<400> 14

```

Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
 1             5             10             15
Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
      20             25             30
Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
      35             40             45
Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
      50             55             60
Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
65             70             75             80
Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
      85             90             95
Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys
      100            105            110
Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
      115            120            125
Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Glu His Ser
      130            135            140
Ala Pro Asn Ser Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Lys Asp Gly
145            150            155            160
Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Arg Val
      165            170            175
Ile Phe Thr Asp Ser Lys Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly
      180            185            190
Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro
      195            200            205
Val Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg
      210            215            220
Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Ala Val Lys Ile Val Ser Ser Thr
225            230            235            240
His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe
      245            250            255
Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp
      260            265            270
Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu
      275            280            285
Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn Lys Leu Gln Glu Lys Leu Pro Glu
      290            295            300
Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala
305            310            315            320
Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala Val Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln
      325            330            335
Pro Thr Asn Asp Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val
      340            345            350
Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys
      355            360            365
His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
      370            375            380
Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln
385            390            395            400
Ser Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
      405            410            415
Ile Phe Pro Tyr Ile Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
      420            425            430
Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile

```


435	440	445
Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr	Lys Ala Asn Thr	Asp Lys Ser Asn Lys
450	455	460
Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser	Ala Lys Lys Glu Ala Thr	Pro Ala Thr
465	470	475
Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser	Pro Val Glu Lys Glu Ser	Gln Lys Gln
485	490	495
Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys	Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu	
500	505	510
Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly	Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys	
515	520	525
Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser	Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val	
530	535	540
Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala	Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys	
545	550	555
Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr	Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys	
565	570	575
Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala	Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly	
580	585	590
His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys	Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys	
595	600	605
Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu	Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro	
610	615	620
Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser	Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro	
625	630	635
Arg Lys Arg Lys Asn		640
645		

<210> 15
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ORF0657n 突变体

<400> 15
Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
1 5 10 15
Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
20 25 30
Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
35 40 45
Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
50 55 60
Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
65 70 75 80
Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
85 90 95
Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys
100 105 110
Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
115 120 125
Leu Arg Asp Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Glu His Ser
130 135 140
Ala Pro Asn Ser Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Lys Asp Gly
145 150 155 160

Thr	Gln	Gln	Phe	Tyr	His	Tyr	Ala	Ser	Thr	Val	Lys	Pro	Ala	Arg	Val
				165					170					175	
Ile	Phe	Thr	Asp	Thr	Lys	Pro	Glu	Ile	Glu	Leu	Gly	Leu	Gln	Ser	Gly
			180					185					190		
Gln	Phe	Trp	Arg	Lys	Phe	Glu	Val	Tyr	Glu	Gly	Asp	Lys	Lys	Leu	Pro
		195					200					205			
Val	Lys	Leu	Val	Ser	Tyr	Asp	Ser	Val	Lys	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Arg
		210				215					220				
Phe	Ser	Val	Ser	Asn	Gly	Thr	Arg	Ala	Val	Lys	Ile	Val	Ser	Ser	Thr
225					230					235					240
His	Tyr	Asn	Asn	Lys	Glu	Glu	Lys	Tyr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Met	Glu	Phe
				245					250					255	
Ala	Gln	Pro	Ile	Tyr	Asn	Ser	Ala	Asp	Lys	Tyr	Lys	Thr	Glu	Glu	Asp
			260					265					270		
Tyr	Lys	Ala	Glu	Lys	Leu	Leu	Ala	Pro	Tyr	Lys	Lys	Ala	Lys	Thr	Leu
		275					280					285			
Glu	Arg	Gln	Val	Tyr	Glu	Leu	Asn	Lys	Leu	Gln	Asp	Lys	Leu	Pro	Glu
		290				295					300				
Lys	Leu	Lys	Ala	Glu	Tyr	Lys	Lys	Lys	Leu	Asp	Asp	Thr	Lys	Lys	Ala
305					310					315					320
Leu	Asp	Asp	Gln	Val	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Glu	Phe	Gln	Asn	Val	Gln
				325					330					335	
Pro	Thr	Asn	Glu	Lys	Met	Thr	Asp	Leu	Gln	Asp	Thr	Lys	Tyr	Val	Val
			340					345					350		
Phe	Glu	Ser	Val	Glu	Asn	Asn	Glu	Ser	Val	Met	Asp	Thr	Phe	Val	Lys
		355					360					365			
His	Pro	Ile	Lys	Thr	Gly	Met	Leu	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Val	Val	Met
		370				375						380			
Glu	Thr	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Lys	Asp	Phe	Ile	Val	Glu	Gly	Gln
385					390					395					400
Arg	Val	Arg	Thr	Val	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Asn	Asn	Thr	Arg	Thr	Ile
				405					410					415	
Ile	Phe	Pro	Tyr	Val	Glu	Gly	Lys	Thr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile	Val	Lys
			420					425					430		
Val	His	Val	Lys	Thr	Ile	Asp	Tyr	Asp	Gly	Gln	Tyr	His	Val	Arg	Ile
		435					440					445			
Val	Asp	Lys	Glu	Ala	Phe	Thr	Lys	Ala	Asn	Thr	Asp	Lys	Ser	Asn	Lys
						455					460				
Lys	Glu	Gln	Gln	Asp	Asn	Ser	Ala	Lys	Lys	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala	Thr
465					470					475					480
Pro	Ser	Lys	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Glu	Lys	Glu	Ser	Gln	Lys	Gln
				485					490					495	
Asp	Ser	Gln	Lys	Asp	Asp	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Val	Glu	Lys	Glu
			500					505					510		
Asn	Asp	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Gly	Lys	Asp	Lys	Thr	Pro	Ala	Thr	Lys
		515					520					525			
Pro	Thr	Lys	Gly	Glu	Val	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Thr	Lys	Val
						535						540			
Val	Ser	Thr	Thr	Gln	Asn	Val	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Ala	Ser	Ser	Lys
545					550					555					560
Thr	Thr	Lys	Asp	Val	Val	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Glu	Ala	Lys
				565					570					575	
Asp	Ser	Ala	Pro	Leu	Gln	Lys	Ala	Asn	Ile	Lys	Asn	Thr	Asn	Asp	Gly
			580					585					590		
His	Thr	Gln	Ser	Gln	Asn	Asn	Lys	Asn	Thr	Gln	Glu	Asn	Lys	Ala	Lys
		595					600					605			
Ser	Leu	Pro	Gln	Thr	Gly	Glu	Glu	Ser	Asn	Lys	Asp	Met	Thr	Leu	Pro
						615						620			

Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
 625 630 635 640
 Arg Lys Arg Lys Asn
 645

<210> 16
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ORF0657n 突变体

<400> 16
 Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
 35 40 45
 Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
 50 55 60
 Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
 65 70 75 80
 Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
 85 90 95
 Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys
 100 105 110
 Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
 115 120 125
 Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Ile Asp Lys Asp His Ser
 130 135 140
 Ala Pro Asn Ser Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Lys Asp Gly
 145 150 155 160
 Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Arg Val
 165 170 175
 Ile Phe Thr Asp Ser Gly Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly
 180 185 190
 Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro
 195 200 205
 Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg
 210 215 220
 Phe Pro Val Ser Asn Gly Thr Lys Ala Val Lys Ile Val Ser Ser Thr
 225 230 235 240
 His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe
 245 250 255
 Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp
 260 265 270
 Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu
 275 280 285
 Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu
 290 295 300
 Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln
 325 330 335
 Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val

```

          340          345          350
Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys
          355          360          365
His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
          370          375          380
Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln
385          390          395          400
Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
          405          410          415
Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
          420          425          430
Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile
          435          440          445
Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys
          450          455          460
Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr
465          470          475          480
Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
          485          490          495
Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
          500          505          510
Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
          515          520          525
Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
          530          535          540
Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
545          550          555          560
Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
          565          570          575
Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
          580          585          590
His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
          595          600          605
Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
          610          615          620
Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
625          630          635          640
Arg Lys Arg Lys Asn
          645

```

<210> 17

<211> 645

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ORF0657n 突变体

<400> 17

```

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

```

Thr	Ser	Glu	Lys	Ala	Pro	Glu	Thr	Lys	Pro	Val	Ala	Asn	Ala	Val	Ser
65					70					75					80
Val	Ser	Asn	Lys	Glu	Val	Glu	Ala	Pro	Thr	Ser	Glu	Thr	Lys	Glu	Ala
			85						90					95	
Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Lys	Ala	Pro	Lys	Glu	Thr	Lys	Glu	Val	Lys
			100					105					110		
Pro	Ala	Ala	Lys	Ala	Thr	Asn	Asn	Thr	Tyr	Pro	Ile	Leu	Asn	Gln	Glu
		115				120						125			
Leu	Arg	Glu	Ala	Ile	Lys	Asn	Pro	Ala	Ile	Ile	Asp	Lys	Asp	His	Ser
	130					135					140				
Ala	Pro	Asn	Ser	Arg	Pro	Ile	Asp	Phe	Glu	Met	Lys	Lys	Lys	Asp	Gly
145					150					155					160
Thr	Gln	Gln	Phe	Tyr	His	Tyr	Ala	Ser	Ser	Val	Lys	Pro	Ala	Arg	Val
			165					170						175	
Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Gly	Pro	Glu	Ile	Glu	Leu	Gly	Leu	Gln	Ser	Gly
			180					185					190		
Gln	Phe	Trp	Arg	Lys	Phe	Glu	Val	Tyr	Glu	Gly	Asp	Lys	Lys	Leu	Pro
		195					200					205			
Ile	Lys	Leu	Val	Ser	Tyr	Asp	Thr	Val	Lys	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Arg
	210					215					220				
Phe	Pro	Val	Ser	Asn	Gly	Thr	Lys	Ala	Val	Lys	Ile	Val	Ser	Ser	Thr
225					230					235					240
His	Phe	Asn	Asn	Lys	Glu	Glu	Lys	Tyr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Met	Glu	Phe
			245						250					255	
Ala	Gln	Pro	Ile	Tyr	Asn	Ser	Ala	Asp	Lys	Phe	Lys	Thr	Glu	Glu	Asp
			260					265					270		
Tyr	Lys	Ala	Glu	Lys	Leu	Leu	Ala	Pro	Tyr	Lys	Lys	Ala	Lys	Thr	Leu
	275						280					285			
Glu	Arg	Gln	Val	Tyr	Glu	Leu	Asn	Lys	Ile	Gln	Asp	Lys	Leu	Pro	Glu
	290					295					300				
Lys	Leu	Lys	Ala	Glu	Tyr	Lys	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Thr	Lys	Lys	Ala
305					310					315					320
Leu	Asp	Glu	Gln	Val	Lys	Ser	Ala	Ile	Thr	Glu	Phe	Gln	Asn	Val	Gln
			325						330					335	
Pro	Thr	Asn	Glu	Lys	Met	Thr	Asp	Leu	Gln	Asp	Thr	Lys	Tyr	Val	Val
		340						345					350		
Tyr	Glu	Ser	Glu	Glu	Asn	Asn	Glu	Ser	Met	Met	Asp	Thr	Phe	Val	Lys
	355					360						365			
His	Pro	Ile	Tyr	Thr	Gly	Met	Leu	Asn	Gly	Lys	Lys	Tyr	Met	Val	Met
	370					375					380				
Glu	Thr	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Lys	Asp	Phe	Met	Val	Glu	Gly	Gln
385					390					395					400
Arg	Val	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Lys	Asn	Asn	Thr	Arg	Thr	Ile
			405						410					415	
Ile	Phe	Pro	Tyr	Val	Glu	Gly	Lys	Thr	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile	Val	Lys
		420						425					430		
Val	His	Val	Lys	Thr	Ile	Asp	Tyr	Asp	Gly	Gln	Tyr	His	Val	Arg	Ile
	435					440						445			
Val	Asp	Lys	Glu	Ala	Phe	Thr	Lys	Ala	Asn	Thr	Asp	Lys	Ser	Asn	Lys
	450					455					460				
Lys	Glu	Gln	Gln	Asp	Asn	Ser	Ala	Lys	Lys	Glu	Ala	Thr	Pro	Ala	Thr
465					470					475					480
Pro	Ser	Lys	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Glu	Lys	Glu	Ser	Gln	Lys	Gln
			485						490					495	
Asp	Ser	Gln	Lys	Asp	Asp	Asn	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Val	Glu	Lys	Glu
		500						505					510		
Asn	Asp	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Gly	Lys	Asp	Lys	Thr	Pro	Ala	Thr	Lys
	515						520						525		

Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
 530 535 540
 Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
 545 550 555 560
 Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
 565 570 575
 Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
 580 585 590
 His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
 595 600 605
 Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
 610 615 620
 Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
 625 630 635 640
 Arg Lys Arg Lys Asn
 645

<210> 18
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ORF0657n 突变体

<400> 18
 Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
 35 40 45
 Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
 50 55 60
 Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
 65 70 75 80
 Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
 85 90 95
 Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys
 100 105 110
 Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
 115 120 125
 Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Ile Asp Lys Asp His Ser
 130 135 140
 Ala Pro Asn Ser Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Lys Asp Gly
 145 150 155 160
 Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Arg Val
 165 170 175
 Ile Phe Thr Asp Ser Gly Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly
 180 185 190
 Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro
 195 200 205
 Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg
 210 215 220
 Phe Pro Val Ser Asn Gly Thr Lys Ala Val Lys Ile Val Ser Ser Thr
 225 230 235 240
 His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe

<220>

<223> ORF0657n 突变体

<400> 19

```

Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
 1             5             10             15
Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
      20             25             30
Met Ser Asn Gly Glu Ala Gln Ala Ala Ala Glu Glu Thr Gly Gly Thr
      35             40             45
Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
      50             55             60
Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
65             70             75             80
Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
      85             90             95
Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys
      100            105            110
Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
      115            120            125
Leu Arg Glu Gly Ser Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys
      130            135            140
Asp His Ser Ala Pro Asn Ser Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys
      145            150            155            160
Lys Asp Gly Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Lys Pro
      165            170            175
Ala Arg Val Ile Phe Thr Asp Ser Lys Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu
      180            185            190
Gln Ser Gly Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys
      195            200            205
Lys Leu Pro Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala
      210            215            220
Tyr Ile Arg Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Ala Val Lys Ile Val
      225            230            235            240
Ser Ser Thr His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu
      245            250            255
Met Glu Phe Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr
      260            265            270
Glu Glu Asp Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala
      275            280            285
Lys Thr Leu Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn Lys Ile Gln Asp Lys
      290            295            300
Leu Pro Glu Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr
      305            310            315            320
Lys Lys Ala Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln
      325            330            335
Asn Val Gln Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys
      340            345            350
Tyr Val Val Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr
      355            360            365
Phe Val Lys His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr
      370            375            380
Met Val Met Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val
      385            390            395            400
Glu Gly Gln Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr
      405            410            415
Arg Thr Ile Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala
      420            425            430

```


Ile Val Lys Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His
 435 440 445
 Val Arg Ile Val Asp Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr
 450 455 460
 Asp Lys Ser Asn Lys Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu
 465 470 475 480
 Ala Thr Pro Ala Thr Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys
 485 490 495
 Glu Ser Gln Lys Gln Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro
 500 505 510
 Ser Val Glu Lys Glu Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys
 515 520 525
 Thr Pro Ala Thr Lys Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr
 530 535 540
 Thr Pro Thr Lys Val Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr
 545 550 555 560
 Thr Ala Ser Ser Lys Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly
 565 570 575
 Ser Ser Glu Ala Lys Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys
 580 585 590
 Asn Thr Asn Asp Gly His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln
 595 600 605
 Glu Asn Lys Ala Lys Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys
 610 615 620
 Asp Met Thr Leu Pro Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val
 625 630 635 640
 Ala Phe Val Leu Pro Arg Lys Arg Lys Asn
 645 650

<210> 20
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 2H2 Vh

<400> 20
 Asp Val His Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Asn Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Leu Ile Trp Ala Gly Gly Val Thr Ile Tyr Asn Ser Thr Leu Met
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ile Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Ala Ser Arg Asp His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 21

<211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 2H2 V1

<400> 21
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ile Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Phe Arg Phe Ser Gly Gly
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 22
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小鼠 2H2B3 可变区和人 Kappa 恒定区

<400> 22
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ile Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Phe Arg Phe Ser Gly Gly
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

200

205

<210> 23
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小鼠 2H2B3 可变区和人 IgG1 恒定区

<400> 23

Asp Val His Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Asn Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Leu Ile Trp Ala Gly Gly Val Thr Ile Tyr Asn Ser Thr Leu Met
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ile Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Ala Ser Arg Asp His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 24
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码 2H2 Vh 的序列

<400> 24
 gatgtgcacc tgggtggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagaa cctgtccatc 60
 acttgcaactg tctctgggtt ctcattatcc cgctatgggtg tacactgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggacta atatgggctg gtggagtcac aatttataat 180
 tcgactctca tgtccagact gagcatcagc aaagacagct ccaagagcca gggttttccta 240
 aaaatgaaca gtctacaaat tgatgacaca gccattact actgtgccag agaagcatct 300
 cgggaccact actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctgc 354

<210> 25
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码 2H2 V1 的序列

<400> 25
 gatattgtga tgaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaagatcacc 60
 atgacctgca gtgccagctc aagtgttagt tacatctact ggtaccagca gaagtcaggc 120
 acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cccttttcgc 180
 ttcatgtggcg gtgggtcttg gacctctttc tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240
 gatgtgtcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cactcagtt cggtgctggg 300
 accaagctgg aaataaaacg t 321

<210> 26
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重链前导序列

<400> 26
 Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser

<210> 27
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 轻链前导序列

<400> 27
 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Asp Ala Arg Cys
 20

<210> 28
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸引物

<400> 28
 acagatgccca gatgcgatat tgtgatgacc cagtct 36

<210> 29
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸引物

<400> 29
 tgcagccacc gtacgtttta tttccagctt ggtccc 36

<210> 30
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸引物

<400> 30
 acaggtgtcc actcggatgt gcacctggtg gagtca 36

<210> 31
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 寡核苷酸引物

<400> 31
 gcccttggtg gatgccgagg agactgtgag agtggt 36

<210> 32
 <211> 20

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

<400> 32
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser
20

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 33
gtattaggaa ttcggccccc gaggccgagg 30

<210> 34
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 34
gcattactcg cggcccagcc ggccatggcg gac 33

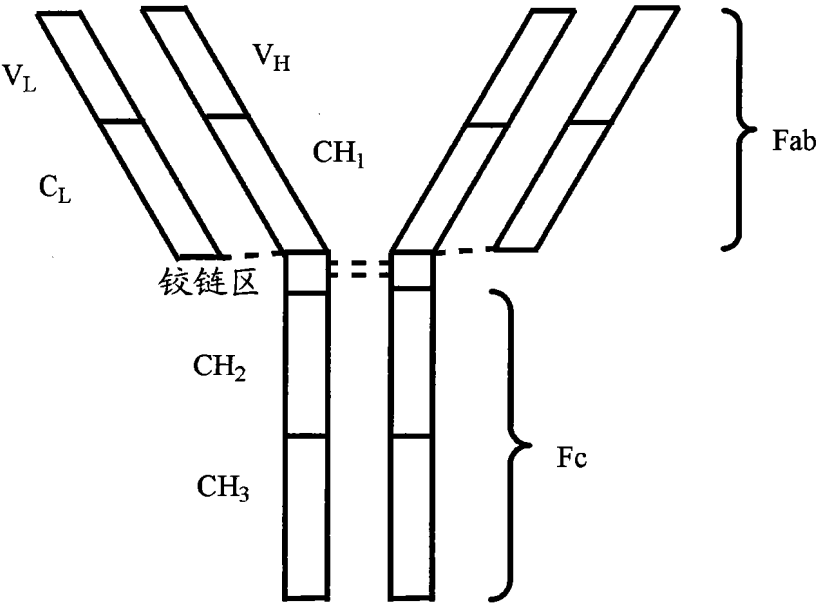


图 1

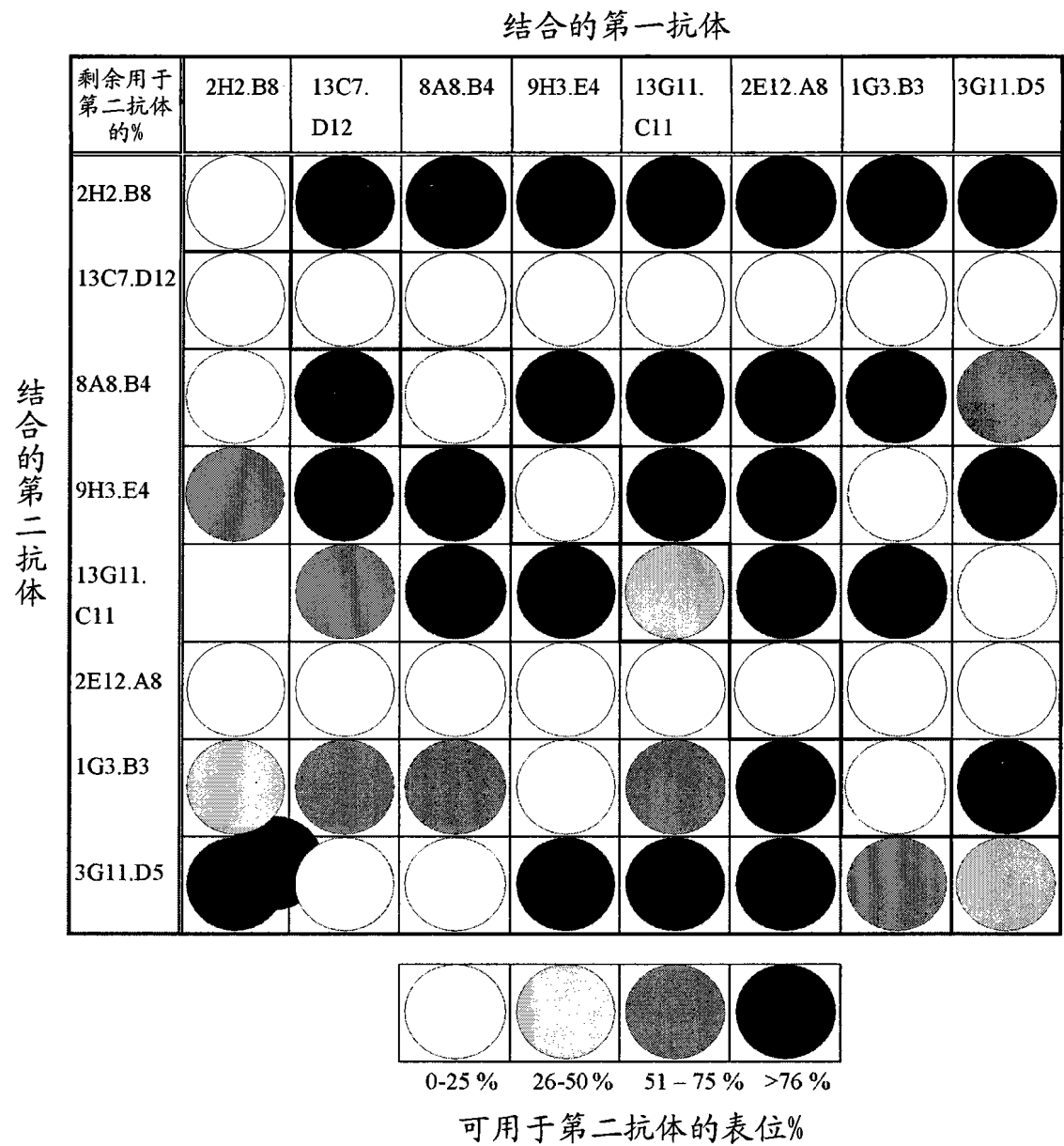


图 2

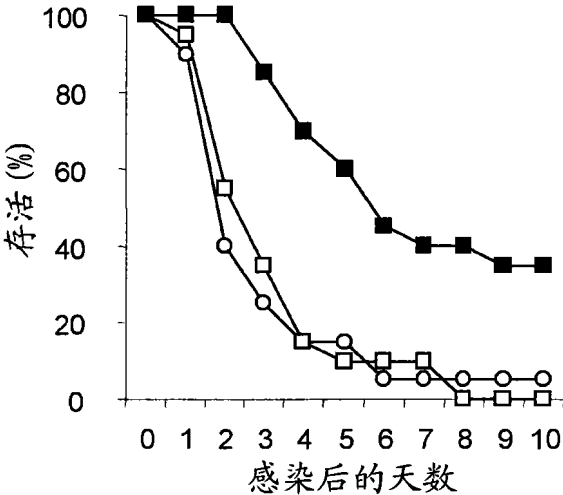


图 3A

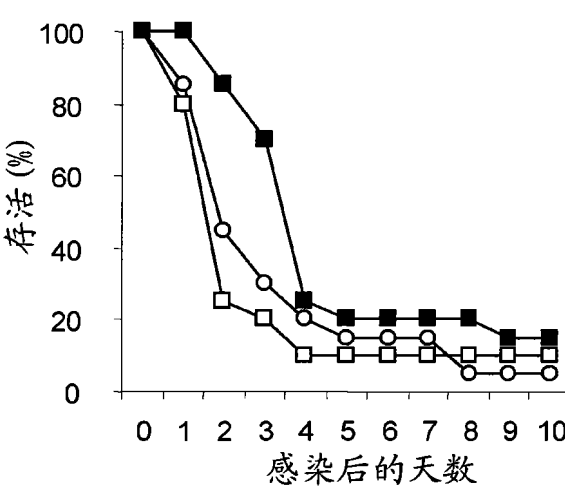


图 3B

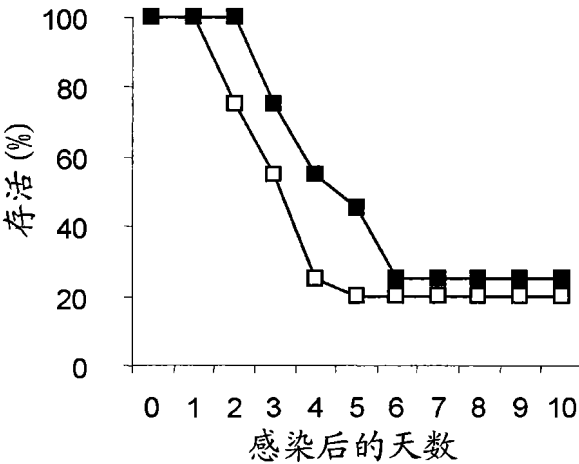


图 3C

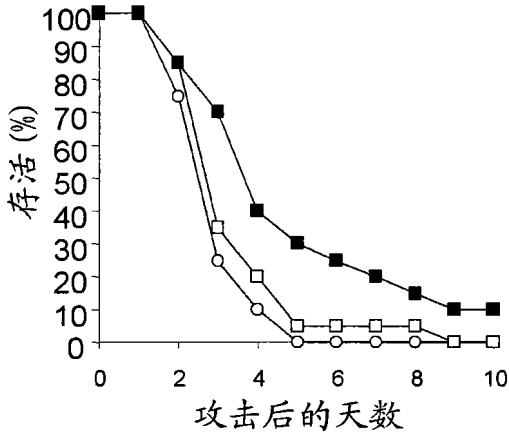


图 4A

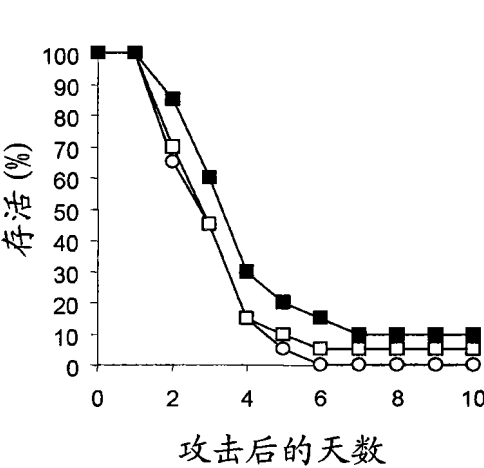


图 4B

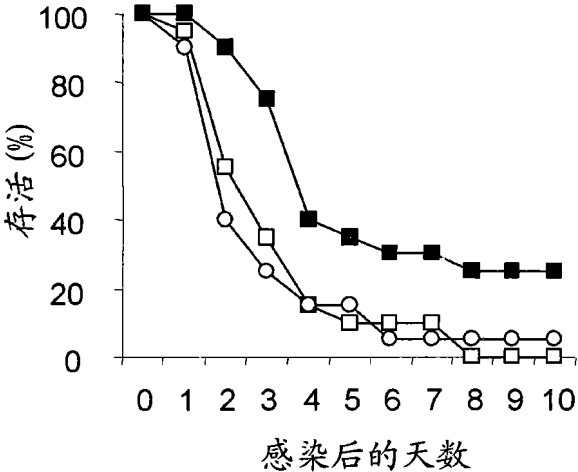


图 5A

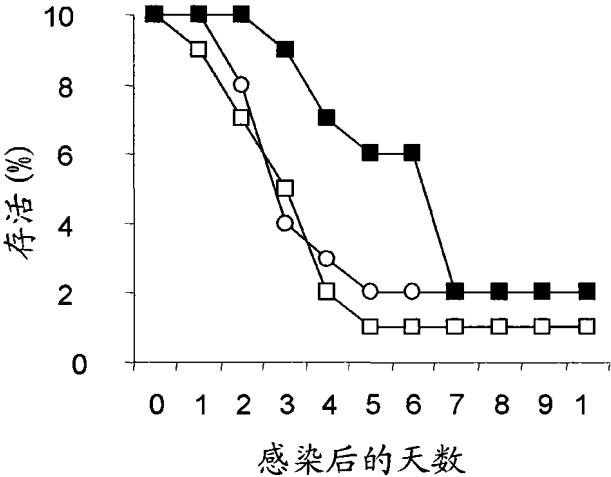


图 5B

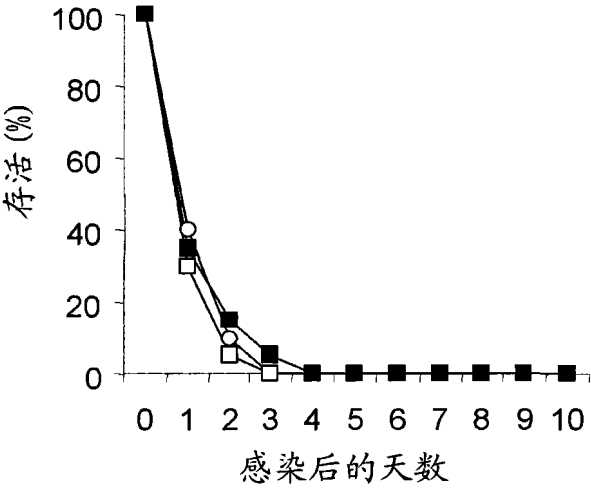


图 5C

专利名称(译)	靶定金黄色葡萄球菌ORF0657n的抗原结合蛋白		
公开(公告)号	CN101375161A	公开(公告)日	2009-02-25
申请号	CN200780003623.2	申请日	2007-01-23
申请(专利权)人(译)	默克公司		
当前申请(专利权)人(译)	默克公司		
[标]发明人	MJ布朗 AS安德森 LD科普 KU延森 T麦尼利 B哈维 E杜尔 R埃恩斯特		
发明人	M·J·布朗 A·S·安德森 L·D·科普 K·U·延森 T·麦尼利 B·哈维 E·杜尔 R·埃恩斯特		
IPC分类号	G01N33/53 C12N5/06 C12N5/16		
CPC分类号	C07K2317/565 C07K2317/92 C07K16/1271 A61K2039/505 C07K2317/72 C07K2317/56 C07K2317/24		
代理人(译)	李波 刘玥		
优先权	60/763023 2006-01-27 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明表征了与ORF0657n靶区域(SEQ ID NO : 1)结合的抗原结合蛋白。ORF0657n是一种金黄色葡萄球菌蛋白。通过mAb 1G3.BD4、mAb 2H2.BE11、mAb 13C7. BC1和mAb 13G11.BF3结合位点提供ORF0657n靶区域。在致死模型攻击中，提供了mAb 2H2.BE11和mAb13C7.BC1，用于增加抗金黄色葡萄球菌感染的存活率。也在离体模型中用IgG1或IgG2b形式的mAb 2H2证明了保护作用；并且用mAb2H2.BE11在被动免疫鼠留置导管模型中证明了保护作用。

