



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105722522 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 19

(21) 申请号 201480053899.1	(72) 发明人 乔治·乔治奥 埃弗雷特·斯通
(22) 申请日 2014.08.29	(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 105722522 A	代理人 傅宇昌
(43) 申请公布日 2016.06.29	(51) Int.Cl.
(30) 优先权数据 61/872,132 2013.08.30 US 61/986,366 2014.04.30 US	A61K 38/00 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2016.03.30	(56) 对比文件 W0 2012099441 A2,2012.07.26 Adams S等.The kynurenine pathway in brain tumor pathogenesis.《Cancer Research》.2012,第72卷(第22期),第5649-5657 页.
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2014/053437 2014.08.29	审查员 李宁
(87) PCT国际申请的公布数据 W02015/031771 EN 2015.03.05	权利要求书1页 说明书36页 序列表83页 附图9页
(73) 专利权人 得克萨斯大学体系董事会 地址 美国得克萨斯	

(54) 发明名称
用于肿瘤疗法的犬尿氨酸耗竭酶的施用

(57) 摘要
本发明描述了涉及具有犬尿氨酸酶活性的蛋白的用途的方法和组合物,例如,在某些方面,可以是公开了能够降解犬尿氨酸的改性犬尿氨酸酶。而且,本发明的某些方面提供了使用公开的蛋白或核酸治疗犬尿氨酸耗竭癌症的组合物和方法。

1. 犬尿氨酸酶或编码犬尿氨酸酶的核酸在制备用于治疗受试者的肿瘤的藥物中的用途,其中所述犬尿氨酸酶由与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的氨基酸序列组成,其中所述肿瘤是表达吡哆胺-2,3-双加氧酶亚型1 (ID01)、吡哆胺-2,3-双加氧酶亚型2 (ID02) 或色氨酸2,3-双加氧酶 (TD0) 的肿瘤。

2. 权利要求1的用途,其中所述犬尿氨酸酶由与SEQ ID NO:8具有至少95%同一性的氨基酸序列组成。

3. 权利要求1的用途,其中所述犬尿氨酸酶由与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的氨基酸序列组成,所述氨基酸序列在第306位具有Phe306Met或Phe306Leu置换。

4. 权利要求2的用途,其中所述犬尿氨酸酶由与SEQ ID NO:8具有至少95%同一性的氨基酸序列组成,所述氨基酸序列在第306位具有Phe306Met或Phe306Leu置换。

5. 权利要求1的用途,其中所述犬尿氨酸酶偶联至聚乙二醇 (PEG)。

6. 权利要求1的用途,其中所述犬尿氨酸酶进一步包含异源肽片段,其中所述异源肽片段是XTEN肽、IgG Fc、白蛋白或白蛋白结合肽。

7. 权利要求1的用途,其中所述犬尿氨酸酶对于犬尿氨酸具有比对于3'-OH犬尿氨酸更大的催化活性。

8. 权利要求1的用途,其中所述犬尿氨酸酶具有至少 $0.5\text{M}^{-1}/\text{s}^{-1}$ 的对于犬尿氨酸的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ 。

9. 权利要求1的用途,其中所述肿瘤是实体肿瘤。

10. 权利要求1的用途,其中所述肿瘤是血液肿瘤。

11. 权利要求1的用途,其中所述编码犬尿氨酸酶的核酸存在于表达载体中。

12. 权利要求11的用途,其中所述编码犬尿氨酸酶的表达载体被包含在宿主细胞中。

用于肿瘤疗法的犬尿氨酸耗竭酶的施用

[0001] 发明背景

[0002] 本申请要求2013年8月30日提交的美国临时申请号61/872,132和2014年4月30日提交的美国临时申请号61/986,366的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 本发明是在由美国国家卫生研究院颁发的第R01 CA154754号拨款下借助政府资助进行的。该政府在本发明中享有某些权利。

1. 技术领域

[0004] 本发明一般涉及使用耗竭L-犬尿氨酸或L-3-羟基犬尿氨酸的酶治疗癌症的组合物和方法。更特别地,本发明关注具有L-犬尿氨酸降解活性的适用于人类治疗的细菌酶和哺乳动物酶的工程学、药理优化和用途。

[0005] 2. 相关技术的描述

[0006] 癌细胞所致的吲哚胺-2,3-双加氧酶亚型(IDO1或IDO2)过表达或用于表达这两种酶中任意一种的癌浸润性白细胞的重编程,已被证明对减弱对癌症的适应性免疫应答具有深刻的影响。IDO1和IDO2以及酶色氨酸2,3-双加氧酶(TDO),其通过基质细胞的表达可以通过一些肿瘤诱导,催化色氨酸(Trp)分解代谢为L-犬尿氨酸(KYN)中的限速步骤(Godin-Ethier等,2011)。使用LAT1型氨基酸交换剂,肿瘤将细胞质KYN分子交换为细胞外Trp分子(Kaper等,2007),其对免疫细胞具有局部提高KYN水平同时局部耗竭Trp水平的双重作用。相邻免疫细胞使KYN内在化,其中该KYN作为芳烃受体(AHR)的活性配体,该芳烃受体导致通过免疫细胞分化和/或凋亡诱导引起肿瘤耐受的多种细胞因子和趋化因子的表达(Della Chiesa等,2006;Opitz等,2011;Song等,2011)。另外,由犬尿氨酸,尤其犬尿喹啉酸形成的其它KYN相关化合物也通过充当孤儿GPCR GPCR35的激动剂发挥了免疫抑制的作用。通过IDO1或TDO的抑制对KYN形成的抑制(和因此KYN新陈代谢副产物(包括犬尿喹啉酸、3-羟基犬尿氨酸和喹啉酸)形成的抑制,作为癌症靶点已经受到显著的关注(Chen和Guillemin,2009;Rutella等,2009;Prendergast,2011)。用于IDO1的底物类似物抑制剂(如1-DL-甲基色氨酸)已被开发并已在克服癌症诱导肿瘤耐受,从而恢复天然免疫系统抗肿瘤的能力中显示初步前景(Lob等,2009)。然而,色氨酸2,3-双加氧酶(TDO)也产生KYN,其也在肿瘤中频繁表达,且1-DL-甲基色氨酸不抑制这种酶(Pilotte等,2012)。目前在1期和2期临床试验中也额外关注了1-DL-甲基色氨酸的D-异构体(1-D-MT)。反常的是,1-D-MT能够上调IDO1的表达,实际上增加了KYN的水平并且诱导了某些癌症的免疫抑制(Opitz等,2011)。

[0007] 控制KYN的肿瘤产生是许多研究的焦点,且具有治疗尤其如乳腺癌、卵巢癌、成胶质细胞瘤、胰腺癌等癌症的潜力。已知KYN能抑制增殖以及诱导T细胞和NK细胞的凋亡(Opitz等,2011;Mandi和Vacsei,2012)使肿瘤能够躲避患者免疫系统的探测和破坏。KYN是芳烃受体(AHR)的有效配体,该芳烃受体在T细胞中的激活诱导分化为CD25+FoxP3+T调节细胞(Tregs)(Mezrich等,2010)。KYN还已显示能预防细胞因子介导的特异性受体(NKp46和NKG2D)的上调,该特异性受体是NK介导细胞杀死肿瘤细胞系所必须的(Della Chiesa等,2006),该行为也可能通过其对AHR的激动作用来介导(Shin等,2013)。也有将升高的血清

KYN水平与在多种类型的癌症中存活减少联系起来的临床证据。在健康患者中,血清中的KYN水平在0.5至1 μ M的范围。在患有产生KYN的癌症类型(如弥漫性大B细胞淋巴瘤)的患者中,测量血清KYN水平高达10倍(Yoshikawa等,2010;de Jong等,2011;Yao等,2011),在接受同样治疗方案的淋巴瘤患者中预后存活;与对于那些KYN水平高于1.5 μ M的患者仅仅58%的存活相比,那些血清水平低于1.5 μ M的患者显示89%的3年存活率。这一存活差异归因于KYN的免疫抑制作用(Yoshikawa等,2010)。小分子IDO抑制剂(如1-D-MT)的用途,已经证实控制KYN水平在恢复免疫功能中的效用,但是1-D-MT所致的IDO1上调的脱靶效应,和对于TD0和IDO1亚型的抑制缺乏令人担忧。

[0008] 本发明公开了在肿瘤和/或血液中特异性耗竭KYN和其代谢产物的酶的用途。KYN耗竭酶用于降低KYN浓度来治疗IDO1、IDO2或TD0表达的肿瘤,从而预防肿瘤介导的致耐受性作用而且介导肿瘤消融的促炎应答。显著地,用于耗竭KYN和KYN新陈代谢副产物的酶的使用,绕过如上所述与IDO亚型和TD0小分子抑制剂相关的问题,并且进一步彻底绕过非常普遍伴随小分子药物和导致不可预测的毒性和副作用的脱靶效应。

发明概要

[0009] 通过提供包含能够降解L-犬尿氨酸和3-羟基-L-犬尿氨酸并在血清中显示癌症疗法所需的良好药物代谢动力学的细菌多肽序列和哺乳动物多肽序列的酶,本发明的方面克服本领域的主要缺陷。在一些方面,犬尿氨酸酶可对犬尿氨酸具有比对3'-OH犬尿氨酸更大的催化活性。可以使用来自细菌物种的犬尿氨酸酶。此类酶可以具有选自SEQ ID NO:7和13-52或其改性版本组成的组的氨基酸序列。尤其是,该治疗剂可以源自荧光假单胞菌酶(*Pseudomonas fluorescens*)的犬尿氨酸酶(Pf-KYNU)。可选地,可以使用来自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)的犬尿氨酸酶。该治疗剂可以源自梭状冻胶样杆菌(*Mucilaginibacter paludis*)犬尿氨酸酶。进一步,为了预防由于同种异体犬尿氨酸酶的免疫原性所致的不良反应,可以使用智人(*Homo sapiens*)酶或其它显示与人类酶具有>95%的序列同一性的灵长类动物犬尿氨酸酶。例如,新型酶可以具有选自SEQ ID NO:7-9组成的组的氨基酸序列。

[0010] 在其它方面,可以有包含天然的或改性的人类或灵长类动物犬尿氨酸酶的多肽,该犬尿氨酸酶能够降解KYN并具有降解3-羟基犬尿氨酸或犬尿喹啉酸的活性。在一些实施方案中,该多肽在生理条件下能够降解KYN。例如,多肽可以对至少或约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、 10^4 、 10^5 、 10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$ 或由此衍生的任何范围的KYN(k_{cat}/K_M)具有催化效率。

[0011] 如上所讨论的改性多肽,与未改性多肽(例如,天然多肽)或在本文中公开的任何多肽序列相比,可以特性化为具有某一百分比的同一性。例如,未改性多肽可以包含天然犬尿氨酸酶的至少或多达约150、200、250、300、350、400个残基(或由此衍生的任何范围)。百分比同一性可以是改性和未改性多肽之间,或任何两个对比序列之间的约、至多或至少40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或由此衍生的任何范围)。也被预期的是,与多肽的未改性区域相比,如上所讨论的同一性百分比可以涉及多肽的特别改性区域。如,多肽可以包含改性或突变的犬尿氨酸酶

的底物识别位点,该底物识别位点可以基于改性或突变的犬尿氨酸酶底物识别位点的氨基酸序列与来自同一物种或跨物种的未改性或突变的犬尿氨酸酶的氨基酸序列的同一性进行表征。改性或突变的人类多肽被表征为,例如,与未改性的犬尿氨酸酶具有至少90%同一性,这是指在改性或突变的人类多肽中至少90%的氨基酸与未改性多肽中的氨基酸一致。

[0012] 此类未改性多肽可以是天然的犬尿氨酸酶,特别是人类亚型或其它灵长类动物亚型。例如,天然人类犬尿氨酸酶可以具有SEQ ID NO:8的序列。其它天然的灵长类动物犬尿氨酸酶的非限制性实例包括苏门达腊猩猩 (*Pongo abelii*) 犬尿氨酸酶 (Genbank ID:XP_002812508.1;SEQ ID NO:10)、食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 犬尿氨酸酶 (Genbank ID:EHH54849.1;SEQ ID NO:11) 和黑猩猩 (*Pan troglodytes*) 犬尿氨酸酶 (Genbank ID:XP_003309314.1;SEQ ID NO:12)。示例性的天然多肽包含与SEQ ID NO:8或10-12或其片段具有约、至多或至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或由此衍生的任何范围)的序列。例如,该天然多肽可以包含SEQ ID NO:8或10-12序列的至少或多达约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、415个残基(或由此衍生的任何范围)。

[0013] 在一些实施方案中,该天然多肽可以通过一种或多种其它改性(如化学改性、取代、插入、缺失和/或截短)来改性。例如,该改性可以位于天然酶的底物识别位点上。在特定实施方案中,可以通过取代来改性该天然犬尿氨酸酶。例如,取代的数量可以是一个、两个、三个、四个或多个。在进一步的实施方案中,可以在底物识别位点或任何可以影响底物特异性的位置改性该天然犬尿氨酸酶。

[0014] 在一个实施方案中,提供了分离改性的人类犬尿氨酸酶,其中该改性酶相对于天然人类犬尿氨酸酶(参见SEQ ID NO:8)具有至少一个取代,且其中该至少一个取代包括Met或Leu对Phe的取代,这一取代通常发现于天然人类犬尿氨酸酶的第306位上。因此,在一方面,提供了包含Phe306Met取代的分离改性的人类犬尿氨酸酶。在另一方面,提供了包含Phe306Leu取代的分离改性的人类犬尿氨酸酶。

[0015] 在一些方面,本发明也预期了包含连接于同种异体氨基酸序列的犬尿氨酸酶的多肽。例如,该犬尿氨酸酶可以作为融合蛋白连接于同种异体氨基酸序列。在特定实施方案中,该犬尿氨酸酶可以连接于如IgG Fc、白蛋白、白蛋白结合蛋白或XTEN多肽的氨基酸序列以增加体内半衰期。

[0016] 为了增加血清的稳定性,该犬尿氨酸酶可以连接于一个或多个聚醚分子。在特定实施方案中,该聚醚可以是聚乙二醇(PEG)。该多肽可以通过特异性氨基酸残基(如赖氨酸或半胱氨酸)连接于(例如,共价地)PEG。对于治疗性施用,可以将包含犬尿氨酸酶的多肽分散在药学上可接受的载体中。

[0017] 在一些方面,预期了编码此类犬尿氨酸酶的核酸。在一些实施方案中,该核酸已经是被优化用于在细菌中表达的密码子。在特定实施方案中,该细菌为大肠杆菌(*E.coli*)。在其它方面,该核酸已经是优化用于在真菌(例如,酵母)、昆虫或哺乳动物中表达的密码子。本发明进一步预期了包含此类核酸的载体,如表达载体。在特定实施方案中,该编码犬尿氨酸酶的核酸可操作地连接于启动子,其包括但不限于同种异体启动子。在一个实施方案中,犬尿氨酸酶可以通过载体(例如,基因疗法载体)递送至靶细胞。可能已通过重组DNA技术改性此类病毒,以使犬尿氨酸酶编码核酸在靶细胞中表达。这些载体可以源自非病毒(例如,

质粒)或病毒(例如,腺病毒、腺相关病毒、逆转录酶病毒、慢病毒、疱疹病毒或痘苗病毒)来源的载体。非病毒载体优选地与试剂复合,以促使DNA穿过细胞膜进入。此类非病毒载体复合物的实例包括具有聚阳离子剂的制剂,聚阳离子剂促使DNA和脂质基递送系统的凝聚。脂质基递送系统的实例包括脂质体基核酸递送。

[0018] 在更进一步的方面,本发明进一步预期了包含此类载体的宿主细胞。该宿主细胞可以是细菌(例如,大肠杆菌)、真菌细胞(例如,酵母)、昆虫细胞或哺乳动物细胞。

[0019] 在一些实施方案中,该载体被引入宿主细胞以用于表达犬尿氨酸酶。可以以任何合适方式表达该蛋白。在一个实施方案中,在宿主细胞中表达该蛋白,从而蛋白质被糖基化。在另一个实施方案中,在宿主细胞中表达该蛋白,从而蛋白质被非糖基化。

[0020] 本发明的某些方面也预期了通过施用犬尿氨酸酶多肽、在基因疗法载体中编码犬尿氨酸酶的核酸或本发明的制剂进行治疗的方法,和尤其是治疗肿瘤细胞或患有癌症的受试者的方法。该受试者可以是任何动物,如小鼠。例如,该受试者可以是哺乳动物,特别是灵长类动物,更特别地是人类患者。在一些实施方案中,该方法可以包括选择患有癌症的患者。

[0021] 在一些实施方案中,该癌症是对犬尿氨酸耗竭敏感的任何癌症。在一个实施方案中,本发明预期了治疗肿瘤细胞或癌症患者的方法,其包括施用包含此类多肽的制剂。在一些实施方案中,该施用在使得至少一部分该癌症细胞被杀死的条件下发生。在另一个实施方案中,该制剂包含此类在生理条件下具有犬尿氨酸降解活性的犬尿氨酸酶且进一步包含附着的聚乙二醇链。在一些实施方案中,该制剂是包含任何如上所讨论的犬尿氨酸酶和药学上可接受的赋形剂的药物制剂。此类药学上可接受的赋形剂对本领域的技术人员是已知的。可以预期所有上述的犬尿氨酸酶对人类疗法是有用的。

[0022] 在进一步的实施方案中,还提供一种治疗肿瘤细胞的方法,其包括施用包含具有犬尿氨酸降解活性的非细菌(哺乳动物,例如,灵长类动物或小鼠)犬尿氨酸酶或对其编码的核酸的制剂。

[0023] 该施用或治疗可以针对用于细胞的营养源,不一定是细胞本身。因此,在体内应用中,治疗肿瘤细胞包括使用于肿瘤细胞群体的营养培养基与犬尿氨酸酶接触。在这一实施方案中,该培养基可以是需要犬尿氨酸耗竭的血液、淋巴液、脊髓液等体液。

[0024] 根据本发明的某些方面,此类包含犬尿氨酸酶的制剂可经静脉内、皮内、动脉内、腹膜内、病灶内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、滑膜内、气管内、鼻内、玻璃体内、阴道内、直肠内、瘤内、肌内、皮下、结膜下、囊内、经粘膜、心包内、脐内、眼内、口服、局部、通过吸入、输注、连续输注、局部灌注、经导管、经灌洗、在脂质组合物中(例如,脂质体)或通过其它方法或如本领域普通技术人员所已知的前述任何组合进行施用。

[0025] 在进一步的实施方案中,本方法也可以包括对受试者施用至少第二种抗癌疗法。该第二种抗癌疗法可以是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。在某些方面,该第二种抗癌疗法可以是抗-PD-1、抗-CTLA-4或抗PD-L1抗体。

[0026] 在一些实施方案中,包含嵌合抗原受体(CAR)和犬尿氨酸酶的细胞被预期用于治疗患有癌症的受试者。在一些方面,该细胞可以使用编码该CAR和该犬尿氨酸酶的DNA和一些情况下的转座酶来转染。

[0027] 该CAR可以靶向任何目标癌症细胞抗原,包括,例如,HER2、CD19、CD20和GD2。抗原

结合区域或域可包含源自特定人类单克隆抗体的单链可变片段(scFv) V_H 和 V_L 链的片段,如美国专利7,109,304中所述的那些,该专利通过引用全部并入本文。该片段也可以是人类抗原特异性抗体的任何数量的不同抗原结合域。在一个更特别的实施方案中,该片段是由被优化用于人类密码子使用以在人类细胞中表达的序列编码的抗原特异性scFv。CAR的其它实例,参见,例如,WO2012/031744、WO 2012/079000、WO 2013/059593和美国专利8,465,743,这些专利全部通过引用全部并入本文。

[0028] 该犬尿氨酸酶可以是本文中所公开的任何犬尿氨酸酶。细胞转染的方法在本领域是已知的,但是在某些方面,采用高效转染方法(如电穿孔)。例如,使用核转染设备,可以将核酸引入细胞。优选地,该转染步骤不涉及用病毒感染或转导细胞,其能够在受治疗的受试者中引起基因毒性和/或导致对含有病毒序列的细胞的免疫应答。

[0029] 各种CAR构建体和其表达载体在本领域是已知的且进一步在本文中详述。例如,在一些方面,该CAR表达载体是DNA表达载体如质粒、线性表达载体或游离基因。在一些方面,该载体包含其它序列,如促进该CAR表达的序列、启动子、增强子、聚-A信号和/或一个或多个内含子。在优选方面,该CAR编码序列被转座子序列侧接,从而转座酶的存在允许编码序列整合到转染细胞的基因组。

[0030] 在某些方面,进一步用促进CAR编码序列整合到该转染细胞基因组的转座酶来转染细胞。在一些方面,该转座酶作为DNA表达载体提供。然而,在优选方面,该转座酶作为可表达RNA或蛋白提供,从而转座酶的长期表达不会出现在转基因细胞中。根据该实施方案,可以使用任何转座酶系统。在其它方面,细胞可以被慢病毒感染,以促进该CAR编码序列和该犬尿氨酸酶编码序列整合到该细胞的基因组中。

[0031] 在一个实施方案中,提供了包含犬尿氨酸酶或编码犬尿氨酸酶的核酸的组合物,用于治疗受试者的肿瘤。在另一个实施方案中,提供了犬尿氨酸酶或编码犬尿氨酸酶的核酸在用于治疗肿瘤的药剂的制造中的用途。犬尿氨酸酶可以是实施方案中的任何犬尿氨酸酶。

[0032] 对于本文所述的任何其它方法或组合物可以采用在本发明的方法和/或组合物的上下文中所讨论的实施方案。因此,适用于一种方法或组合物的实施方案也可以应用于本发明的其它方法和组合物。

[0033] 如本文所使用的,术语“编码(encode)”或“编码(encoding)”(就核酸而言)用于使本发明容易被本领域的技术人员理解;然而,这些术语可以分别与“包括/包含(comprise)”或“包括/包含(comprising)”交互使用。

[0034] 如本说明书中所使用的,“一个/种(a)”或“一个/种(an)”可以表示一个或多个。正如本权利要求中所使用的,当与单词“包括/包含(comprising)”一起使用时,单词“一个/种(a)”或“一个/种(an)”可以表示一个或多个。

[0035] 尽管本公开支持仅指替代方案的定义和“和/或”,除非明确地指出仅指替代方案或替代方案是互斥的,否则在权利要求书中术语“或”的使用表示“和/或”。在本文中所使用的“另一个”可以表示至少第二个或更多个。

[0036] 在整个申请中,术语“约”用来指示一个值包括用于确定该值所采用的装置或方法的误差的固有变化,或者研究受试者之间存在的变化。

[0037] 其它方面,本发明的特征和优点将从下面的详细描述变得显而易见。然而,应该理

解,尽管详细描述和特定实例例示了本发明的优选实施方案,但它们仅仅通过说明的方式给出,因为根据该详细描述,本发明精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见。

[0038] 附图简述

[0039] 以下附图构成了本说明书的部分,并包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个,结合本文出现的特定实施方案的详细描述,可以更好的理解本发明。

[0040] 图1-(第1道)PRECISION PLUS PROTEIN™ MW标准(BioRad)、(第2-4道)增加浓度的Pf-KYNU和(第5道)PEG 5,000MW改性的Pf-KYNU的SDS-PAGE;

[0041] 图2-Pf-KYNU在(空心方块)PBS和(空心圆)混合人类血清中的稳定性;

[0042] 图3-PEG-Pf-KYNU在同种自体B16小鼠黑色素瘤模型中的疗效,如通过肿瘤生长速率所测量。(实心方块)热灭活PEG-Pf-KYNU。(实心圆)活性PEG-Pf-KYNU;

[0043] 图4-PEG-Pf-KYNU在同种自体B16小鼠黑色素瘤模型中的疗效,如通过存活所测量。(实心方块)热灭活PEG-Pf-KYNU。(实心圆)活性PEG-Pf-KYNU;

[0044] 图5A-B-用热灭活PEG-Pf-KYNU治疗的小鼠。(•)用活性PEG-Pf-KYNU治疗的小鼠。图5A-在用活性PEG-Pf-KYNU治疗的组中循环CD4+调节T-细胞群体明显较少。图5B-肿瘤浸润CD8+T-细胞群体显示明显较高的颗粒酶B和干扰素 γ 表达;

[0045] 图6-用于大肠杆菌中的犬尿氨酸酶活性的遗传选择。大肠杆菌- Δ trpE细胞接种于带有滤纸片的M9基本培养基平板中,该平板浸入L-Trp(Trp)、缓冲液(-)、邻氨基苯甲酸(AA)或L-Kyn(Kyn)中;

[0046] 图7-梭状冻胶样杆菌犬尿氨酸酶(Mu-KYNU)的体外稳定性。活性为Mu-KYNU时间的函数:(空心方块)在37℃下PBS中在74%剩余活性的幅度时具有 $^1T_{1/2}=6h$ 且随后 $^2T_{1/2}=150h$,和(实心圆)在37℃下混合人类血清中在30%剩余活性的幅度时具有 $^1T_{1/2}=5h$ 且随后 $^2T_{1/2}=73h$;

[0047] 图8-B16同种异体移植在用PEG-Pf-KYNU(--●)、失活PEG-Pf-KYNU(-●●)、抗-PD1(●●●)或抗-CTLA-4(-)治疗的C57BL/6J中的Kaplan-Meier图。箭头表示治疗天数,(A)表明用抗体治疗,(E)表明用酶治疗;

[0048] 图9A-C-图9A-携带B16肿瘤同种异体移植的C57BL/6J,其用PBS(圆)(对照)、单独抗-PD1(方块)、抗-PD1/PEG-Mu-KYNU(倒置三角形)、或抗-PD1/PEG-Pf-KYNU(竖立三角形)来治疗。图9B-观察到加性效应:与单独抗-PD1的0%肿瘤消除相比,抗-PD1/PEG-Pf-KYNU组合治疗消除60%的肿瘤,抗-PD1/PEG-Mu-KYNU组合消除20%的肿瘤。图9C-相应的Kaplan-Meier图;

[0049] 图10A-B-图10A-携带B16肿瘤同种异体移植的C57BL/6J,其用热灭活的PEG-Mu-KYNU(■)或活性PEG-Mu-KYNU(▲)治疗。图10B-相应的Kaplan-Meier图,其描述对于PEG-Mu-KYNU(---)25天的平均存活时间,和对于热灭活PEG-Mu-KYNU(-)22天的平均存活时间(箭头表示治疗天数)。

具体实施方式

[0050] 犬尿氨酸是氨基酸色氨酸的代谢产物,其通过吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO)或色氨

酸-2,3-双加氧酶(TDO)的作用来产生。犬尿氨酸对细胞生理学发挥多种作用,其中最重要的作用之一是T细胞应答的调控。许多肿瘤细胞调节IDO和/或TDO的合成,以提高犬尿氨酸局部浓度,该提高伴随着色氨酸的耗竭。高水平的犬尿氨酸用作抑制肿瘤浸润T细胞功能的强有力的方法,否则T细胞将攻击肿瘤。

[0051] 本发明提供了使用犬尿氨酸降解酶作为耗竭肿瘤微环境以及血清中局部犬尿氨酸水平的手段从而预防肿瘤介导的T细胞作用抑制的方法。犬尿氨酸水解酶(犬尿氨酸酶)将犬尿氨酸转化为丙氨酸和邻氨基苯甲酸,后者对T-细胞功能的影响未知。本发明人生成犬尿氨酸酶的药物制剂,以使该酶在生理条件下持续时间延长。本发明人随后显示该酶的瘤内施用导致小鼠中侵袭性肿瘤生长的明显阻滞。

[0052] I. 定义

[0053] 如本文所使用的,术语“蛋白质”和“多肽”是指包含经肽键连接的氨基酸的化合物,且可以互换使用。

[0054] 如本文所使用的,术语“融合蛋白”是指包含蛋白或以非天然的方式可操作地连接的蛋白片段的嵌合蛋白。

[0055] 如本文所使用的,术语“半衰期”(1/2-周期)是指其多肽的浓度在体外或体内降低一半所需的时间,例如,在对哺乳动物注射后。

[0056] 术语“在可操作的组合中”、“在可操作的顺序中”,和“可操作地连接”是指这样的连接,其中组分之间的关系允许它们以其预期的方式起作用,例如,核酸序列以这样的方式连接从而产生能够指导给定基因的转录和/或所需蛋白分子的合成的核酸分子,或氨基酸序列以这样的方式连接从而产生融合蛋白。

[0057] 术语“连接子”是指作为分子桥可操作地连接两个不同分子的化合物或部分,其中连接子的一部分可操作地连接至第一分子,且其中连接子的另一部分可操作地连接至第二分子。

[0058] 术语“PEG化”是指与聚乙二醇(PEG)的结合,鉴于其高度的生物相容性和易于改性,聚乙二醇已经广泛地用作药物载体。PEG可以通过PEG链末端的羟基经化学法偶联(例如,共价连接)到活性剂;然而,PEG本身限制每分子至多两个活性剂。在不同的途径中,PEG和氨基酸的共聚物作为将保留PEG的生物相容性的新型生物材料已经得到研究,但其具有每分子大量附着点(从而提供更大的载药量)的额外优点,且其能被综合地设计以适合各种应用。

[0059] 术语“基因”是指包含多肽或其前体生产所必需的控制和编码序列的DNA序列。多肽能够被全长编码序列或被编码序列的任何部分编码,从而保留所需的酶活性。

[0060] 术语“天然”是指基因、基因产物的典型形式或该基因或基因产物从天然存在源分离时的特征。天然形式是在自然群体中最常见的,从而任意指定为正常或野生型的形式。相反,术语“改性的”、“变体”或“突变体”是指与天然基因或基因产物相比显示序列改性和功能性质(例如,改变的特征)的基因或基因产物。

[0061] 术语“载体”用于指载体核酸分子,其中可以插入核酸序列,用于引入该序列可以在其中复制的细胞中。核酸序列可以是“外源的”,意指其相对于该载体所引入的细胞是外来的,或该序列与细胞中的序列同源但处于宿主细胞核酸(在其中通常未发现该序列)内的位置。载体包括质粒、粘粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如,YAC)。

本领域的技术人员将能够很好地通过标准重组技术(参见,例如,Maniatis等,1988和 Ausubel等,1994,两者均通过引用并入本文)构建载体。

[0062] 术语“表达载体”是指任何类型的基因构建体,其包含编码能够被转录的RNA的核酸。在一些情况下,RNA分子随后被转译为蛋白、多肽或肽。在其它情况下,这些序列不被转译,例如,在反义分子或核酶的生产中。表达载体可以包含多种“控制序列”,其是指在特定宿主细胞中可操作连接的编码序列的转录和可能的转译所必需的核酸序列。除了支配转录和转译的控制序列之外,载体和表达载体还可以包含提供其它功能的核酸序列,序列描述如下。

[0063] 本文中所使用的术语“治疗有效量”是指在方法中采用的以实现治疗效果的细胞和/或治疗性组合物(如治疗性多核苷酸和/或治疗性多肽)的量。在本申请通篇所使用的术语“治疗益处”或“治疗有效的”是指就此病状的药物治疗而言促进或增强受试者健康的任何情况。这包括,但不限于,减少疾病体征或症状的频率或严重性。例如,癌症的治疗可以涉及,例如,肿瘤大小的减小、肿瘤侵袭力的减小、癌症生长速率的减小或转移的预防。癌症的治疗也可以是指延长患有癌症的受试者的存活。

[0064] 本文中所使用的术语“ K_M ”是指酶的米氏常数,且其被定义为给定酶在酶催化反应中达到其最大速度的一半时特异性底物的浓度。本文中所使用的术语“ k_{cat} ”是指每个酶位点转化为每单位时间的产物的转换数或底物分子数,且该酶在其中以最大效率起作用。本文中所使用的术语“ k_{cat}/K_M ”是特异性常数,其是酶如何高效地将底物转化为产物的量度。

[0065] 本文中所使用的术语“嵌合抗原受体(CAR)”,可以是指人工T-细胞受体、嵌合T-细胞受体或嵌合免疫受体,例如,且包含将人工特异性移植到特定的免疫效应细胞上的工程化受体。CAR可用于将单克隆抗体的特异性带到T细胞上,从而允许产生大量的特异性T细胞,例如,在过继细胞疗法中使用。例如,在特定的实施方案中,CAR指导细胞特异性到肿瘤相关抗原上。在一些实施方案中,CAR包括胞内激活域、跨膜域和胞外域,该胞外域包括肿瘤相关抗原结合区域。在特殊方面,CAR包括源自单克隆抗体的单链可变片段(scFv)的融合(如美国专利7,109,304所述的那些,其通过引用全部并入本文),其融合到CD3- ζ 的跨膜和内功能域。其它CAR设计的特异性可以源于受体的配体(例如,肽)或源于模式识别受体(如Dectin)。在特定实施方案中,可通过使用对B系分子CD19特异的CAR重定向T细胞的特异性来靶向恶性B细胞。在某些情况下,可以改变抗原-识别域的间隔以降低激活诱导的细胞死亡。在某些情况下,CAR包括其它共刺激信号传导的域,如CD3-zeta、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP10和/或OX40。在一些情况下,可使用该CAR对分子共表达,该分子包括共刺激分子、用于成像(例如,用于正电子成像术)的报告基因、添加前体药物时有条件地消融T-细胞的基因产物、归巢受体、趋化因子、趋化因子受体、细胞因子和细胞因子受体。

[0066] “治疗(Treatment)”和“治疗(treating)”是指为了获得疾病或健康相关病状的治疗益处,向受试者施用或应用治疗剂或对受试者实施某种过程或方式。例如,治疗可以包括施用药学有效量的犬尿氨酸酶。

[0067] “受试者”和“患者”是指人类或非人类,如灵长类动物、哺乳动物和脊椎动物。在特定实施方案中,该受试者是人类。

[0068] II. 犬尿氨酸酶多肽

[0069] 一些实施方案关注了改性蛋白和多肽。特殊的实施方案关注了这样的改性蛋白或

多肽,其表现出至少一种可与未改性版本相比的功能活性,优选地,为犬尿氨酸降解活性或3'-羟基-犬尿氨酸降解活性。在进一步的方面,可以进一步改性该蛋白或多肽以增加血清的稳定性。因此,当本申请提及“改性蛋白”或“改性多肽”的功能或活性时,本领域普通技术人员将理解,这包括,例如,具有胜过未改性蛋白或多肽的其它优点的蛋白或多肽,如犬尿氨酸降解活性或3'-羟基-犬尿氨酸降解活性。在某些实施方案中,该未改性蛋白或多肽是天然犬尿氨酸酶,优选地为人类犬尿氨酸酶或荧光假单胞菌犬尿氨酸酶。特定预期的是,关注“改性蛋白”的实施方案可以相对于“改性多肽”来实施,反之亦然。

[0070] 活性的检测可以使用本领域技术人员熟悉的测定来完成,特别是相对于蛋白活性,且可以包括,用于比较目的,该改性或未改性蛋白或多肽的天然和/或重组版本的用途。

[0071] 在某些实施方案中,可以基于其犬尿氨酸和/或3'-羟基-犬尿氨酸降解活性的增加来鉴别改性多肽(如改性犬尿氨酸酶)。例如,可以鉴别未改性多肽的底物识别位点。这一鉴别可基于结构分析或同源分析。可以产生涉及此类底物识别位点改性的突变体群体。在进一步的实施方案中,具有增加的犬尿氨酸降解活性的突变体可以选自该突变体群体。所需突变体的选择可以包括如检测犬尿氨酸降解得到的副产物或产物的方法。

[0072] 改性蛋白可以具有氨基酸的缺失和/或取代;因而,具有缺失的蛋白、具有取代的蛋白和具有缺失和取代的蛋白是改性蛋白。在一些实施方案中,这些改性蛋白可以进一步包含插入物或添加的氨基酸,如,例如,融合蛋白或具有连接子的蛋白。“改性缺失蛋白”缺少一个或多个天然蛋白的残基,但可以拥有该天然蛋白的特异性和/或活性。“改性缺失蛋白”也可以有减少的免疫原性或抗原性。改性缺失蛋白的实例是这样的蛋白,其具有至少一个抗原区域缺失的氨基酸残基,该区域即被确定是在特殊生物体(如可以施用该改性蛋白的生物体的类型)中为抗原性的蛋白区域。

[0073] 取代或置换变体通常包含一个氨基酸与另一个氨基酸在一个或多个蛋白内的位点处的交换,且可被设计用于调整一个或多个多肽的性质,尤其是其效应子功能和/或生物利用度。取代可以是保守的或不保守的,即,一个氨基酸被一个类似形状和电荷的氨基酸置换。保守的取代在本领域是已知的,且包括,例如,这些变化:氨酸转变为丝氨酸;精氨酸转变为赖氨酸;天冬酰胺转变为谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸转变为谷氨酸;半胱氨酸转变为丝氨酸;谷氨酰胺转变为天冬酰胺;谷氨酸转变为天冬氨酸;甘氨酸转变为脯氨酸;组氨酸转变为天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸转变为亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸转变为缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸转变为精氨酸;蛋氨酸转变为亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸转变为酪氨酸,亮氨酸或蛋氨酸;丝氨酸转变为苏氨酸;苏氨酸转变为丝氨酸;色氨酸转变为酪氨酸;酪氨酸转变为色氨酸或苯丙氨酸;和缬氨酸转变为异亮氨酸或亮氨酸。

[0074] 除了缺失或取代,改性蛋白可以具有残基的插入,其通常涉及至少一个残基添加到该多肽中。这可以包括靶向肽或多肽或仅仅单个残基的插入。末端添加,被称为融合蛋白,如下所讨论。

[0075] 术语“生物学功能等效(biologically functional equivalent)”可以在本领域中很好地理解,且进一步在本文中详细定义。因此,具有约70%至约80%之间,或约81%至约90%之间,或甚至约91%至约99%之间的与对照多肽氨基酸相同或功能等效的氨基酸的序列都包括在内,只要保持了蛋白的生物活性。改性蛋白可以在某些方面生物学功能等效于其天然对应物。

[0076] 还应当理解,氨基酸和核酸序列可以包括其它残基,如其它N-或C-端氨基酸或5'或3'序列,但仍基本上如本文所公开的序列之一所述,只要该序列符合上文所提供的标准,包括保持关注蛋白表达的生物蛋白活性。末端序列的添加特别应用于核酸序列,其可以,例如,包括侧翼连接编码区的5'或3'部分的各种非编码序列或可以包括各种内部序列,即,已知出现在基因内的内含子。

[0077] III. 用于疗法的酶促犬尿氨酸降解

[0078] 在某些方面,该多肽可以用于使用耗竭犬尿氨酸的酶治疗疾病,该疾病包括对犬尿氨酸耗竭敏感的癌症,以预防肿瘤介导的致耐受性作用从而介导肿瘤消融促炎应答。在某些方面,犬尿氨酸酶被预期用于治疗ID01、ID02和/或TD0表达的肿瘤。

[0079] 本发明的某些方面提供了一种用于治疗疾病,诸如肿瘤的改性犬尿氨酸酶。特别地,该改性多肽可以具有人类多肽序列从而可以预防人类患者的过敏反应、允许重复给药和提高治疗效果。

[0080] 肿瘤(本发明的治疗方法对其有用)包括任何恶性细胞类型,如那些发现于实体肿瘤或血液肿瘤中的类型。示例性的实体肿瘤可以包括,但不限于,选自由胰腺、结肠、盲肠、胃、脑、头、颈、卵巢、肾、喉、肉瘤、肺、膀胱、黑色素瘤、前列腺和乳房组成的组的器官的肿瘤。示例性的血液肿瘤包括骨髓肿瘤、T或B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、胚细胞瘤、骨髓瘤等。癌症的进一步实例可以使用本文中提供的方法来治疗,包括,但不限于,癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、白血病、鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌,肺腺癌和肺鳞状细胞癌)、腹膜癌、肝癌、胃部癌症或胃癌(包括胃肠癌和胃肠基质癌)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾脏或肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、各种类型的头颈癌、黑色素瘤、浅表扩散性黑色素瘤、痣样黑色素瘤、肢端雀斑样黑色素瘤、结节性黑色素瘤,以及B细胞淋巴瘤(包括低度/滤泡性非何杰金氏淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL) NHL;中度/滤泡性NHL;中度扩散NHL;高度免疫母细胞NHL;高度淋巴细胞NHL;高度小无裂细胞NHL;大肿块NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和沃尔登斯特伦巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、毛细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性髓性白血病(AML),和慢性髓性白血病。

[0081] 该癌症可以具体为以下组织学的类型,尽管其不限于这些:肿瘤,恶性;癌;癌,未分化;巨细胞和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛母质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;胃泌素瘤,恶性;胆管癌;肝细胞癌;混合型肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉腺癌;腺癌;家族性结肠息肉病;实体癌;类癌瘤,恶性;细支气管肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸细胞癌;嗜酸性腺癌;嗜碱细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡腺癌;乳头状和滤泡腺癌;无包膜硬化性癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜癌;皮肤附属器癌;大汗腺腺癌;皮脂腺癌;耵聍腺腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;粘液性囊腺癌;粘液性腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;乳腺小叶癌;炎性癌;佩吉特氏病,乳腺;腺泡细胞癌;腺鳞癌;腺癌w/鳞状化生;胸腺瘤,恶性;卵巢间质肿瘤,恶性;卵泡膜细胞瘤,恶性;粒层细胞瘤,恶性;男性母细胞瘤,恶性;塞尔托利氏细胞癌;莱迪希细胞瘤,恶性;脂质细胞瘤,恶性;副神经节瘤,恶性;乳腺外副神经节瘤,恶性;嗜铬细胞瘤;血管球肉瘤(glomangiosarcoma);恶

性黑色素瘤;无黑色素性黑色素瘤;浅表扩散性黑色素瘤;巨大色素痣内恶性黑色素瘤;上皮样细胞黑色素瘤;蓝痣,恶性;肉瘤;纤维肉瘤;纤维组织细胞瘤,恶性;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;腺泡状横纹肌肉瘤;间质肉瘤;混合瘤,恶性;米勒管混合瘤;肾胚细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;间叶瘤,恶性;布伦纳瘤,恶性;叶状肿瘤,恶性;滑膜肉瘤;间皮瘤,恶性;无性细胞瘤;胚胎性癌;畸胎瘤,恶性;卵巢甲状腺瘤,恶性;绒毛膜癌;中肾瘤,恶性;血管肉瘤;血管内皮瘤,恶性;卡波西肉瘤;血管外皮细胞瘤,恶性;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;皮质旁骨肉瘤;软骨肉瘤;成软骨细胞瘤,恶性;间质软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;尤因氏肉瘤;牙源性瘤,恶性;成釉细胞牙肉瘤;成釉细胞瘤,恶性;成釉细胞纤维肉瘤;松果体瘤,恶性;脊索瘤;胶质瘤,恶性;室管膜瘤;星形细胞瘤;原浆性星形细胞瘤;纤维性星形细胞瘤;星形母细胞瘤;胶质母细胞瘤;少突神经胶质瘤;成少突神经胶质细胞瘤;原始神经外胚层瘤;小脑肉瘤;成神经节细胞瘤;成神经细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅神经源性肿瘤;脑膜瘤,恶性;神经纤维肉瘤;神经鞘膜瘤,恶性;颗粒细胞瘤,恶性;恶性淋巴瘤;何杰金氏病;何杰金氏副肉芽肿;恶性淋巴瘤;小淋巴细胞;恶性淋巴瘤,大细胞,弥散性;恶性淋巴瘤,滤泡性;阿利贝尔氏病;其它指定的非何杰金氏淋巴瘤;恶性组织细胞增生症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠病;白血病;淋巴性白血病;浆细胞白血病;红白血病;淋巴肉瘤细胞性白血病;骨髓性白血病;嗜碱细胞性白血病;嗜酸细胞性白血病;单核细胞性白血病;肥大细胞白血病;巨核母细胞白血病;髓样肉瘤;毛细胞白血病。

[0082] 犬尿氨酸酶可以在本文中作为多种形式的抗肿瘤剂使用,用于耗竭肿瘤组织中或患有癌症的哺乳动物循环中的犬尿氨酸和/或3'-羟基-犬尿氨酸,或用于耗竭犬尿氨酸耗竭被认为是所需的地方的犬尿氨酸。

[0083] 在哺乳动物的循环中耗竭可以在体内进行,在组织培养或其它生物培养基中期望犬尿氨酸和3'-羟基-犬尿氨酸耗竭的一些情况下可以体外进行,当生物体液、细胞或组织在体外操作并随后返回患病的哺乳动物体内时可以进行。进行循环、培养基、生物体液或细胞的犬尿氨酸耗竭以降低被治疗材料可达到的犬尿氨酸的量,从而包括使待耗竭材料与犬尿氨酸耗竭量的犬尿氨酸酶在犬尿氨酸耗竭的条件下接触,以降解被接触材料中的环境犬尿氨酸。

[0084] 该耗竭可以针对用于细胞的营养源,不一定是细胞本身。因此,在体内应用中,治疗肿瘤细胞包括使用于肿瘤细胞群体的营养培养基与犬尿氨酸酶接触。在这一实施方案中,该培养基可以是需要犬尿氨酸耗竭的血液、淋巴液、脊髓液等体液。

[0085] 犬尿氨酸-和3'-羟基-犬尿氨酸-耗竭效率可以依赖该应用广泛地变化,且通常依赖于材料中存在的犬尿氨酸的量、所需的耗竭速率和暴露在犬尿氨酸酶中该材料的耐受性。材料中的犬尿氨酸和犬尿氨酸代谢产物的水平,和因此从材料中得到的犬尿氨酸和犬尿氨酸代谢产物耗竭速率,能够轻易地用本领域熟知的多种化学和生化方法进行监测。示例性的犬尿氨酸-耗竭量进一步在本文中描述,且其范围可以是0.001至100个单位(U)犬尿氨酸酶,优选地约0.01至10U,且更优选地约0.1至5U犬尿氨酸酶/毫升(mL)的待治疗材料。典型的剂量可以基于体重来施用,且范围为约5-1000U/千克(kg)/天,优选地约5-100U/kg/天,更优选地约10-50U/kg/天,更优选地约20-40U/kg/天。

[0086] 犬尿氨酸-耗竭的条件是与犬尿氨酸酶的生物活性相容的缓冲和温度条件,且包括与酶相容的适中温度、盐和pH条件,例如,生理条件。示例性的条件包括约4-40℃,相当于

约0.05至0.2M NaCl的离子强度,和约5至9的pH,同时包括生理条件。

[0087] 在特定实施方案中,本发明预期了使用犬尿氨酸酶作为抗肿瘤药的方法,且因此包括使肿瘤细胞群体与治疗有效量的犬尿氨酸酶接触足够抑制肿瘤细胞生长的一段时间。

[0088] 在一个实施方案中,该体内接触通过施用,通过静脉内、腹膜内或瘤内注射给患者治疗有效量的生理学上耐受的包含本发明的犬尿氨酸酶的组合物来实现,从而耗竭存在于患者中的肿瘤细胞的犬尿氨酸源。

[0089] 治疗有效量的犬尿氨酸酶是经计算用于实现所需效果的预定量,即,耗竭肿瘤组织或患者循环中的犬尿氨酸,且从而介导肿瘤-消融促炎应答。因此,本发明的犬尿氨酸酶的施用剂量范围是那些足够大的能产生所需效果(其中肿瘤细胞分裂的症状和细胞周期被减小)的剂量。该剂量不应大到引起毒副作用,如高粘滞综合症、肺水肿、充血性心力衰竭、神经作用等。通常,该剂量将会随着患者的年龄、病状、性别和疾病程度变化,且能够被本领域技术人员所确定,在有任何并发症的情况下,该剂量可由各个医师调整。

[0090] 该犬尿氨酸酶可以通过注射或随时间逐渐输注在肠胃外施用。该犬尿氨酸酶可以经静脉内、腹膜内、口服、肌内、皮下、腔内、经皮、真皮施用,可以通过蠕动的方式来递送,可以直接注射到包含肿瘤细胞的组织中,或可以通过连接导管的泵来施用,该导管可以包含潜在的犬尿氨酸生物传感器。

[0091] 包含犬尿氨酸酶的治疗性组合物通常静脉内施用,例如,如通过单位剂量注射。术语“单位剂量”当用于指治疗性组合物时,是指适合作为受试者单一剂量的物理上分散的单位,每一单位包含预定量的活性材料和所需的稀释剂(即,载体或媒介物),该预定量的活性材料经计算能产生所需的治疗效果。

[0092] 该组合物按照与剂量制剂相容的方式且以治疗有效量来施用。待施用的数量依赖于待治疗的受试者、受试者的体系利用活性成分的能力,和所需治疗效果的程度。待施用的所需活性成分的精确量依赖于执业医师的判断且对于每一个体是特有的。然而,本文公开了用于体系应用的合适剂量的范围,且剂量范围依赖于施用途径。起始施用和加强注射的合适方案也被预期且以起始施用随后间隔一个或多个小时重复剂量的注射或其它施用为典型,示例性的多次施用如本文中所述,且为特别优选的以维持犬尿氨酸酶的连续高血清和组织水平以及相反地犬尿氨酸的低血清和组织水平。可选地,预期了连续静脉内输注足够维持血液中的浓度在体外疗法指定的范围内。

[0093] IV. 缀合物

[0094] 本发明的组合物和方法涉及改性犬尿氨酸酶,如通过与同种异体肽片段或聚合物(如聚乙二醇)形成缀合物来改性。在进一步的方面,该犬尿氨酸酶可以连接到PEG以增加酶的流体动力学半径,且因此增加血清持久性。在某些方面,所公开的多肽可以与任何靶向剂如配体缀合,该配体具有与外部受体或者肿瘤细胞上的结合位点特异性地和稳定地结合的能力(美国专利公开2009/0304666)。

[0095] A. 融合蛋白

[0096] 本发明的某些实施方案关注了融合蛋白。这些分子可以具有天然或改性犬尿氨酸酶,该犬尿氨酸酶连接在N-或C-末端为同种异体域。例如,融合可以采用其它物种的前导序列以允许在同种异体宿主中蛋白的重组表达。另一有用的融合包括蛋白亲和标签(如血清白蛋白亲和标签或六个组氨酸残基)或免疫活性域(如抗体表位,优选可切割的)的添加,以

促进该融合蛋白的纯化。非限定性亲和标签包括多组氨酸、几丁质结合蛋白 (CBP)、麦芽糖结合蛋白 (MBP) 和谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)。

[0097] 在特定实施方案中,该犬尿氨酸酶可以连接到增加体内半衰期的肽,如XTEN多肽 (Schellenberger等,2009)、IgG Fc域、白蛋白或白蛋白结合肽。

[0098] 产生融合蛋白的方法是那些本领域技术人员熟知的。可例如,通过完全融合蛋白的从头合成,或通过编码同种异体域的DNA序列的附着,随后表达完整融合蛋白来生成此类蛋白。

[0099] 恢复母本蛋白功能活性的融合蛋白的生成,可以通过将基因与编码肽连接子的桥连DNA片段连接来促进,该肽连接子在串联连接的多肽之间被剪接。该连接子将是足够长的,以允许所获得的融合蛋白的适当折叠。

[0100] B. 连接子

[0101] 在某些实施方案中,该犬尿氨酸酶可以使用双功能交联剂化学缀合,或使用肽连接子在蛋白水平融合。

[0102] 双功能交联剂已经被广泛用于各种目的,包括亲和基质的制备、多样结构的改性和稳定化、配体和受体结合位点的鉴定,和结构研究。合适的肽连接子也可以用于连接该犬尿氨酸酶,如Gly-Ser连接子。

[0103] 载有两个相同官能团的同双功能试剂,证明在相同和不同大分子或大分子亚基之间诱导交联和将多肽配体连接到其特异性结合位点是高效的。异双功能试剂包含两种不同的官能团。通过利用两种不同官能团的不同反应性,能够选择性地和顺序地控制交联。根据其官能团(即氨基-、巯基-、胍-、吡啶-、羧基-特异性基团)的特异性,能够分离该双功能交联剂。在这些交联剂中,针对游离氨基基团的试剂已成为普遍应用的,因为它们可从商业途径获得、容易合成,并且其可在温和反应条件下应用。

[0104] 大多数异双功能交联剂包含伯胺-反应基团和硫醇-反应基团。在另一个实例中,描述了异双功能交联剂和使用该交联剂的方法(美国专利号5,889,155,其通过引用全部明确并入本文)。该交联剂使亲核酰肼残基与亲电马来酰亚胺残基结合,在一个实例中,允许醛偶联到游离硫醇。该交联试剂可被改性,以交联各种官能团。

[0105] 另外,本领域技术人员已知的任何其它连接/偶联剂和/或机理可以用于结合犬尿氨酸酶,如,例如抗体-抗原相互作用、亲和素-生物素连接、酰胺连接、酯连接、硫酯连接、醚连接、硫醚连接、磷酸酯连接、磷酸胺连接、酸酐连接、二硫化物连接、离子和疏水相互作用、双特异性抗体和抗体片段或其组合。

[0106] 优选采用在血液中具有合理稳定性的交联剂。许多类型的包含二硫键的连接子是已知的,可以成功用其缀合靶向和治疗/预防性试剂。证明含有空间位阻的二硫键的连接子可以获得更好的体内稳定性。从而这些连接子是一组连接剂。

[0107] 除了位阻的交联剂,也可以采用非位阻的交联剂。其它有用的交联剂(认为不含有或产生受保护的二硫化物),包括SATA、SPDP和2-亚氨基硫烷(2-iminothiolane) (Wawrzynczak和Thorpe,1987)。此类交联剂的用途在本领域中是很好理解的。另一个实施方案涉及柔性连接子的用途。

[0108] 一旦化学缀合,一般将该肽进行纯化,以从未缀合试剂和其它污染物中分离缀合物。大量纯化技术可用于提供具有足够纯度的缀合物以使它们临床上有用。

[0109] 基于尺寸分离(如凝胶过滤、凝胶渗透或高效液相色谱)的纯化方法是一般最常用的。也可以使用其它色谱技术,如蓝色-琼脂糖凝胶分离。可采用纯化来自包含体的融合蛋白的常规方法,如使用弱去污剂(如N-月桂酰肌氨酸钠(SLS))。

[0110] C.PEG化

[0111] 在本发明的某些方面,公开了与犬尿氨酸酶的PEG化相关的方法和组合物。例如,根据本文所公开的方法,该犬尿氨酸酶可被PEG化。

[0112] PEG化是聚(乙二醇)聚合物链附着另一分子(一般是药物或治疗性蛋白)的过程。PEG化通常通过PEG反应衍生物与靶向大分子的孵育来完成。PEG共价附着在药物或治疗性蛋白上,能够“掩盖”试剂不受宿主免疫系统影响(减少的免疫原性和抗原性)或增加试剂的流体动力学尺寸(溶液中的尺寸),其通过减少肾清除率延长它的循环时间。PEG化还能够向疏水性药物和蛋白提供水溶解性。

[0113] PEG化的第一步是PEG聚合物在一个或两个末端的合适的功能化。已知在每一末端用相同的反应部分活化的PEG为“同双功能的”,而如果存在的官能团不同,那么PEG衍生物被称为“异双功能的”或“异功能的”。制备PEG聚合物的化学活性或活化衍生物以将PEG附着在所需分子上。

[0114] 用于该PEG衍生物的合适的官能团的选择基于将与PEG偶联的分子上可用反应基团的类型。对于蛋白,典型的反应氨基酸包括赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。也可以使用N-末端氨基和C-末端羧酸。

[0115] 用于形成第一代PEG衍生物的技术通常是使PEG聚合物与能与羟基反应的基团(代表性地有酸酐、酸性氯化物、氯甲酸酯和碳酸酯)反应。在第二代PEG化化学中,更高效的官能团(如醛、酯、酰胺,等等)可用于缀合。

[0116] 随着PEG化的应用变得越来越先进和复杂,增加了用于缀合的异双功能PEG的需要。这些异双功能PEG在连接两个实体中非常有用,其中需要亲水、柔性和可生物相容的间隔物。异双功能PEG的优选端基是马来酰亚胺、乙烯砜、吡啶二硫物、胺、羧酸和NHS酯。

[0117] 最常见的改性剂或连接子基于甲氧PEG(mPEG)分子。它们的活性依赖于将蛋白改性基团添加到醇端。在一些例子中,聚乙二醇(PEG二醇)用作前体分子。该二醇随后在两端改性,以制得异-或同-二聚PEG连接的分子。

[0118] 蛋白一般在亲核位点(如未质子化的硫醇(半胱氨酰残基)或氨基)PEG化。半胱氨酰-特异性改性剂的实例包括PEG马来酰亚胺、PEG碘乙酸酯、PEG硫醇,和PEG乙烯砜。所有这四种在温和的条件以及中性至弱碱性pH下有强的半胱氨酰-特异性,但每一种都有一些缺点。与马来酰亚胺形成的硫醚在碱性条件下可能有些不稳定,从而对具有这一连接子的制剂选择有一些限制。与碘代PEG形成的硫代氨基甲酸酯连接更稳定,但是游离碘能够在一些条件下改性酪氨酸残基。PEG硫醇与蛋白硫醇形成二硫键,但是这一连接在碱性条件下也是不稳定的。PEG-乙烯砜的反应性与马来酰亚胺和碘代PEG相比相对较慢;然而,形成的硫醚连接很稳定,它较慢的反应速率还可以使PEG-乙烯砜反应更容易控制。

[0119] 位点-特异性PEG化很少在天然半胱氨酰残基上进行,由于这些残基常常呈二硫键的形式或为生物活性所必需的。在另一方面,可使用定点诱变以合并用于硫醇-特异性连接子的半胱氨酰PEG化位点。该半胱氨酸突变一定要设计,以使得PEG化试剂容易接近且在PEG化后仍然有生物活性。

[0120] 胺-特异性改性剂包括PEG NHS酯、PEG三氟乙基磺酸酯、PEG醛、PEG异硫氰酸酯和一些其它的改性剂。所有这些在温和的条件下反应,且对氨基是非常特异性的。该PEG NHS酯可能是更活泼的反应主体之一;然而,它的高反应性可使PEG化反应难以大规模控制。PEG醛与氨基形成亚胺,随后用氰基硼氢化钠将其还原为仲胺。与硼氢化钠不同,氰基硼氢化钠不会还原二硫键。然而,这一化学品有较高的毒性,且必须小心处理,特别在其变得易挥发的较低pH值时。

[0121] 由于在大多数蛋白上有多个赖氨酸残基,位点特异性的PEG化是很困难的。幸运的是,因为这些试剂能与未保护的氨基反应,有可能通过在较低pH下进行反应以将PEG化指向较低pK的氨基。通常, α -氨基的pK与赖氨酸残基的 ϵ -氨基相比低1-2个pH单位。通过在pH7或更低情况下PEG化该分子,可经常获得N-末端的高选择性。然而,如果该蛋白的N-末端部分不是生物活性所必需的,那么这是唯一可行的。尽管如此,PEG化的药物代谢动力学益处经常比体外生物活性的明显损失更重要,导致产物不管PEG化的化学如何,都具有更大的体内生物活性。

[0122] 在开发PEG化过程时,需要考虑一些参数。幸运地是,通常不会多于四个或五个关键参数。PEG化条件最优化的“实验设计”方法可能是非常有用的。对于硫醇-特异性PEG化反应,要考虑的参数包括:蛋白浓度、PEG蛋白比(以摩尔计)、温度、pH、反应时间,且在一些例子中,包括氧气的排除(氧气可促成蛋白分子间二硫化物的形成,这将会降低PEG化产物的产率)。对于胺-特异性改性,应考虑同样的因素(氧气除外),除非pH可以是更具决定性的,特别是当靶向N-末端氨基时。

[0123] 对于胺-和硫醇-特异性改性,该反应条件可以影响蛋白的稳定性。这可能限制温度、蛋白浓度和pH。另外,PEG连接子的反应性在开始PEG化反应之前应该是已知的。例如,如果该PEG化试剂只有70%的活性,那么PEG的使用量应该保证只有活性PEG分子被计入蛋白-PEG反应化学计算中。

[0124] V. 蛋白和肽

[0125] 在某些实施方案中,本发明关注了包含至少一种蛋白或肽(如犬尿氨酸酶)的新型组合物。这些肽可以包含在融合蛋白中或缀合到如上文所述的试剂。

[0126] 如本文所使用的,蛋白或肽通常是指,但不限于,具有大于约200个氨基酸,直到由基因翻译的全长序列的蛋白;具有大于约100个氨基酸的多肽;和/或具有约3至约100个氨基酸的肽。为了方便,术语“蛋白”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用。

[0127] 如本文所使用的,“氨基酸残基”是指本领域已知的任何天然存在的氨基酸,任何氨基酸衍生物,或任何氨基酸类似物。在某些实施方案中,该蛋白或肽的残基是连续的,无任何中断氨基酸残基的序列的非氨基酸。在其它实施方案中,该序列可以包含一个或多个非氨基酸部分。在特定实施方案中,该蛋白或肽的残基的序列可被一个或多个非氨基酸部分中断。

[0128] 因此,该术语“蛋白或肽”涵盖这样的氨基酸序列,其包含天然存在的蛋白中发现的20种常用氨基酸中至少一种,或至少一种改性或非常规氨基酸。

[0129] 蛋白或肽可以通过本领域技术人员已知的任意技术来制得,该技术包括通过标准分子生物学技术表达蛋白、多肽或肽,来自天然源的蛋白或肽的分离,或蛋白或肽的化学合成。对应于不同基因的核苷酸和蛋白、多肽和肽序列先前已被公开,并可在本领域普通技术

人员已知的计算机化数据库中发现。这样一个数据库是美国国家生物技术信息中心的Genbank和GenPept数据库(可在万维网以网址ncbi.nlm.nih.gov/进入)。可以使用本文所公开的或本领域普通技术人员将已知的技术扩增和/或表达已知基因的编码区域。可选地,蛋白、多肽和肽的各种商业制剂对本领域技术人员是已知的。

[0130] VI. 核酸和载体

[0131] 在本发明的某些方面中,可以公开了编码犬尿氨酸酶或包含犬尿氨酸酶的融合蛋白的核酸序列。依赖于使用的表达体系,可基于常规方法选择核酸序列。例如,如果犬尿氨酸酶源于人类犬尿氨酸酶,且包含多个很少在大肠杆菌中使用随后可以干预表达的密码子。因此,各自基因或其变体可以是被优化用于大肠杆菌表达的密码子。各种载体也可以用于表达目标蛋白。示例性的载体包括,但不限于,质粒载体、病毒载体、转位子或脂质体基载体。

[0132] VII. 宿主细胞

[0133] 宿主细胞可以是任何可以被转化以允许犬尿氨酸酶及其缀合物的表达和分泌的细胞。该宿主细胞可以是细菌、哺乳动物细胞、酵母或丝状真菌。各种细菌包括埃希氏菌(*Escherichia*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)。属于酵母菌属(*Saccharomyces*)、克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)或毕赤酵母属(*Pichia*)的酵母将用作合适的宿主细胞。各种物种的丝状真菌可以用作表达宿主,包括以下属:曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)、青霉菌属(*Penicillium*)、头孢霉属(*Cephalosporium*)、绵霉属(*Achlya*)、柄孢壳菌属(*Podospira*)、内座壳属(*Endothia*)、毛霉属(*Mucor*)、旋孢腔菌属(*Cochliobolus*)和梨孢属(*Pyricularia*)。

[0134] 可用宿主生物体的实例包括细菌,例如,大肠杆菌MC1061,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)衍生物BRB1(Sibakov等,1984),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) SAI123(Lordanescu,1975),或变铅青链霉菌(*Streptococcus lividans*) (Hopwood等,1985);酵母,例如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) AH 22(Mellor等,1983)或粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);和丝状真菌,例如,构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*),泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*) (Ward,1989),或里氏木霉(*Trichoderma reesei*) (Penttila等,1987;Harkki等,1989)。

[0135] 哺乳动物宿主细胞的实例包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO-K1;ATCC CCL61)、大鼠垂体细胞(GH1;ATCC CCL82)、HeLa S3细胞(ATCC CCL2.2)、大鼠肝癌细胞(H-4-II-E;ATCC CRL 1548)、SV40-转化的猴肾细胞(COS-1;ATCC CRL 1650),和鼠胚胎细胞(NIH-3T3;ATCC CRL 1658)。前述内容是对许多本领域中已知的可能的宿主生物体的示例而非限制。原则上,所有能够分泌的宿主(无论是原核的或真核的)都能够被使用。

[0136] 表达该犬尿氨酸酶和/或其融合蛋白的哺乳动物宿主细胞在通常用于培养亲本细胞系的条件下培养。通常,细胞在包含生理盐和营养物的标准培养基(如标准RPMI、MEM、IMEM,或DMEM)中培养,通常补充有5%-10%血清,如胎牛血清。培养条件也是标准的,例如,培养物在37°C下在固定或滚动培养基中孵育直至获得所需的蛋白水平。

[0137] VIII. 蛋白纯化

[0138] 蛋白纯化技术对本领域技术人员来说是熟知的。这些技术涉及,从一种层面讲,将细胞、组织,或器官均化并粗略分馏成多肽和非多肽级分。除非另有说明,该目标蛋白或多

肽可以进一步使用色谱和电泳技术纯化,以实现部分或完全纯化(或纯化至同质性)。特别适用于纯肽制备的分析方法是离子交换色谱、凝胶排阻色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳、亲和色谱、免疫亲和色谱,和等电点聚焦。特别高效纯化肽的方法是快速液相色谱(FPLC)或甚至高效液相色谱(HPLC)。

[0139] 纯化的蛋白或肽用于指可从其它组分中分离的组合物,其中该蛋白或肽被纯化到相对于其天然可获取状态的任何程度。分离或纯化的蛋白或肽,因此,也指从其可能天然存在的环境中游离的蛋白或肽。通常,“纯化的”将指已经历分馏除去各种其它组分的蛋白或肽组合物,且该组合物基本保留其表达生物活性。当使用术语“基本上纯化的”时,该名称是指这样的组合物,其中蛋白或肽形成该组合物的主要组分,如在构成该组合物中蛋白的约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多。

[0140] 各种适于蛋白纯化的技术对本领域技术人员是熟知的。这些技术包括,例如,使用硫酸铵、PEG、抗体等沉淀,或通过热变性,随后离心;色谱步骤,如离子交换、凝胶过滤、反相、羟磷灰石和亲和色谱;等电点聚焦;凝胶电泳;和这些与其它技术的组合。如在本领域中通常已知的,据信,各种纯化步骤进行的顺序可以改变,或某些步骤可以省略,且仍能得到用于制备基本纯化的蛋白或肽的合适方法。

[0141] 根据本公开,各种用于定量该蛋白或肽纯化程度的方法对本领域技术人员是已知的。这些方法包括,例如,确定活性级分的比活性,或通过SDS/PAGE分析评估级分中多肽的量。用于评估级分纯度的优选的方法是计算该级分的比活性,以将其与初始提取物的比活性进行比较,并因此计算其中的纯度,根据“-纯化倍数(fold purification number)”进行评估。当然,用于表示活性量的实际单位将依赖于在纯化后所选择的特定测定技术,以及该表达蛋白或肽是否表现出可检测的活性。

[0142] 没有一般要求提出该蛋白或肽总是以其最纯的状态提供。事实上,在某些实施方案中,劣于基本纯的产品也预期具有可利用性。部分纯化可以组合使用较少的纯化步骤,或利用相同常规纯化方案的不同形式来完成。例如,可以理解的是,利用HPLC设备进行的阳离子交换柱色谱通常将得出比采用低压力色谱系统的相同技术更大的纯化“-倍数”。展示较低相对纯化程度的方法在蛋白产品的总回收或保持该表达蛋白的活性时可以有优势。

[0143] 在某些实施方案中,蛋白或肽可以是分离或纯化的,例如,犬尿氨酸酶、包含犬尿氨酸酶的融合蛋白或PEG化后的改性犬尿氨酸酶。例如,His标签或亲和表位可以包含在此类犬尿氨酸酶中,以促进纯化。亲和色谱是依赖于待分离的物质与其能够与之特异性结合的分子之间的特异性亲和力的色谱过程。这是一种受体-配体类型的相互作用。柱材料通过将结合伙伴之一共价偶联到不溶基质上来合成。然后,该柱材料能够从溶液中特异性吸附该物质。通过将条件改为不发生结合的情况而发生洗脱(例如,改变的pH、离子强度、温度等)。基质应是不在任何明显程度吸附分子并具宽范围的化学、物理和热稳定性的物质。配体应以不影响其结合性的方式被偶联。配体还应提供相对紧密的结合。应该有可能洗脱该物质而不破坏样品或配体。

[0144] “尺寸排阻色谱(SEC)”是一种色谱方法,其中溶液中的分子的分离是基于它们的尺寸,或用更专业的术语来说,它们的流体动力学体积。它常常应用到大分子或大分子复合物,如蛋白和工业聚合物。通常,当水溶液用于通过该柱运输样品时,该技术被称为凝胶过滤色谱,与凝胶渗透色谱相对,其用于当有机溶剂用作流动相时。

[0145] SEC的基本原理是不同尺寸的颗粒经固定相以不同的速率洗脱(过滤)。这导致基于尺寸的颗粒溶液的分离。假如所有颗粒同时被装载或几乎同时装载,则相同尺寸的颗粒应该一起洗脱。每一尺寸排阻柱具有能够被分离的分子量的范围。排阻极限定义该范围上端的分子量,且为其中分子太大从而陷在固定相中的情况。渗透极限定义该分离范围下端的分子量,且为其中足够小尺寸的分子能够完全渗透进固定相的孔且所有低于这一分子质量的分子很小以至于它们以单条带洗脱的情况。

[0146] 高效液相色谱(或高压液相色谱,HPLC)是在生物化学和分析化学中频繁使用的用于分离、鉴定和定量化合物的柱色谱的形式。HPLC利用装有色谱填充材料(固定相)的柱,使流动相穿过该柱移动的泵,和显示分子保留时间的检测器。保留时间依赖于该固定相、被分析的分子和所用溶剂之间的相互作用而变化。

[0147] IX. 药物组合物

[0148] 预期的是,新型犬尿氨酸酶可以全身或局部施用以抑制肿瘤细胞的生长,且更优选地,杀死患有局部晚期或转移癌症的癌症患者中的癌症细胞。该新型犬尿氨酸酶可经静脉内、鞘内和/或腹膜内施用。该新型犬尿氨酸酶可以单独或与抗增殖药物组合施用。在一个实施方案中,该新型犬尿氨酸酶被施用以降低手术或其它过程之前患者负荷的癌症。可选地,该新型犬尿氨酸酶可在手术后施用,以保证任何剩余的癌症(例如,手术未能消除的癌症)不会存活。

[0149] 但这并不意味着,本发明受到治疗性制剂的特殊性质的限制。例如,此类组合物可以与生理上耐受液体、凝胶,或固体载体、稀释剂,和赋形剂一起提供在制剂中。这些治疗性制剂可以用于兽用用途对哺乳动物施用,如家畜,和以类似于其它治疗性试剂的方式在人类中用于临床用途。通常,治疗性效果所需的剂量将根据用途的类型和施用模式以及个体受试者的特殊要求而变化。

[0150] 此类组合物通常被制备为液体溶液或混悬液,用作可注射剂。合适的稀释剂和赋形剂是,例如,水、盐水、右旋糖、甘油等,和其组合。另外,如果需要,该组合物可以包含少量的辅助物质,如增湿剂或乳化剂、稳定剂,或pH缓冲剂。

[0151] 当预期临床应用时,其可能为制备包含蛋白、抗体,和药物的呈适合预期应用的形式药物组合物所必需的。通常,药物组合物可以包含有效量的一种或多种犬尿氨酸酶或溶解或分散于药学上可接受的载体中的添加剂。短语“药学上或药理学上可接受的”是指当施用至动物(例如人类,视情况而定)时不会产生不适、过敏,或其它不良反应的分子实体和组合物。鉴于本公开,包含至少一种由本文所公开的方法分离的犬尿氨酸酶(kyureninase)或其它活性成分的药物组合物的制剂将是本领域技术人员已知的,如Remington's Pharmaceutical Sciences(第18版,1990)所举例的,其通过引用并入本文。此外,对于动物(例如,人类)施用,将理解的是,制剂应该满足FDA生物学标准办公室(FDA Office of Biological Standards)所要求的无菌、致热原性、一般安全性,和纯度标准。

[0152] 如本文所使用的,“药学上可接受的载体”包括任何和全部溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗细菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶剂、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、芳香剂、染料、类似材料和其组合,如将为本领域普通技术人员所已知(例如,参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,1990,其通过引用并入本文)。除非任何常规载体与活

性成分不相容,否则考虑将其用于药物组合物中。

[0153] 本发明的某些实施方案可以包括不同类型的载体,取决于它是以固体、液体还是气溶胶形式施用,以及用于施用途如注射时它是否需要无菌。该组合物可经静脉内、皮内、经皮、鞘内、动脉内、腹膜内、鼻内、阴道内、直肠内、肌内、皮下、粘膜、口服、局部(topically)、局部(locally)、通过吸入(例如,气溶胶吸入)、通过注射、通过输注、通过连续输注、通过直接浸浴靶细胞的局部灌注、经导管、经灌洗、以液体组合物(例如,脂质体),或通过其它方法或之前的任意组合来施用,如本领域普通技术人员将已知的(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,1990,其通过引用并入本文)。

[0154] 该改性多肽可被配制成呈游离碱、中性或盐的形式的组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐,例如,那些与蛋白质组合物的自由氨基形成的,或与无机酸(如盐酸或磷酸)形成的,或与此类有机酸(如醋酸、草酸、酒石酸或苦杏仁酸)形成的盐。与游离羧基形成的盐,还可源自无机碱,如,例如,钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物,或如异丙胺、三甲胺、组氨酸、或普鲁卡因的有机碱。配制后,溶液就以与剂型相适的方式且以治疗有效的量进行施用。可以以各种剂型来容易地施用制剂,如配制用于非肠道施用,如可注射溶液,或用于递送至肺的气溶胶,或配制用于消化道施用,如药物释放胶囊等。

[0155] 进一步根据本发明的某些方面,适于施用的本发明的组合物可在药学上可接受的载体中与惰性稀释剂一起或不与惰性稀释剂一起提供。该载体应是可同化的且包括液体、半-固体,即,糊剂,或固体载体。除了对受体或对其中所含成分的治疗有效性有害的任何常规介质、试剂、稀释剂或载体外,其在用于实践本方法的可施用的组合物中的用途是适宜的。载体或稀释剂的实例包括脂肪、油、水、盐水溶液、脂质、脂质体、树脂、粘合剂、填充剂等,或其组合。该组合物还可以包含各种抗氧化剂以阻止一种或多种组分的氧化。另外,通过防腐剂可以防止微生物的作用,如各种抗菌剂和抗真菌剂,包括但不限于对羟基苯甲酸酯类(例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)、氯代丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞或其组合。

[0156] 根据本发明的某些方面,该组合物与该载体以任何方便和实际的方法组合,即,通过溶解、悬浮、乳化、混合、封装、吸收等。此过程对本领域技术人员是常规的。

[0157] 在本发明的一个特定的实施方案中,将该组合物与半固体或固体载体彻底组合或混合。该混合能够以任何方便的方式如研磨来完成。在该混合过程中还可以加入稳定剂,以便保护该组合物以免失去治疗活性,即,在胃中的变性作用。用于该组合物中的稳定剂的实例包括缓冲液、氨基酸(如,甘氨酸和赖氨酸)、碳水化合物(如,右旋糖、甘露糖、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、山梨糖醇、甘露糖醇等)。

[0158] 在进一步的实施方案中,本发明可以关注包含犬尿氨酸酶、一种或多种脂质,和水性溶剂的药物脂质媒介物组合物的用途。如本文所使用的,术语“脂质”定义为包括任何宽范围的典型不溶于水并可用有机溶剂萃取的物质。这一大类的化合物是本领域技术人员所熟知的,如术语“脂质”在本文中所使用,其不限于任何特殊结构。实例包括包含长链脂肪族烃和其衍生物的化合物。脂质可以是天然存在的或合成的(即,由人设计或生产)。然而,脂质常常是生物物质。生物脂质在本领域是熟知的,且包括例如,中性脂肪、磷脂、磷酸甘油酯、类固醇、萜、溶血脂质(lysolipid)、鞘糖脂、糖脂、硫苷脂(sulphatide)、带有醚和酯连接的脂肪酸的脂质、可聚合脂质和其组合。当然,除了在本文中特别描述的作为脂质为本领

域技术人员理解的那些化合物,其它化合物也包括在该化合物和方法中。

[0159] 本领域普通技术人员将熟悉可用于将组合物分散在脂质媒介物中的技术的范围。例如,该犬尿氨酸酶或其融合蛋白可被分散在包含脂质的溶液中,用脂质溶解、用脂质乳化、与脂质混合、与脂质组合、共价键合到脂质、作为脂质中的混悬液包含、用胶束或脂质体包含或复合,或其它通过本领域普通技术人员已知的任何手段与脂质或脂质结构相关的方法。该分散可能会或不会导致脂质体的形成。

[0160] 施用于动物患者的组合物的实际剂量可通过物理和生理因素来确定,如体重、病状的严重程度、正在治疗的疾病类型、之前或同时进行的治疗性干预、患者的自发病和施用的途径。依赖于施用的剂量和途径,优选剂量和/或有效量的施用数量可以根据受试者的应答改变。负责施用的执业医师无论如何将要确定组合物中活性成分的浓度和该个体受试者的适宜剂量。

[0161] 在某些实施方案中,药物组合物可以包含,例如,至少约0.1%的活性化合物。在其它实施方案中,活性化合物可以包含,例如,约2%至约75%的单位重量,或约25%至约60%,和其中可衍生出的任何范围。自然地,可以按照此类方式制备活性化合物在各治疗上有用的组合物中的量,使得将在该化合物的任意给定单位剂量中获得合适的剂量。制备此类药物制剂的本领域技术人员将考虑如溶解性、生物利用率、生物半衰期、施用途径、产品保存期等因素以及其它药理学考量因素,且因此,多种剂量和治疗方案可以是所希望的。

[0162] 在其它非限定的实例中,剂量也可以包括每次施用时约1微克/千克/体重、约5微克/千克/体重、约10微克/千克/体重、约50微克/千克/体重、约100微克/千克/体重、约200微克/千克/体重、约350微克/千克/体重、约500微克/千克/体重、约1毫克/千克/体重、约5毫克/千克/体重、约10毫克/千克/体重、约50毫克/千克/体重、约100毫克/千克/体重、约200毫克/千克/体重、约350毫克/千克/体重、约500毫克/千克/体重,至约1000毫克/千克/体重或更多,及可以从其中衍生的任何范围。在本文列出的数量的衍生范围的非限制性的实例中,基于上述的数量,可施用约5毫克/千克/体重至约100毫克/千克/体重、约5微克/千克/体重至约500毫克/千克/体重等范围。

[0163] X. 组合治疗

[0164] 在某些实施方案中,本实施方案的组合物和方法涉及犬尿氨酸酶与第二种或另外的疗法的组合施用。此类疗法能够应用于治疗任何与犬尿氨酸酶依赖相关的疾病。例如,该疾病可以是癌症。

[0165] 该方法和组合物,包括组合物疗法,提高治疗或预防效果,和/或增加另一抗癌或抗过度增殖疗法的治疗效果。治疗性或预防性方法和组合物可以以有效实现所需效果(如杀死癌症细胞和/或抑制细胞过度增殖)的组合物提供。这一过程可以涉及施用犬尿氨酸酶和第二种疗法。该第二种疗法可以具有或不具有直接的细胞毒性作用。例如,该第二种疗法可以是上调免疫系统而没有直接细胞毒性作用的试剂。组织、肿瘤或细胞可被暴露于一种或多种包含一种或多种试剂(例如,犬尿氨酸酶或抗癌剂)的组合物或药物制剂中,或通过使该组织、肿瘤和/或细胞暴露于两种或多种不同的组合物或制剂中,其中一种组合物提供1) 犬尿氨酸酶,2) 抗癌剂,或3) 犬尿氨酸酶和抗癌剂。也预期的是,此类组合疗法能够与化学疗法、放射疗法、手术疗法或免疫疗法联合使用。

[0166] 当术语“接触的”和“暴露的”应用于细胞时,在本文中用于描述治疗性构建体和化

疗剂或放射治疗剂被递送到靶细胞或被置于与靶细胞直接邻近的过程。为了实现杀死细胞,例如,将两种药剂以有效去杀死细胞或预防其分裂的组合量递送到细胞。

[0167] 犬尿氨酸酶可以在相对于抗癌治疗之前、之间、之后,或以各种组合施用。施用可以有间隔,间隔范围从同时至数分至数天至数周。在实施方案中,在向患者单独提供该犬尿氨酸酶和抗癌药时,一般需要保证,在各自递送时间之间的显著周期不会超出,从而该两种化合物将仍然能够对患者发挥有利的组合作用。在此例子中,预期的是,可以在相互间隔约12至24或72h内,更特别地,在相互间隔约6-12h内给患者提供该犬尿氨酸酶和抗癌疗法。在一些情况下,可能需要显著延长用于治疗的时间周期,其中分别施用的间隔在几天(2、3、4、5、6,或7)至几周(1、2、3、4、5、6、7,或8)。

[0168] 在某些实施方案中,治疗的过程将会持续1-90天或更长(这一范围包括中断天数)。预期的是,一种试剂可以在1天至90天(这一范围包括中断天数)中任意一天或其任意组合施用,且另一种试剂在1天至90天(这一范围包括中断天数)中任意一天或其任意组合施用。在单日(24-小时周期)内,可以一次或多次对患者施用该试剂。此外,在治疗过程后,预期的是,存在这样的时间周期,在该期间不进行抗癌治疗。这一时间周期可以持续1-7天,和/或1-5周,和/或1-12月或更长(这一范围包括中断天数),其依赖于患者的条件,如预后、强度、健康等。期望的是,如果需要可以重复治疗周期。

[0169] 可以采用各种组合。对于以下的实例,犬尿氨酸酶是“A”且抗癌疗法是“B”。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0170] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0171] 本实施方案的任何化合物或疗法对患者施用,将遵循此类化合物施用的常规方案,考虑试剂的毒性(如果有的话)。因此,在一些实施方案中,有监测毒性的步骤,该毒性归因于组合疗法。

[0172] A. 化学疗法

[0173] 根据本实施方案,可以使用多种化疗剂。术语“化学疗法”是指药物治疗癌症的用途。“化疗剂”用于表示在癌症治疗中被施用的化合物或组合物。这些试剂或药物通过它们在细胞内的活性模式分类,例如,它们是否和在哪个阶段影响细胞周期。可选地,试剂可以基于其直接交联DNA、插入DNA,或通过影响核酸合成诱导染色体和有丝分裂畸变的能力进行表征。

[0174] 化疗剂的实例包括烷化剂类(如噻替派和环磷酰胺);烷基磺酸酯类(如白消安、英丙舒凡和噻消安);氮丙啶类(如苯佐替派、卡波醌,美妥替派和乌瑞替派);乙撑亚胺类和甲基蜜胺类(包括六甲密胺、三乙撑密胺、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine));多聚乙酰(尤其是布拉他辛和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成的类似物拓扑替康);苔藓抑素;卡利他汀(callystatin);CC-1065(包括它的阿多来新,卡折来新和比折来新合成类似物);念珠藻素类(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);尾海兔素;多卡霉素(包括合成的类似物、KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素;水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵素(spongistatin);氮芥类(如苯丁酸氮芥、氮芥、胆磷酰胺

(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲洛磷胺和尿嘧啶氮芥);亚硝基脲类(如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀);抗生素类(如烯二炔抗生素类(例如,卡里奇霉素,尤其是卡里奇霉素 γ 1I和卡里奇霉素 ω 1I));达内霉素(包括达内霉素A);二磷酸盐(如氯膦酸盐);埃斯培拉霉素;以及新制癌菌素发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素、安曲霉素(authrarnycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡拉比星(carabycin)、卡米诺霉素、嗜癌菌素、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氨基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星和去氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素(如丝裂霉素C)、麦考酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素类、培洛霉素、泊非霉素、嘌罗霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物类(如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU));叶酸类似物(如二甲叶酸、蝶罗呤、三甲曲沙);嘌呤类似物(如氟达拉滨、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤);嘧啶类似物(如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷);雄激素类(如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯);抗肾上腺素类(anti-adrenals)(如米托坦、曲洛司坦);叶酸补充剂(如亚叶酸(frolic acid));醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吡啶;阿莫司汀(bestrabucil);比生群;依达曲沙;地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺;亚丝醌;艾弗米辛(elformithine);依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;美登素类(maytansinoids)(如美登素和安丝菌素);米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇(mopidanmol);二胺硝吡啶(nitraerine);喷司他丁;苯来美特;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK多糖复合物;雷佐生;根霉素;西佐喃;锆螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯族毒素类(特别是T-2毒素、疣孢菌素A(verracurinA)、杆孢菌素A和蛇形菌素(anguidine));乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加西托星(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉烷类,例如,紫杉醇和多西他赛吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;巯嘌呤;铂配位复合物(如顺铂、奥沙利铂和卡铂);长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺消灵;替尼泊苷;依达曲沙;柔红霉素;氨基蝶呤;卡培他滨;伊班膦酸盐;伊立替康(例如,CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄醇,如维甲酸;卡培他滨;卡铂、甲苄肼、普卡霉素(plicomycin)、吉西他滨(gemcitabine)、诺维苯、法尼基蛋白-转移酶抑制剂,反铂(transplatinum)和以上任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0175] B. 放射疗法

[0176] 导致DNA损害和已广泛使用的其它因素包括通称为 γ -射线、X-射线和/或放射性同位素向肿瘤细胞的直接递送的那些。也预期了其它形式的DNA损害因素,如微波、质子束辐射(美国专利5,760,395和4,870,287)和UV辐射。更可能的是,所有这些因素对DNA、DNA的前体、DNA的复制和修复,和染色体装配和维持有广范的损害。X-射线的剂量范围从日常50至200伦琴的剂量(对于延长的时间周期(3到4周))至2000-6000伦琴的单剂量。放射性同位素的剂量范围变化很广,且依赖于同位素的半衰期、发射的辐射强度和类型,和增殖性细胞

的吸收。

[0177] C. 免疫疗法

[0178] 本领域技术人员将理解,免疫疗法可以与实施方案的方法组合或联合使用。在癌症治疗中,免疫疗法,一般依赖靶向且破坏癌症细胞的免疫效应子细胞和分子的使用。Rituximab(**RITUXAN®**)是这样一个实例。检验点抑制剂(如,例如ipilumimab)是另外一个这样的实例。免疫效应子可以是,例如,对在肿瘤细胞表面上的一些标记物特异性的抗体。该抗体可以单独用作疗法的效应子,或可以恢复其它细胞以实际影响细胞杀伤。该抗体也可以与药物或毒素(化疗、放射性核素、蓖麻毒素A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合且仅用作靶向剂。可选地,该效应子可以是这样的淋巴细胞,该淋巴细胞载有直接或间接与肿瘤细胞靶点相互作用的表面分子。各种效应子细胞包括细胞毒素T细胞和NK细胞。

[0179] 在免疫疗法的一个方面,该肿瘤细胞必须负载有一些适用于靶向的标记物,即,不存在于大多数的其它细胞中。在本实施方案的上下文中,存在许多肿瘤标记物且任何一种该肿瘤标记物可以适用于靶向。普通的肿瘤标记物包括CD20、癌胚抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-7、HMFG、唾液酸化路易斯抗原(Sialyl Lewis Antigen)、MucA、MucB、PLAP、层粘连蛋白受体、erb B,和p155。免疫疗法的另一方面是使抗癌效果和免疫刺激效果相结合。免疫刺激分子也是存在的,其包括:细胞因子,如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN;趋化因子,如MIP-1、MCP-1、IL-8,和生长因子,如FLT3配体。

[0180] 目前研究和使用的免疫疗法的实例是免疫佐剂,例如,牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、二硝基氯苯,和芳香化合物(美国专利5,801,005和5,739,169;Hui和Hashimoto,1998;Christodoulides等,1998);细胞因子治疗,例如,干扰素 α 、 β 和 γ 、IL-1、GM-CSF和TNF(Bukowski等,1998;Davidson等,1998;Hellstrand等,1998);基因疗法,例如,TNF、IL-1、IL-2,和p53(Qin等,1998;Austin-Ward和Villaseca,1998;美国专利5,830,880和5,846,945);和单克隆抗体,例如,抗-CD20、抗-神经节苷脂GM2,和抗-p185(Hollander,2012;Hanibuchi等,1998;美国专利5,824,311)。预期的是,一种或多种抗癌疗法可以与本文描述的抗体疗法一起使用。

[0181] D. 手术

[0182] 约60%患有癌症的人将经历某种类型的手术,包括预防性的、诊断的或分期的、治愈性的,和减轻的手术。治愈性手术包括切除术,其中全部或部分生癌组织被物理除去、切除,和/或破坏,且可以同其它疗法联合使用,如本实施方案的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法,和/或替代疗法。肿瘤切除术是指至少部分肿瘤的物理去除。除了肿瘤切除术,手术治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微控制(microscopically-controlled)手术(Mohs手术)。

[0183] 切除部分或全部生癌细胞、组织或肿瘤后,在体内会形成一个腔。通过灌注,直接注射或在该区域局部应用另外的抗癌疗法来完成治疗。此治疗可以重复,例如,每1、2、3、4、5、6或7天,或每1、2、3、4和5周,或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11,或12个月。这些治疗也可可为不同的剂量。

[0184] E. 其它试剂

[0185] 预期的是,其它试剂可以与本发明的某些方面组合使用,以改善治疗的治疗性效果。这些其它试剂包括影响细胞表面受体和GAP连接的上调的试剂,细胞抑制剂和分化试

剂,细胞粘附抑制剂或增加过度增殖细胞对细胞凋亡诱导剂敏感性的试剂,或其它生物试剂。通过升高GAP连接数目增加细胞间信号传导会提高对相邻过度增殖细胞群体的抗过度增殖效应。在其它实施方案中,细胞抑制剂或分化试剂可与本实施方案的某些方面组合使用以提高治疗的抗过度增殖效应。细胞粘附抑制剂被预期用于提高本实施方案的疗效。细胞粘附抑制剂的实例有粘着斑激酶 (FAKs) 抑制剂和洛伐他汀。进一步预期的是,增加过度增殖细胞对细胞凋亡的敏感性的其它试剂如抗体c225,可以与本实施方案的某些方面组合使用以提高疗效。

[0186] XI. 试剂盒

[0187] 本发明的某些方面可以提供试剂盒,如治疗性试剂盒。例如,试剂盒可以包括一种或多种如本文所述的药物组合物和任选地它们的使用说明书。试剂盒也可以包括一个或多个用于实现此组合物的施用的装置。例如,本发明试剂盒可以包括药物组合物和实现该组合物直接静脉内注射到生癌肿瘤的导管。在其它实施方案中,本发明试剂盒可包括犬尿氨酸酶的预填充安瓿,该犬尿氨酸酶任选地配制成药物或冻干的,以用于递送装置。

[0188] 试剂盒可以包括带标签的容器。合适的容器包括,例如,瓶、小瓶和试管。该容器可以由多种材料如玻璃或塑料制成。该容器可以盛放包含犬尿氨酸酶的组合物,该犬尿氨酸酶对治疗性或非治疗性应用是有效的,如上所述。容器上的标签可以表明,该组合物用于特异性疗法或非治疗性应用,且也可以表明体内或体外使用的用法说明书,如上所述。本发明的试剂盒将通常包括如上所述的容器和一个或多个包含从商业和使用者的立场方面所需的材料的其它容器,该材料包括缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器和带有使用说明书的包装说明书。

[0189] XII. 实施例

[0190] 包括以下实施例用于说明本发明的优选的实施方案。本领域的技术人员应当理解,以下实施例中公开的技术代表本发明人发现在本发明的实践中很好地起作用的技术,因此可被视为构成用于其实践的优选的模式。然而,根据本公开本领域技术人员应理解,可以对所公开的特定的实施方案进行改变,且仍然可以获得相似或类似的结果,而不会脱离本发明的精神和范围。

[0191] 实施例1—来自荧光假单胞菌的犬尿氨酸酶的基因构建、表达和纯化

[0192] 通过四个密码子优化的基因块的重叠延伸聚合酶链式反应 (PCR), 构建用于表达来自荧光假单胞菌的犬尿氨酸酶 (Pf-KYNU) 的基因, 该基因块是由DNA-Works软件 (Hoover和Lubkowski, 2002) 设计的。全长基因包含N-末端XbaI限制酶位点 (核苷酸1-6)、优化的核糖体结合位点 (RBS; 核苷酸29-55)、起始密码子 (核苷酸56-58)、N-末端His₆标签 (核苷酸59-91)、大肠杆菌密码子优化的Pf-KYNU基因 (核苷酸92-1336)、终止密码子 (核苷酸1337-1342), 和C-末端BamHI限制酶位点 (核苷酸1342-1347) (参见SEQ ID NO:1)。上述限制酶位点用于克隆已组装的基因至pET-28a+载体 (Novagen)。然后, 使用这一构建体转化用于表达的BL21 (DE3) 大肠杆菌。细胞在37℃下含50mg/L卡那霉素的TB培养基 (Terrific Broth) 中在210rpm振荡下生长。当通过添加IPTG (0.5mM最终浓度) 并在37℃下连续振荡过夜而达到OD₆₀₀~1.0时, 诱导表达。然后, 通过离心收获细胞, 且将该细胞重悬浮于由50mM磷酸钠 (pH7.4), 300mM NaCl, 0.5mM磷酸吡哆醛 (PLP), 1mM苯甲基磺酰氟和1μg/mL脱氧核糖核酸酶组成的裂解缓冲液中。通过弗氏压碎器 (French press) 实现裂解, 且在4℃下通过在20,

000x g下离心1h,清除裂解物中的微粒。然后,经由5 μ m注射器滤器过滤上清液,且将该上清液应用到Ni-NTA/琼脂糖柱(Qiagen),该柱已经在由50mM磷酸钠、300mM NaCl和0.1mM PLP组成的缓冲液(pH 7.4)中预平衡。将裂解物装载在该柱上,用5倍柱体积(CV)的50mM磷酸钠(pH 7.4)、300mM NaCl和带有30mM咪唑的0.1mM PLP冲洗树脂。接下来,设定流速以使用100CV的无内毒素PBS(Corning)缓冲液过夜缓慢冲洗该柱,该缓冲液具有0.1mMPLP和1%v/v **TRITON®** X114。这一过夜冲洗除去了脂多糖(LPS或内毒素),该脂多糖是典型的细菌表达体系的污染物。然后,在5CV的含有0.1mM PLP(含有250mM咪唑)的无内毒素的PBS中洗脱该冲洗过的酶,且再用5CV部分的无内毒素PBS(含0.1mM PLP)漂洗该树脂。此时,用缓冲液交换酶至新鲜PBS中,以除去咪唑,加入10%甘油且在液氮中快速冷却等分部分,保存在-80℃下。可选地,立刻用缓冲液交换酶至新制无菌100mM磷酸钠(pH8.4)中,以同时除去咪唑和制备用于PEG化的酶(参见,实施例4)。酶纯度通常为>95%,其基于SDS-PAGE分析和培养物的平均为大约75mg/L的典型产率。通过测量Abs_{280nm}和使用已计算的63,745M⁻¹cm⁻¹的酶消光系数评估蛋白的数量。

[0193] 实施例2—来自智人的犬尿氨酸酶的基因构建、表达和纯化

[0194] 通过四个密码子优化的基因块的重叠延伸聚合酶链式反应(PCR)获得用于表达来自智人的犬尿氨酸酶(h-KYNU)的基因,该基因块是由DNA-Works软件(Hoover和Lubkowski, 2002)设计的。全长基因包含N-末端XbaI限制酶位点(核苷酸1-6)、优化的RBS(核苷酸28-60)、起始密码子(核苷酸61-63)、N-末端His₆标签(核苷酸64-96)、大肠杆菌密码子优化的h-KYNU基因(核苷酸97-1488)、终止密码子(核苷酸1489-1491),和C-末端BamHI限制酶位点(核苷酸1492-1497)(参见SEQ ID NO:2)。上述限制酶位点用于克隆已装配的基因至pET-28a+载体(Novagen)。然后,使用这一构建体转化用于表达的BL21(DE3)大肠杆菌。细胞在37℃下含50mg/L卡那霉素的TB培养基(Terrific Broth)中在210rpm振荡下生长。当通过加入IPTG(0.5mM最终浓度)并在37℃下连续振荡过夜达到OD₆₀₀~1.0时,诱导表达。然后,通过离心收获细胞,且将该细胞重悬浮于由50mM磷酸钠(pH7.4),300mM NaCl,0.5mM磷酸吡哆醛(PLP),1mM苯甲基磺酰氟和1 μ g/mL脱氧核糖核酸酶组成的裂解缓冲液中。通过弗氏压碎器实现裂解,且其在4℃下通过在20,000x g下离心1h,清除裂解物中的微粒。然后,经由5 μ m注射器滤器过滤上清液,且将该上清液应用到Ni-NTA/琼脂糖柱(Qiagen),该柱已经在由50mM磷酸钠(pH 7.4)、300mM NaCl,和0.1mMPLP的缓冲液中预平衡。将裂解物装载在该柱后,用5倍柱体积(CV)的50mM磷酸钠(pH 7.4)、300mM NaCl和含有30mM咪唑的0.1mM PLP冲洗该树脂。接下来,设定流速以使用100CV的无内毒素PBS(Corning)缓冲液过夜缓慢冲洗该柱,该缓冲液含有0.1mM PLP和1%v/v **TRITON®** X114。这一过夜冲洗除去了脂多糖(LPS或内毒素),该脂多糖是酶细菌表达中的典型污染物。然后在5CV的含有0.1mM PLP(含有250mM咪唑)的无内毒素PBS中洗脱该冲洗过的酶,且再用5CV部分的无内毒素PBS(含0.1mM PLP)漂洗该树脂。此时,用缓冲液交换酶至新鲜PBS中,以除去咪唑,加入10%的甘油且在液氮中快速冷却等分部分,保存在-80℃下。可选地,可用缓冲液交换酶至新制无菌的100mM磷酸钠(pH8.4),以同时除去咪唑和制备用于PEG化的酶(参见,实施例4)。酶纯度通常为>95%,如通过SDS-PAGE分析和液体培养物的平均为大约20mg/L的典型产率所评估。通过测量Abs_{280nm}和使用已计算的76,040M⁻¹cm⁻¹的酶消光系数评估蛋白的数量。

[0195] 实施例3—来自小家鼠(Mus musculus)的犬尿氨酸酶的基因构建、表达和纯化

[0196] 通过三个密码子优化的基因块的重叠延伸聚合酶链式反应 (PCR) 获得用于表达来自小家鼠的犬尿氨酸酶 (m-KYNU) 的基因, 该基因块是由 DNA-Works 软件 (Hoover 等, 2002) 设计的。全长基因包含 N-末端 XbaI 限制酶位点 (核苷酸 1-6)、优化的 RBS (核苷酸 29-58)、起始密码子 (核苷酸 59-61)、N-末端 His₆ 标签 (核苷酸 62-94) 大肠杆菌密码子优化的 m-KYNU 基因 (核苷酸 95-1483)、终止密码子 (核苷酸 1484-1486), 和 C-末端 BamHI 限制酶位点 (核苷酸 1487-1492) (参见 SEQ ID NO:3)。上述限制酶位点用于克隆已装配的基因至 pET-28a+ 载体 (Novagen)。然后, 使用这一构建体转化用于表达的 BL21 (DE3) 大肠杆菌。细胞在 37℃ 下含 50mg/L 卡那霉素的 TB 培养基 (Terrific Broth) 中在 210rpm 振荡下生长。当通过加入 0.5mM IPTG 并在 37℃ 下连续过夜达到 OD₆₀₀ ~ 1.0 时, 诱导表达。通过离心收获细胞, 且将该细胞重悬浮于由 50mM 磷酸钠 (pH 7.4), 300mM NaCl, 0.5mM 磷酸吡哆醛 (PLP), 1mM 苯甲基磺酰氟和 1μg/mL 脱氧核糖核酸酶的裂解缓冲液中。通过弗氏压碎器实现裂解, 且通过在 4℃ 下在 20,000x g 下离心 1h, 清除裂解物中的微粒。然后, 经由 5μm 注射器过滤器过滤上清液, 且将该上清液应用到 Ni-NTA/琼脂糖柱 (Qiagen), 该柱已经在由 50mM 磷酸钠 (pH 7.4)、300mM NaCl, 和 0.1mM PLP 组成的缓冲液中预平衡。将裂解物装载在该柱后, 用 5 倍柱体积 (CV) 的 50mM 磷酸钠 (pH 7.4)、300mM NaCl 和含有 30mM 咪唑的 0.1mM PLP 冲洗该树脂。接下来, 设定流速以使用 100CV 的无内毒素 PBS (Corning) 缓冲液过夜缓慢冲洗该柱, 该缓冲液含有 0.1mM PLP 和 1% v/v TRITON® X114。这一过夜冲洗除去了脂多糖 (LPS 或内毒素), 该脂多糖是酶细菌表达中的典型污染物。在 5CV 的含有 0.1mM PLP (含有 250mM 咪唑) 的无内毒素 PBS 中洗脱该冲洗过的酶, 且再用 5CV 部分的无内毒素 PBS (含 0.1mM PLP) 漂洗该树脂。此时, 用缓冲液交换酶至新鲜 PBS 中, 以除去咪唑, 加入 10% 的甘油且在液氮中快速冷却等分部分, 保存在 -80℃ 下。

[0197] 实施例 4—来自荧光假单胞菌的犬尿氨酸酶的药物制剂

[0198] 为了提高酶的体内循环时间, 通过缀合于 PEG 使蛋白中的表面活性基团功能化, 增加了 KYNU 酶的流体动力学半径。在一个实施方案中, 通过表面赖氨酸残基与甲氧基 PEG 琥珀酰亚胺基碳酸酯 5000MW (NANOCs) 反应, 使 Pf-KYNU 功能化。彻底用缓冲液交换该纯化的无内毒素的酶至新鲜制备的 100mM 磷酸钠 (pH 8.4), 且浓缩至 10mg/mL。将所得溶液直接加入 100:1 摩尔过量的固体 PEG 试剂中, 且允许在室温下反应 1h (图 1)。通过在 100kDa 截流离心过滤装置 (AMICON®) 中彻底用缓冲液交换至新鲜的无内毒素 PBS 中, 将未反应的 PEG 从溶液中除去。然后在 PBS 中在尺寸排阻 HPLC 柱 (Phenomenex) 上检查该酶的表观分子质量。使用来自 BioRad 的 MW 标准溶液产生标准曲线和与该蛋白标准的保留时间相比的酶保留时间。基于该标准曲线, 非 PEG 化的酶具有 40kDa 的表观质量, 该表观质量接近一个 Pf-KYNU 单体的质量。观察到该酶的 PEG 化版本具有 1,300kDa 的表观质量, 即, 大幅度大于未改性的酶。使用 Chromo-LAL 动态显色内毒素试剂盒 (Associates of Cape Cod, Inc.) 定量内毒素的水平。通常, 用上述方式清洗的酶导致纯 Pf-KYNU 的 0.19 ± 0.07 EU/mg 的内毒素水平。

[0199] 实施例 5—来自智人的犬尿氨酸酶的药物制剂

[0200] 为了提高人类酶的体内循环停留时间, 通过缀合于 PEG 使蛋白中的表面活性基团功能化, 增加了 h-KYNU 酶的流体动力学半径。在一个实施方案中, 通过表面赖氨酸残基与甲氧基 PEG 琥珀酰亚胺基碳酸酯 5000MW (NANOCs) 的反应, 使 h-KYNU 功能化。彻底用缓冲液交换该纯化的无内毒素的酶至新鲜制备的 100mM 磷酸钠 (pH 8.4), 且浓缩至 10mg/mL。将所得溶液

直接加入100:1摩尔过量的固体PEG试剂中,且允许在室温下反应1h。通过在100kDa截流离心过滤装置(AMICON®)中彻底用缓冲液交换至新鲜的无内毒素的PBS中,将未反应的PEG从溶液中除去。然后使用PBS平衡的尺寸排阻HPLC柱(Phenomenex)和与MV标准溶液(BioRad)相比的保留时间,确定该酶的表现分子质量。使用Chromo-LAL动态显色内毒素试剂盒(Associates of Cape Cod, Inc.)定量内毒素水平。

[0201] 实施例6—测量犬尿氨酸酶的动力学参数的测定

[0202] 通过分光光度测定定量Pf-KYNU和h-KYNU以及如实施例4和5中所述的PEG化版本的动力学参数,其中作为时间的函数监测该酶底物L-犬尿氨酸的最大吸光度的衰减。在PBS缓冲液(pH7.4)中制备L-犬尿氨酸溶液,以使最终浓度在8 μ M-250 μ M的范围。L-犬尿氨酸具有4,500M⁻¹cm⁻¹的消光系数,在365nm处有 λ_{\max} ,而犬尿氨酸酶反应的产物(L-邻氨基苯甲酸和L-丙氨酸)在365nm处不会明显吸收。通过加入并快速混合酶溶液(~20nM最终)和底物溶液且通过测量一段时间的Abs_{365nm}监测25℃下底物KYN的损耗来开始反应。处理所获得的数据,且将该数据拟合到Michaelis-Menten方程用于测定动力学常数。以相同的方式测量PEG化Pf-KYNU酶的动力学。对于非PEG化的酶, $k_{\text{cat}}/K_M=1.0\times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,且对于PEG化的形式, $k_{\text{cat}}/K_M=1.3\times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。如在本文所述,也确定了3-羟基-L-犬尿喹啉酸的水解的动力学参数。

[0203] 实施例7—犬尿氨酸酶的体外稳定性

[0204] 为了测量Pf-KYNU的体外稳定性,将该酶加入到PBS缓冲液或混合人类血清,至10 μ M的最终浓度,且在37℃下培养。在时间点处各自取出10 μ L的部分,且将其加入到990 μ L的L-犬尿氨酸/PBS的250 μ M溶液中。如实施例3中所述,通过在365nm处测量一段时间内吸光度的衰减监测反应的最初速率。通过比较在每个时间点处L-犬尿氨酸酶催化的初始速率并比较其与时间=0处的速率,确定酶稳定性。将所得数据绘制为%活性对时间,且拟合为指数方程,以确定半衰期($T_{1/2}$)。发现该Pf-KYNU酶在PBS中具有 $T_{1/2}=34.3\text{h}$ 且在混合人类血清中具有 $T_{1/2}=2.4\text{h}$ (图2)。

[0205] 实施例8—定量体内犬尿氨酸和色氨酸水平的测定

[0206] 通过HPLC定量和监测L-犬尿氨酸、色氨酸、犬尿喹啉酸(kynureninic acid)、3-羟基-L-犬尿氨酸和L-邻氨基苯甲酸(L-anthranilic acid)的体内水平(犬尿氨酸酶催化产物中的一种)。在小鼠尸检后,除去血液、肿瘤、脾、肝样品。将血液样品离心以从血清中分离全血。首先将组织样品均质化,然后离心以除去固体部分。将1:10v/v部分的100%三氟乙酸加入到每一液体部分,以沉降大分子。通过离心,再次除去固体,且使上清液通过0.45 μ m注射器滤器。直接对处理的上清液应用HPLC(Shimadzu),且使用梯度(从0%的溶液B至100%的溶液B,其中溶液A是H₂O+0.1%三氟乙酸且溶液B是乙腈+0.1%三氟乙酸)将该处理的上清液在标准分析C-18柱上分离。连续收集从190nm至900nm的全吸光度范围以监测所有可能的分子,且同时收集荧光光谱($E_x=365\text{nm}$, $E_m=480\text{nm}$)以特异性监测犬尿氨酸水平。使用由纯分子(Sigma)制得的标准溶液确定浓度和保留时间。

[0207] 实施例9—PEG-Pf-KYNU在自源B16小鼠黑色素瘤模型中的疗效

[0208] 将B6-WT小鼠(n=20)各自使用 2.5×10^5 个B16小鼠黑色素瘤细胞通过皮下侧腹注射孵育。在允许肿瘤形成10天(肿瘤平均=20mm²)后,将小鼠分成两组,每组n=10。然后使用20mg/kg的热灭活PEG-Pf-KYNU每三天瘤内注射治疗对照组,直到肿瘤尺寸增加到

350mm²。通过同样的方式(不同的是每三天瘤内注射20mg/kg的活性PEG-Pf-KYNU)治疗实验组,直到肿瘤尺寸增加到350mm²的端点。与导致明显寿命延长的同样治疗的热灭活PEG-Pf-KYNU组(图3)相比,在施用活性PEG-Pf-KYNU的治疗组中,B16黑色素瘤肿瘤的生长速率明显被限制(图4)。使用抗体小组(即,抗CD45、CD4、Nk1.1、CD25、FoxP3、CD8、颗粒酶B、IFN γ 、CTLA4、CD11c、CD11b、F4/80、GR-1和Ly6-C)评估从对照和实验治疗组中分离的淋巴球,表明循环CD4+CD25+FoxP3+调节T-细胞的群体在使用活性PEG-Pf-KYNU(4.8 \pm 0.8%对8.6 \pm 0.8%)治疗的组中明显较低。另外,肿瘤浸润CD8+T-细胞表达颗粒酶B和干扰素 γ 的群体在使用活性酶(26 \pm 19%对4 \pm 2%)治疗的小鼠中明显较高。(图5A-B)

[0209] 实施例10—用于肿瘤靶向的犬尿氨酸酶-scFv融合蛋白

[0210] 在一些方面,本发明也预期了这样的多肽,其包含连接于同种异体氨基酸序列的改性细菌犬尿氨酸酶或哺乳动物犬尿氨酸酶。例如,天然或改性犬尿氨酸酶可以连接至单链可变片段(scFv)抗体,该抗体结合特异性细胞表面肿瘤抗原。在这一实施方案中,含有对已知的肿瘤抗原(优选为在较低速率下内在化的肿瘤特异性抗原,例如,MUC-1)具有特异性亲和力的该蛋白的scFv部分的scFv-犬尿氨酸酶融合蛋白,将允许将该融合蛋白的犬尿氨酸酶部分递送到肿瘤细胞并降解KYN。一个实施例将是scFv-犬尿氨酸酶融合蛋白,其中该scFv蛋白靶向并结合到人类表皮生长因子受体2(HER2),该人类表皮生长因子受体2在某些类型的乳腺癌中是上调的。

[0211] 在这一实施方案中,天然或改性犬尿氨酸酶-抗-HER2-scFv融合蛋白将起作用以靶向并直接将犬尿氨酸酶集中到该肿瘤表面且起作用以降解肿瘤产生的KYN。

[0212] 实施例11—犬尿氨酸酶-抗-CTLA4-scFv融合蛋白

[0213] 在一些方面,本发明也预期了这样的多肽,其包含连接于同种异体氨基酸序列的改性细菌犬尿氨酸酶或哺乳动物犬尿氨酸酶。例如,该天然或改性犬尿氨酸酶可以连接于单链可变片段(scFv)抗体,该抗体结合细胞毒性T-淋巴细胞抗原4(CTLA-4)抗体、程序性细胞死亡1(PD-1)或程序性细胞死亡配体1(PD-L1)。拮抗抗体或抗体片段对CTLA-4、PD-1或PD-L1的阻断允许抑制T-细胞信号被逆转,允许CD28刺激T-细胞激活。在这一实施方案中,天然或改性犬尿氨酸酶-抗-CTLA4-、抗-PD-1-或抗-PD-L1-scFv融合蛋白将起作用以同时除去抑制蛋白:蛋白相互作用信号传导和抑制犬尿氨酸信号传导。天然或改性犬尿氨酸酶-scFv融合蛋白的这一实施方案将被期望以有力地上调T-细胞激活并促进强抗-肿瘤应答。

[0214] 实施例12—将犬尿氨酸酶递送至T细胞的嵌合抗原受体的构建体

[0215] 在一些方面,本发明也预期了一种慢病毒载体,其适用于含有嵌合抗原受体(CAR)构建体的T细胞的转染,从而除了该CAR构建体之外,改性细菌犬尿氨酸酶或哺乳动物犬尿氨酸酶将是共表达的。CAR构建体是包含融合于CD3- ζ 链的跨膜和胞质信号传导域的胞外抗原结合域的蛋白且经常是CD28分子(Ahmed等,2010)。该抗原结合域可以是设计用于结合肿瘤细胞表达的抗原的scFv,该抗原实例为胶质母细胞瘤或骨肉瘤表达的HER2、各种B-细胞恶性肿瘤表达的CD19或CD20,或成神经细胞瘤表达的GD2(Lipowska-Bhalla等,2012)或任何其它相关靶标。在这一实施方案中,该慢病毒载体(递送合适的CAR构建体至T细胞)将另外共表达胞液中的天然或改性细菌或哺乳动物犬尿氨酸酶。包含该CAR/犬尿氨酸酶构建体的该T细胞将具有双重能力,1)结合到特异性肿瘤细胞和2)降解KYN,以预防调节显型和或细胞凋亡的KYN诱导。在另一个实施方案中,T细胞将表达CAR构建体,该构建体结合CD19+或

CD20+弥漫性大B细胞淋巴瘤,同时共表达犬尿氨酸酶以降解高浓度的KYN,该高浓度的KYN通常由这一肿瘤类型产生(Yoshikawa等,2010;de Jong等,2011;Yao等,2011)。

[0216] 实施例13—用于犬尿氨酸酶活性的遗传选择

[0217] 氨基酸L-色氨酸(L-Trp)通过trp生物合成基因的表达由戊糖衍生前体、分支酸酯合成。在细菌如大肠杆菌中trp生物合成基因设置于由五个基因trpE、trpD、trpC、trpB和trpA组成的操纵子中。该TrpE和TrpD蛋白是邻氨基苯甲酸盐合酶复合物的组分,该复合物在分支酸酯和L-谷氨酰胺转化为邻氨基苯甲酸和L-谷氨酸酯中催化第一步。通过TrpC、TrpA和TrpB的作用,邻氨基苯甲酸然后接着转化为L-Trp。缺少功能化的邻氨基苯甲酸酯合酶基因的细胞对于L-Trp是营养缺陷的,且不能在不含色氨酸的基本培养基中生长。本发明人推测由于犬尿氨酸能够被运输至许多生物体的胞液中,所以表达显示充分高催化活性的重组L-犬尿氨酸酶的细胞,应该能够将胞质L-犬尿氨酸转化为邻氨基苯甲酸,且后者接着能够合成L-Trp。与之相反,不表达该酶或表达具有低催化活性的变体的细胞,在含有L-犬尿氨酸的基本培养基上应该分别显示没有生长或很慢的生长。

[0218] 大肠杆菌trpE和trpD缺失突变体从Genetic Resources at Yale CGSC中获得。菌株基因型分别是(F⁻, Δ (araD-araB) 567, Δ lacZ4787 (::rrnB-3), λ⁻, Δ trpE772::kan, rph-1, Δ (rhaD-rhaB) 568, hsdR514)和(F⁻, Δ (araD-araB) 567, Δ lacZ4787 (::rrnB-3), λ⁻, Δ trpD771::kan, rph-1, Δ (rhaD-rhaB) 568, hsdR514)。将细胞铺在M9基本培养基板上。在L-Trp、L-Kyn、邻氨基苯甲酸或缓冲液中任一者中浸湿滤纸盘,然后安置在板上,随后在37°C下培养。大肠杆菌-Δ trpD细胞仅在L-Trp存在下生长,然而大肠杆菌-Δ trpE也可以在邻氨基苯甲酸存在下生长,但在缓冲液或L-Kyn存在下不行,表明trpC、trpA和trpB被表达以允许拯救L-Trp营养缺陷型,其中邻氨基苯甲酸作为中间代谢产物(图6)。而且,携带Pf-KYNU基因的质粒转化的大肠杆菌-Δ trpE细胞在L-Kyn的存在下强有力地能在M9基本培养基板上生长。

[0219] 实施例14—细菌犬尿氨酸酶(显示对犬尿氨酸的高催化活性和与人类犬尿氨酸酶的同源性)的基因构建、表达和纯化

[0220] 类似于其它真核犬尿氨酸酶,该智人酶对3'-OH犬尿氨酸的水解是高选择性的,且对犬尿氨酸具有低约1,000倍的催化活性。由于其对犬尿氨酸的弱催化活性,该人类酶不适合治疗目的。PEG化Pf-KYNU(实施例9)、Mu-KYNU(实施例22和实施例23)或Cp-KYNU(实施例17)(所有这些对犬尿氨酸,而非3'-OH犬尿氨酸,显示高催化活性)的施用导致肿瘤生长阻滞,如实施例9所示(图3)。然而,PEG化人类犬尿氨酸酶的施用在类似或较高剂量下对B16黑色素瘤肿瘤的生长没有影响(n=4)。然而,如实施例20所示,h-KYNU的工程学能够提高该人类酶的L-犬尿氨酸降解活性。此工程化的h-KYNU变体可以导致肿瘤生长阻滞,如PEG化Pf-KYNU(实施例9)、Mu-KYNU(实施例22和实施例23)和Cp-KYNU(实施例17)所见的。

[0221] 该Pf-KYNU对其人类对应物显示低的序列同一性(24%的氨基酸同一性)。由于其与该人类蛋白的低序列同一性,Pf-KYNU可以引起患者的不良免疫应答以及中和抗体的产生。因此,重要的是,发现对犬尿氨酸显示高催化活性和选择性且与智人犬尿氨酸酶具有较高度氨基酸同一性的犬尿氨酸酶。本发明人鉴定了许多显示与智人犬尿氨酸酶>38%的氨基酸同一性且还具有高犬尿氨酸水解活性的细菌酶。这些酶的序列提供为SEQ ID NO: 13-52。这些酶与智人犬尿氨酸酶相比的百分比同一性提供于表1中。作为代表性的实施例,

通过二个密码子优化的基因块的重叠延伸聚合酶链式反应 (PCR), 构建用于表达来自梭状冻胶样杆菌 (Mu-KYNU) (SEQ ID NO:33) 的犬尿氨酸酶, 该基因块是由 DNA-Works 软件 (Hoover 和 Lubkowski, 2002) 设计的。全长基因包含 N-末端 NcoI 限制酶位点、优化的 RBS、N-末端 His₆ 标签、大肠杆菌密码子优化的 Mu-KYNU 基因、终止密码子和 C-末端 EcoRI 限制酶位点。上述限制酶位点用于克隆已装配的基因至 pET-28a+ 载体 (Novagen)。然后使用这一构建体转化用于表达的 BL21 (DE3) 大肠杆菌。细胞在 37℃ 下含 50mg/L 卡那霉素的 TB 培养基 (Terrific Broth) 中在 210rpm 振荡下生长。当通过加入 IPTG (0.5mM 最终浓度) 并在 37℃ 下连续振荡过夜达到 OD₆₀₀ ~ 1.0 时, 诱导表达。然后通过离心收获细胞, 且将该细胞重悬浮于由 50mM 磷酸钠 (pH7.4), 300mM NaCl, 0.5mM 磷酸吡哆醛 (PLP), 1mM 苯甲基磺酰氟和 1μg/mL 脱氧核糖核酸酶组成的裂解缓冲液中。通过弗氏压碎器实现裂解, 且通过在 4℃ 下在 20,000xg 下离心 1h, 清除裂解物中的微粒。然后, 经由 5μm 注射器滤器过滤上清液, 且将该上清液应用到 Ni-NTA/琼脂糖柱 (Qiagen), 该柱已经在由 50mM 磷酸钠 (pH7.4)、300mM NaCl, 和 0.1mM PLP 组成的缓冲液中预平衡。将裂解物装载在该柱后, 用 5 倍柱体积 (CV) 的 50mM 磷酸钠 (pH 7.4), 300mM NaCl 和含有 30mM 咪唑的 0.1mM PLP 冲洗该树脂。然后在 5CV 的含有 0.1mM PLP (含有 250mM 咪唑) 的 PBS 中洗脱该冲洗过的酶。此时, 用缓冲液交换酶至新鲜 PBS 中, 以除去咪唑, 加入 10% 甘油且在液氮中快速冷却等分部分, 保存在 -80℃ 下。酶纯度通常为 >95%, 其基于 SDS-PAGE 分析和培养物的平均为大约 75mg/L 的典型产率。通过测定 Abs_{280nm} 和使用已计算的 78,185M⁻¹cm⁻¹ 的酶消光系数评估蛋白的数量。

[0222] 表1. 与智人犬尿氨酸酶相比的真细菌犬尿氨酸酶的百分比同一性

[0223]

种类	SEQ ID NO	%同一性
<i>Arenitalea lutea</i>	13	44.1
<i>Belliella baltica</i> DSM 15883	14	43.3
<i>Bizionia argentinensis</i>	15	42.9
<i>Candidatus Entothionella</i> sp.TSY2	16	44.9
<i>Candidatus Koribacter versatilis</i> Ellin345	17	43.3
<i>Cecembia lonarensis</i>	18	45.1
兽类衣原体 (<i>Chlamydia pecorum</i>) PV3056/3	19	38.2
<i>Chlamydophila caviae</i> GPIC	20	40.8
(珊瑚状珊瑚球菌) <i>Corallococcus coralloides</i> DSM 2259	21	43
<i>Cyclobacterium marinum</i> DSM 74	22	44.5
<i>Cystobacter fuscus</i>	23	43.5
<i>Echinicola vietnamensis</i> DSM 17526	24	44.5
(黄杆菌) <i>Flavobacterium bacterium</i> BBFL7	25	43.4
<i>Flexibacter litoralis</i> DSM 6794	26	47.5
<i>Formosa</i> sp.AK20	27	45.7
<i>Fulvivirga imtechensis</i>	28	47.1
<i>Kangiella aquimarina</i>	29	44.1
<i>Kangiella koreensis</i> DSM 16069	30	44.3
<i>Lacinutrix</i> sp.5H-3-7-4	31	44.2
<i>Mariniradius saccharolyticus</i>	32	44.5

Mucilaginibacter paludis	33	43.9
(拟香味类香味菌) Myroides odoratimimus	34	42.2
(橙色粘球菌) Myxococcus fulvus HW-1	35	44.5
Myxococcus stipitatus DSM 14675	36	44.4
(黄色黏球菌) Myxococcus xanthus DK 1622	37	45.1
Nafulsella turpanensis	38	48.2
Niastella koreensis GR20-10	39	44.8
Nonlabens dokdonensis DSW-6	40	44
Pedobacter agri	41	44.1
Pedobacter sp.BAL39	42	42.1
Pedobacter sp.V48	43	44.1
Rhodonellum psychrophilum	44	45.4
Salinispora arenicola	45	39.1
Saprospira grandis str.Lewin	46	43.2
(橙色标桩菌) Stigmatella aurantiaca DW4/3-1	47	42.5
(地毯草黄单孢菌) Xanthomonas axonopodis	48	42
Psychroflexus gondwanensis	49	44
Lewinella cohaerens	50	45.6
Lewinella persica	51	44.9
Pontibacter roseus	52	44.8

[0224] 实施例15—梭状冻胶样杆菌犬尿氨酸酶 (Mu-KYNU) 的动力学参数

[0225] 通过分光光度测定定量Mu-KYNU的动力学参数,其中作为时间的函数监测该酶底物L-犬尿氨酸的最大吸光度的衰减。在PBS缓冲液 (pH7.4) 中制备L-犬尿氨酸溶液,以使最终浓度在16 μ M至500 μ MM的范围。L-犬尿氨酸具有4,500M⁻¹cm⁻¹的消光系数,在365nm处具有 λ_{max} ,而犬尿氨酸酶反应的产物 (L-邻氨基苯甲酸和L-丙氨酸) 在365nm处不会明显吸收。通过加入并快速混合酶溶液 (~20nM最终浓度) 和底物溶液且通过测量一段时间内的Abs_{365nm}监测在25℃下底物的损耗开始反应。处理所得数据,且将该数据拟合到Michaelis-Menten方程,用于确定动力学常数。确定Mu-KYNU具有 $k_{cat}/K_M=1.2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 。

[0226] 实施例16—梭状冻胶样杆菌犬尿氨酸酶 (Mu-KYNU) 的体外稳定性

[0227] 为了测量Mu-KYNU的体外稳定性,将该酶加入到PBS缓冲液或混合人类血清,至10 μ M的最终浓度,且在37℃下培养。在时间点处各自取出10 μ L的部分,且将其加入到990 μ L的L-犬尿氨酸/PBS的250 μ M溶液中。如实施例3中所述,通过在365nm处测量一段时间内吸光度的衰减,监测反应的最初速率。通过比较在每个时间点处L-犬尿氨酸酶催化的初始速率和比较其与时间=0处的速率,测定酶稳定性。将所得数据绘制为百分比活性对时间,且拟合为双相衰减模型 (Stone等,2010) 以确定半衰期 ($T_{1/2}$)。发现PBS中Mu-KYNU酶的活性在74%保留活性幅度时具有 $^1T_{1/2}=6h$,且随后 $^2T_{1/2}=150h$ (图7)。确定混合人类血清的Mu-KYNU酶的稳定性在30%保留活性幅度时具有 $^1T_{1/2}=5h$,且随后 $^2T_{1/2}=73h$ (图7)。

[0228] 实施例17—来自兽类嗜衣原体 (Chlamydophila pecorum) 的犬尿氨酸酶的基因构建、表达和纯化

[0229] 使用大肠杆菌-密码子优化的基因块合成用于表达来自兽类嗜衣原体的犬尿氨酸

酶(Cp-KYNU)的基因。全长基因包含N-末端NcoI限制酶位点(核苷酸1-6)、起始密码子(核苷酸3-5)、N-末端His₆标签(核苷酸6-35)、大肠杆菌密码子优化的Cp-KYNU基因(核苷酸36-1295)、终止密码子(核苷酸1296-1298)和C-末端EcoRI限制酶位点(核苷酸1299-1304)(参见SEQ ID NO:53)。上述限制酶位点用于克隆已装配的基因至pET-28a+载体(Novagen)。然后使用这一构建体转化用于表达的BL21(DE3)大肠杆菌。细胞在37℃下含50mg/L卡那霉素的TB培养基(Terrific Broth)中在210rpm振荡下生长。当通过加入IPTG(0.5mM最终浓度)并在16℃下连续振荡过夜达到OD₆₀₀~1.0时,诱导表达。然后,通过离心收获细胞,且将该细胞重悬浮于由50mM磷酸钠(pH7.4),300mM NaCl,0.5mM磷酸吡哆醛(PLP),1mM苯甲基磺酰氟和1μg/mL脱氧核糖核酸酶组成的裂解缓冲液中。通过弗氏压碎器实现裂解,且通过在4℃下在20,000x g下离心1h,清除裂解物中的微粒。然后,经由5μm注射器过滤器过滤上清液,且将该上清液应用到Ni-NTA/琼脂糖柱(Qiagen),该柱已经在由50mM磷酸钠(pH7.4)、300mM NaCl和0.1mM PLP组成的缓冲液中预平衡。将裂解物装载在该柱后,用10倍柱体积(CV)的50mM的磷酸钠(pH 7.4)、300mM NaCl和含有30mM咪唑的0.1mM PLP冲洗该树脂。然后,用5CV的包含0.1mM PLP和250mM咪唑的PBS洗脱该冲洗过的酶。用缓冲液交换该洗脱的酶至新鲜PBS中,以除去咪唑,加入10%甘油,且在液氮中快速冷却等分部分,保存在-80℃下。

[0230] 实施例18—兽类嗜衣原体犬尿氨酸酶(Cp-KYNU)的动力学参数

[0231] 通过分光光度测定定量Cp-KYNU(SEQ ID NO:57)的动力学参数,其中作为时间的函数监测该酶底物L-犬尿氨酸最大吸光度的衰减。在PBS缓冲液(pH7.4)中制备L-犬尿氨酸溶液,以使最终浓度在16μM-500μM的范围。L-犬尿氨酸具有4,500M⁻¹cm⁻¹的消光系数,在365nm处具有λ_{max},而犬尿氨酸酶反应的产物(邻氨基苯甲酸盐和L-丙氨酸)在365nm处不会明显吸收。通过加入并快速混合酶溶液(200nM最终浓度)和底物溶液且通过测量一段时间内的Abs_{365nm}监测在25℃下底物的损耗开始反应。处理所得数据,且将该数据拟合Michaelis-Menten方程,用于测定动力学常数。确定Cp-KYNU具有k_{cat}/K_M=3×10⁴M⁻¹s⁻¹。

[0232] 实施例19—来自梭状冻胶样杆菌的犬尿氨酸酶的药物制剂

[0233] 为了提高酶的体内循环时间,通过缀合于PEG使蛋白中的表面活性基团功能化,增加了Mu-KYNU的流体动力学半径。在一个实施方案中,通过表面赖氨酸残基与甲氧基PEG琥珀酰亚胺基碳酸酯5000MW(NANOCs)的反应,使Mu-KYNU PEG化。确定纯化的Mu-KYNU包含如下所述的很低的内毒素水平(<20EU/mg)。彻底将其用缓冲液交换至新鲜制备的100mM磷酸钠缓冲液(pH8.4)且浓缩至大于1mg/mL。将所得溶液直接加入100:1摩尔过量的固体PEG试剂中,且允许其在室温下搅拌反应1h。通过在100kDa截流离心过滤装置(Amicon)中彻底用缓冲液交换至新鲜的无内毒素的PBS中,将未反应的PEG从溶液中除去。然后,使用来自BioRad的MW标准溶液在PBS中在尺寸排阻HPLC柱(Phenomenex)上检查该酶的表现分子量,以产生标准曲线,且比较酶的保留时间与蛋白标准的保留时间。使用Chromo-LAL动态显色内毒素试剂盒(Associates of Cape Cod, Inc.)定量内毒素水平。

[0234] 实施例20—在工程人类犬尿氨酸酶变体中增强的L-犬尿氨酸降解

[0235] 该h-KYNU酶对3'-OH犬尿氨酸的水解是高选择性的,且对L-犬尿氨酸具有低约1,000倍的催化活性。由于其对L-犬尿氨酸的弱催化活性,该野生型人类酶不适合治疗性目的。对于h-KYNU的工程改进L-犬尿氨酸降解活性,使用h-KYNU基因和一对设计用于引入氨基酸F306对应的密码子的变体的寡核苷酸,通过重叠延伸聚合酶链式反应(PCR),构建饱和

突变形成文库。F306位于h-KYNU的活性位点内,其中其在底物结合中表现重要作用。使用实施例6的微量滴定板犬尿氨酸测定筛选该F306饱和文库的活性。多于12个克隆已经显示与野生型h-KYNU相比明显较高的活性,且被选择出来进一步分析。这些克隆的测序表明在位置F306处的两个氨基酸取代导致增强的L-犬尿氨酸降解活性,也就是h-KYNU-F306M (SEQ ID NO:55) 和h-KYNU-F306L (SEQ ID NO:56)。然后,纯化这些变体至同质,且对于h-KYNU-F306M和h-KYNU-F306L,与野生型h-KYNU比较,具体的动力学在对于L-犬尿氨酸的 k_{cat}/K_M 中分别显示2倍和5倍的增加。

[0236] 实施例21—Pf-KYNU、抗-PD1和抗-CTLA-4疗法在同种自体B16小鼠黑色素瘤模型中的比较

[0237] 在B16黑色素瘤小鼠模型中,与抗-PD1 (克隆RMP1-14, BioXCell#BE0146) 或抗CTLA-4 (克隆UC10-4F10-11, BioXCell#BE0032) 免疫检验点抑制剂抗体并排比较,评估该PEG化荧光假单胞菌犬尿氨酸酶 (PEG-Pf-KYNU)。50000个B16细胞在C57BL/6J小鼠的侧腹灌输 (第0天,每一组n=8只小鼠)。一旦产生明显的肿瘤 (第10天),则使用250 μ g抗-PD1, 100 μ g抗-CTLA-4 (200 μ g第一剂,根据Holmgaard等 (2013)) 或 (图8) 所示时间处的500 μ g PEG-Pf-KYNU治疗该动物。热灭活PEG-Pf-KYNU用作对照。施用PEG-Pf-KYNU导致明显肿瘤生长阻滞和存活延长,其方式与使用对于PEG-Pf-KYNU的抗-PD1或抗-CTLA-4检验点抑制剂抗体 (图8) 相对于只使用灭活酶或PBS观察到的结果难以区分开。

[0238] 实施例22—Mu-KYNU或Pf-KYNU和抗-PD1的组合疗法在同种自体B16小鼠黑色素瘤模型中的疗效

[0239] 结合抗PD1免疫检验点抑制剂抗体,评估在B16黑色素瘤同种异体移植中的PEG化的酶 (PEG-Pf-KYNU和PEG-Mu-KYNU) (Curran等, 2010)。用50,000个B16细胞灌输四组C57BL/6J小鼠 (每组10只) (第0天),且允许肿瘤产生。一旦产生明显的肿瘤 (第10天),则在第10、13和16天通过IP注射用250 μ g抗-PD1 (克隆RMP1-14, BioXCell#BE0146) 或在肿瘤位点附近皮下用或不用500 μ g PEG-Pf-KYNU或500 μ g PEG-Mu-KYNU,治疗该动物。小鼠在第10天至25天之间接收了总共6剂KYNU。给一组腹腔注射PBS作为PD-1的对照。与PBS对照对比,肿瘤生长被严重削弱或甚至在所有治疗上肢中逆转 (图9A)。重要地,抗-PD1与KYNU组合使用,观察到加性效应,导致使用PEG-Pf-KYNU/抗-PD1治疗的60%的该肿瘤的完全缓解和使用PEG-Mu-KYNU/抗-PD1治疗的20%的该肿瘤的完全缓解 (图9B)。相应的Kaplan-Meier曲线提供于图9C中。

[0240] 实施例23—PEG-Mu-KYNU疗法在同种自体B16小鼠黑色素瘤模型中的疗效

[0241] 在B16黑色素瘤小鼠模型中评估PEG化的梭状冻胶样杆菌犬尿氨酸酶 (PEG-Mu-KYNU)。通过在C57BL/6J小鼠的侧腹灌输50,000个B16细胞,开始同种异体移植 (第0天,每一组n=9只小鼠)。一旦产生明显的肿瘤 (第10天),则用500 μ g PEG-Mu-KYNU通过在肿瘤位点附近每3天皮下注射总共6剂治疗该动物。使用热灭活PEG-Mu-KYNU的相同治疗方案用作对照。与热灭活PEG-Mu-KYNU对照的22天相比 (图10B),施用PEG-Mu-KYNU导致肿瘤生长阻滞,延长平均存活时间25天 (图10A)。

[0242] * * *

[0243] 根据本公开,完全可以制备并实施在此公开并要求保护的所有方法,而无须进一步实验。虽然已经就优选的实施方案描述本发明的组合物和方法,但是对本领域的技术人

员来说,显而易见的是,在不偏离本发明的观点、精神和范围的情况下可以对本文所述的方法及方法的各个步骤或方法的各个步骤间的顺序作出改变。更特别地,显而易见的是,化学上和生理上都相关的某些试剂可以取代在本文中所述的试剂,而可以达到相同或相似的结果。所有此类对于本领域技术人员而言显而易见的类似取代和修改被认为落入由所附的权利要求定义的本发明的精神、范围和观点之中。

[0244] 参考文献

[0245] 以下参考文献为本文所述的内容提供了示范性操作或其它详细补充,通过引用明确并入本文。

[0246] 美国专利号4,870,287

[0247] 美国专利号5,739,169

[0248] 美国专利号5,760,395

[0249] 美国专利号5,801,005

[0250] 美国专利号5,824,311

[0251] 美国专利号5,830,880

[0252] 美国专利号5,846,945

[0253] 美国专利号5,889,155

[0254] 美国专利号7,109,304

[0255] 美国专利号8,465,743

[0256] 美国专利公开2009/0304666

[0257] WO 2012/031744

[0258] WO 2012/079000

[0259] WO 2013/059593

[0260] Ahmed et al.,HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors.Clinical Cancer Research,16(2):474-485,2010.

[0261] Austin-Ward and Villaseca,Revista Medica de Chile,126(7):838-845,1998.

[0262] Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y.,1994.

[0263] Bukowski et al.,Clinical Cancer Res.,4(10):2337-2347,1998.

[0264] Chen and Guillemin,Kynurenine pathway metabolites in humans:disease and healthy States.Int J Tryptophan Res,2:1-19,2009.

[0265] Christodoulides et al.,Microbiology,144(Pt 11):3027-3037,1998.

[0266] Curran et al.,PD-1and CTLA-4combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16melanoma tumors.Proceedings of the National Academy of Sciences,107:4275-4280,2010.

[0267] Davidson et al.,J.Immunother.,21(5):389-398,1998.

[0268] de Jong et al.,Serum tryptophan and kynurenine concentrations as parameters for indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with

endometrial, ovarian, and vulvar cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 21 (7) :1320-1327, 2011.

[0269] Della Chiesa et al., The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood*, 108 (13) :4118-4125, 2006.

[0270] Godin-Ethier et al., Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Human Cancers: Clinical and Immunologic Perspectives. *Clinical Cancer Research*, 17 (22) :6985-6991, 2011.

[0271] Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78 (4) :480-485, 1998.

[0272] Harkki et al., *BioTechnology*, 7:596-603, 1989.

[0273] Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37 (4) :347-353, 1998.

[0274] Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.

[0275] Holmgaard et al., Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *The Journal of Experimental Medicine*, 210:1389-1402, 2013.

[0276] Hoover and Lubkowski, DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Research*, 30 (10) : e43-e43, 2002.

[0277] Hopwood et al., In: *Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*, The John Innes Foundation, Norwich, Conn., 1985.

[0278] Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66 (11) :5329-5336, 1998.

[0279] Ito et al., *J. Biochem.*, 79:1263, 1976.

[0280] Kaper et al., Nanosensor detection of an immunoregulatory tryptophan influx/kynurenine efflux cycle. *PLoS Biology*, 5 (10) :e257, 2007.

[0281] Lipowska-Bhalla et al., Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 61 (7) :953-962, 2012.

[0282] Lob et al., Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer*, 9 (6) :445-452, 2009.

[0283] Lordanescu, *J. Bacteriol*, 12:597-601, 1975.

[0284] Mandi and Vecsei, The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm*, 119 (2) :197-209, 2012.

[0285] Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.

[0286] Mellor et al., *Gene*, 24:1-14, 1983.

[0287] Mezrich et al., An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 185 (6) :3190-3198, 2010.

[0288] Opitz et al., The Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor 1-Methyl-

D-tryptophan Upregulates IDO1 in Human Cancer Cells. *PLoS One*, 6 (5) :e19823, 2011.

[0289] Opitz et al., An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478 (7368) :197-203, 2011.

[0290] Penttila et al., *Gene*, 61:155-164, 1987.

[0291] Pilotte et al., Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 (7) :2497-2502, 2012.

[0292] Prendergast, Cancer: Why tumours eat tryptophan. *Nature*, 478 (7368) :192-194, 2011.

[0293] Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (24) :14411-14416, 1998.

[0294] Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.

[0295] Rutella et al., Targeting indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) to counteract tumour-induced immune dysfunction: from biochemistry to clinical development. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 9 (2) :151-177, 2009.

[0296] Schellenberger et al., *Nature Biotech.*, 27:1186-1190, 2009.

[0297] Shin et al., Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110 (30) :12391-12396, 2013.

[0298] Sibakov et al., *Eur. J. Biochem.*, 145:567-572, 1984.

[0299] Song et al., L-Kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *International Immunopharmacology*, 11 (8) :932-938, 2011.

[0300] Stone et al., Replacing Mn^{2+} with Co^{2+} in human arginase I enhances cytotoxicity toward L-arginine auxotrophic cancer cell lines. *ACS Chemical Biology*, 5:333-342, 2010.

[0301] Ward, *Proc. Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi*, Helsinki, 119-128, 1989.

[0302] Wawrzynczak and Thorpe, In: *Immunoconjugates, Antibody Conjugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.

[0303] Yao et al., Serum metabolic profiling and features of papillary thyroid carcinoma and nodular goiter. *Mol Biosyst*, 7 (9) :2608-2614, 2011.

[0304] Yoshikawa et al., Serum concentration of L-kynurenine predicts the clinical outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Eur J Haematol*, 84 (4) :304-309, 2010.

序列表

<110> Board of Regents, The University of Texas System

<120> 用于肿瘤疗法的犬尿氨酸耗竭酶的施用

<130> UTFB. P1018W0

<150> US 61/872,132

<151> 2013-08-30

<150> US 61/986,366

<151> 2014-04-30

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1347

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 1

tctagaaata attttgttta actttaagga aaacattaaa ataaggaggt agcaaatggg	60
cggatcatcat caccaccatc atgggagcgg caccaccgc aacgattgcc tggcgtgga	120
tgcgcaggat agcctggcac cgctgcgtca gcagtttgcg ctgccggaag gtgttattta	180
tctggatggc aacagcctgg gtgcgcgtcc ggttgcggcg ctggcgcgtg cgcaggcgg	240
gattgcggaa gaatgggca acggcctgat tcgcagctgg aacagcgcgg gctggcgcga	300
tctgagcgaa cgctgggca accgcctggc gaccctgatt ggccgcgcgc atggcgaagt	360
ggtggtgacc gataccacca gcattaacct gtttaaagtg ctgagcgcgg cgctgcgcgt	420
gcaggcgacc cgcagcccg aacccgcgt gattgtgacc gaaaccagca actttccgac	480
cgatctgtat attgcggaag gcctggcgga tatgctgcag cagggtata ccctgcgcct	540
ggtggatagc ccggaagaac tgccgcaggc gattgatcag gataccgcgg tggatgatgt	600
gacccatgtg aactataaaa ccggctatat gcatgatatg caggcgtga ccgcgtgag	660
ccatgaatgc ggccgcgtgg cgatttgga tctggcgcat agcgcgggcg cggcgccggt	720
ggatctgcat caggcgggcg cggattatgc gattggctgc acctataaat atctgaacgg	780
cggcccgagg agccaggcgt ttgtgtgggt gagccgcag ctgtgcgac tggtgccga	840
gccgtgtct ggttggttg gccatagccg ccagtttgcg atggaaccgc gctatgaacc	900
gagcaacggc attgcgcgt atctgtgcgg caccagccg attaccagcc tggcgtggt	960
ggaatgcggc ctggatgtgt ttgcgcagc cgatattggc agcctgcgcg gcaaaagcct	1020
ggcgtgacc gatctgttta ttgaactggt ggaacagcgc tgcgcggcgc atgaactgac	1080
cttggtgacc ccgcgcgaac atgcgaaac cggcagccat gtgagctttg aacatccgga	1140
aggctatgcg gtgattcagg cgctgattga tcgcggcgtg attggcgatt atcgcgaacc	1200
gcgcattatg cgctttggt ttaccccgt gtataccacc ttaccgaag tgtgggatgc	1260
ggtgcagatt ctggcgaaa ttctggatcg caaacctgg gcgcaggcgc agtttcaggt	1320
gcgcatagc gtgacctagt aggatcc	1347

<210> 2

<211> 1497

[0001]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 2
tctagaaata attttgitta actttaagga caaatcagga cacagttaag gaggtaaaat 60
atggcggtc atcatcacca ccatcatggg agcggcgaac cgagctccct tgaacttccg 120
gccgataccg tgcaacggat agcggcggaa ttgaaatgtc acccgaccga cgaacgcgtc 180
gcgttacatc tggatgagga agacaagctg cgtcacttcc gcgagtgtt ttacattccg 240
aaaattcagg atctgccgc agtggacttg agcctgtgta acaaagacga gaacgccatc 300
tacttcttgg gcaatagcct gggcctgcaa ccaaagatgg tgaacaccta tctttaggag 360
gagcttgaca aatggcgcaa gatcgcgcc tacggccatg aagtcggcaa gcgtccctgg 420
attaccggcg atgagtcaat cgttggcttg atgaaggata tcgtcggcgc gaacgagaaa 480
gaaattgcgc tgatgaacgc gctgaccgtg aatctgcatc tgctgatgtc gtcattcttt 540
aagccccccc cgaagcgcta caaatcctg ctggaagcga aagcgtttcc cagcgatcat 600
tatgcgatag aaagccagct gcaactgcac ggcctgaata tcgaggagag catgcgtatg 660
ataaaacgcg gcgaagtgta ggagaccctg cggattgagg acatcctgga ggtgatcgag 720
aaggaggcgc acagtatcgc ggtgatactt ttcagcggcg tgcatttcta cacgggcca 780
cacttcaata tcccgccat taccaaagcc ggcagcgca aagggtgcta ttaggcttt 840
gatctggcgc atgcagtggg caacgtcga ctgtatctt atgattgggg cgttgatttt 900
gcgtgtgtgt gcagctataa gtatctgaat gccggggccg gtgggattgc gggagccttt 960
attcatgaga aacacgcgca taccattaaa ccggcgttgg ttggtgtgtt tgggcacgaa 1020
ctgagcaccg gcttcaagat ggataacaaa ctgcaattga ttccgggcgt gtgcggcttt 1080
cgtattagca acccccgat tctgtgtgtc tgcagcctgc acgcgtctct ggagattttc 1140
aagcaggcga ccatgaaagc gctgcgtaag aaaagtgtgc ttctgacggg ctacctggag 1200
tacctgataa agcacaacta cggcaaggat aaggcggcca cgaagaagcc ggttgtgaac 1260
attatcaccc cgtctcatgt ggaagaacgt ggctgccaac tgacgataac gttcagcgtg 1320
ccaacaagg acgtgttcca agagctggag aagcgtggcg tgggtgtgtg taaacgtaat 1380
ccgaatggca ttcgtgtggc gcctgtgccg ctgtacaaca gttccacga cgtgtataag 1440
ttaccaacc tgctgacgag cattctggac agtcgggaaa caaaaacta gggatcc 1497

[0002]

<210> 3
<211> 1492
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的多核苷酸

<400> 3
tctagaaata attttgitta actttaagaa cacggtcggg aatataagga ggtaaaatat 60
ggcggtcat catcaccacc atcatgggag cggcgagccg agcccgctgg aactgccggt 120
tgacgcggta cgtcgtattg cggcagaact gaactgtgac ccgaccgatg aacgtgtggc 180
gtcgcgtctc gacgaagagg acaagctctc tcaattccgt aactgttctt atatccctaa 240
aatgcgtgac ctgccgagca tcgatctgtc tctgtttctt gaagacgacg acgcgattta 300

	cttctctgggt aactctctgg gtctgcagcc aaaaatggtt cgtacctacc tggaggaaga	360
	gctggacaaa tgggcgaaaa tgggtgccta cggccatgat gtgggcaaac gcccgtagat	420
	cgtcggcgac gaaagcattg tgtctctcat gaaggacatt gttagtgac acgagaaaga	480
	aattgcgctg atgaatgctc tgaccatcaa cctgcacctg ctgctcctgt ctttcttcaa	540
	gccgaccccg aagcgtcata aaatcctgct cgaggctaaa ggttcccg ctgatcacta	600
	cgcgatcgaa tctcaaatcc aactgcacgg tctggacgtt gagaagtcta tgcgtatggt	660
	taagccgctg gaagcgagg agaccctccg tatggaagac atcctcgaag ttatcgaaga	720
	agaaggtgac tctatcgag ttattctgtt ccttgccctg cacttttaca ccggtcaact	780
	gttcaatata ccggcaatca ccaaagcggg ccacgcgaaa ggttgcttcg ttggtttcga	840
	cctggcccat gcggttggtg acgtggagct gcgcctccac gactggggtg ttgactttgc	900
	gtgtggtgc tcttacaat acctgaactc tggtagcggg ggtctcgcgg gtgcgttcgt	960
	ccacgaaaaa cagcgcaca ccgttaaacc ggcgtggtt ggttggttcg gccacgacct	1020
	ctctacgctg ttcaacatgg acaacaaact ccagctgac ccaggcgcca acggtttccg	1080
	tatctctaac ccgccatcc tcttggtttg ctctctgcac gcgtctctcg aggttttcca	1140
	gcaggcgacc atgaccgccc tgcgcgtaa atctattctc ctgacgggtt atctggaata	1200
	catgctgaag cactaccact ctaaagacaa cagggaaaac aaaggtccga tcgttaacat	1260
	catcaccctg tctcgtgcgg aagaacgtgg ctgccaactg accctgacct tctctattcc	1320
	gaaaaaatct gttttcaaag aactggagaa acgtggtgtt gtttgcgaca aacgtgaacc	1380
[0003]	ggacggtatc cgcgttgctc cggctccgct gtacaactct ttccatgacg ttataagtt	1440
	cattcgtctg ctcacctcca tcttggaactc tagcgaacgc tctaaggat cc	1492
	<210> 4	
	<211> 1251	
	<212> DNA	
	<213> 荧光假单胞菌	
	<400> 4	
	atgaccaccc gcaacgattg cctggcgtg gatgcgcagg atagcctggc accgctgcgt	60
	cagcagtttg cgctgccgga aggtgttatt tatctggatg gcaacagcct gggtgcgcgt	120
	ccggttgccg cgctggcgcg tgcgcaggcg gtgattgcgg aagaatgggg caacggcctg	180
	attcgcagct ggaacagcgc gggctggcgc gatctgagcg aacgcctggg caaccgcctg	240
	gcgacctga ttggcgcgcg cgatggcgaa gtggtggtga ccgataccac cagcattaac	300
	ctgtttaaag tgctgagcgc ggcgtgcgc gtgcaggcga cccgcagccc ggaacgccgc	360
	gtgatttga ccgaaaccag caactttccg accgatctgt atattgcgga aggcctggcg	420
	gatatgctgc agcagggcta taccctgcgc ctggtggata gcccggaaga actgccgcag	480
	gcgattgac aggataccgc ggtggtgatg ctgacctatg tgaactataa aaccggctat	540
	atgcatgata tgcaggcgct gaccgcgtg agccatgaat gcggcgcgct ggcgatttgg	600
	gatctggcgc atagcgcggg cgcggtgccg gtggatctgc atcaggcggg cgcggattat	660
	gcgattggtg gcacctataa atatctgaac ggcgcccg gcagccaggc gtttgtgtgg	720
	gtgagccgc agctgtgcga tctggtgccg cagccgctgt ctggttggtt tggccatagc	780
	cgccagtttg cgatggaacc gcgtatgaa ccgagcaacg gcattgcgcg ctatctgtgc	840

	ggcaccacagc cgattaccag cctggcgatg gtggaatgcg gcctggatgt gtttgcgcag	900
	accgatatgg cgagccitgcg ccgcaaaagc ctggcgctga ccgatctgtt tattgaactg	960
	gtggaacagc gctgcgcggc gcatgaactg accctgggtga ccccgcgca acatgcgaaa	1020
	cgcggcagcc atgtgagctt tgaacatccg gaaggctatg cgggtgattca ggcgctgatt	1080
	gatcgcgggc tgattggcga ttatcgcgaa ccgcgcatga tgcgctttgg ctttaccgcc	1140
	ctgtatacca ctttaccga agtgtgggat gcggtgcaga ttctgggcga aattctggat	1200
	cgcaaaacct gggcgaggc gcagtttcag gtgcgccata gcgtgaccta g	1251
	<210> 5	
	<211> 1398	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 5	
	atgggaaccga gctcccttga acttccggcc gataccgtgc aacggatagc ggcggaattg	60
	aaatgtcacc cgaccgacga acgcgtcgcg ttacatctgg atgaggaaga caagctgcgt	120
	cacttccgag agtgccttta cattccgaaa attcaggatc tgccgccagt ggacttgagc	180
	ctggtcaaca aagacgagaa cgccatctac ttcttgggca atagcctggg cctgcaacca	240
	aagatggtga aaacctatct tgaggaggag cttgacaaat gggcgaagat cgcggcctac	300
	ggccatgaag tcggcaagcg tccctggatt accggcgatg agtcaatcgt tggcttgatg	360
	aaggatatcg tcggcgcgaa cgagaaagaa attgcgctga tgaacgcgt gaccgtgaat	420
	ctgcatctgc tgatgctgtc attctttaag cccacccga agcgctacaa aatcctgctg	480
[0004]	gaagcgaag cgtttccag cgatcattat gcgatagaaa gccagctgca actgcacggc	540
	ctgaatatcg aggagagcat gcgtatgata aaaccgcgag aaggtgagga gaccctgcgg	600
	attgaggaca tcttgagggt gatcgagaag gagggcgaca gtatcgcggt gatacttttc	660
	agcggcgtgc atttctacac gggccaacac ttcaatatcc cggccattac caaagccggc	720
	caggcgaaag ggtgctatgt aggctttgat ctggcgcatg cagtgggcaa cgtcgaactg	780
	tatcttcatg attggggcgt tgattttgcg tgctggtgca gctataagta tctgaatgcc	840
	ggggccgggtg ggattgcggg agccttttatt catgagaaac acgcgcatac cattaaaccg	900
	gcgtggttg gctggttttg gcacgaactg agcaccgcgt tcaagatgga taacaaactg	960
	caatgatgc cgggcgtgtg cggttttcgt attagcaacc ccccgattct gctggtctgc	1020
	agcctgcacg cgtctctgga gatcttcaag caggcgacca tgaagcgct gcgtaagaaa	1080
	agtgtgcttc tgacgggcta cctggagtac ctgataaagc acaactacgg caaggataag	1140
	gcggccacga agaagccggt tgtgaacatt atcaccctgt ctcatgtgga agaactggc	1200
	tgccaactga cgataacgtt cagcgtgcca aacaaggacg tgttccaaga gctggagaag	1260
	cgtggcgtgg tgtgtgataa acgtaatccg aatggcatc gtgtggcgcc tgtgccgctg	1320
	tacaacagct tccacgacgt gtataagttc accaactgc tgacgagcat tctggacagt	1380
	gcggaaacca aaaactag	1398
	<210> 6	
	<211> 1395	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 6	

	atggagccga gcccgtgga actgccggtt gacgcggtac gtcgtattgc ggcagaactg	60
	aactgtgacc cgaccgatga acgtgtggcg ctgcgtctcg acgaagagga caagctctct	120
	cacttcctga actgcttcta tatccctaaa atgcgtgacc tgccgagcat cgatctgtct	180
	ctggtttctg aagacgacga cgcgatttac ttcttgggta actctctggg tctgcagcca	240
	aaaatggttc gtacctacct ggaggaagag ctggacaaat gggcgaaaat gggcgcctac	300
	ggccatgatg tgggcaaacg cccgtggatc gtcggcgacg aaagcattgt gtcctctcatg	360
	aaggacattg ttgtgtcaca cgagaaagaa attgcgtga tgaatgctct gaccatcaac	420
	ctgcacctgc tgctcctgtc ttcttcaag ccgaccccgga agcgtcataa aatcctgtct	480
	gaggctaaag cgttcccgtc tgatcactac gcgatcgaat ctcaaatacca actgcacggt	540
	ctggacgttg agaagtctat gcgtatggtt aagccgcgtg aaggcgagga gaccctccgt	600
	atggaagaca tcctcgaagt tatcgaagaa gaaggtgact ctatcgcagt tattctgttc	660
	tctggcctgc acttttacac cggtaactg ttcaatatcc cggcaatcac caaagcgggc	720
	cacgcgaaag gttgcttcgt tggtttcgac ctggcccatg cggttggtaa cgtggagctg	780
	cgcctccacg actggggtgt tgactttgcg tgctgtgtct cttacaaata cctgaactct	840
	ggcgcgggtg gtctcgcggg tgcgttcgtc cacgaaaaac acgcgcacac cgttaaaccg	900
	gcgctggttg gctggttcgg ccacgacctc tctacgcgtt tcaacatgga caacaaactc	960
	cagctgatcc caggcgccaa cggtttccgt atctctaacc cggcgcctct cctggtttgc	1020
	tctctgcacg cgtctctcga ggttttccag caggcgacca tgaccgcctt gcgccgtaaa	1080
[0005]	tctattctcc tgacgggtta tctggaatac atgctgaagc actaccactc taaagacaac	1140
	acggaaaaca aaggtccgat cgttaacatc atcaccccg ctcgtgcgga agaacgtggc	1200
	tgccaactga ccttgacctt ctctattccg aaaaaatctg ttttcaaaga actggagaaa	1260
	cgtggtgttg tttgcgacaa acgtgaaccg gacggtatcc gcgttgctcc ggtcccgtg	1320
	tacaactctt tccatgacgt ttataagttc attcgtctgc tcacctccat cctggactct	1380
	agcgaacgct cctaa	1395

<210> 7

<211> 416

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌

<400> 7

Met Thr Thr Arg Asn Asp Cys Leu Ala Leu Asp Ala Gln Asp Ser Leu
1 5 10 15

Ala Pro Leu Arg Gln Gln Phe Ala Leu Pro Glu Gly Val Ile Tyr Leu
20 25 30

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

Gln Ala Val Ile Ala Glu Glu Trp Gly Asn Gly Leu Ile Arg Ser Trp
50 55 60

Asn Ser Ala Gly Trp Arg Asp Leu Ser Glu Arg Leu Gly Asn Arg Leu
65 70 75 80

	Ala Thr Leu Ile Gly Ala Arg Asp Gly Glu Val Val Val Thr Asp Thr	85	90	95
	Thr Ser Ile Asn Leu Phe Lys Val Leu Ser Ala Ala Leu Arg Val Gln	100	105	110
	Ala Thr Arg Ser Pro Glu Arg Arg Val Ile Val Thr Glu Thr Ser Asn	115	120	125
	Phe Pro Thr Asp Leu Tyr Ile Ala Glu Gly Leu Ala Asp Met Leu Gln	130	135	140
	Gln Gly Tyr Thr Leu Arg Leu Val Asp Ser Pro Glu Glu Leu Pro Gln	145	150	155
	Ala Ile Asp Gln Asp Thr Ala Val Val Met Leu Thr His Val Asn Tyr	165	170	175
	Lys Thr Gly Tyr Met His Asp Met Gln Ala Leu Thr Ala Leu Ser His	180	185	190
	Glu Cys Gly Ala Leu Ala Ile Trp Asp Leu Ala His Ser Ala Gly Ala	195	200	205
	Val Pro Val Asp Leu His Gln Ala Gly Ala Asp Tyr Ala Ile Gly Cys	210	215	220
[0006]	Thr Tyr Lys Tyr Leu Asn Gly Gly Pro Gly Ser Gln Ala Phe Val Trp	225	230	235
	Val Ser Pro Gln Leu Cys Asp Leu Val Pro Gln Pro Leu Ser Gly Trp	245	250	255
	Phe Gly His Ser Arg Gln Phe Ala Met Glu Pro Arg Tyr Glu Pro Ser	260	265	270
	Asn Gly Ile Ala Arg Tyr Leu Cys Gly Thr Gln Pro Ile Thr Ser Leu	275	280	285
	Ala Met Val Glu Cys Gly Leu Asp Val Phe Ala Gln Thr Asp Met Ala	290	295	300
	Ser Leu Arg Arg Lys Ser Leu Ala Leu Thr Asp Leu Phe Ile Glu Leu	305	310	315
	Val Glu Gln Arg Cys Ala Ala His Glu Leu Thr Leu Val Thr Pro Arg	325	330	335
	Glu His Ala Lys Arg Gly Ser His Val Ser Phe Glu His Pro Glu Gly	340	345	350
	Tyr Ala Val Ile Gln Ala Leu Ile Asp Arg Gly Val Ile Gly Asp Tyr	355	360	365
	Arg Glu Pro Arg Ile Met Arg Phe Gly Phe Thr Pro Leu Tyr Thr Thr	370	375	380

Phe Thr Glu Val Trp Asp Ala Val Gln Ile Leu Gly Glu Ile Leu Asp
 385 390 395 400
 Arg Lys Thr Trp Ala Gln Ala Gln Phe Gln Val Arg His Ser Val Thr
 405 410 415
 <210> 8
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 8
 Met Glu Pro Ser Ser Leu Glu Leu Pro Ala Asp Thr Val Gln Arg Ile
 1 5 10 15
 Ala Ala Glu Leu Lys Cys His Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu His
 20 25 30
 Leu Asp Glu Glu Asp Lys Leu Arg His Phe Arg Glu Cys Phe Tyr Ile
 35 40 45
 Pro Lys Ile Gln Asp Leu Pro Pro Val Asp Leu Ser Leu Val Asn Lys
 50 55 60
 Asp Glu Asn Ala Ile Tyr Phe Leu Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Lys Met Val Lys Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Lys
 85 90 95
 Ile Ala Ala Tyr Gly His Glu Val Gly Lys Arg Pro Trp Ile Thr Gly
 100 105 110
 Asp Glu Ser Ile Val Gly Leu Met Lys Asp Ile Val Gly Ala Asn Glu
 115 120 125
 Lys Glu Ile Ala Leu Met Asn Ala Leu Thr Val Asn Leu His Leu Leu
 130 135 140
 Met Leu Ser Phe Phe Lys Pro Thr Pro Lys Arg Tyr Lys Ile Leu Leu
 145 150 155 160
 Glu Ala Lys Ala Phe Pro Ser Asp His Tyr Ala Ile Glu Ser Gln Leu
 165 170 175
 Gln Leu His Gly Leu Asn Ile Glu Glu Ser Met Arg Met Ile Lys Pro
 180 185 190
 Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Ile Glu Asp Ile Leu Glu Val Ile
 195 200 205
 Glu Lys Glu Gly Asp Ser Ile Ala Val Ile Leu Phe Ser Gly Val His
 210 215 220
 Phe Tyr Thr Gly Gln His Phe Asn Ile Pro Ala Ile Thr Lys Ala Gly
 225 230 235 240
 Gln Ala Lys Gly Cys Tyr Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Val Gly

[0007]

	245	250	255
	Asn Val Glu Leu Tyr Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe Ala Cys Trp 260	265	270
	Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ala Gly Ala Gly Gly Ile Ala Gly Ala 275	280	285
	Phe Ile His Glu Lys His Ala His Thr Ile Lys Pro Ala Leu Val Gly 290	295	300
	Trp Phe Gly His Glu Leu Ser Thr Arg Phe Lys Met Asp Asn Lys Leu 305	310	315
	Gln Leu Ile Pro Gly Val Cys Gly Phe Arg Ile Ser Asn Pro Pro Ile 325	330	335
	Leu Leu Val Cys Ser Leu His Ala Ser Leu Glu Ile Phe Lys Gln Thr 340	345	350
	Met Lys Ala Leu Arg Lys Lys Ser Val Leu Leu Thr Gly Tyr Leu Glu 355	360	365
	Tyr Leu Ile Lys His Asn Tyr Gly Lys Asp Lys Ala Ala Thr Lys Lys 370	375	380
	Pro Val Val Asn Ile Ile Thr Pro Ser His Val Glu Glu Arg Gly Cys 385	390	395
[0008]	Gln Leu Thr Ile Thr Phe Ser Val Pro Asn Lys Asp Val Phe Gln Glu 405	410	415
	Leu Glu Lys Arg Gly Val Val Cys Asp Lys Arg Asn Pro Asn Gly Ile 420	425	430
	Arg Val Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe His Asp Val Tyr Lys 435	440	445
	Phe Thr Asn Leu Leu Thr Ser Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Lys Asn 450	455	460
	<210> 9		
	<211> 464		
	<212> PRT		
	<213> 小家鼠		
	<400> 9		
	Met Glu Pro Ser Pro Leu Glu Leu Pro Val Asp Ala Val Arg Arg Ile 1	5	10
	Ala Ala Glu Leu Asn Cys Asp Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu Arg 20	25	30
	Leu Asp Glu Glu Asp Lys Leu Ser His Phe Arg Asn Cys Phe Tyr Ile 35	40	45
	Pro Lys Met Arg Asp Leu Pro Ser Ile Asp Leu Ser Leu Val Ser Glu 50	55	60

[0009]

Asp	Asp	Asp	Ala	Ile	Tyr	Phe	Leu	Gly	Asn	Ser	Leu	Gly	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Lys	Met	Val	Arg	Thr	Tyr	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Asp	Lys	Trp	Ala	Lys	85	90	95	
Met	Gly	Ala	Tyr	Gly	His	Asp	Val	Gly	Lys	Arg	Pro	Trp	Ile	Val	Gly	100	105	110	
Asp	Glu	Ser	Ile	Val	Ser	Leu	Met	Lys	Asp	Ile	Val	Gly	Ala	His	Glu	115	120	125	
Lys	Glu	Ile	Ala	Leu	Met	Asn	Ala	Leu	Thr	Ile	Asn	Leu	His	Leu	Leu	130	135	140	
Leu	Leu	Ser	Phe	Phe	Lys	Pro	Thr	Pro	Lys	Arg	His	Lys	Ile	Leu	Leu	145	150	155	160
Glu	Ala	Lys	Ala	Phe	Pro	Ser	Asp	His	Tyr	Ala	Ile	Glu	Ser	Gln	Ile	165	170	175	
Gln	Leu	His	Gly	Leu	Asp	Val	Glu	Lys	Ser	Met	Arg	Met	Val	Lys	Pro	180	185	190	
Arg	Glu	Gly	Glu	Glu	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Asp	Ile	Leu	Glu	Val	Ile	195	200	205	
Glu	Glu	Glu	Gly	Asp	Ser	Ile	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Gly	Leu	His	210	215	220	
Phe	Tyr	Thr	Gly	Gln	Leu	Phe	Asn	Ile	Pro	Ala	Ile	Thr	Lys	Ala	Gly	225	230	235	240
His	Ala	Lys	Gly	Cys	Phe	Val	Gly	Phe	Asp	Leu	Ala	His	Ala	Val	Gly	245	250	255	
Asn	Val	Glu	Leu	Arg	Leu	His	Asp	Trp	Gly	Val	Asp	Phe	Ala	Cys	Trp	260	265	270	
Cys	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Ala	Gly	Ala	275	280	285	
Phe	Val	His	Glu	Lys	His	Ala	His	Thr	Val	Lys	Pro	Ala	Leu	Val	Gly	290	295	300	
Trp	Phe	Gly	His	Asp	Leu	Ser	Thr	Arg	Phe	Asn	Met	Asp	Asn	Lys	Leu	305	310	315	320
Gln	Leu	Ile	Pro	Gly	Ala	Asn	Gly	Phe	Arg	Ile	Ser	Asn	Pro	Pro	Ile	325	330	335	
Leu	Leu	Val	Cys	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Leu	Glu	Val	Phe	Gln	Gln	Ala	340	345	350	
Thr	Met	Thr	Ala	Leu	Arg	Arg	Lys	Ser	Ile	Leu	Leu	Thr	Gly	Tyr	Leu	355	360	365	

Glu Tyr Met Leu Lys His Tyr His Ser Lys Asp Asn Thr Glu Asn Lys
 370 375 380
 Gly Pro Ile Val Asn Ile Ile Thr Pro Ser Arg Ala Glu Glu Arg Gly
 385 390 395 400
 Cys Gln Leu Thr Leu Thr Phe Ser Ile Pro Lys Lys Ser Val Phe Lys
 405 410 415
 Glu Leu Glu Lys Arg Gly Val Val Cys Asp Lys Arg Glu Pro Asp Gly
 420 425 430
 Ile Arg Val Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe His Asp Val Tyr
 435 440 445
 Lys Phe Ile Arg Leu Leu Thr Ser Ile Leu Asp Ser Ser Glu Arg Ser
 450 455 460
 <210> 10
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> 苏门答腊猩猩
 <400> 10
 Met Glu Pro Ser Ser Leu Glu Leu Pro Ala Asp Thr Val Gln Arg Ile
 1 5 10 15
 Ala Ala Glu Leu Lys Cys His Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu His
 20 25 30
 Leu Asp Glu Glu Asp Lys Leu Arg His Phe Arg Glu Tyr Phe Tyr Ile
 35 40 45
 Pro Lys Ile Arg Asp Leu Pro Pro Val Asp Phe Ile Ile Ser Glu Ser
 50 55 60
 Lys Asp Glu Asn Ala Ile Tyr Phe Leu Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Lys Met Val Lys Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu Asp Lys Trp Ala
 85 90 95
 Lys Ile Ala Ala Tyr Gly His Glu Val Gly Lys Arg Pro Trp Ile Thr
 100 105 110
 Gly Asp Glu Ser Ile Val Gly Leu Met Lys Asp Ile Val Gly Ala Asn
 115 120 125
 Glu Lys Glu Ile Ala Leu Met Asn Ala Leu Thr Val Asn Leu His Leu
 130 135 140
 Leu Met Leu Ser Phe Phe Lys Pro Thr Pro Lys Arg Tyr Lys Ile Leu
 145 150 155 160
 Leu Glu Ala Lys Ala Phe Pro Ser Asp His Tyr Ala Ile Glu Ser Gln
 165 170 175

[0010]

	Leu	Gln	Leu	His	Gly	Leu	Asn	Ile	Glu	Glu	Ser	Met	Arg	Met	Val	Lys	
				180					185					190			
	Pro	Arg	Glu	Gly	Glu	Glu	Thr	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Ile	Leu	Glu	Val	
			195					200					205				
	Ile	Glu	Lys	Glu	Gly	Asp	Ser	Ile	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Gly	Val	
		210					215					220					
	His	Phe	Tyr	Thr	Gly	Gln	His	Phe	Asn	Ile	Pro	Ala	Ile	Thr	Lys	Ala	
	225					230					235					240	
	Gly	Gln	Ala	Lys	Gly	Cys	Tyr	Val	Gly	Phe	Asp	Leu	Ala	His	Ala	Val	
					245					250					255		
	Gly	Asn	Val	Glu	Leu	Tyr	Leu	His	Asp	Trp	Gly	Val	Asp	Phe	Ala	Cys	
			260						265					270			
	Trp	Cys	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ile	Ala	Gly	
			275					280					285				
	Ala	Phe	Val	His	Glu	Lys	His	Ala	His	Thr	Ile	Lys	Pro	Ala	Leu	Val	
		290					295					300					
	Gly	Trp	Phe	Gly	His	Glu	Leu	Ser	Thr	Arg	Phe	Lys	Met	Asp	Asn	Lys	
	305					310					315					320	
[0011]	Leu	Gln	Leu	Ile	Pro	Gly	Val	Cys	Gly	Phe	Arg	Ile	Ser	Asn	Pro	Pro	
					325					330					335		
	Ile	Leu	Leu	Val	Cys	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Leu	Glu	Ile	Phe	Lys	Gln	
			340						345					350			
	Ala	Thr	Met	Lys	Ala	Leu	Arg	Lys	Lys	Ser	Ile	Leu	Leu	Thr	Gly	Tyr	
			355					360					365				
	Leu	Glu	Tyr	Leu	Ile	Lys	His	Ser	Tyr	Gly	Lys	Asp	Lys	Ala	Ala	Thr	
		370					375					380					
	Lys	Lys	Pro	Val	Val	Asn	Ile	Ile	Thr	Pro	Ser	His	Ile	Glu	Glu	Arg	
	385					390					395					400	
	Gly	Cys	Gln	Leu	Thr	Ile	Thr	Phe	Ser	Val	Pro	Asn	Lys	Asp	Val	Phe	
					405					410					415		
	Gln	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Gly	Val	Val	Cys	Asp	Lys	Arg	Asn	Pro	Asn	
				420					425					430			
	Gly	Ile	Arg	Val	Ala	Pro	Val	Pro	Leu	Tyr	Asn	Ser	Phe	His	Asp	Val	
		435						440					445				
	Tyr	Lys	Phe	Thr	Asn	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Leu	Asp	Ser	Ala	Glu	Thr	
		450					455					460					
	Thr	Asn															
	465																

<210> 11
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴

<400> 11

Met Glu Pro Ser Pro Leu Glu Leu Pro Ala Asp Thr Val Gln Arg Ile
 1 5 10 15

Ala Thr Glu Leu Lys Cys His Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu His
 20 25 30

Leu Asp Glu Val Asp Lys Leu Arg His Phe Arg Glu Cys Phe Tyr Ile
 35 40 45

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

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

Lys Met Val Lys Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Lys
 85 90 95

Ile Ala Ala Tyr Gly His Glu Val Gly Lys Arg Pro Trp Ile Thr Gly
 100 105 110

[0012]

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

Lys Glu Ile Ala Leu Met Asn Ala Leu Thr Val Asn Leu His Leu Leu
 130 135 140

Leu Leu Ser Phe Phe Lys Pro Thr Pro Lys Arg Tyr Lys Ile Leu Leu
 145 150 155 160

Glu Ala Lys Ala Phe Pro Ser Asp His Tyr Ala Ile Glu Ser Gln Leu
 165 170 175

Gln Leu His Gly Leu Asn Ile Glu Glu Ser Met Arg Met Ile Lys Pro
 180 185 190

Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Ile Glu Asp Ile Leu Glu Val Ile
 195 200 205

Glu Lys Glu Gly Asp Ser Ile Ala Val Ile Leu Phe Ser Gly Val His
 210 215 220

Phe Tyr Thr Gly Gln His Phe Asn Ile Pro Ala Ile Thr Lys Ala Gly
 225 230 235 240

Gln Ala Lys Gly Cys Tyr Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Val Gly
 245 250 255

Asn Val Glu Leu Tyr Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe Ala Cys Trp
 260 265 270

[0013]

Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ala Gly Ala Gly Gly Ile Ala Gly Ala
 275 280 285
 Phe Ile His Glu Lys His Ala His Thr Ile Lys Pro Ala Leu Val Gly
 290 295 300
 Trp Phe Gly His Glu Leu Ser Thr Arg Phe Lys Met Asp Asn Lys Leu
 305 310 315 320
 Gln Leu Ile Pro Gly Val Cys Gly Phe Arg Ile Ser Asn Pro Pro Ile
 325 330 335
 Leu Leu Val Cys Ser Leu His Ala Ser Leu Glu Ile Phe Lys Gln Ala
 340 345 350
 Thr Met Lys Ala Leu Arg Lys Lys Ser Ile Leu Leu Thr Gly Tyr Leu
 355 360 365
 Glu Tyr Leu Ile Lys His Lys Tyr Gly Lys Asp Lys Ala Ala Thr Glu
 370 375 380
 Lys Pro Ile Val Asn Ile Ile Thr Pro Ser His Ile Glu Glu Arg Gly
 385 390 395 400
 Cys Gln Leu Thr Ile Thr Phe Ser Val Pro Asn Lys Asp Val Phe Gln
 405 410 415
 Glu Leu Glu Lys Arg Gly Val Val Cys Asp Lys Arg Asn Pro Asn Gly
 420 425 430
 Ile Arg Val Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe His Asp Val Tyr
 435 440 445
 Lys Phe Thr Asn Leu Leu Thr Ser Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Thr
 450 455 460
 Asn
 465
 <210> 12
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> 黑猩猩
 <400> 12
 Met Glu Pro Ser Ser Val Glu Leu Pro Ala Asp Thr Val Gln Arg Ile
 1 5 10 15
 Ala Ala Glu Leu Lys Cys His Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu His
 20 25 30
 Leu Asp Glu Glu Asp Lys Leu Arg His Phe Arg Glu Cys Phe Tyr Ile
 35 40 45
 Pro Lys Ile Gln Asp Leu Pro Pro Val Asp Leu Ser Leu Val Asn Lys
 50 55 60
 Asp Glu Asn Ala Ile Tyr Phe Leu Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro

[0014]

65	70	75	80
Lys Met Val Lys Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Lys	85	90	95
Ile Ala Ala Tyr Gly His Glu Val Gly Lys Arg Pro Trp Ile Thr Gly	100	105	110
Asp Glu Ser Ile Val Gly Leu Met Lys Asp Ile Val Gly Ala Asn Glu	115	120	125
Lys Glu Ile Ala Leu Met Asn Ala Leu Thr Val Asn Leu His Leu Leu	130	135	140
Met Leu Ser Phe Phe Lys Pro Thr Pro Lys Arg Tyr Lys Ile Leu Leu	145	150	155
Glu Ala Lys Ala Phe Pro Ser Asp His Tyr Ala Ile Glu Ser Gln Leu	165	170	175
Gln Leu His Gly Leu Asn Ile Glu Glu Ser Met Arg Met Ile Lys Pro	180	185	190
Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Ile Glu Asp Ile Leu Glu Val Ile	195	200	205
Glu Lys Glu Gly Asp Ser Ile Ala Val Ile Leu Phe Ser Gly Val His	210	215	220
Phe Tyr Thr Gly Gln His Phe Asn Ile Pro Ala Ile Thr Lys Ala Gly	225	230	235
Gln Ala Lys Gly Cys Tyr Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Val Gly	245	250	255
Asn Val Glu Leu Tyr Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe Ala Cys Trp	260	265	270
Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ala Gly Ala Gly Gly Ile Ala Gly Ala	275	280	285
Phe Ile His Glu Lys His Ala His Thr Ile Lys Pro Ala Leu Val Gly	290	295	300
Trp Phe Gly His Glu Leu Ser Thr Arg Phe Lys Met Asp Asn Lys Leu	305	310	315
Gln Leu Ile Pro Gly Val Cys Gly Phe Arg Ile Ser Asn Pro Pro Ile	325	330	335
Leu Leu Val Cys Ser Leu His Ala Ser Leu Glu Ile Phe Lys Gln Ala	340	345	350
Thr Met Lys Ala Leu Arg Lys Lys Ser Val Leu Leu Thr Gly Tyr Leu	355	360	365
Glu Tyr Leu Ile Lys His Asn Tyr Gly Lys Asp Lys Ala Ala Thr Lys			

370	375	380
Lys Pro Val Val Asn Ile Ile Thr Pro Ser His Val Glu Glu Arg Gly 385 390 395 400		
Cys Gln Leu Thr Ile Thr Phe Ser Val Pro Asn Lys Asp Val Phe Gln 405 410 415		
Glu Leu Glu Lys Arg Gly Val Val Cys Asp Lys Arg Asn Pro Asn Gly 420 425 430		
Ile Arg Val Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe His Asp Val Tyr 435 440 445		
Lys Phe Thr Asn Leu Leu Thr Ser Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Thr 450 455 460		
Asn 465		
<210> 13 <211> 431 <212> PRT <213> Arenitalea lutea <400> 13		
Met Leu Glu Thr Glu Asn Ile Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Lys Leu Gly 1 5 10 15		
[0015] Leu Asp Tyr Ala Leu Asp Gln Asp Arg Lys Asp Glu Leu Lys Ser Tyr 20 25 30		
Arg Asn Gln Phe His Ile Pro Lys Asp Lys Gln Gly Asp Ala Trp Ile 35 40 45		
Tyr Met Thr Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro Lys Gln Thr Lys Ala 50 55 60		
Tyr Val Asn Gln Glu Leu Asn Asp Trp Ala Asn Leu Gly Val Glu Gly 65 70 75 80		
His Phe Glu Ala Lys Asn Pro Trp Leu Ala Tyr His Glu Phe Leu Thr 85 90 95		
Glu Ser Met Ala Lys Val Val Gly Ala Lys Pro Ile Glu Val Val Val 100 105 110		
Met Asn Thr Leu Thr Ala Asn Leu His Phe Met Met Val Ser Phe Tyr 115 120 125		
Lys Pro Thr Lys Thr Arg Tyr Lys Ile Leu Ile Glu Ser Asp Ala Phe 130 135 140		
Pro Ser Asp Lys Tyr Ala Val Glu Ser Gln Leu Arg His His Gly Phe 145 150 155 160		
Asp Asp Lys Glu Gly Val Val Leu Trp Lys Pro Arg Pro Gly Glu Glu 165 170 175		

	Leu	Leu	Asn	Tyr	Asp	Asp	Leu	Glu	Thr	Ile	Leu	Glu	Thr	Gln	Gly	Asp	
				180					185					190			
	Glu	Ile	Ala	Leu	Ile	Met	Ile	Gly	Gly	Val	Asn	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Gln	
		195						200					205				
	Tyr	Phe	Asp	Leu	Lys	Arg	Ile	Thr	Gln	Leu	Gly	His	Lys	Gln	Gly	Cys	
		210					215					220					
	Asn	Val	Gly	Phe	Asp	Cys	Ala	His	Gly	Ala	Gly	Asn	Val	Ala	Leu	Asn	
	225					230					235					240	
	Leu	His	Asp	Ser	Gly	Ala	Asp	Phe	Ala	Val	Trp	Cys	Thr	Tyr	Lys	Tyr	
					245					250					255		
	Leu	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Gly	Cys	Phe	Val	His	Glu	Arg	
				260					265					270			
	His	Ala	Tyr	Arg	Lys	Asp	Leu	Asn	Arg	Phe	Thr	Gly	Trp	Trp	Ser	His	
		275						280					285				
	Asn	Lys	Gln	Thr	Arg	Phe	Asn	Met	Arg	Gly	Glu	Phe	Asp	Gln	Leu	Pro	
		290					295					300					
	Gly	Ala	Glu	Gly	Trp	Gln	Leu	Ser	Asn	Pro	Pro	Ile	Leu	Ser	Met	Ala	
	305					310					315					320	
[0016]	Ala	Ile	Lys	Ala	Ser	Leu	Asp	Leu	Phe	Asn	Glu	Val	Gly	Met	Asp	Lys	
					325					330					335		
	Leu	Ile	Asn	Lys	Ser	Lys	Lys	Leu	Thr	Gly	Tyr	Phe	Glu	Tyr	Leu	Leu	
				340					345					350			
	Lys	Gln	Leu	Gly	Glu	Asp	Thr	Ile	Arg	Ile	Ile	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	
			355					360					365				
	Glu	Glu	Arg	Gly	Cys	Gln	Leu	Ser	Ile	Gln	Val	Lys	Asn	Ala	Asp	Lys	
		370					375					380					
	Ser	Leu	His	Asn	Lys	Leu	Thr	Glu	Val	Gly	Ile	Ile	Ser	Asp	Trp	Arg	
	385					390					395					400	
	Glu	Pro	Asp	Val	Ile	Arg	Cys	Ala	Pro	Val	Pro	Leu	Tyr	Asn	Ser	Phe	
					405					410					415		
	Glu	Asp	Val	Tyr	Arg	Leu	Val	Glu	Lys	Leu	Lys	Gly	Ile	Leu	Lys		
			420					425					430				
	<210>	14															
	<211>	429															
	<212>	PRT															
	<213>	Bellicella Baltica DSM 15883															
	<400>	14															
	Met	Ser	Asn	Gln	Ile	Asn	Phe	Glu	Tyr	Ser	Leu	Asp	Phe	Ala	Gln	Lys	
	1				5					10					15		

[0017]

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

Ile Phe Gln Gln Ala Gly Ile Lys Thr Leu Arg Glu Lys Ser Glu Thr
 325 330 335
 Leu Thr Ser Tyr Leu Glu Phe Leu Ile Gln Lys Ile Ser Gly Asn Ser
 340 345 350
 Gly Val Leu Glu Ile Ile Thr Pro Lys Asn Ile Asn Glu Arg Gly Cys
 355 360 365
 Gln Leu Ser Leu Leu Val His Lys Gly Gly Lys Ala Val Phe Asp Glu
 370 375 380
 Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Val Gly Asp Trp Arg Asn Pro Asn Val Ile
 385 390 395 400
 Arg Ile Ala Pro Thr Pro Leu Tyr Asn Ser Tyr Glu Asp Val Phe Arg
 405 410 415
 Phe Ala Lys Ile Leu Glu Gln Ser Leu Gln Lys Phe Ala
 420 425
 <210> 15
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> Bizionia argentinensis
 <400> 15
 Met Ser Asn Phe Lys Thr Gly Ile Asp Phe Ala Lys Glu Gln Asp Glu
 1 5 10 15
 Asn Asp Thr Leu Ser Cys Tyr Arg Asn Gln Phe His Ile Pro Lys Asp
 20 25 30
 Lys Gln Gly Asn Asp Met Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu
 35 40 45
 Gln Pro Lys Ala Thr Lys Asp Tyr Ile Asn Gln Glu Leu Glu Asp Trp
 50 55 60
 Ala Asn Leu Gly Val Glu Gly His Thr His Ala Lys Asn Pro Trp Leu
 65 70 75 80
 Gly Tyr His Glu Phe Leu Thr Asp Ser Met Ala Lys Val Val Gly Ala
 85 90 95
 Lys Pro Ile Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Thr Ala Asn Leu His
 100 105 110
 Phe Met Met Val Ser Phe Tyr Lys Pro Thr Ile Glu Arg Tyr Lys Ile
 115 120 125
 Ile Ile Glu Ala Asp Ala Phe Pro Ser Asp Lys Tyr Ala Val Glu Ser
 130 135 140
 Gln Leu Arg His His Gly Tyr Asp Asp Lys Glu Gly Leu Leu Leu Trp
 145 150 155 160

[0018]

[0019]

Lys Ala Arg Glu Gly Glu Glu Leu Leu Arg Tyr Glu Asp Leu Glu Ala
 165 170 175
 Ile Leu Lys Glu His Gly Asp Asp Val Ala Leu Val Met Ile Gly Gly
 180 185 190
 Val Asn Tyr Tyr Thr Gly Gln Phe Phe Asp Leu Lys Arg Ile Thr Glu
 195 200 205
 Leu Gly His Lys His Gly Cys Met Val Gly Phe Asp Cys Ala His Gly
 210 215 220
 Ala Gly Asn Val Glu Leu Asn Leu His Asp Ser Gly Ala Asp Phe Ala
 225 230 235 240
 Val Trp Cys Thr Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Ser Leu Gly
 245 250 255
 Gly Cys Phe Val His Glu Arg His Ala His Asn Lys Arg Leu Asn Arg
 260 265 270
 Phe Thr Gly Trp Trp Ser His Asn Lys Glu Thr Arg Phe Lys Met Arg
 275 280 285
 Asp Glu Phe Asp Ala Ile Pro Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Asn
 290 295 300
 Pro Pro Ile Leu Ser Met Ala Ala Ile Lys Ala Ser Leu Asp Ile Phe
 305 310 315 320
 Glu Glu Ile Gly Met Lys Lys Leu Asn Glu Lys Ser Arg Ala Leu Thr
 325 330 335
 Ala Tyr Phe Glu Phe Leu Leu Lys Gln Val Gly Asp Asp Ser Ile Arg
 340 345 350
 Ile Ile Thr Pro Glu Asn Pro Asp Glu Arg Gly Cys Gln Leu Ser Ile
 355 360 365
 Gln Val Lys Asn Ala Asp Arg Ser Leu His Asp Lys Leu Thr Asp Ala
 370 375 380
 Gly Val Ile Ser Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Cys Ala Pro
 385 390 395 400
 Ile Pro Leu Tyr Asn Ser Tyr Gln Asp Val Tyr His Met Val Glu Arg
 405 410 415
 Leu Lys Asn Ile Leu Glu
 420
 <210> 16
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Candidatus Entotheonella sp. TSY2
 <400> 16
 Met Thr Ala Phe His Ala His Phe Gln Pro Thr Arg Glu Ala Ala Leu

[0020]

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

305	310	315	320
Asp Ile Phe Asp Arg Ala Gly Met Met Arg Leu Arg Ala Lys Ser Glu	325	330	335
Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Glu Tyr Leu Leu Arg Asp Arg Ala Leu Pro	340	345	350
Gly Val Ser Leu Ile Thr Pro Asp Asp Pro Ala Gln Arg Gly Ala Gln	355	360	365
Leu Ser Leu Gln Ile Lys Gln His Gly Cys Ala Leu His Gln Arg Leu	370	375	380
Ala Glu Ala His Ile Ile Cys Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg	385	390	395
Val Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Thr Phe Leu Asp Val Leu Thr Phe	405	410	415
Val Asn Ala Leu Asp Thr Ala His Arg Glu Val Leu Val Ser Ser	420	425	430
<210> 17			
<211> 424			
<212> PRT			
<213> Candidatus Koribacter versatilis Ellin345			
<400> 17			

[0021]

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

	Glu Leu Cys Pro Arg Val Gly Glu Ala Thr Met Arg Asp Glu Asp Ile 165 170 175
	Leu Glu Leu Ile Glu Arg Glu Gly Gln Ser Ile Ala Leu Ile Leu Leu 180 185 190
	Gly Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Gln Ala Phe Asp Met Ala Glu Ile 195 200 205
	Thr Lys Ala Gly His Ala Gln Gly Cys Val Val Ala Phe Asp Cys Ala 210 215 220
	His Ala Ala Gly Asn Leu Glu Leu Lys Leu His Glu Trp Asp Val Asp 225 230 235 240
	Trp Ala Ala Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Gly Gly Pro Gly Cys 245 250 255
	Ile Gly Gly Cys Phe Val His Glu Arg Tyr Ala Arg Asp Phe Glu Leu 260 265 270
	Pro Arg Phe Ala Gly Trp Trp Gly His Asp Gln Glu Thr Arg Phe Lys 275 280 285
	Met Gly Pro Glu Phe His Pro Met Ala Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu 290 295 300
[0022]	Ser Asn Pro Ser Ile Leu Thr Met Ala Ala Leu Arg Ala Ser Met Glu 305 310 315 320
	Ile Phe Asp Glu Ala Gly Ile Gly Lys Leu Arg Gln Arg Ser Ile Ala 325 330 335
	Leu Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Asp Gln Gln Lys Ser Ala Arg 340 345 350
	Phe Glu Ile Ile Thr Pro Arg Glu Pro Glu Arg Arg Gly Ala Gln Leu 355 360 365
	Ser Ile Arg Val Ala Ala Gly Asn Arg Ser Val Cys Asp Arg Leu Val 370 375 380
	Glu Glu Gly Ala Leu Cys Asp Trp Arg Glu Pro Asp Ile Leu Arg Val 385 390 395 400
	Ala Pro Val Pro Leu Tyr Cys Ser Tyr Arg Asp Cys Tyr Arg Phe Val 405 410 415
	Gln Arg Phe Val Ala Asn Leu Asn 420
	<210> 18
	<211> 428
	<212> PRT
	<213> Cecembia lonarensis
	<400> 18

	Met	Ser	Asn	Asn	Gln	Tyr	Glu	Phe	Ser	Glu	Ser	Phe	Ala	Arg	Gln	Met	
	1				5					10					15		
	Asp	Val	Gln	Asp	Thr	Leu	Ser	Gly	Phe	Arg	Asp	Arg	Phe	Tyr	Phe	Pro	
				20					25					30			
	Gln	Ile	Asn	Gly	Lys	Glu	Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys	Gly	Asn	Ser	Leu	Gly	
			35					40					45				
	Leu	Gln	Pro	Lys	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ile	Asn	Lys	Glu	Leu	Asp	Asn	
		50					55					60					
	Trp	Ala	Lys	Leu	Gly	Val	Asp	Gly	His	Phe	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ala	Trp	
	65					70					75					80	
	Tyr	His	Val	Arg	Lys	Lys	Ser	Lys	Pro	Ala	Leu	Ser	Ala	Ile	Val	Gly	
					85				90						95		
	Ala	His	Glu	His	Glu	Val	Val	Ala	Met	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Asn	Leu	
				100					105					110			
	His	Phe	Leu	Met	Val	Ser	Phe	Tyr	Cys	Pro	Asp	Gln	Thr	Arg	Tyr	Lys	
			115					120					125				
	Ile	Ile	Thr	Glu	Ala	Gly	Ala	Phe	Pro	Ser	Asp	Met	Tyr	Met	Leu	Glu	
		130					135					140					
[0023]	Thr	Gln	Val	Lys	Phe	His	Gly	Leu	Asp	Pro	Glu	Lys	Cys	Ile	Val	Glu	
	145					150					155					160	
	Leu	Ser	Pro	Arg	Ala	Gly	Glu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Ile	Leu	
					165					170					175		
	Met	Ala	Ile	Glu	Ala	Asn	Lys	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Val	Met	Met	Ala	
				180					185					190			
	Gly	Leu	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Gln	Val	Phe	Asp	Met	Lys	Ala	Ile	Thr	
		195						200					205				
	Ala	Ala	Ala	His	Gln	Val	Gly	Ala	Arg	Ala	Gly	Phe	Asp	Leu	Ala	His	
		210					215					220					
	Ala	Val	Gly	Asn	Ala	Lys	Leu	Glu	Leu	His	Asp	Trp	Gly	Val	Asp	Phe	
	225					230					235					240	
	Ala	Thr	Trp	Cys	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	Asn	Ile	
					245					250					255		
	Ser	Gly	Ile	Phe	Val	His	Glu	Arg	His	Ala	Glu	Asn	Gln	Glu	Leu	Pro	
				260					265					270			
	Arg	Phe	Ala	Gly	Trp	Trp	Gly	His	Asp	Glu	Gly	Glu	Arg	Phe	Arg	Met	
			275					280					285				
	Glu	Lys	Gly	Phe	Lys	Pro	Met	Tyr	Gly	Ala	Asp	Gly	Trp	Gln	Leu	Ala	
		290					295					300					

Asn Ser Asn Val Leu Ala Leu Ala Ala His Gln Ala Ser Leu Asp Ile
 305 310 315 320
 Phe Glu Glu Ala Gly Met Asp Arg Leu Arg Ala Lys Ser Glu Leu Leu
 325 330 335
 Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Ile Glu Lys Ile Ser Gly Asp Ser Gly
 340 345 350
 Val Leu Glu Ile Ile Thr Pro Lys Ile Pro Asn Glu Arg Gly Cys Gln
 355 360 365
 Leu Ser Leu Leu Ile His Lys Gly Gly Lys Ser Val Phe Asp Glu Phe
 370 375 380
 Tyr Lys His Gly Val Val Gly Asp Trp Arg Asn Pro Asn Val Ile Arg
 385 390 395 400
 Leu Ala Pro Thr Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Ile Asp Ile Tyr Gln Phe
 405 410 415
 Ala Lys Ile Leu Glu Gln Ser Leu Gln Lys Phe Ala
 420 425
 <210> 19
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> 兽类衣原体 PV3056/3
 [0024]
 <400> 19
 Met Ile Glu Lys Leu Lys Gln Tyr His Asp Glu Ala Ile Ser Leu Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Asp Pro Leu Gln Lys Phe Lys Glu Cys Phe Thr Leu Pro Lys
 20 25 30
 Glu Pro Gly Ala Leu Tyr Phe Cys Ser Asn Ser Leu Gly Leu Pro Ala
 35 40 45
 Lys Ala Ala Ser Gln Lys Leu Glu Glu Gln Leu Gln Arg Trp Ser Glu
 50 55 60
 Leu Gly Ala Arg Gly Trp Phe Glu Gly Glu Gly Asn Trp Tyr Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Glu Glu Ser Ile Val Arg Pro Leu Ser Lys Ile Leu Gly Ala Glu
 85 90 95
 Ser Asn Glu Val Thr Leu Met Asn Ser Leu Thr Val Asn Leu His Met
 100 105 110
 Leu Leu Ile Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Lys Thr Arg Tyr Lys Ile Leu
 115 120 125
 Ile Asp Gly Pro Ala Phe Pro Ser Asp Leu Tyr Ala Ile Lys Ser His
 130 135 140

[0025]

Leu Arg Phe His Lys Lys Glu Glu Gly Leu Ile Leu Ile Glu Pro Arg
 145 150 155 160
 Pro Gly Glu His Leu Val Gln Glu Glu Asp Phe Leu Arg Val Ile Lys
 165 170 175
 Ile Gln Gly Glu Glu Ile Ala Leu Val Phe Leu Asn Cys Val Asn Phe
 180 185 190
 Leu Ser Gly Gln Val Leu Lys Val Asp Glu Ile Thr Arg Tyr Ala Lys
 195 200 205
 Glu Ala Gly Cys Cys Val Gly Tyr Asp Leu Ala His Ala Ala Gly Asn
 210 215 220
 Ile Pro Leu Ser Leu His Asp Leu Gly Gly Asp Phe Ala Val Gly Cys
 225 230 235 240
 Ser Tyr Lys Tyr Leu Cys Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Ala Tyr
 245 250 255
 Val His Ala Ser His His His Gln Gln Phe Val Arg Phe Ser Gly Trp
 260 265 270
 Trp Gly Asn Asp Pro Asn Thr Arg Phe Tyr Phe Pro Lys Glu Phe Val
 275 280 285
 Pro Tyr Gly Gly Ala Ser Ser Trp Gln Val Ser Thr Pro Ser Ile Leu
 290 295 300
 Ala Lys Leu Pro Leu Ile Ala Ala Leu Glu Val Phe Glu Glu Ala Gly
 305 310 315 320
 Met Glu Asn Ile Arg Glu Lys Ser Lys Lys Gln Thr Ala Phe Leu Tyr
 325 330 335
 Thr Leu Leu Glu Asn Ala Arg Gly Thr His Phe Asp Met Ile Thr Pro
 340 345 350
 Lys Glu Pro Glu Leu Arg Gly Cys Gln Leu Ser Leu Arg Ile Lys Cys
 355 360 365
 Ser Arg Ser Glu Glu Ile Leu Arg Lys Leu Glu Arg Leu Gly Ile Thr
 370 375 380
 Cys Asp Phe Arg Ser Pro Asn Ile Leu Arg Val Thr Pro Ser Pro Leu
 385 390 395 400
 Tyr Thr Ser Phe Tyr Glu Ile Tyr Arg Phe Ala Tyr Thr Phe Leu Glu
 405 410 415
 Val Leu Lys Thr Ile
 420
 <210> 20
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Chlamydophila caviae GPIC

<400> 20

Met Asn Glu Ile Leu Lys His Tyr Gln Lys Lys Ala Ala Gln Leu Asp
1 5 10 15

Glu Gln Asp Ser Leu Lys His Leu Arg Ala Arg Phe Ala Leu Pro Lys
20 25 30

Asp Pro Asn Ala Ile Tyr Phe Cys Asn Asn Ser Leu Gly Leu Pro Ala
35 40 45

Val Gly Ala Phe Thr Lys Ile Glu Glu Leu Leu Gln Arg Trp Ser Asp
50 55 60

Val Gly Val Asn Gly Trp Phe Glu Gly Val Gly Asn Trp Tyr Arg Ser
65 70 75 80

Phe Asp Asn Pro Leu Arg Gln Pro Leu Ser Lys Ile Leu Gly Ala Glu
85 90 95

Tyr Glu Glu Val Val Val Met Asn Ser Leu Thr Met Asn Leu His Leu
100 105 110

Leu Leu Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Asp Thr Arg Tyr Lys Ile Leu
115 120 125

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

[0026]

Leu Ser Phe His Gly Lys Asn Pro Asp Asp Ala Leu Ile Ile Leu Glu
145 150 155 160

Pro Arg Ala Gly Glu Asp Leu Leu Arg Tyr Glu Asp Phe Gln Gln Thr
165 170 175

Leu Glu Glu Gln Gly Glu Ser Ile Ala Leu Val Phe Met Asn Cys Val
180 185 190

Asn Phe Leu Thr Gly Gln Val Leu Glu Val Glu Ala Ile Thr Asn Leu
195 200 205

Ala Lys Glu Lys Gly Cys Val Val Gly Cys Asp Leu Ala His Ala Ala
210 215 220

Gly Asn Ile Pro Leu Lys Leu His Glu Trp Gly Val Asp Phe Ala Leu
225 230 235 240

Gly Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Cys Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile
245 250 255

Ala Phe Val His Lys Ser His His Asn Glu Gln Leu Pro Arg Phe Ser
260 265 270

Gly Trp Trp Gly Asn Asp Pro Glu Thr Arg Phe Gln Met Gln Leu Gln
275 280 285

Pro Glu Phe Ile Pro Tyr Ser Gly Ala Tyr Ser Trp Gln Val Ser Thr

	290	295	300
	Pro Ser Ile Val Ser Leu Met Pro Leu Leu Ala Thr Leu Glu Val Phe		
	305	310	315 320
	Glu Glu Ala Gly Met Glu Arg Val Arg His Lys Ser Lys Gln Met Thr		
		325	330 335
	Ala Phe Leu Leu Glu Leu Leu Glu Leu Ala Pro Pro Ser Cys Phe Glu		
		340	345 350
	Ile Ile Thr Pro Arg Asp Pro Glu Leu Arg Gly Ser Gln Leu Ser Ile		
		355	360 365
	Arg Ile Gln Gln His Ser Glu Glu Val Leu Gln Lys Leu Glu Ala Gln		
		370	375 380
	Arg Ile Thr Cys Asp Ser Arg Pro Pro Asp Ile Ile Arg Val Thr Ala		
	385	390	395 400
	Thr Pro Leu Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Ile Tyr Lys Phe Thr Cys Lys		
		405	410 415
	Leu Phe Glu Val Leu Glu Ile Lys Ser		
		420	425
[0027]	<210>	21	
	<211>	425	
	<212>	PRT	
	<213>	珊瑚状珊瑚球菌 DSM 2259	
	<400>	21	
	Met Thr Ala Pro Val Tyr Glu Asn Thr Asp Val Phe Ala Tyr Gly Leu		
	1	5	10 15
	Asp Ala Ala Asp Pro Leu Arg Pro Leu Arg Asp Glu Phe Leu Phe Pro		
		20	25 30
	Pro Ala Pro Ser Gly Ala Pro Ala Ile Tyr Leu Ala Gly Asn Ser Leu		
		35	40 45
	Gly Leu Gln Pro Arg Lys Ala Arg Lys Tyr Val Gln Met Glu Met Glu		
		50	55 60
	Asp Trp Glu Arg Leu Gly Val Glu Gly His Val His Gly Arg His Pro		
	65	70	75 80
	Trp Leu Pro Tyr His Glu Gln Leu Thr Asp Met Val Ala Arg Val Val		
		85	90 95
	Gly Ala Gln Pro Ile Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Ser Val Asn		
		100	105 110
	Leu His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Arg Glu Arg Phe		
		115	120 125
	Lys Ile Leu Ile Glu Gly Gly Ala Phe Pro Ser Asp Gln Tyr Ala Val		
		130	135 140

	Ala Ser Gln Ala Arg Phe His Gly Tyr Asp Pro Lys Glu Ala Ile Val	
	145 150 155 160	
	Arg Leu Met Pro Arg Glu Gly Glu Asp Thr Leu Arg Ser Glu Asp Ile	
	165 170 175	
	Leu Glu Ala Ile Glu Arg His Gly Lys Glu Leu Ala Leu Val Met Leu	
	180 185 190	
	Gly Ser Val Asn Tyr Leu Thr Gly Gln Ala Phe Asp Leu Arg Glu Ile	
	195 200 205	
	Thr Arg Val Ala His Ala Gln Gly Cys Lys Val Gly Phe Asp Leu Ala	
	210 215 220	
	His Ala Ala Gly Asn Leu Lys Leu Ser Leu His Asp Asp Gly Pro Asp	
	225 230 235 240	
	Phe Ala Val Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Gly Gly Pro Gly Ser	
	245 250 255	
	Leu Gly Gly Val Phe Val His Glu Arg His Ala His Ser Pro Gln Leu	
	260 265 270	
	Pro Arg Phe Glu Gly Trp Trp Gly His Asn Lys Ala Thr Arg Phe Glu	
	275 280 285	
[0028]	Met Gly Pro Thr Phe Asp Pro Leu Pro Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu	
	290 295 300	
	Ser Asn Pro Pro Ile Phe Gln Leu Ala Ala Leu Arg Ser Ser Leu Glu	
	305 310 315 320	
	Leu Phe Asp Lys Ala Thr Met Ala Ala Leu Arg Thr Lys Ser Asp Gln	
	325 330 335	
	Leu Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Asp Arg Leu Pro Ala Gly Tyr	
	340 345 350	
	Val Ser Ile Thr Thr Pro Arg Asp Leu Lys Gln Arg Gly Ala Gln Leu	
	355 360 365	
	Ser Leu Arg Phe Lys Gly Glu Pro Lys Arg Leu Leu Gln Arg Leu Ser	
	370 375 380	
	Ala Ala Gly Ile Ile Cys Asp Phe Arg Glu Pro Asp Ile Ile Arg Ala	
	385 390 395 400	
	Ala Pro Thr Pro Leu Tyr Asn Thr Tyr Leu Asp Val Phe Arg Phe Val	
	405 410 415	
	Lys Ala Leu Glu Ala His Ala Leu Glu	
	420 425	
	<210> 22	
	<211> 426	

<212> PRT
 <213> Cyclobacterium marinum DSM 745
 <400> 22
 Met Asp Gln Ile Ala Phe Glu Leu Thr Pro Glu Phe Ala Arg Lys Met
 1 5 10 15
 Asp Leu Ala Asp Pro Leu Ser Thr Tyr Arg Glu Lys Phe Tyr Ile Pro
 20 25 30
 Glu Lys Asn Gly Gln Pro Leu Ile Tyr Phe Cys Gly Asn Ser Leu Gly
 35 40 45
 Leu Gln Pro Arg Ser Val Asn Ala Tyr Leu Lys Gln Glu Leu Glu Lys
 50 55 60
 Trp Ala Asp Lys Gly Val Asp Gly His Phe Glu Gly Lys Val Pro Trp
 65 70 75 80
 Ile Asp Ala Arg Lys Pro Ser Lys Arg Leu Ile Ala Pro Leu Val Gly
 85 90 95
 Ala Asn Glu Gln Glu Val Val Ala Met Asn Ser Leu Ser Val Asn Leu
 100 105 110
 His Leu Leu Met Val Ser Phe Tyr Gln Pro Lys Gly Lys Lys Phe Lys
 115 120 125
 [0029] Ile Leu Thr Glu Ala Gly Ala Phe Pro Ser Asp Gln Tyr Ile Leu Glu
 130 135 140
 Ser Gln Val Lys Phe His Gly Leu Leu Pro Asp Glu Ala Ile Leu Glu
 145 150 155 160
 Met Ala Pro Arg Pro Asn Glu His Leu Leu Arg Thr Glu Asp Ile Leu
 165 170 175
 Gln Lys Ile Glu Asp His Lys Asp Glu Leu Ala Leu Ile Met Leu Ser
 180 185 190
 Gly Leu Gln Tyr Tyr Thr Gly Gln Leu Phe Asp Leu Glu Ala Ile Ser
 195 200 205
 Ser Ala Ala Asn Lys Gln Gly Ile Thr Ile Gly Phe Asp Leu Ala His
 210 215 220
 Ala Ile Gly Asn Val Pro Leu Arg Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe
 225 230 235 240
 Ala Thr Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Asn Val
 245 250 255
 Ser Gly Ile Phe Val His Glu Lys His Ser Asp Asn Ala Leu Leu Pro
 260 265 270
 Arg Phe Ala Gly Trp Trp Gly His Asp Glu Lys Glu Arg Phe Lys Met
 275 280 285

Lys Lys Gly Phe Lys His Met Pro Gly Ala Asp Gly Trp Leu Leu Ser
 290 295 300
 Asn Asp Asn Val Leu Gly Leu Ala Ala His Gln Ala Ser Leu Glu Leu
 305 310 315 320
 Phe Ala Glu Ala Gly Leu Asp Lys Leu Arg Lys Lys Ser Ile Gln Leu
 325 330 335
 Thr Asn Tyr Leu Glu Phe Ala Ile His Glu Thr Ile Lys Asp Ser Glu
 340 345 350
 Leu Leu Glu Ile Ile Thr Pro Leu Lys Pro Thr Glu Arg Gly Cys Gln
 355 360 365
 Leu Ser Leu Leu Ile His Lys Lys Gly Lys Glu Val Phe Asp Tyr Trp
 370 375 380
 Ile Asp Asn Gly Val Val Ala Asp Trp Arg Asn Pro Asn Val Ile Arg
 385 390 395 400
 Leu Ala Pro Thr Pro Met Tyr Asn Thr Phe Gln Asp Val Phe Glu Phe
 405 410 415
 Ser Arg Ile Leu Lys Asn Ser Leu Glu Ala
 420 425

[0030]

<210> 23
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> Cystobacter fuscus
 <400> 23
 Met Ser Gly Glu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Glu Ala Phe Ala Arg
 1 5 10 15
 Arg Met Asp Ala Glu Asp Pro Leu Arg Ser Phe Arg Glu Glu Phe Leu
 20 25 30
 Phe Pro Val His Gly Asp Gly His Glu Leu Tyr Leu Leu Gly Asn Ser
 35 40 45
 Leu Gly Leu Gln Pro Arg Lys Ala Lys Glu Tyr Val Leu Ala Ala Met
 50 55 60
 Glu Asp Trp Ala Arg Leu Gly Val Asp Gly His Phe Lys Gly Ser Pro
 65 70 75 80
 Pro Trp Met Glu Phe His Val Gly Leu Gly Glu Gln Met Ala Arg Val
 85 90 95
 Val Gly Ala Arg Pro Glu Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Thr Val
 100 105 110
 Asn Leu His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Pro Glu Arg
 115 120 125

	Ser	Lys	Ile	Leu	Met	Glu	Ala	Ser	Ala	Phe	Pro	Ser	Asp	Gln	Tyr	Ala	
	130						135					140					
	Val	Ala	Ala	Gln	Val	Arg	His	His	Gly	Tyr	Ser	Pro	Glu	Gln	Thr	Val	
	145					150					155					160	
	Ile	Pro	Leu	Ala	Pro	Arg	Pro	Gly	Glu	His	Thr	Leu	Arg	His	Glu	Asp	
					165					170					175		
	Ile	Leu	Asp	Thr	Leu	Glu	Arg	His	Gly	Lys	Glu	Ile	Ala	Leu	Val	Leu	
				180					185					190			
	Leu	Gly	Asn	Val	Asn	Tyr	Leu	Thr	Gly	Gln	Ala	Phe	Asp	Met	Ala	Ala	
			195					200					205				
	Ile	Thr	Arg	Ala	Ala	His	Gln	Arg	Gly	Cys	Arg	Val	Gly	Phe	Asp	Leu	
	210						215					220					
	Ala	His	Ala	Ala	Gly	Asn	Leu	Arg	Leu	Ser	Leu	His	Glu	Asp	Gly	Pro	
	225					230					235					240	
	Asp	Phe	Ala	Val	Trp	Cys	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Asn	Gly	Gly	Pro	Gly	
					245					250					255		
	Ala	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Ile	His	Glu	Arg	His	Leu	Arg	Asp	Ala	Ser	
				260					265					270			
[0031]	Leu	His	Arg	Leu	Pro	Gly	Trp	Trp	Gly	Asn	Asp	Arg	Gly	Thr	Arg	Phe	
			275					280					285				
	Gln	Met	Lys	Pro	Asp	Phe	Glu	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Trp	Val	
		290					295					300					
	Leu	Ser	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Gln	Met	Ala	Ala	Leu	Arg	Ala	Ser	Leu	
	305					310					315					320	
	Glu	Leu	Phe	Asp	Arg	Ala	Thr	Met	Pro	Ala	Leu	Arg	Ala	Lys	Ser	Glu	
					325					330					335		
	Lys	Leu	Thr	Gly	Tyr	Leu	Glu	Phe	Leu	Ile	Asp	Arg	Leu	Pro	Glu	Gly	
				340					345					350			
	Phe	Val	His	Ser	Leu	Thr	Pro	Arg	Asp	Pro	Gly	Gln	Arg	Gly	Ala	His	
			355					360					365				
	Leu	Ser	Leu	Arg	Phe	Thr	Lys	Asp	Pro	Gln	Arg	Met	Leu	Glu	Thr	Leu	
		370					375					380					
	Arg	Ala	Glu	Gly	Ile	His	Cys	Asp	Phe	Arg	Tyr	Pro	Asp	Ile	Ile	Arg	
	385					390					395					400	
	Ala	Ala	Pro	Val	Pro	Leu	Tyr	Asn	Ser	Phe	Leu	Asp	Val	His	Arg	Phe	
					405					410					415		
	Val	Ser	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Ala	Arg	Gly							
				420					425								

<210> 24
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> *Echinicola vietnamensis* DSM 17526
 <400> 24
 Met Ser Ser Tyr Arg Tyr Ser Leu Ala Phe Ala Gln Glu Arg Asp Arg
 1 5 10 15
 Glu Asp Pro Leu Arg Lys Phe Gln Ser Arg Phe His Phe Pro Lys Val
 20 25 30
 Asn Gly Glu Ala Ala Ile Tyr Phe Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln
 35 40 45
 Pro Lys Ala Val Arg Glu His Leu Asp Arg Asp Leu Glu Ser Trp Ala
 50 55 60
 Ser Lys Ala Val Asp Gly His Phe Glu Gly Asp Ala Pro Trp Phe Ser
 65 70 75 80
 Val His Glu Arg Ser Lys Ala Ala Leu Ala Glu Ile Val Gly Ala Lys
 85 90 95
 Lys His Glu Val Val Ala Met Gly Ser Leu Thr Thr Asn Leu His Ala
 100 105 110
 Leu Leu Val Ser Phe Tyr Gln Pro Asn Gly Lys Arg Asn Lys Ile Leu
 115 120 125
 Thr Glu Ala Gly Ala Phe Pro Ser Asp Met Tyr Ala Leu Glu Ser Gln
 130 135 140
 Val Lys Tyr His Gly Leu Asp Pro Asp Glu Ala Ile Val Glu Val Gly
 145 150 155 160
 Pro Arg Pro Gly Glu His Thr Ile Arg Thr Glu Asp Ile Leu Gln Ala
 165 170 175
 Ile Ser Lys His Gln Asp Glu Leu Ala Cys Val Met Met Ala Gly Leu
 180 185 190
 Gln Tyr Tyr Thr Gly Gln Val Phe Asp Met Lys Ala Ile Ala Ser Ala
 195 200 205
 Ala His Ala Val Gly Ala Thr Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Ala
 210 215 220
 Gly Asn Ala Pro Leu His Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe Ala Ala
 225 230 235 240
 Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Asn Val Ala Gly
 245 250 255
 Ile Phe Val His Glu Arg His Gly Asn Asn Pro Ala Leu Asn Arg Phe
 260 265 270
 Ala Gly Trp Trp Gly His Asp Glu Lys Val Arg Phe Lys Met Glu Lys

[0032]

275	280	285
Gly Phe Val Pro Met Tyr Gly	Ala Asp Gly Trp Gln Asn Ser Asn Gly	
290	295	300
Asn Val Leu Gly Met Ala Ala His Gln Ala Ser Leu Asp Ile Phe Gln		
305	310	315
Glu Ala Gly Met Val His Leu Arg Lys Lys Ser Val Gln Leu Thr Gly		
325	330	335
Phe Leu Ala Phe Leu Ile Arg Glu Ile Ser Gly Glu Ser Gly Val Leu		
340	345	350
Glu Val Ile Thr Pro Asn Ala Glu Ala Glu Arg Gly Cys Gln Leu Ser		
355	360	365
Leu Leu Ile His Lys Gly Gly Lys Ala Val Phe Asp Glu Phe Tyr Gln		
370	375	380
Asn Gly Ile Val Gly Asp Trp Arg Asn Pro Asn Val Ile Arg Ile Ala		
385	390	395
Pro Thr Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Val Phe Arg Phe Ala Lys		
405	410	415
Ile Leu Glu Gln Ser Leu Ser Lys Phe Ala		
420	425	

[0033]

<210> 25
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> 黄杆菌 BBFL7

<400> 25

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

[0034]

Ile Glu Ala Asp Ala Phe Pro Ser Asp Arg Tyr Ala Val Ala Ser Gln
 130 135 140
 Val Gln Phe His Gly His Asp Asp Lys Glu Asn Ile Ile Glu Trp Ala
 145 150 155 160
 Pro Arg Thr Gly Glu His Thr Pro Arg Leu Glu Asp Leu Glu Thr Ile
 165 170 175
 Leu Lys Glu Gln Gly Asp Glu Ile Ala Leu Ile Met Val Gly Ala Val
 180 185 190
 Asn Tyr Tyr Thr Gly Gln Phe Phe Asp Leu Lys Lys Ile Thr Glu Leu
 195 200 205
 Gly His Ala Ala Gly Ala Met Val Gly Phe Asp Cys Ala His Gly Ala
 210 215 220
 Gly Asn Val Asp Leu Gln Leu His Asp Ser Gly Ala Asp Phe Ala Val
 225 230 235 240
 Trp Cys Thr Tyr Lys Tyr Met Asn Ser Gly Pro Gly Ser Leu Gly Gly
 245 250 255
 Cys Phe Val His Glu Arg His Ala Asn Asn Ser Glu Leu Pro Arg Phe
 260 265 270
 Thr Gly Trp Trp Gly His Asn Lys Asp Thr Arg Phe Lys Met Arg Asp
 275 280 285
 Asp Phe Glu Pro Met His Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Asn Pro
 290 295 300
 Pro Ile Leu Ser Met Val Ala Ile Arg Ala Ser Leu Asp Leu Phe Ala
 305 310 315 320
 Gln Ala Gly Phe Glu Asn Leu Arg Lys Lys Ser Ile Gln Leu Thr Asn
 325 330 335
 Tyr Leu Glu Tyr Leu Val Gly Glu Leu Asp Gly Asp Arg Ile Ser Ile
 340 345 350
 Ile Thr Pro Arg Asp Pro Lys Asp Arg Gly Cys Gln Leu Ser Leu Ala
 355 360 365
 Val Lys Asn Ala Asp Lys Ser Leu Phe Asp Ala Ile Thr Ala Lys Gly
 370 375 380
 Val Ile Ala Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Ile Ala Pro Val
 385 390 395 400
 Pro Leu Tyr Asn Asn Tyr Glu Asp Cys Trp Arg Phe Val Asp Val Leu
 405 410 415
 Lys Ser Glu Leu
 420

<210> 26
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Flexibacter litoralis DSM 6794
 <400> 26
 Met Asn Phe Glu Thr Thr Lys Asn Phe Ala Ser Gln Leu Asp Asn Asn
 1 5 10 15
 Asp Ser Leu Ala His Phe Arg Asp Lys Phe Trp Ile Pro Thr Leu Asn
 20 25 30
 Ser Ile Ser Lys Asn Thr Asn Ser Ser Asn Glu Lys Gly Lys Glu Lys
 35 40 45
 Val Val Tyr Phe Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro Lys Thr Thr
 50 55 60
 Lys Ala Tyr Ile Glu Gln Glu Leu Glu Asp Trp Lys Asn Leu Gly Val
 65 70 75 80
 Glu Gly His Phe His Gly Lys Asn Pro Trp Leu Ser Tyr His Lys Leu
 85 90 95
 Leu Thr Asn Gln Thr Ala Lys Ile Val Gly Ala Lys Pro Ile Glu Val
 100 105 110
 Val Val Met Asn Asn Leu Thr Val Asn Leu His Leu Leu Met Val Ser
 115 120 125
 Phe Tyr Arg Pro Asn Gln Lys Arg Phe Lys Ile Leu Met Glu Gly Gly
 130 135 140
 Ala Phe Pro Ser Asp Gln Tyr Ala Ile Glu Ser Gln Val Lys Phe His
 145 150 155 160
 Gly Phe Ser Pro Asp Asp Ala Ile Val Glu Met Met Pro Arg Lys Asn
 165 170 175
 Glu Asn Ser Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Thr Glu Asp Ile Leu Lys
 180 185 190
 Lys Ile Glu Glu Leu Gly Asp Glu Leu Ala Leu Val Met Phe Gly Gly
 195 200 205
 Val Asn Tyr Tyr Thr Gly Gln Phe Phe Asp Leu Glu Lys Ile Thr Gln
 210 215 220
 Ala Ala His Lys Val Gly Ala Thr Ala Gly Phe Asp Leu Ala His Ala
 225 230 235 240
 Ala Gly Asn Val Pro Leu Lys Leu His Asp Trp Lys Val Asp Phe Ala
 245 250 255
 Thr Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Ala Gly Gly Thr Ser
 260 265 270

[0035]

	Gly	Val	Phe	Ile	Asn	Glu	Lys	Tyr	Ala	Asp	Asp	Asp	Ser	Leu	Pro	Arg	
		275						280					285				
	Phe	Ala	Gly	Trp	Trp	Gly	His	Asp	Glu	Lys	Asp	Arg	Phe	Lys	Met	Lys	
		290					295					300					
	Lys	Gly	Phe	Ile	Pro	Met	Arg	Gly	Ala	Glu	Gly	Trp	Gln	Leu	Ser	Asn	
	305					310					315					320	
	Ala	Gln	Ile	Leu	Pro	Met	Ala	Val	His	Lys	Ala	Ser	Leu	Asp	Ile	Phe	
					325					330					335		
	Glu	Glu	Ala	Gly	Phe	Glu	Asn	Leu	Arg	Gln	Lys	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	
			340						345					350			
	Val	Tyr	Met	Glu	Phe	Leu	Ile	Glu	Asn	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Ser	Lys	
		355						360					365				
	Ile	Lys	Ile	Lys	Ile	Ile	Thr	Pro	Lys	Asn	Lys	Leu	Glu	Arg	Gly	Cys	
		370					375					380					
	Gln	Leu	Ser	Leu	Val	Phe	Asp	Lys	Glu	Gly	Lys	Lys	Tyr	His	Glu	Thr	
	385					390					395					400	
	Leu	Thr	Lys	Arg	Gly	Val	Ile	Ser	Asp	Trp	Arg	Glu	Pro	Asn	Val	Ile	
				405						410					415		
[0036]	Arg	Ile	Ala	Pro	Ile	Pro	Leu	Tyr	Asn	Ser	Phe	Met	Asp	Cys	Tyr	Arg	
				420					425					430			
	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	Lys	Glu	Ile	Ala	Val							
		435						440									
	<210>	27															
	<211>	423															
	<212>	PRT															
	<213>	Formosa sp. AK20															
	<400>	27															
	Met	Ser	Asn	Tyr	Lys	Pro	Gly	Leu	Asp	Tyr	Ala	Lys	Glu	Gln	Asp	Gln	
	1				5					10					15		
	Asn	Asp	Ala	Leu	Ser	His	Tyr	Arg	Ser	Gln	Phe	His	Ile	Pro	Lys	Asp	
				20					25					30			
	Asn	Gln	Gly	Asn	Asn	Trp	Leu	Tyr	Phe	Thr	Gly	Asn	Ser	Leu	Gly	Leu	
			35					40					45				
	Gln	Pro	Lys	Ser	Thr	Gln	Lys	Tyr	Ile	Gln	Gln	Glu	Leu	Asp	Asp	Trp	
		50					55					60					
	Ala	Asn	Leu	Gly	Val	Glu	Gly	His	Phe	Glu	Ala	Lys	Asn	Pro	Trp	Met	
	65					70				75						80	
	Pro	Tyr	His	Glu	Phe	Leu	Thr	Asp	Ser	Met	Ala	Lys	Ile	Val	Gly	Ala	
					85					90					95		

[0037]

Lys Pro Ile Glu Val Val Thr Met Asn Thr Leu Thr Thr Asn Leu His
 100 105 110

Leu Leu Met Val Ser Phe Tyr Gln Pro Thr Lys Thr Lys Tyr Lys Ile
 115 120 125

Val Ile Glu Ser Asp Ala Phe Pro Ser Asp Arg Tyr Ala Val Gln Thr
 130 135 140

Gln Leu Glu Phe His Gly Phe Asp Ala Asn Glu Gly Leu Ile Glu Trp
 145 150 155 160

Lys Pro Arg Gln Gly Glu Glu Leu Leu Asn Leu Asp Asp Leu Glu Thr
 165 170 175

Ile Leu Glu Glu Gln Gly Asp Glu Ile Ala Leu Leu Leu Ile Gly Gly
 180 185 190

Val Asn Tyr Tyr Thr Gly Gln Tyr Leu Asp Leu Lys Lys Ile Ala Glu
 195 200 205

Leu Gly His Ala Lys Asn Cys Met Val Gly Ile Asp Leu Ala His Gly
 210 215 220

Ala Gly Asn Ile Lys Pro Glu Leu His Asp Ser Gly Val Asp Phe Ala
 225 230 235 240

Ala Trp Cys Thr Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Ser Leu Gly
 245 250 255

Gly Leu Phe Val His Glu Lys His Ala His Asn Lys Lys Leu Lys Arg
 260 265 270

Phe Ala Gly Trp Trp Ser His Asn Lys Ala Thr Arg Phe Asn Met Arg
 275 280 285

Gln Pro Leu Asp Val Ile Pro Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Asn
 290 295 300

Pro Pro Ile Leu Ser Met Ala Ala Ile Lys Ala Ser Leu Asp Met Phe
 305 310 315 320

Asn Glu Val Gly Met Asp Ala Leu Arg Glu Lys Ser Glu Lys Leu Thr
 325 330 335

Gly Tyr Phe Glu Phe Leu Leu Asn Glu Leu Asn Asn Asp Lys Val Lys
 340 345 350

Ile Ile Thr Pro Ser Asn Pro Lys Glu Arg Gly Cys Gln Leu Ser Ile
 355 360 365

Gln Val Arg Asp Ala Asp Lys Ser Leu His Lys Lys Leu Thr Lys Ala
 370 375 380

His Ile Ile Thr Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Cys Ala Pro
 385 390 395 400

Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Val Tyr Arg Met Val Asp Lys
 405 410 415

 Leu Lys Gln Ile Leu Asn Thr
 420

 <210> 28
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Fulvivirga imtechensis

 <400> 28

 Met Ala Lys Asp Ile Leu His Met Thr Tyr Glu Asn Ser Leu Thr Phe
 1 5 10 15

 Ala Gln Asp Leu Asp Arg Asp Asp Pro Leu Arg His Phe Arg Asn Lys
 20 25 30

 Phe His Ile Pro Gln Leu Asn Asp Lys Asp Val Ile Tyr Phe Thr Gly
 35 40 45

 Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro Lys Asn Thr Arg Val Tyr Ile Glu Glu
 50 55 60

 Glu Leu Glu Gly Trp Ala Thr Leu Gly Val Asp Gly His Phe His Ser
 65 70 75 80

 Gln Lys Arg Pro Trp Phe Tyr Tyr His Lys Phe Ser Lys Glu Ala Leu
 85 90 95

 Ala Lys Ile Val Gly Ala Lys Pro Ser Glu Val Val Ser Met Asn Asn
 100 105 110

 Leu Thr Val Asn Leu His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr
 115 120 125

 Ser Ser Arg Phe Lys Ile Met Ile Glu Ala Gly Ala Phe Pro Ser Asp
 130 135 140

 Gln Tyr Ala Val Glu Ser Gln Ile Lys Phe His Gly Tyr Asn Tyr Glu
 145 150 155 160

 Asp Ala Leu Ile Glu Ile Ser Pro Arg Glu Gly Glu Tyr His Leu Arg
 165 170 175

 Thr Glu Asp Ile Leu Ser Lys Ile Glu Glu Asn Lys Asp Ser Leu Ala
 180 185 190

 Leu Val Leu Phe Gly Gly Val Gln Tyr Tyr Thr Gly Gln Leu Phe Asp
 195 200 205

 Ile Gly Ser Ile Thr Ala Ala Gly His Trp Ala Gly Ala Ile Val Gly
 210 215 220

 Phe Asp Leu Ala His Ala Ala Gly Asn Val Pro Leu Asn Leu His Asn
 225 230 235 240

 Asp Gln Val Asp Phe Ala Ala Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser

[0038]

	245	250	255
	Gly Pro Gly Gly Val Ser Gly Ile Phe Val His Glu Lys His Gly Asp 260 265 270		
	Ala Glu Leu Pro Arg Phe Ala Gly Trp Trp Gly His Asn Glu Ser Glu 275 280 285		
	Arg Phe Lys Met Lys Lys Gly Phe Ile Pro Met Ser Gly Ala Asp Gly 290 295 300		
	Trp Gln Leu Ser Asn Val Asn Ile Leu Ser Ser Ala Ala His Leu Ala 305 310 315 320		
	Ala Leu Glu Ile Tyr Asp Glu Ala Gly Met Glu Ala Leu Arg Gln Lys 325 330 335		
	Ser Ile Arg Leu Thr Gly Phe Met Glu Tyr Leu Leu Asn Gly Phe Asn 340 345 350		
	Leu Gly Asp Asp Val Leu Lys Ile Ile Thr Pro Thr Asp Pro Ala Ala 355 360 365		
	Arg Gly Cys Gln Leu Ser Leu Leu Val Ser Lys Asn Gly Lys Ala Ile 370 375 380		
	Phe Glu His Leu Thr Arg Ser Gly Val Val Ala Asp Trp Arg Glu Pro 385 390 395 400		
[0039]	Asp Val Ile Arg Val Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Thr Phe Glu Asp 405 410 415		
	Val Tyr Asn Phe Cys Glu Ile Leu Lys Lys Val Ile Phe 420 425		
	<210> 29		
	<211> 425		
	<212> PRT		
	<213> Kangiella aquimarina		
	<400> 29		
	Met Thr Asp Ile Phe Ser Ile Asp Tyr Ala Arg Gln Leu Asp Gln Gln 1 5 10 15		
	Asp Pro Ile Ser Arg Met Arg Glu Gln Phe His Ile Pro Lys Gln Asp 20 25 30		
	Asn Gly Asp Asp Glu Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln 35 40 45		
	Pro Lys Arg Thr Gln Glu Tyr Leu Asn Tyr Glu Leu Ser Gln Trp Gln 50 55 60		
	Lys Leu Gly Val Lys Gly His Phe Ser Gly Asp Phe Pro Trp Met Pro 65 70 75 80		
	Tyr His Glu Phe Leu Thr Glu Glu Ser Ala Lys Leu Val Gly Ala Lys 85 90 95		

[0040]

Asn Ser Glu Val Val Cys Met Asn Ser Leu Thr Ala Asn Leu His Phe	100	105	110
Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Ala Thr Arg Asn Lys Ile Leu	115	120	125
Ile Glu Asp His Ala Phe Pro Ser Asp His Tyr Ala Val Glu Ser Gln	130	135	140
Val Arg Tyr His Gly Phe Asp Pro Asp Gln Ala Met Leu Leu Ala Lys	145	150	155
Pro Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Thr Glu Asp Leu Leu Asn Leu	165	170	175
Ile Glu Leu His Gly Glu Glu Ile Ala Leu Ile Met Leu Pro Gly Val	180	185	190
Gln Tyr Tyr Thr Gly Gln Val Leu Asp Met Lys Ala Ile Thr Gln Ala	195	200	205
Gly His Ala Lys Gly Cys Lys Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Thr	210	215	220
Gly Asn Ile Pro Met His Leu His Asp Trp Asp Val Asp Phe Ala Ala	225	230	235
Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Ser Val Ala Gly	245	250	255
Cys Phe Val His Glu Lys His His Thr Asn Met Glu Leu Pro Arg Phe	260	265	270
Ala Gly Trp Trp Gly His Asp Lys Asp Ser Arg Phe Lys Met Glu Asn	275	280	285
His Phe Ile Pro Met Lys Ser Ala Glu Ala Trp Gln Leu Ser Asn Pro	290	295	300
Pro Ile Leu Ser Leu Ala Ala Ile Arg Ala Ser Leu Asp Thr Ile Lys	305	310	315
Asp Ala Gly Gly Ile Gln Ala Leu Arg Asp Lys Ser Leu Lys Leu Ser	325	330	335
Arg Tyr Leu Arg Asp Leu Leu Glu Gln Glu Leu Ala Asp Glu Ile Asn	340	345	350
Ile Leu Thr Pro Ala Asp Glu Lys Ala Ser Gly Cys Gln Leu Ser Leu	355	360	365
Thr Val Asn Leu His Gly Leu Asp Gly Lys Thr Val Phe Asp Arg Ile	370	375	380
Glu Ala Ala Gly Val Thr Cys Asp Phe Arg His Pro Asn Val Ile Arg	385	390	395
			400

Val Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Ala Tyr Arg Phe
405 410 415

Val Thr Ile Leu Lys Asp Ser Leu Lys
420 425

<210> 30

<211> 425

<212> PRT

<213> *Kangiella koreensis* DSM 16069

<400> 30

Met Asn Asn Leu Phe Ser Leu Glu His Ala Gln Gln Leu Asp Gln Gln
1 5 10 15

Asp Pro Leu His His Met Arg Asp Gln Phe His Ile Pro Lys Gln Asp
20 25 30

Asn Gly Asp Asp Glu Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln
35 40 45

Pro Lys Arg Thr Gln Glu Tyr Leu Asn Tyr Glu Leu Asn Gln Trp Gln
50 55 60

Lys Leu Gly Val Lys Gly His Phe Ser Gly Asp Phe Pro Trp Met Pro
65 70 75 80

[0041]

Tyr His Glu Phe Leu Thr Glu Glu Ser Ala Lys Leu Val Gly Ala Lys
85 90 95

Asn Thr Glu Val Val Cys Met Asn Ser Leu Thr Ala Asn Leu His Phe
100 105 110

Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Ser Lys Thr Arg Asn Lys Ile Leu
115 120 125

Ile Glu Asp His Ala Phe Pro Ser Asp His Tyr Ala Val Glu Ser Gln
130 135 140

Ile Arg Phe His Gly Phe Asp Pro Asp Gln Ala Met Leu Leu Ala Lys
145 150 155 160

Pro Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Thr Glu Asp Leu Leu Asn Leu
165 170 175

Ile Glu Met His Gly Asp Glu Ile Ala Leu Ile Met Leu Pro Gly Val
180 185 190

Gln Tyr Tyr Thr Gly Gln Val Leu Asp Met Lys Thr Ile Thr Glu Ala
195 200 205

Gly His Ala Lys Gly Cys Met Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Thr
210 215 220

Gly Asn Ile Pro Met Asn Leu His Asp Trp Asn Val Asp Phe Ala Ala
225 230 235 240

	Trp	Cys	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Val	Ala	Gly	
					245					250						255	
	Cys	Phe	Val	His	Glu	Lys	His	His	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Pro	Arg	Phe	
				260					265						270		
	Ala	Gly	Trp	Trp	Gly	His	Asp	Lys	Glu	Ser	Arg	Phe	Arg	Met	Glu	Asn	
			275					280						285			
	Arg	Phe	Val	Pro	Met	Gln	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gln	Val	Ser	Asn	Pro	
		290					295					300					
	Pro	Ile	Leu	Ser	Leu	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Ser	Leu	Asp	Thr	Val	Lys	
	305					310					315					320	
	Glu	Ala	Gly	Gly	Ile	Asp	Ala	Leu	Arg	Glu	Lys	Ser	Leu	Lys	Leu	Thr	
					325					330					335		
	Arg	Tyr	Leu	Arg	Asp	Leu	Leu	Glu	Gln	Glu	Leu	Ser	Glu	Glu	Ile	Asn	
				340					345						350		
	Ile	Leu	Thr	Pro	Ala	Asp	Asn	Ser	Ala	Ser	Gly	Cys	Gln	Leu	Ser	Leu	
			355					360					365				
	Thr	Val	Asn	Leu	His	Val	Leu	Asp	Gly	Lys	Thr	Val	Phe	Asp	Arg	Ile	
		370						375					380				
[0042]	Glu	Ala	Ala	Gly	Val	Thr	Cys	Asp	Phe	Arg	His	Pro	Asn	Val	Ile	Arg	
	385					390					395					400	
	Val	Ala	Pro	Val	Pro	Leu	Tyr	Asn	Ser	Phe	Glu	Asp	Ala	Tyr	Arg	Phe	
					405					410					415		
	Val	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Ser	Leu	Gln								
				420					425								
	<210>	31															
	<211>	421															
	<212>	PRT															
	<213>	Lacinutrix sp. 5H-3-7-4															
	<400>	31															
	Met	Ser	Asn	Tyr	Thr	Leu	Gly	Arg	Asp	Phe	Ala	Gln	Gln	Leu	Asp	Lys	
	1				5					10					15		
	Glu	Asp	Gln	Leu	Ala	His	Tyr	Arg	Asn	Gln	Phe	His	Ile	Pro	Lys	Asp	
				20					25					30			
	Lys	Asn	Gly	Asp	Asp	Leu	Ile	Tyr	Leu	Cys	Gly	Asn	Ser	Leu	Gly	Leu	
			35					40					45				
	Gln	Pro	Lys	Val	Thr	Lys	Asp	Tyr	Ile	Asn	Gln	Glu	Leu	Glu	Asp	Trp	
		50					55					60					
	Ala	Asn	Leu	Gly	Val	Glu	Gly	His	Thr	Glu	Gly	Lys	Asn	Pro	Trp	Leu	
	65					70					75					80	

	Pro	Tyr	His	Glu	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	Met	Ala	Lys	Val	Val	Gly	Ala	
					85					90					95		
	Lys	Pro	Ile	Glu	Val	Val	Val	Met	Asn	Thr	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	His	
				100					105					110			
	Phe	Met	Met	Val	Ser	Phe	Tyr	Lys	Pro	Thr	Lys	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ile	
			115					120					125				
	Leu	Ile	Glu	Ala	Asp	Ala	Phe	Pro	Ser	Asp	Lys	Tyr	Ala	Val	Glu	Ser	
			130				135					140					
	Gln	Leu	Arg	His	His	Gly	Phe	Asp	Asp	Lys	Glu	Gly	Leu	Val	Leu	Trp	
	145					150					155					160	
	Lys	Ala	Arg	Glu	Gly	Glu	Glu	Leu	Ala	Asn	Tyr	Glu	Asp	Leu	Glu	Ala	
					165					170					175		
	Ile	Leu	Glu	Ala	Gln	Gly	Asp	Glu	Ile	Ala	Leu	Ile	Met	Ile	Gly	Gly	
					180				185					190			
	Val	Asn	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Gln	Phe	Phe	Asp	Phe	Lys	Arg	Ile	Ala	Ala	
			195					200					205				
	Leu	Gly	His	Lys	Asn	Gly	Cys	Met	Val	Gly	Phe	Asp	Cys	Ala	His	Gly	
		210					215					220					
[0043]	Ala	Gly	Asn	Val	Asn	Leu	Asp	Leu	His	Asn	Ser	Gly	Ala	Asp	Phe	Ala	
	225					230					235				240		
	Val	Trp	Cys	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Met	Asn	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser	Leu	Ser	
					245					250					255		
	Gly	Cys	Phe	Val	His	Glu	Arg	His	Ala	His	Asn	Lys	Asp	Leu	Asn	Arg	
				260					265					270			
	Phe	Thr	Gly	Trp	Trp	Ser	His	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg	Phe	Asn	Met	Arg	
			275					280					285				
	Gly	Glu	Phe	Asp	Gln	Leu	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Trp	Gln	Leu	Ser	Asn	
		290					295					300					
	Pro	Pro	Ile	Leu	Ser	Met	Ala	Ala	Ile	Lys	Ala	Ser	Ala	Asp	Ile	Phe	
	305					310					315				320		
	Ala	Glu	Val	Gly	Met	Glu	Lys	Leu	Thr	Gln	Lys	Ser	Lys	Lys	Leu	Thr	
					325					330					335		
	Gly	Tyr	Phe	Glu	Phe	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Asn	Asn	Ser	Asp	Ile	Lys	
				340					345					350			
	Ile	Ile	Thr	Pro	Ser	Asn	Pro	Asn	Glu	Arg	Gly	Cys	Gln	Leu	Ser	Ile	
			355					360					365				
	Gln	Val	Lys	Asn	Ala	Asp	Lys	Ala	Leu	His	His	Lys	Leu	Thr	Glu	Ser	
				370			375					380					

Gly Val Ile Ser Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Cys Ala Pro
 385 390 395 400
 Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Val Tyr Asn Met Val Glu Arg
 405 410 415
 Leu Lys Ala Cys Leu
 420
 <210> 32
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Cecembia lonarensis
 <400> 32
 Met Thr Thr Thr Asp Phe Glu Tyr Thr Glu Asp Phe Ala Lys Arg Met
 1 5 10 15
 Asp Asp Leu Asp Pro Phe Arg His Phe Arg Ser Met Phe His Phe Pro
 20 25 30
 Tyr Val Asn Gly Lys Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Gly Asn Ser Leu Gly
 35 40 45
 Leu Gln Pro Lys Ser Val Arg Glu Tyr Leu Asp Arg Glu Leu Lys Asn
 50 55 60
 Trp Glu Leu Met Ala Val Asp Gly His Phe His Gly Glu Asp Ala Trp
 65 70 75 80
 Tyr His Val Arg Lys Lys Ser Lys Pro Ala Leu Ala Glu Ile Val Gly
 85 90 95
 Ala His Glu His Glu Val Val Ala Met Asn Asn Leu Ser Ser Asn Leu
 100 105 110
 His Phe Leu Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Lys Glu Arg Tyr Lys
 115 120 125
 Ile Ile Thr Glu Ala Gly Ala Phe Pro Ser Asp Met Tyr Met Leu Glu
 130 135 140
 Thr Gln Val Lys Phe His Gly Phe Asp Pro Ala Asp Ala Ile Ile Glu
 145 150 155 160
 Val Ala Pro Arg Pro Gly Glu Tyr Thr Ile Arg Thr Glu Asp Ile Leu
 165 170 175
 Ala Ala Ile Glu Asp Asn Gln Asp Glu Leu Ala Leu Val Met Met Ala
 180 185 190
 Gly Leu Gln Tyr Tyr Thr Gly Gln Val Phe Asp Met Glu Ala Ile Thr
 195 200 205
 Lys Ala Gly His Gly Ile Gly Val Pro Val Gly Phe Asp Leu Ala His
 210 215 220
 Ala Ala Gly Asn Ile Pro Leu Arg Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe

[0044]

225	230	235	240
Ala Ala Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Asn Ile	245	250	255
Ser Gly Ile Phe Val His Glu Arg His Ala Asp Asn Thr Glu Leu Pro	260	265	270
Arg Phe Gly Gly Trp Trp Gly His Asp Glu Ala Ile Arg Phe Lys Met	275	280	285
Glu Lys Gly Phe Glu Pro Met Tyr Gly Ala Asp Gly Trp Gln Leu Ala	290	295	300
Asn Ser Asn Val Leu Ala Leu Ala Val His Gln Ala Ser Leu Asp Ile	305	310	315
Phe Gln Glu Ala Gly Met Glu Arg Leu Arg Thr Lys Ser Glu Leu Leu	325	330	335
Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Ile Arg Lys Val Gly Phe Ala Asn Gly	340	345	350
Val Leu Glu Ile Ile Thr Pro Asn Asn Pro Lys Glu Arg Gly Cys Gln	355	360	365
Leu Ser Leu Leu Val His Lys Gly Gly Lys Leu Val Phe Asp His Leu	370	375	380
Tyr Ala Asn Gly Val Val Gly Asp Trp Arg His Pro Asn Val Ile Arg	385	390	395
Val Ala Pro Thr Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Thr Asp Val Phe Arg Phe	405	410	415
Ala Lys Ile Leu Glu His Ser Leu Gln Lys Phe Ala	420	425	
<210> 33			
<211> 429			
<212> PRT			
<213> Mucilaginibacter paludis			
<400> 33			
Met Asn Tyr Gln Asn Thr Leu Ala Phe Ala Arg Glu Leu Asp Glu Gln	1	5	10
Asp Asn Leu Ala Gly Phe Arg Asn Glu Phe Ile Ile Pro Gln His His	20	25	30
Gly Arg Asp Met Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro	35	40	45
Lys Ala Thr Ala Gly Val Ile Ala Glu Gln Leu Ser Asn Trp Gly Ser	50	55	60
Leu Ala Val Glu Gly Trp Phe Glu Gly Asp Ser Pro Trp Met His Tyr	65	70	75
			80

[0045]

	His	Lys	Lys	Leu	Thr	Glu	Pro	Leu	Ala	Ala	Ile	Val	Gly	Ala	Leu	Asn	
					85					90						95	
	Thr	Glu	Val	Val	Ala	Met	Asn	Thr	Leu	Thr	Val	Asn	Leu	His	Phe	Leu	
				100					105					110			
	Leu	Val	Ser	Phe	Tyr	Arg	Pro	Thr	Ala	Lys	Lys	Tyr	Lys	Ile	Leu	Met	
			115					120					125				
	Glu	Gly	Gly	Ala	Phe	Pro	Ser	Asp	Gln	Tyr	Ala	Ile	Glu	Ser	Gln	Val	
		130					135					140					
	His	Phe	His	Gly	Tyr	Gln	Pro	Asp	Asp	Ala	Ile	Ile	Glu	Val	Phe	Pro	
	145					150				155						160	
	Arg	Ala	Gly	Glu	Asp	Thr	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Ile	Ile	Arg	Thr	Ile	
				165						170					175		
	His	Asp	His	Ala	Asp	Asp	Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Phe	Gly	Gly	Ile	Asn	
				180					185					190			
	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Gln	Phe	Tyr	Asp	Leu	Glu	Gln	Ile	Thr	Gln	Ala	Ala	
		195						200					205				
	His	Gln	Val	Gly	Ala	Tyr	Ala	Gly	Phe	Asp	Leu	Ala	His	Ala	Ala	Gly	
		210					215					220					
[0046]	Asn	Val	Pro	Leu	Gln	Leu	His	His	Trp	Gln	Val	Asp	Phe	Ala	Cys	Trp	
	225					230					235					240	
	Cys	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Met	Asn	Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	Ile	Ser	Gly	Ala	
				245						250					255		
	Phe	Ile	His	Glu	Lys	His	Phe	Gly	Asn	Lys	Glu	Leu	Asn	Arg	Phe	Ala	
				260					265					270			
	Gly	Trp	Trp	Gly	Tyr	Arg	Glu	Asp	Lys	Arg	Phe	Glu	Met	Lys	Pro	Gly	
		275						280					285				
	Phe	Lys	Pro	Gln	Glu	Gly	Ala	Glu	Gly	Trp	Gln	Val	Ser	Cys	Ser	Pro	
		290					295					300					
	Leu	Leu	Leu	Met	Ala	Ala	His	Lys	Ala	Ser	Leu	Asn	Val	Phe	Glu	Lys	
	305					310					315					320	
	Ala	Gly	Tyr	Ile	Glu	Pro	Leu	Arg	Lys	Lys	Ser	Lys	Leu	Leu	Thr	Gly	
				325						330					335		
	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Leu	Ile	Glu	Gly	Ile	Asn	Thr	Ala	His	Gln	Lys	Gln	
			340						345					350			
	Leu	Phe	Lys	Ile	Ile	Thr	Pro	Lys	Asn	Glu	Asn	Glu	Arg	Gly	Cys	Gln	
			355					360					365				
	Leu	Ser	Ile	Val	Cys	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Ile	Phe	Asp	Gln	Leu	Val	
		370					375					380					

Glu Gly Gly Val Leu Gly Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Leu
 385 390 395 400
 Ser Pro Ile Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Val Tyr Leu Ala Gly
 405 410 415
 Lys Leu Leu Ala Gly Ser Val Thr Gln Phe Phe Ala Glu
 420 425
 <210> 34
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> 拟香味类香味菌(Myroides odoratimimus)
 <400> 34
 Met Ser Phe Glu Asn Thr Leu Ala Tyr Ala Lys Ser Leu Asp Glu Lys
 1 5 10 15
 Asp Pro Leu Ala Lys Tyr Arg Asp Glu Phe Asn Phe Pro Glu Val Asn
 20 25 30
 Gly Lys Gln Val Ile Tyr Phe Thr Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro
 35 40 45
 Lys Arg Ala Val Glu Tyr Val Asn Glu Val Met Asn Asp Trp Gly Ala
 50 55 60
 [0047] Leu Ala Val Glu Gly His Phe Tyr Ala Glu Lys Pro Trp Trp Asp Tyr
 65 70 75 80
 His Glu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Ser Arg Ile Val Gly Ala Lys Ser
 85 90 95
 Ser Glu Ile Thr Val Met Asn Thr Leu Thr Val Asn Leu His Leu Leu
 100 105 110
 Met Thr Thr Phe Tyr Arg Pro Thr Ala Ser Lys Tyr Lys Ile Ile Cys
 115 120 125
 Glu Glu Lys Ala Phe Pro Ser Asp Gln Tyr Leu Ile Gln Ser Gln Val
 130 135 140
 Arg Leu His Gly Leu Asp Pro Lys Glu Ala Ile Ile Glu Leu Lys Lys
 145 150 155 160
 Arg Pro Gly Glu His Asn Phe Arg Leu Glu Asp Ile Leu Glu Lys Ile
 165 170 175
 Asp Glu Val Gly Glu Glu Val Ala Leu Val Leu Ile Gly Gly Leu Asn
 180 185 190
 Tyr Tyr Thr Gly Gln Val Phe Asp Ile Gln Thr Ile Thr Ala His Ala
 195 200 205
 His Gln Tyr Gly Ala Lys Val Gly Trp Asp Leu Ala His Ala Ala Gly
 210 215 220

Asn Ile Glu Leu Lys Leu His Glu Trp Asn Val Asp Phe Ala Ala Trp
 225 230 235 240
 Cys Ser Tyr Lys Tyr Met Asn Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Gly Cys
 245 250 255
 Phe Ile His Glu Arg Tyr His Thr Asp Lys Asp Leu Val Arg Leu Ala
 260 265 270
 Gly Trp Trp Gly His Asn Lys Glu Arg Arg Phe Leu Met Glu Lys Lys
 275 280 285
 Phe Asp Ala Val Glu Ser Ala His Gly Trp Gln Ile Ser Asn Pro Ser
 290 295 300
 Ile Leu Ser Leu Ala Pro Tyr Leu Ala Ser Ile Glu Met Phe Asp Glu
 305 310 315 320
 Val Gly Met Glu Ala Leu Ile Thr Lys Gln Arg Lys Ile Thr Ala Tyr
 325 330 335
 Leu Glu Phe Val Met Glu Asp Val Ala Lys Ala Val Asn Ala Asn Tyr
 340 345 350
 Glu Leu Ile Thr Pro Lys Glu Glu Ser Glu Arg Gly Ser Gln Leu Ser
 355 360 365
 [0048] Val Phe Leu His Gly Lys Gly Lys Asp Leu Phe Ser Tyr Leu Met Asn
 370 375 380
 Glu Gly Val Ile Val Asp Trp Arg Glu Pro Asn Val Val Arg Leu Ala
 385 390 395 400
 Pro Val Pro Phe Tyr Thr Ser Tyr Glu Asp Ile Tyr Arg Phe Gly Glu
 405 410 415
 Ile Leu Lys Lys Ala Asp Ser Leu Phe
 420 425
 <210> 35
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> 橙色粘球菌HW-1(Myxococcus fulvus HW-1)
 <400> 35
 Met Thr Thr Pro His Ala Phe Glu Asp Thr Glu Ala Phe Ala His Thr
 1 5 10 15
 Leu Asp Ala Glu Asp Ala Leu Arg Gly Tyr Arg Asp Ala Phe His Phe
 20 25 30
 Pro Pro Gly Pro Asp Gly Lys Pro Val Val Tyr Leu Ala Gly Asn Ser
 35 40 45
 Leu Gly Leu Gln Pro Arg Asn Ala Ala Arg Tyr Ile Gln Glu Glu Leu
 50 55 60

	Glu Asp Trp Ala Arg	Leu Gly Val Glu Gly His His His Gly Arg His	65	70	75	80
	Pro Trp Leu His Tyr His Glu Leu Val Thr Glu Gln Ala Ala Arg Leu		85	90	95	
	Val Gly Ala Lys Pro Leu Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Ser Val		100	105	110	
	Asn Leu His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Lys Gln Arg		115	120	125	
	Phe Lys Ile Leu Val Glu Ala Gly Ala Phe Pro Ser Asp Gln Tyr Ala		130	135	140	
	Val Ala Ser Gln Val Arg Phe His Gly His Asp Ala Arg Glu Ala Val		145	150	155	160
	Leu Glu Leu Lys Pro Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Thr Glu Asp		165	170	175	
	Ile Leu Asp Thr Leu Glu Arg His Gly His Glu Val Ala Leu Val Met		180	185	190	
	Leu Gly Ser Val Asn Tyr Leu Thr Gly Gln Ala Phe Asp Leu Ala Ala		195	200	205	
[0049]	Ile Thr Lys Ala Ala His Ala Lys Gly Cys Leu Val Gly Phe Asp Leu		210	215	220	
	Ala His Gly Ala Gly Asn Leu Lys Leu Ser Leu His Asp Asp Gly Pro		225	230	235	240
	Asp Phe Ala Val Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ala Gly Pro Gly		245	250	255	
	Ala Leu Gly Gly Val Phe Val His Glu Arg His Ala His Thr Lys Asp		260	265	270	
	Leu Pro Arg Phe Glu Gly Trp Trp Gly His Asp Lys Gln Thr Arg Phe		275	280	285	
	Gln Met Gly Pro Thr Phe His Ala Leu Pro Gly Ala Glu Gly Trp Gln		290	295	300	
	Leu Ser Asn Pro Pro Ile Phe Gln Leu Ala Ala Leu Arg Ala Ser Leu		305	310	315	320
	Glu Leu Phe Asp Gln Ala Gly Met Ala Ala Leu Arg Ala Lys Ser Glu		325	330	335	
	Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Asp Lys Leu Pro Gln Gly		340	345	350	
	Phe Val Arg Ile Thr Thr Pro Arg Asp Val Lys Gln Arg Gly Ala Gln		355	360	365	

Leu Ser Leu Arg Phe Arg Gly Glu Pro Gln Gly Leu Leu Lys Arg Met
 370 375 380
 Gly Asp Ala Gly Ile Val Cys Asp Phe Arg Lys Pro Asp Ile Ile Arg
 385 390 395 400
 Ala Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Thr Asp Val Tyr Arg Phe
 405 410 415
 Val Lys Ala Leu Glu Gly Tyr Ala Arg Glu
 420 425
 <210> 36
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Myxococcus stipitatus DSM 14675
 <400> 36
 Met Thr Thr His Ser Phe Glu Asp Thr Glu Asp Phe Ala Arg Arg Ala
 1 5 10 15
 Asp Glu Ala Asp Ala Leu Arg Ser Phe Arg Asp Ala Phe His Phe Pro
 20 25 30
 Pro Gly Thr Asp Gly Lys Pro Leu Val Tyr Leu Ala Gly Asn Ser Leu
 35 40 45
 Gly Leu Gln Pro Lys Asn Ala Ala Arg Tyr Val Gln Glu Glu Leu Glu
 50 55 60
 Asp Trp Ala Arg Phe Gly Val Glu Gly His His His Gly Arg His Pro
 65 70 75 80
 Trp Leu His Tyr His Glu Leu Val Thr Glu Gln Ala Ala Arg Leu Val
 85 90 95
 Gly Ala Lys Pro Gln Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Thr Val Asn
 100 105 110
 Leu His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Lys Thr Arg Phe
 115 120 125
 Lys Ile Leu Val Glu Gly Gly Ala Phe Pro Ser Asp Gln Tyr Ala Val
 130 135 140
 Ala Ser Gln Ala Arg Phe His Gly Tyr Asp Pro Arg Glu Ala Ile Leu
 145 150 155 160
 Glu Leu Lys Pro Arg Pro Gly Glu Glu Thr Leu Arg Thr Glu Asp Ile
 165 170 175
 Leu Ala Thr Leu Asp Gln His Gly His Glu Val Ala Leu Val Met Leu
 180 185 190
 Gly Ser Val Asn Tyr Leu Thr Gly Gln Ala Phe Asp Ile Pro Ala Ile
 195 200 205
 Thr Lys Thr Ala His Ala Lys Gly Cys Phe Val Gly Phe Asp Leu Ala

[0050]

210	215	220
His Gly Ala Gly Asn 225	Leu Lys Leu Ala Leu 230	His Asp Asp Gly Pro Asp 235 240
Phe Ala Val Trp 245	Cys Ser Tyr Lys Tyr 250	Leu Asn Gly Gly Pro Gly Ala 255
Leu Ala Gly Val 260	Phe Val His Glu Arg 265	His Ala Arg Ser Lys Asp Ile 270
Pro Arg Phe Glu Gly Trp Trp 275	Gly His Asp Lys Ala Thr 280 285	Arg Phe Gln
Met Gly Pro Thr Phe Asp 290	Pro Leu Pro Gly Ala 295 300	Glu Gly Trp Gln Leu
Ser Asn Pro Pro Ile 305	Leu Gln Leu Ala Ala 310 315	Leu Arg Ala Ser Phe Glu 320
Leu Phe Asp Gln 325	Ala Gly Met Glu Ala 330	Leu Arg Ala Lys Ser Glu Lys 335
Leu Thr Gly Tyr 340	Leu Glu Phe Leu 345	Leu Glu Lys Leu Pro Pro Gly Phe 350
Val Arg Ile Ile Thr Pro Arg 355	Asp Val Lys Gln Arg 360 365	Gly Ala Gln Leu
Ser Leu Arg Phe Lys Gly 370	Glu Ala Gln Gly Met 375 380	Leu Lys Arg Leu Ser
Asp Ala Gly Ile Ile Cys Asp Phe Arg Lys 385 390	Pro Asp Ile Ile Arg Ala 395 400	
Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Cys Ser Phe Thr Asp Val Tyr Arg Phe Val 405 410 415		
Arg Thr Leu Glu Ala His Ala Arg Asp 420 425		
<210> 37		
<211> 426		
<212> PRT		
<213> 黄色黏球菌 DK 1622 (Myxococcus xanthus DK 1622)		
<400> 37		
Met Thr Thr Pro Tyr Leu Phe Glu Asp Ser Glu Ser Phe Ala Arg Lys 1 5 10 15		
Leu Asp Ala Glu Asp Ala Leu Arg Gly Tyr Arg Asp Ala Phe His Phe 20 25 30		
Pro Pro Gly Pro Asp Gly Lys Pro Val Val Tyr Leu Ala Gly Asn Ser 35 40 45		
Leu Gly Leu Gln Pro Arg Asn Ala Ala Arg Tyr Ile Gln Glu Glu Leu 50 55 60		

[0051]

[0052]

Glu Asp Trp Ala Arg Leu Gly Val Glu Gly His His His Gly Arg His
 65 70 75 80

Pro Trp Leu His Tyr His Glu Leu Val Thr Glu His Ala Ala Arg Leu
 85 90 95

Val Gly Ala Lys Pro Leu Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Ser Val
 100 105 110

Asn Leu His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Lys Gln Arg
 115 120 125

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

Val Ala Ser Gln Val Arg Phe His Gly Tyr Asp Ala Arg Glu Ala Val
 145 150 155 160

Leu Glu Leu Lys Pro Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Thr Glu Asp
 165 170 175

Ile Leu Glu Thr Ile Glu Arg His Gly His Glu Val Ala Leu Val Met
 180 185 190

Leu Gly Ser Val Asn Tyr Leu Thr Gly Gln Ala Phe Asp Leu Ala Ala
 195 200 205

Ile Thr Lys Ala Ala His Ala Lys Gly Cys Phe Val Gly Phe Asp Leu
 210 215 220

Ala His Gly Ala Gly Asn Leu Arg Leu Ser Leu His Asp Asp Gly Pro
 225 230 235 240

Asp Phe Ala Val Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ala Gly Pro Gly
 245 250 255

Ala Leu Gly Gly Val Phe Val His Glu Arg His Ala His Thr Lys Asp
 260 265 270

Leu Pro Arg Phe Glu Gly Trp Trp Gly His Asp Lys Gln Thr Arg Phe
 275 280 285

Gln Met Gly Pro Thr Phe Ser Ala Leu Pro Gly Ala Glu Gly Trp Gln
 290 295 300

Leu Ser Asn Pro Pro Ile Phe Gln Leu Ala Ala Leu Arg Ala Ser Leu
 305 310 315 320

Glu Leu Phe Asp Gln Ala Gly Met Ala Ala Leu Arg Ala Lys Ser Glu
 325 330 335

Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Asp Arg Leu Pro Glu Gly
 340 345 350

Phe Val Arg Ile Thr Thr Pro Arg Asp Val Lys Gln Arg Gly Ala Gln
 355 360 365

Leu Ser Leu Arg Phe Arg Gly Glu Pro Gln Gly Leu Leu Lys Arg Leu
 370 375 380

Gly Asp Ala Gly Ile Ile Cys Asp Phe Arg Lys Pro Asp Ile Ile Arg
 385 390 395 400

Ala Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Thr Asp Val Tyr Arg Phe
 405 410 415

Val Lys Thr Leu Glu Gly His Ala Arg Glu
 420 425

<210> 38
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Nafulsella turpanensis

<400> 38

Met Ile Asn Gln Tyr Gln Ser Asn Gln Ala Tyr Ala Arg Glu Gln Asp
 1 5 10 15

Ala Arg Asp Pro Leu Arg Gln Phe Arg Glu Gln Phe Ile Ile Pro Pro
 20 25 30

Ala Lys Ser Gly Gly Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Gly Asn Ser Leu Gly
 35 40 45

[0053] Leu Gln Pro Lys Asn Thr Arg Ser Tyr Leu Asp Arg Glu Leu Glu Lys
 50 55 60

Trp Ala Thr Tyr Ala Val Asp Gly His Phe His Ala Pro Glu Pro Trp
 65 70 75 80

Leu His Tyr His Arg Leu Leu Lys Glu Pro Leu Ala Arg Ile Val Gly
 85 90 95

Ala Lys Pro Glu Glu Val Val Val Met Asn Asn Leu Ser Ser Asn Leu
 100 105 110

His Phe Leu Met Val Ser Phe Tyr Gln Pro Thr Thr Lys Arg Tyr Lys
 115 120 125

Val Leu Met Glu Gly Gly Ala Phe Pro Ser Asp Gln Tyr Ala Val Glu
 130 135 140

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

Val Phe Pro Arg Glu Gly Glu Gln Thr Leu Arg Thr Glu Asp Ile Leu
 165 170 175

Ala Ala Ile Glu Gln His Gln Asp Glu Leu Ala Leu Val Leu Phe Ala
 180 185 190

Gly Leu Gln Tyr Tyr Thr Gly Gln Val Phe Asp Met Ala Ala Ile Thr
 195 200 205

Lys	Ala	Gly	Gln	Ala	Ala	Gly	Ala	Lys	Val	Gly	Phe	Asp	Leu	Ala	His	
210						215					220					
Ala	Ala	Gly	Asn	Val	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Asp	Trp	Gly	Val	Asp	Phe	
225					230					235					240	
Ala	Ala	Trp	Cys	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Asn	
				245					250						255	
Ser	Gly	Ile	Phe	Val	His	Glu	Arg	Tyr	Ala	Asn	Gln	Ala	Glu	Leu	Pro	
			260					265						270		
Arg	Phe	Ala	Gly	Trp	Trp	Gly	His	Asp	Glu	Lys	Glu	Arg	Phe	Leu	Met	
		275					280						285			
Gln	Lys	Gly	Phe	Lys	Pro	Met	Tyr	Gly	Ala	Asp	Gly	Trp	Gln	Leu	Ser	
	290					295					300					
Asn	Gly	Asn	Ile	Leu	Pro	Leu	Ala	Ala	Gln	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Ile	
305					310					315					320	
Phe	Glu	Gln	Ala	Gly	Met	Asp	Asn	Leu	Arg	Gln	Lys	Ser	Ile	Gln	Leu	
				325					330						335	
Thr	Gly	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Leu	Ile	Arg	Glu	Glu	Val	Ser	Ser	Lys	Ala	
			340					345						350		
[0054]	Asn	Arg	Leu	Gln	Ile	Ile	Thr	Pro	Ser	Gln	Pro	Glu	Glu	Arg	Gly	Cys
			355					360					365			
Gln	Leu	Ser	Leu	Phe	Val	Glu	Lys	Asn	Gly	Lys	Gln	Leu	Phe	Glu	Gln	
	370					375					380					
Ile	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Asp	Trp	Arg	Glu	Pro	Asn	Val	Ile	
385					390					395					400	
Arg	Val	Ala	Pro	Thr	Pro	Leu	Tyr	Asn	Thr	Phe	Thr	Asp	Val	Phe	Gln	
				405					410					415		
Phe	Ala	Gln	Leu	Leu	Lys	Lys	Ala	Ile	Lys	Glu	Gln					
			420					425								
<210>	39															
<211>	428															
<212>	PRT															
<213>	Niastella koreensis GR20-10															
<400>	39															
Met	Ile	Phe	Glu	Asn	Ser	His	Ser	Phe	Ala	Tyr	Val	Leu	Asp	Glu	Gln	
1				5					10					15		
Asp	Glu	Leu	Arg	Ser	Phe	Arg	Glu	Gln	Phe	Ile	Met	Pro	Val	Ile	Asp	
			20					25					30			
Gly	Lys	Gln	Gln	Ile	Tyr	Phe	Leu	Gly	Asn	Ser	Leu	Gly	Leu	Gln	Pro	
		35					40					45				

	Lys	Arg	Thr	Asn	Asp	Tyr	Leu	Gln	Gln	Val	Leu	Asn	Lys	Trp	Ala	Asn	
	50						55					60					
	Tyr	Gly	Val	Glu	Gly	Phe	Phe	Met	Gly	Glu	Gln	Pro	Trp	Leu	Gln	Tyr	
	65					70					75					80	
	His	Asp	His	Leu	Thr	Lys	Pro	Leu	Ser	Thr	Ile	Val	Gly	Ala	Leu	Pro	
					85					90					95		
	His	Glu	Val	Val	Ala	Met	Asn	Gln	Leu	Thr	Val	Asn	Leu	His	Leu	Leu	
				100					105					110			
	Leu	Val	Ser	Phe	Tyr	Asn	Pro	His	Gly	Lys	Arg	Asn	Lys	Ile	Ile	Cys	
			115					120					125				
	Glu	Ala	Lys	Ala	Phe	Pro	Ser	Asp	Gln	Tyr	Met	Leu	Glu	Thr	His	Val	
		130						135					140				
	Lys	Tyr	Cys	Gly	Phe	Asn	Pro	Asp	Asp	Val	Ile	Val	Glu	Val	Gly	Pro	
	145					150					155					160	
	Arg	Lys	Gly	Glu	His	Thr	Ile	Arg	His	Glu	Asp	Ile	Leu	Gln	Ala	Ile	
					165					170						175	
	Gln	Gln	His	Lys	Asp	Glu	Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Trp	Gly	Gly	Met	Asn	
				180					185						190		
[0055]	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Gln	Leu	Phe	Asp	Met	Ala	Ala	Ile	Thr	Lys	Ala	Ala	
			195					200					205				
	Gln	Ala	Val	Gly	Ala	Lys	Val	Gly	Phe	Asp	Leu	Ala	His	Ala	Ala	Gly	
		210					215					220					
	Asn	Val	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Asn	Trp	Asn	Val	Asp	Phe	Ala	Ala	Trp	
	225					230					235					240	
	Cys	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Met	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	Gly	Ile	Gly	Gly	Ala	
					245					250					255		
	Tyr	Ile	His	Glu	Arg	Tyr	His	Asn	Asp	Thr	Ser	Leu	Pro	Arg	Phe	Ala	
				260					265					270			
	Gly	Trp	Trp	Gly	Tyr	Asp	Lys	Ala	Thr	Arg	Phe	Leu	Met	Gln	Lys	Gly	
			275					280					285				
	Phe	Asn	Ala	Thr	Arg	Ser	Ala	Glu	Gly	Trp	Gln	Leu	Ser	Thr	Pro	Ser	
		290					295					300					
	Pro	Leu	Leu	Tyr	Ala	Ala	His	Arg	Ala	Ala	Leu	Asp	Leu	Phe	Met	Glu	
	305					310					315					320	
	Ala	Gly	Phe	Asn	Arg	Leu	Gln	Asn	Lys	Arg	Gln	Leu	Leu	Asn	Lys	Trp	
					325					330					335		
	Leu	Trp	Phe	Leu	Leu	Asp	Asp	Leu	Asn	Asn	Ala	Gln	Thr	Glu	Pro	Val	
				340					345					350			

Val Glu Phe Ile Thr Pro Arg Asn Glu Ala Glu Arg Gly Cys Gln Val
 355 360 365
 Ser Met Leu Met Leu Gln Gln Gly Lys Gln Val Phe Asp Glu Leu Ala
 370 375 380
 Arg Ala Gly Val Ile Val Asp Trp Arg Glu Pro Asn Val Ile Arg Leu
 385 390 395 400
 Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Glu Val Trp Gln Phe Thr
 405 410 415
 Asn Ile Leu Arg Gln Ile Leu Gln Leu Gln His Ala
 420 425
 <210> 40
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> Nonlabens dokdonensis DSW-6
 <400> 40
 Met Asn Phe Lys Thr Asp His Asn Phe Ala Ile Glu Leu Asn Lys Ser
 1 5 10 15
 Asp Ser Leu Ser Arg Phe Arg Glu Ser Phe His Ile Pro Lys His Thr
 20 25 30
 Asp Gly Thr Asp Ser Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln
 35 40 45
 Pro Arg Gln Thr Lys Thr Phe Leu Asn Gln Glu Leu Asp Asp Trp Ala
 50 55 60
 Arg Leu Gly Val Glu Gly His Phe His Ala Ala His Pro Trp Met Pro
 65 70 75 80
 Tyr His Glu Phe Leu Thr Glu Thr Thr Ala Gln Ile Val Gly Ala Lys
 85 90 95
 Pro His Glu Val Val Ile Met Asn Thr Leu Thr Thr Asn Leu His Leu
 100 105 110
 Met Met Val Ser Phe Tyr Gln Pro Lys Gly Lys Arg Thr Lys Ile Ile
 115 120 125
 Ile Glu Ala Asp Ala Phe Pro Ser Asp Arg Tyr Ala Val Ala Ser Gln
 130 135 140
 Val Lys Phe His Gly His Asp Asp Lys Glu Asn Ile Ile Glu Trp Ser
 145 150 155 160
 Pro Arg Ala Gly Glu His Thr Pro Arg Ile Glu Asp Leu Glu Asn Leu
 165 170 175
 Leu Lys Glu Gln Gly Asp Glu Ile Ala Leu Ile Met Val Gly Ala Val
 180 185 190
 Asn Tyr Tyr Thr Gly Gln Phe Phe Asp Leu Lys Lys Ile Thr Glu Leu

[0056]

195	200	205
Gly His Ala Ala Gly	Ala Met Val Gly Phe Asp	Cys Ala His Gly Ala
210	215	220
Gly Asn Val Asp Leu Gln	Leu His Asn Ser Gly	Ala Asp Phe Ala Val
225	230	235 240
Trp Cys Thr Tyr Lys	Tyr Met Asn Ser Gly	Pro Gly Ser Leu Gly Gly
245	250	255
Cys Phe Val His Glu Arg	His Ala Ser Asn Ser Asp	Leu Pro Arg Phe
260	265	270
Thr Gly Trp Trp Gly His	Asn Lys Asp Thr Arg Phe	Lys Met Arg Asp
275	280	285
Asp Phe Glu Pro Met His	Gly Ala Glu Gly Trp	Gln Leu Ser Asn Pro
290	295	300
Pro Ile Leu Ser Met Val	Ala Ile Arg Ala Ser	Leu Asp Leu Phe Ala
305	310	315 320
Gln Ala Gly Phe Glu Asn	Leu Arg Gln Lys Ser	Ile Gln Leu Thr Asn
325	330	335
Tyr Leu Glu Tyr Leu Leu	Ser Asn Leu Glu Gly Asp	Arg Ile Ser Ile
340	345	350
Ile Thr Pro Glu Asn Pro	Lys Asp Arg Gly Cys	Gln Leu Ser Leu Ala
355	360	365
Val Lys Asn Ala Asp Lys	Ser Leu Phe Asp Ala	Ile Thr Glu Lys Gly
370	375	380
Val Ile Ala Asp Trp Arg	Glu Pro Asp Val Ile	Arg Ile Ala Pro Val
385	390	395 400
Pro Leu Tyr Asn Asn Tyr	Glu Asp Cys Trp Arg	Phe Val Asp Val Leu
405	410	415
Lys Ser Glu Leu		
420		
<210>	41	
<211>	431	
<212>	PRT	
<213>	Pedobacter agri	
<400>	41	
Met Lys Leu Glu Asn Thr	Leu Ala Phe Ala Lys	Glu Gln Asp Glu Lys
1	5	10 15
Asp Glu Leu Lys His Phe	Arg Asp Gln Phe Leu Phe	Pro Lys Tyr Gln
20	25	30
Asp Lys Phe Phe Ile Tyr	Leu Cys Gly Asn Ser	Leu Gly Leu Gln Pro
35	40	45

[0057]

[0058]

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

Gln Tyr Lys Ile Ile Thr Pro Lys Asn Ser Ala Glu Arg Gly Ala Gln
 355 360 365
 Leu Ser Ile Ile Ala Ala Arg Asn Gly Lys Glu Ile Phe Asp Gly Leu
 370 375 380
 Leu Ala His Gly Ile Leu Gly Asp Trp Arg Glu Pro Asn Val Ile Arg
 385 390 395 400
 Leu Ser Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Ile Tyr Gln Thr
 405 410 415
 Gly Lys Ala Leu Ser Glu Val Thr Arg Lys Ile Leu Thr Thr Ala
 420 425 430
 <210> 42
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Pedobacter sp. BAL39
 <400> 42
 Met Lys Val Val Asp Asn Lys Lys Thr Gly Leu Phe Asn Tyr Ile Pro
 1 5 10 15
 Phe Leu Trp Ile Phe Gly Thr Met Asn Phe Glu Asn Thr Leu Ala Phe
 20 25 30
 Ala Gln Gly Leu Asp Gln Ala Asp Pro Leu Arg Asp Leu Arg Asn Glu
 35 40 45
 Phe Leu Phe Pro Gln Gln Asn Gly Lys Pro Phe Ile Tyr Leu Cys Gly
 50 55 60
 Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro Lys Val Ala Arg Glu Val Leu Asp Arg
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Asn Trp Gln Asn Leu Ala Val Glu Gly Trp Phe Glu Gly
 85 90 95
 Glu Thr Pro Trp Met Tyr Tyr His Lys Ala Leu Lys Glu Leu Met Ala
 100 105 110
 Pro Ile Val Gly Ala Arg Pro Ala Glu Val Cys Pro Met Asn Thr Leu
 115 120 125
 Thr Val Asn Leu His Leu Leu Met Val Ser Phe Tyr Lys Pro Lys Ala
 130 135 140
 Lys Arg Phe Lys Ile Met Met Glu Ala Gly Ala Phe Pro Ser Asp Gln
 145 150 155 160
 Tyr Ala Ile Glu Ser Gln Val Arg Phe His Gly Tyr Asp Pro Lys Asp
 165 170 175
 Ala Ile Ile Glu Val Ser Pro Arg Pro Gly Glu Tyr Thr Leu Arg Thr
 180 185 190

[0059]

Glu Asp Ile Leu Glu Gln Ile Ser Leu Gln Gly Asp Gln Ile Ala Leu
 195 200 205
 Val Leu Phe Gly Gly Ile Asn Tyr Phe Thr Gly Gln Trp Phe Asp Met
 210 215 220
 Glu Ala Ile Thr Arg Ala Gly His Gln Ala Gly Ala Val Val Gly Phe
 225 230 235 240
 Asp Leu Ala His Ala Ala Gly Asn Val Pro Val Gln Leu His Asp Trp
 245 250 255
 Asp Val Asp Phe Ala Cys Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Gln Asn Ser Gly
 260 265 270
 Pro Gly Gly Ile Ser Gly Ile Phe Val His Glu Arg His Phe Gly Asp
 275 280 285
 Gln Thr Leu Ser Arg Phe Ala Gly Trp Trp Gly Tyr Gln Glu Ser Gln
 290 295 300
 Arg Phe Lys Met Glu Lys Gly Phe Val Pro Glu Ala Gly Ala Asp Gly
 305 310 315 320
 Trp Gln Val Ser Cys Thr Gln Val Met Pro Met Ala Leu Tyr His Ala
 325 330 335
 [0060] Ala Leu Gln Ile Phe Glu Lys Ala Gly Phe Ile Gly Pro Leu Arg Lys
 340 345 350
 Lys Ser Lys Ala Leu Thr Ala Tyr Leu Phe Tyr Leu Ile Asn Glu Val
 355 360 365
 Asn Asn Glu Leu Cys Glu Met Gln Tyr Gln Val Ile Thr Pro Ser Ser
 370 375 380
 Ala Glu Asp Arg Gly Ala Gln Val Ser Ile Ile Ala Lys Ala Asn Gly
 385 390 395 400
 Lys Tyr Ile Phe Glu Gln Leu Val Ala Asn Asn Val Leu Gly Asp Trp
 405 410 415
 Arg Glu Pro Asn Val Ile Arg Leu Ser Pro Val Pro Ser Tyr Asn Ser
 420 425 430
 Phe Glu Asp Val Phe Arg Thr Ala Glu Leu Leu Leu Gln Ile Gly Arg
 435 440 445
 Lys
 <210> 43
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Pedobacter sp. V48
 <400> 43

	Met	Asn	Phe	Glu	Asn	Asn	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Leu	Asp	Gln	Ala	
	1				5					10					15		
	Asp	Pro	Leu	Ser	Ser	Phe	Arg	His	Asp	Phe	Leu	Phe	Pro	Gln	Gln	Asn	
			20						25					30			
	Gly	Asn	Pro	Phe	Ile	Tyr	Leu	Cys	Gly	Asn	Ser	Leu	Gly	Leu	Gln	Pro	
			35					40					45				
	Lys	Ala	Val	Arg	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Gln	Leu	Asn	Asn	Trp	Arg	Asn	
		50					55					60					
	Leu	Ala	Val	Glu	Gly	Trp	Phe	Glu	Gly	Asp	Asn	Pro	Trp	Met	Phe	Tyr	
	65					70				75						80	
	His	Lys	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Met	Gly	Pro	Leu	Val	Gly	Ala	Ser	Thr	
				85					90						95		
	Asp	Glu	Val	Cys	Pro	Met	Asn	Thr	Leu	Thr	Val	Asn	Leu	His	Leu	Leu	
				100					105					110			
	Met	Val	Ser	Phe	Tyr	Lys	Pro	Val	Arg	Gly	Arg	Phe	Lys	Ile	Ile	Met	
			115					120					125				
	Glu	Ala	Gly	Ala	Phe	Pro	Ser	Asp	Gln	Tyr	Ala	Val	Glu	Ser	Gln	Val	
		130					135					140					
[0061]	Arg	Phe	His	Gly	Tyr	Asp	Ala	Lys	Glu	Ala	Ile	Val	Glu	Val	Ala	Pro	
	145					150					155					160	
	Arg	Ile	Gly	Glu	Tyr	Ile	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Ile	Leu	Ala	Gln	Ile	
				165						170					175		
	Ala	Lys	His	Gly	Asp	Glu	Val	Ala	Leu	Val	Leu	Phe	Ser	Gly	Val	Asn	
				180					185					190			
	Tyr	Phe	Thr	Gly	Gln	Trp	Phe	Asp	Met	Glu	Ala	Ile	Thr	Met	Ala	Gly	
		195						200					205				
	His	Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Val	Gly	Phe	Asp	Leu	Ala	His	Ala	Ala	Gly	
		210					215					220					
	Asn	Val	Pro	Leu	Lys	Leu	His	Asp	Trp	Asp	Ile	Asp	Phe	Ala	Cys	Trp	
	225					230					235					240	
	Cys	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Gln	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	Gly	Ile	Ser	Gly	Ile	
				245						250					255		
	Phe	Val	His	Glu	Lys	His	Phe	Thr	Asp	Thr	Thr	Leu	Asn	Arg	Phe	Ala	
				260					265					270			
	Gly	Trp	Trp	Gly	Tyr	Gln	Gln	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Met	Glu	Lys	Gly	
		275						280					285				
	Phe	Leu	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Asp	Gly	Trp	Gln	Val	Ser	Cys	Thr	Gln	
		290					295					300					

Val Met Pro Met Ala Leu Tyr Phe Ala Ser Leu Gln Ile Phe Glu Lys
 305 310 315 320
 Ala Gly Phe Ile Glu Pro Leu Arg Leu Lys Ser Lys Thr Leu Thr Ser
 325 330 335
 Tyr Leu Phe His Ile Val Asn Gln Val Asn Lys Leu Leu Ser Cys Glu
 340 345 350
 Gln Phe Glu Ile Ile Thr Pro Asp Asn Glu Asn Glu Arg Gly Ala Gln
 355 360 365
 Val Ser Ile Ile Ala Lys Gln Lys Gly Lys Glu Ile Phe Glu Lys Leu
 370 375 380
 Ile Ala Asn Asn Val Leu Gly Asp Trp Arg Glu Pro Asn Val Ile Arg
 385 390 395 400
 Leu Ser Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Val Phe Arg Thr
 405 410 415
 Gly Glu Leu Leu Leu Gln Ile Thr Lys Gly Val Ile
 420 425
 <210> 44
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Rhodonellum psychrophilum
 <400> 44
 Met Lys Asp Ile Lys Tyr Glu Tyr Ser Glu Phe Phe Ala Arg Gln Leu
 1 5 10 15
 Asp Asn Glu Asp Pro Leu Lys Asp Phe Arg Asn Glu Phe Tyr Phe Pro
 20 25 30
 Lys Ile Glu Gly Lys Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Gly Asn Ser Leu Gly
 35 40 45
 Leu Gln Pro Arg Ser Thr Lys Glu Tyr Ile Gln Arg Glu Leu Asp Asn
 50 55 60
 Trp Ala Glu Leu Ala Val Asp Gly His Phe Lys Gly Glu Asp Ala Trp
 65 70 75 80
 Tyr His Val Arg Lys Lys Ser Lys Pro Ala Leu Ser Glu Ile Val Gly
 85 90 95
 Ala His Glu His Glu Val Val Ala Met Asn Asn Leu Ser Ser Asn Leu
 100 105 110
 His Phe Leu Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Ser Lys Thr Arg Phe Lys
 115 120 125
 Ile Ile Thr Glu Ala Gly Ala Phe Pro Ser Asp Met Tyr Met Leu Glu
 130 135 140
 Thr Gln Val Lys Phe His Gly Leu Asp Pro Glu Lys Thr Ile Ile Glu

[0062]

145	150	155	160
Val Ala Pro Arg Pro Gly Glu His Thr Leu Arg Thr Glu Asp Ile Leu	165	170	175
Leu Ala Ile Glu Glu Gln Gly Glu Glu Leu Ala Leu Val Met Met Ala	180	185	190
Gly Leu Gln Tyr Tyr Thr Gly Gln Val Phe Asp Met Glu Ser Ile Thr	195	200	205
Arg Ala Gly His Ser Val Gly Ala Asn Val Gly Phe Asp Leu Ala His	210	215	220
Ala Ala Gly Asn Val Pro Met Ser Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe	225	230	235
Ala Thr Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Met Asn Ser Gly Pro Gly Asn Val	245	250	255
Ser Gly Val Phe Val His Glu Arg His Ala Gln Asn Pro Asp Leu Pro	260	265	270
Arg Phe Ala Gly Trp Trp Gly His Asp Glu Glu Glu Arg Phe Lys Met	275	280	285
Glu Lys Gly Phe Lys Pro Met Tyr Gly Ala Asp Gly Trp Gln Val Ala	290	295	300
Asn Ser Asn Val Leu Ala Leu Ala Ala His Gln Ser Ser Leu Asp Ile	305	310	315
Phe Glu Arg Ala Gly Ile Lys Asn Leu Arg Glu Lys Ser Glu Leu Leu	325	330	335
Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Ile Gln Gln Ile Ser Gly Asp Ser Gly	340	345	350
Val Ile Glu Ile Ile Thr Pro Lys Asn Pro Gln Glu Arg Gly Cys Gln	355	360	365
Leu Ser Leu Leu Val His Lys Gly Gly Lys Ala Val Phe Asp Glu Leu	370	375	380
Tyr Leu Asn Gly Ile Ile Gly Asp Trp Arg His Pro Lys Val Met Arg	385	390	395
Ile Ala Pro Thr Pro Leu His Asn Ser Phe Leu Asp Val Phe Arg Phe	405	410	415
Ala Gln Ile Leu Glu Lys Ser Ile Leu Lys Phe Ala	420	425	
<210>	45		
<211>	430		
<212>	PRT		
<213>	Salinispora arenicola		

<400> 45

Met Asn Lys Glu Glu Leu Asp Gln Glu Glu Lys Ala Ala Asn Arg Leu
1 5 10 15

Asp Thr Ala Asp Pro Gly His Arg His Leu Phe His Leu Pro Pro Ser
20 25 30

Asp Gly Gly Arg Tyr Gln Gln Ala Ala Tyr Leu Ala Gly Asn Ser Leu
35 40 45

Gly Leu Gln Pro Leu Ala Thr Arg Asp Glu Leu Leu Ala Asp Leu Asp
50 55 60

Ala Trp Arg Arg Leu Gly Val Glu Gly His Leu Glu Ala Asp Arg Pro
65 70 75 80

Trp Leu Pro Tyr His Glu Leu Leu Thr Ala Pro Thr Ala Arg Leu Val
85 90 95

Gly Ala Arg Pro Ala Glu Val Val Val Met Asn Ser Leu Thr Val Asn
100 105 110

Leu His Leu Leu Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Val Gly Ala Arg Thr
115 120 125

Arg Ile Val Ile Glu Asp Asn Ala Phe Pro Ser Asp Ser Tyr Ala Val
130 135 140

[0064]

Arg Ser Gln Ala Arg Phe His Gly Leu Asp Pro Asp Thr Thr Val Val
145 150 155 160

Arg Leu Ala Pro Arg Pro Gly Glu Asp Thr Leu Arg Thr Val Asp Val
165 170 175

Leu Asp Leu Leu Ala Ala Glu Gly Asp Thr Ile Ala Leu Val Leu Leu
180 185 190

Gly Gly Val Asn Tyr Leu Thr Gly Glu Leu Leu Asp Ile Pro Ala Ile
195 200 205

Thr Ala Ala Gly Arg Ala Ala Gly Ala Ala Val Gly Trp Asp Leu Ala
210 215 220

His Ala Ala Gly Asn Val Pro Leu Ser Leu His Asp Trp Asp Val Asp
225 230 235 240

Phe Ala Ala Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Gly
245 250 255

Leu Ser Ser Val Phe Val His Glu Arg His Leu Ala Asp Pro Thr Leu
260 265 270

Pro Arg Phe Glu Gly Trp Trp Ser Thr Asp Ala Ala Val Arg Phe Glu
275 280 285

Met Ser Pro Val Ala Arg Pro Pro Ala Thr Ala Glu Ala Trp Gln Val
290 295 300

Ser Asn Pro Pro Ile Phe Ala Met Gly Pro Val Arg Thr Ser Leu Glu
 305 310 315 320
 Leu Phe Asp Ser Val Gly Met Thr Ala Leu Arg Glu Arg Ser Val Arg
 325 330 335
 Leu Thr Gly Tyr Leu Glu Trp Leu Leu Asp Gln Ile Thr Pro Gly Arg
 340 345 350
 Gln Leu Ala Val Val Thr Pro Arg Asp Pro Asp Arg Arg Gly Ala Gln
 355 360 365
 Leu Ser Val Arg Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Glu Leu Thr Lys Arg
 370 375 380
 Leu Arg Cys Glu Tyr Gly Val Ile Ala Asp Ala Arg Glu Pro Asp Ile
 385 390 395 400
 Val Arg Phe Ala Pro Val Pro Leu Tyr Ser Thr Tyr His Asp Cys Trp
 405 410 415
 Arg Val Ala Asp Ala Leu Ala Ala Thr Val Glu Val Arg Gly
 420 425 430
 <210> 46
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Saprospira grandis str. Lewin
 <400> 46
 Met Gln Glu Val Gln Phe Glu Asp Ala Leu Asp Tyr Ala Lys Ala Gln
 1 5 10 15
 Asp Val Ser Asp Pro Leu Ala His Phe Arg Pro Gln Phe His Phe Pro
 20 25 30
 Lys Gln Ala Asp Gly Ser Pro Ile Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu
 35 40 45
 Gly Leu Gln Pro Arg Leu Ala Gln Gln Leu Met Gln Asp Glu Met Asp
 50 55 60
 Val Trp Lys Glu Leu Ala Val Glu Gly His Phe Lys Ala Glu Arg Pro
 65 70 75 80
 Trp Met Thr Tyr His Glu Glu Phe Ser Arg Gln Leu Ser Pro Ile Val
 85 90 95
 Gly Ala Leu Pro Lys Glu Ile Thr Val Met Asn Thr Leu Ser Val Asn
 100 105 110
 Leu His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Lys Ser Arg Tyr
 115 120 125
 Lys Ile Val Ile Glu Gly Gly Ala Phe Pro Ser Asp Lys Tyr Ala Val
 130 135 140

[0065]

[0066]

Asp Ser Gln Leu Arg Phe His Gly Ile Asp Pro Gln Asp Gly Leu Ile
 145 150 155 160
 Gln Leu Arg Pro Arg Met Gly Glu Asp His Leu Arg Thr Glu Asp Ile
 165 170 175
 Leu Gln Ala Leu Glu Arg Glu Lys Asp Ser Ile Ala Leu Val Met Leu
 180 185 190
 Ser Gly Ile Asn Tyr Tyr Thr Gly Gln Cys Phe Asp Met Lys Ser Ile
 195 200 205
 Thr Lys Lys Gly His Glu Ile Gly Ala Met Val Gly Phe Asp Leu Ala
 210 215 220
 His Ala Ala Gly Asn Val Arg Leu Gln Leu His Asp Trp Gly Met Asp
 225 230 235 240
 Phe Ala Val Trp Cys His Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Cys
 245 250 255
 Ile Ala Gly Ala Phe Val His Glu Arg His Leu Asn Arg Lys Asp Leu
 260 265 270
 Pro Arg Phe Glu Gly Trp Trp Gly His His Lys Glu Ser Arg Phe Lys
 275 280 285
 Met Pro Ala Thr Phe Glu Pro Ala Pro Asn Ala Asp Ala Trp Gln Ile
 290 295 300
 Ser Asn Ala Pro Ile Leu Ala Met Val Pro Met Arg Ala Ser Leu Ala
 305 310 315 320
 Leu Phe Asn Glu Ala Gly Met Asp Arg Leu Leu Ala Lys Ser Lys Lys
 325 330 335
 Leu Thr Ala Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Asn Gln Leu Pro Thr Asp Arg
 340 345 350
 Ile Arg Ile Leu Thr Pro Lys Asp Pro Lys Asp Arg Gly Ala Gln Leu
 355 360 365
 Ser Ile Gln Val Lys Gly Ala Asp Arg Ser Leu Phe Asp Asp Leu Val
 370 375 380
 Lys Asn Gly Val Ile Gly Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Ile
 385 390 395 400
 Ser Pro Ala Pro Ile Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Val Tyr Arg Met Val
 405 410 415
 Gln Ile Leu Lys Lys Cys Leu Gln Leu
 420 425
 <210> 47
 <211> 427
 <212> PRT

<213> 橙色标桩菌 (Stigmatella aurantiaca) DW4/3-1

<400> 47

Met Thr Glu Ala Ser Met Arg Phe Glu Glu Gly Glu Gly Phe Ala Arg
1 5 10 15

Arg Met Asp Ala Glu Asp Pro Leu Arg Ser Phe Arg Glu Glu Phe Leu
20 25 30

Phe Pro Gln Ser Pro Gln Gly Glu Pro Leu Val Tyr Leu Ala Gly Asn
35 40 45

Ser Leu Gly Leu Gln Pro Arg Arg Ala Gln Gln Tyr Val Gln Glu Glu
50 55 60

Met Glu Asp Trp Ala Arg Leu Gly Val Glu Gly His Phe His Ala Arg
65 70 75 80

Arg Pro Trp Leu Pro Tyr His Glu Asn Leu Thr Gly Gln Thr Ala Arg
85 90 95

Leu Val Gly Ala Leu Pro Leu Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Ser
100 105 110

Val Asn Leu His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Arg Glu
115 120 125

[0067]

Arg Phe Lys Ile Leu Ile Glu Gly Gly Ala Phe Pro Ser Asp Gln Tyr
130 135 140

Ala Val Ala Ser Gln Ala Arg Phe His Gly Phe Asp Pro Lys Asp Ala
145 150 155 160

Val Leu Lys Leu Glu Pro Arg Ala Gly Glu Asp Thr Leu Arg Thr Glu
165 170 175

Asp Ile Leu Glu Thr Leu Glu Arg His Gly Ser Glu Ile Ala Leu Val
180 185 190

Leu Leu Gly Asn Val Asn Tyr Leu Thr Gly Gln Ala Phe Asp Met Lys
195 200 205

Ala Leu Thr Gln Ala Ala His Ala Arg Gly Cys Arg Val Gly Phe Asp
210 215 220

Leu Ala His Gly Ala Gly Asn Leu Arg Leu Ser Leu His Asp Asp Gly
225 230 235 240

Pro Asp Phe Ala Val Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Gly Gly Pro
245 250 255

Gly Ala Leu Gly Gly Val Phe Ile His Glu Arg His Ala Arg Ala Glu
260 265 270

Gly Leu Pro Arg Phe Glu Gly Trp Trp Gly Asn Asp Lys Ala Ile Arg
275 280 285

Phe Gln Met Gly Pro Asp Phe Val Pro Leu Pro Gly Ala Glu Gly Trp
 290 295 300
 Gln Leu Ser Asn Pro Pro Ile Phe Gln Leu Ala Ala Leu Arg Ala Ser
 305 310 315 320
 Met Glu Leu Phe Asp Arg Ala Thr Met Pro Ser Leu Arg Gly Lys Gly
 325 330 335
 Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Asp Arg Leu Pro Ser
 340 345 350
 Gly Phe Val Arg Ile Thr Thr Pro Arg Asp Val Lys Ala Arg Gly Ser
 355 360 365
 Gln Leu Ser Leu Arg Phe Ser Lys Asp Pro Arg Arg Leu Leu Thr Arg
 370 375 380
 Leu Ser Glu Ala Gly Val Cys Cys Asp Phe Arg Ser Pro Asp Ile Ile
 385 390 395 400
 Arg Ala Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Gln Asp Val Tyr Arg
 405 410 415
 Phe Val Lys Val Leu Glu Ser His Ala Arg Asp
 420 425

[0068]

<210> 48
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> 地毯草黄单胞菌 (*Xanthomonas axonopodis*)
 <400> 48
 Met Thr Asp Pro Leu Ser Arg Ala His Ala Ala Ala Leu Asp Ala Ala
 1 5 10 15
 Asp Pro Leu Arg Asn Leu Arg Asp Ala Phe Val Phe Pro Gln His Gly
 20 25 30
 Asp Asp Asp Gln Thr Tyr Phe Val Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro
 35 40 45
 Arg Ala Ala Arg Ala Met Val Asp Glu Val Leu Asp Gln Trp Gly Ala
 50 55 60
 Leu Ala Val Glu Gly His Phe Thr Gly Pro Thr Gln Trp Leu Thr Tyr
 65 70 75 80
 His Gln Leu Val Arg Asp Ala Leu Ala Arg Val Val Gly Ala Gln Pro
 85 90 95
 Gly Glu Val Val Ala Met Asn Thr Leu Ser Val Asn Leu His Leu Met
 100 105 110
 Met Ala Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Ala Glu Arg Gly Ala Ile Leu Ile
 115 120 125
 Glu Ala Gly Ala Phe Pro Ser Asp Arg His Ala Val Glu Ser Gln Leu

130	135	140
Arg Leu His Gly Leu Asp Pro Ala Thr His Leu Ile Glu Val Glu Ala 145	150	155 160
Asp Glu Pro Asn Gly Thr Val Ser Met Ser Ala Ile Ala Glu Ala Ile 165	170	175
Ala Gln His Gly Pro His Leu Ala Leu Val Leu Trp Pro Gly Ile Gln 180	185	190
Tyr Arg Thr Gly Gln Ala Phe Asp Leu Ala Glu Ile Val Arg Leu Ala 195	200	205
Arg Ala Gln Gly Ala Ala Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Val Gly 210	215	220
Asn Leu Pro Leu Thr Leu His Asp Asp Gly Val Asp Phe Ala Val Trp 225	230	235 240
Cys His Tyr Lys Tyr Leu Asn Ala Gly Pro Gly Ala Val Gly Gly Cys 245	250	255
Phe Val His Ala Arg His Ala Thr Ser Asp Leu Pro Arg Met Ala Gly 260	265	270
Trp Trp Gly His Glu Gln Gln Thr Arg Phe Arg Met Asp Pro Gln Phe 275	280	285
Val Pro Ser Pro Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Asn Pro Pro Val 290	295	300
Leu Ala Leu Ala Pro Leu Arg Ala Ser Leu Ala Leu Phe Asp Gln Ala 305	310	315 320
Gly Met Ala Ala Leu Arg Ala Lys Ser Glu Gln Leu Thr Gly His Leu 325	330	335
Glu Gln Leu Ile His Ala Arg Ala Pro Gln Val Leu Gln Ile Val Thr 340	345	350
Pro Val Glu Pro Ala Arg Arg Gly Cys Gln Leu Ser Leu Arg Val Ala 355	360	365
Gly Gly Arg Ala Arg Gly Arg Ala Leu Phe Glu His Leu His Ala Ala 370	375	380
Gly Val Leu Gly Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Ile Ala Pro 385	390	395 400
Val Pro Leu Tyr Asn Arg Phe Ser Asp Leu His Thr Phe Val Glu Gln 405	410	415
Val Glu Ala Trp Ala Ala Ala 420		
<210>	49	

<211> 422
 <212> PRT
 <213> Psychroflexus gondwanensis
 <400> 49
 Met Lys Tyr Gln Asn Thr Lys Ser Phe Ala Glu Gln Leu Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Asp Pro Leu Lys Ala Tyr Arg Ser Glu Phe Leu Phe Pro Lys Ala Lys
 20 25 30
 Asp Gly Ser Pro Lys Val Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln
 35 40 45
 Pro Lys Gln Thr Ser Ala Phe Ile Gln Gln Glu Leu Gln Asp Trp Ala
 50 55 60
 Asp Leu Gly Val Glu Gly His Ser His Ala Thr His Pro Trp Met Thr
 65 70 75 80
 Ser Asn Glu Asp Leu Ala Asp Ser Met Ala Lys Ile Val Gly Ala Gln
 85 90 95
 Pro Gln Glu Val Val Ile Met Asn Thr Leu Thr Val Asn Leu His Leu
 100 105 110
 Met Met Val Ser Phe Tyr Lys Pro Thr Pro Lys Lys Phe Lys Ile Leu
 115 120 125
 [0070] Ile Glu Ser Asp Ala Phe Pro Ser Asp Lys Tyr Ala Val Glu Ser Gln
 130 135 140
 Leu Lys Phe His Asn Ile Asp Pro Lys Glu Gly Leu Leu Leu Trp Lys
 145 150 155 160
 Pro Arg Pro Gly Glu His Leu Cys Arg Thr Glu Asp Phe Glu Gln Ile
 165 170 175
 Ile Glu Glu His Gly Asp Glu Ile Ala Leu Val Met Ile Gly Ser Thr
 180 185 190
 Asn Tyr Tyr Ser Gly Gln Ala Tyr Asp Leu Lys Arg Ile Thr Glu Val
 195 200 205
 Ser Lys Thr Lys Asp Ile Thr Val Gly Phe Asp Leu Ala His Gly Ala
 210 215 220
 Gly Asn Ile Gln Pro Asn Leu His Asp Ile Gly Ala Asp Phe Ala Val
 225 230 235 240
 Trp Cys Thr Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Ser Leu Gly Gly
 245 250 255
 Cys Phe Ile His Glu Lys His Ile Ala Asp Glu His Ile Asn Arg Phe
 260 265 270
 Val Gly Trp Trp Gly His Asn Lys Asp Ser Arg Phe Asn Met Arg Val
 275 280 285

Asp Phe Asp Pro Ile Pro Thr Ala Asp Gly Trp Gln Leu Ser Asn Pro
 290 295 300
 Pro Ile Leu Ser Leu Ala Gly Thr Arg Ser Ser Leu Asp Leu Phe Asp
 305 310 315 320
 Lys Ala Gly Phe Asp Asn Ile Arg Lys Lys Ser Val Leu Leu Thr Gly
 325 330 335
 Phe Leu Glu Phe Leu Ile Asp Asp Leu Asp Met Glu Glu Ile Ser Ile
 340 345 350
 Leu Thr Pro Arg Ser Pro Glu Glu Arg Gly Cys Gln Leu Ser Ile Gln
 355 360 365
 Val Lys Asn Ala Asn Lys Ser Leu Phe His Gln Leu Met Asp Lys Gly
 370 375 380
 Val Val Ala Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Ile Ala Pro Ala
 385 390 395 400
 Pro Leu Tyr Asn Ser Tyr Thr Asp Val Phe Thr Phe Val Glu Ile Leu
 405 410 415
 Lys His Cys Leu Asn Ala
 420

[0071]

<210> 50
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> Lewinella cohaerens
 <400> 50
 Met Thr Tyr Gln Ala Thr Arg Glu Tyr Ala Gln Ser Gln Asp Asp Lys
 1 5 10 15
 Asp Pro Met Arg Gly Phe Arg Glu Arg Phe His Leu Pro Arg Gln Ala
 20 25 30
 Asn Gly Glu Pro Phe Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln
 35 40 45
 Pro Lys Ser Thr Lys Ala Ala Ile Asp Gln Glu Leu Leu Asp Trp Gln
 50 55 60
 Asn Leu Gly Val Glu Gly His Leu His Ala Lys Asn Pro Trp Leu Pro
 65 70 75 80
 Tyr His Glu Phe Leu Thr Glu Lys Met Ala Glu Ile Val Gly Ala Lys
 85 90 95
 Pro Ile Glu Val Val Met Met Asn Thr Leu Thr Val Asn Leu His Leu
 100 105 110
 Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Glu Gly Lys Arg Thr Lys Ile Leu
 115 120 125

	Met	Glu	Ala	Asp	Ala	Phe	Pro	Ser	Asp	Arg	Tyr	Ala	Ile	Ser	Ser	Gln
	130						135					140				
	Leu	Lys	Phe	His	Gly	Tyr	Asp	Pro	Ala	Glu	His	Leu	Val	Glu	Leu	Lys
	145					150					155					160
	Ala	Arg	Asp	Gly	Glu	Val	Leu	Ile	Arg	Glu	Glu	Asp	Ile	Ala	His	Ile
					165					170					175	
	Leu	Glu	Glu	Gln	Gly	Ala	Glu	Ile	Ala	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	Asn	Thr
				180					185					190		
	Asn	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Gln	Phe	Phe	Asn	Met	Pro	Glu	Ile	Thr	Lys	Leu
		195						200					205			
	Ala	His	Ala	Gln	Gly	Cys	Met	Val	Gly	Phe	Asp	Cys	Ala	His	Gly	Ala
	210						215					220				
	Gly	Asn	Val	Pro	Leu	Asp	Leu	His	Asp	Ser	Gly	Ala	Asp	Phe	Ala	Val
	225					230					235					240
	Trp	Cys	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Val	Ser	Gly
					245					250					255	
	Cys	Phe	Val	His	Glu	Arg	His	Ala	His	Asp	Lys	Glu	Leu	Pro	Arg	Phe
				260					265					270		
[0072]	Thr	Gly	Trp	Trp	Gly	His	Asn	Lys	Val	Thr	Arg	Phe	Gly	Met	Arg	Asp
			275					280					285			
	Asp	Phe	Asp	Pro	Ile	Pro	Gly	Val	Glu	Ala	Trp	Gln	Leu	Ser	Asn	Pro
	290						295					300				
	Pro	Ile	Leu	Ser	Leu	Ala	Ala	Ile	Lys	Ala	Ser	Leu	Glu	Val	Phe	Ala
	305					310					315					320
	Glu	Ala	Gly	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Gln	Lys	Ser	Leu	Ala	Leu	Thr	Gly
					325					330					335	
	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Leu	Val	Asp	Gln	Leu	Pro	Gly	Gly	Lys	Ile	Ser	Ile
				340					345					350		
	Ile	Thr	Pro	Arg	Asp	Pro	Glu	Arg	Arg	Gly	Cys	Gln	Leu	Ser	Ile	Gln
			355					360					365			
	Val	Gln	Asp	Ala	Asp	Lys	Ser	Leu	Tyr	Glu	Ala	Ile	Ser	Ala	Ala	Gly
		370					375					380				
	Val	Ile	Ala	Asp	Trp	Arg	Glu	Pro	Asp	Val	Ile	Arg	Val	Ala	Pro	Val
	385					390					395					400
	Pro	Leu	Tyr	Asn	Thr	Phe	Thr	Glu	Val	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Ile	Leu
					405					410					415	
	Gly	Glu	Lys	Met	Glu	Ala										
				420												

<210> 51
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Lewinella persica

<400> 51

Met Val Glu Glu Phe Gln Asn Asp Leu Ala Phe Ala Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15

Glu Arg Asp Glu Leu Arg Ala Tyr Arg Ser Gln Tyr His Met Pro Val
 20 25 30

Gln Ala Asn Gly Gln Pro Tyr Val Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly
 35 40 45

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

Trp Lys Asn Leu Gly Val Glu Gly His Phe His Ala Lys Asn Pro Trp
 65 70 75 80

Met Pro Tyr His Glu Phe Leu Thr Glu Ala Met Ala Arg Val Val Gly
 85 90 95

Ala Lys Pro Ser Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Thr Val Asn Leu
 100 105 110

[0073]

His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Val Gly Arg Arg Lys Lys
 115 120 125

Ile Ile Ile Glu Ala Asp Ala Phe Pro Ser Asp Lys Tyr Ala Val Glu
 130 135 140

Ser Gln Ile Arg Phe His Gly Leu Ser Pro Glu Asp Cys Leu Ile Glu
 145 150 155 160

Leu Lys Ala Arg Asp Gly Glu Val Cys Leu Arg Gln Glu Asp Ile Leu
 165 170 175

Gly Val Ile Asp Ala His Ser Glu Asp Ile Ala Leu Ile Leu Leu Gly
 180 185 190

Asn Thr Asn Tyr Tyr Thr Gly Gln Phe Phe Asp Met Lys Thr Ile Ser
 195 200 205

Glu His Gly His Ala Lys Gly Cys Met Val Gly Phe Asp Cys Ala His
 210 215 220

Gly Ala Gly Asn Val Pro Leu Asn Leu His Asp Ser Gly Cys Asp Phe
 225 230 235 240

Ala Val Trp Cys Asn Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Gly Met
 245 250 255

Gly Gly Ala Phe Ile His Glu Arg His Ala Asp Ser Lys Asp Ile Pro
 260 265 270

Arg Phe Glu Gly Trp Trp Gly His Asn Lys Glu Thr Arg Phe Lys Met
 275 280 285
 Arg Asp Ala Phe Asp Pro Thr Pro Gly Thr Glu Ala Trp Gln Leu Ser
 290 295 300
 Asn Pro Pro Ile Leu Ala Met Val Ala Val Trp Ser Ala Leu Lys Leu
 305 310 315 320
 Phe Asp Glu Val Gly Met Thr Arg Leu Arg Lys Lys Ala Ile Ser Leu
 325 330 335
 Thr Gly Tyr Leu Glu Tyr Leu Val Asn Thr Leu Gly Asp Asp Val Val
 340 345 350
 Asn Ile Val Thr Pro Ala Asp Pro Ala Gln Arg Gly Ser Gln Leu Ser
 355 360 365
 Ile Gln Val Lys Thr Ala Asp Lys Lys Leu Phe Asn Lys Ile Thr Glu
 370 375 380
 Ala Gly Val Ile Ala Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Val Ala
 385 390 395 400
 Pro Val Pro Met Tyr Asn Ser Tyr Glu Asp Val Tyr Asn Phe Tyr Thr
 405 410 415
 Ile Leu Lys Ser Ala Ile Ala Gly Asn
 420 425
 [0074]
 <210> 52
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> Pontibacter roseus
 <400> 52
 Met Asn Tyr Gln Asn Thr Leu Ala Phe Ala Gln Glu Gln Asp Asn Leu
 1 5 10 15
 Asp Pro Leu Lys His Phe Lys Asp Arg Phe Tyr Phe Pro Gln Val Asn
 20 25 30
 Gly Arg Asp Ala Ile Tyr Phe Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro
 35 40 45
 Lys Ser Ala Gln Met Tyr Ile Asp Asn Glu Met Tyr Lys Trp Ala Asn
 50 55 60
 Tyr Ala Val Glu Gly His Phe Lys Val Glu Glu Pro Trp Phe Asn Tyr
 65 70 75 80
 His Arg Leu Leu Thr Asp Gly Ala Ala Arg Val Val Gly Ala Arg Pro
 85 90 95
 Gln Glu Val Val Ile Met Asn Gln Leu Thr Val Asn Leu His Leu Met
 100 105 110
 Leu Val Ser Phe Tyr Arg Pro Glu Gly Arg Arg Ile Lys Ile Ile Met

115	120	125
Glu Gly Gly Ala Phe Pro Ser Asp Gln Tyr Ala Leu Glu Thr Gln Val 130	135	140
Lys Phe His Gly Tyr Thr Pro Glu Glu Ala Ile Ile Glu Leu Phe Pro 145	150	155 160
Arg Glu Gly Glu His Thr Leu Arg Thr Glu Asp Ile Leu Lys Ser Ile 165	170	175
Glu Ala Ala Gly Asp Glu Leu Ala Leu Val Leu Met Gly Gly Ile Asn 180	185	190
Tyr Tyr Thr Gly Gln Val Tyr Asp Met Ala Ala Ile Thr Gln Ala Gly 195	200	205
His Gly Val Gly Ala Val Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Ala Gly 210	215	220
Asn Val Pro Leu Gln Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe Ala Val Trp 225	230	235 240
Cys Thr Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Gly Thr Ala Gly Val 245	250	255
Phe Val His Glu Arg His Ala Asn Asn Pro Asp Leu Pro Arg Phe Ala 260	265	270
[0075] Gly Trp Trp Gly His Asp Ala Ser Val Arg Phe Gln Met Lys Lys Gly 275	280	285
Phe Ile Pro Met Thr Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Asn Ala Gln 290	295	300
Ile Leu Pro Met Ala Val His Arg Ala Ala Leu Glu Leu Phe Asp Glu 305	310	315 320
Ala Gly Met Asp Asn Leu Arg Ala Lys Ser Glu Lys Leu Thr Gly Tyr 325	330	335
Leu Glu Tyr Leu Ile Asp Asp Val His Val Gly Lys Glu Leu Leu Glu 340	345	350
Met Ile Thr Pro Arg Asp Pro Gln Ala Arg Gly Cys Gln Ile Ser Leu 355	360	365
Leu Val Lys Gln Asn Ala Arg Glu Leu Phe Asn Arg Leu Met Glu Ala 370	375	380
Gly Ile Ile Val Asp Phe Arg Glu Pro Ser Val Ile Arg Val Ala Pro 385	390	395 400
Thr Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Glu Val Tyr Arg Phe Ser Glu Ile 405	410	415
Leu His Asp Cys Leu Gln Ser His		

420

<210> 53
 <211> 1304
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的多核苷酸

<400> 53
 ccatgggcgg acaccatcat caccaccacg gcggcattga aaaactgaaa cagtatcacg 60
 atgaagcgat cagcctggat agccttgatc cttacagaa attcaaagaa tgctttacat 120
 taccgaagga acctggagca ctgtatttct gcagcaatag tctgggcttg cccgcgaaag 180
 cggttccca gaaactggaa gaacagttac agcgggtggag cgaattaggc gtcctgggat 240
 gggttgaagg cgagggtaat tggataaca gcttgaaga gcctatttg cgtccattga 300
 gcaaaatctt aggagcggaa agcaatgaag tgacctgat gaatagcttg accgtgaatc 360
 tgcacatgtt gttgattagt ttctatcgtc cgaccaaagt gcgttataag atactgattg 420
 atggcccagc ctttccgtcc gatctgtatg ccattaagtc gcatctgcgt ttccataaga 480
 aagaagaagg tcttattctg atagaaccgc gtccgggcga acatctggtg caggaagaag 540
 actttctcgc cgtgataaag aagcaaggag aggaaattgc gttgggtgtt ctgaactgcg 600
 tgaattttct gagcggccag gtgctgaaag tggatgaaat cacccttat gccaggagg 660
 ctggctgctg cgtcggttat gatctggcgc atgcagcagg caatatccccc ttaagcttgc 720
 atgatcttgg cggcgacttt gcggtgggct gtcctacaa atatctgtgc ggaggcccag 780
 [0076] gaggtccagg catagcctac gttcacgct caccatcacca ccaacagtgc gtgcgtttca 840
 gcgggtggtg gggcaatgat ccgaataccc ggttttactt ccccaaagag ttgtgcccgt 900
 atggcggctg gagctcctgg caggtgagca ccccgctcat tctggcgaaa ctgccgttaa 960
 ttgcggcact ggagggtgtt gaggaagcgg gcatggagaa tatactgaa aagagcaaga 1020
 aacaacagc gttcctgtat accctgttag aaaatgctc cggcacccat ttgatatga 1080
 taaccccgaa agaaccggag ctgcgtggct gtcagcttag cctgcgtatc aaatgcagcc 1140
 gtagcgaaga gatcttacgg aagctggaac gtttagcat tacatgcgat ttccgttcgc 1200
 cgaacattct gcgtgtggcg ccgagcccgt tgtacaccag cttttacgaa atctatcgtt 1260
 ttgcgtacac ctttctggaa gtctgaaaa ccatttgaga attc 1304

<210> 54
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的多肽

<400> 54

Met Gly Gly His His His His His His Gly Gly Ile Glu Lys Leu Lys
 1 5 10 15

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

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

[0077]

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

	340	345	350
	Arg Gly Thr His Phe Asp Met Ile Thr Pro Lys Glu Pro Glu Leu Arg 355 360 365		
	Gly Cys Gln Leu Ser Leu Arg Ile Lys Cys Ser Arg Ser Glu Glu Ile 370 375 380		
	Leu Arg Lys Leu Glu Arg Leu Gly Ile Thr Cys Asp Phe Arg Ser Pro 385 390 395 400		
	Asn Ile Leu Arg Val Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Thr Ser Phe Tyr Glu 405 410 415		
	Ile Tyr Arg Phe Ala Tyr Thr Phe Leu Glu Val Leu Lys Thr Ile 420 425 430		
	<210> 55 <211> 464 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成的多肽		
	<400> 55		
	Met Glu Pro Ser Ser Leu Glu Leu Pro Ala Asp Thr Val Gln Arg Ile 1 5 10 15		
[0078]	Ala Ala Glu Leu Lys Cys His Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu His 20 25 30		
	Leu Asp Glu Glu Asp Lys Leu Arg His Phe Arg Glu Cys Phe Tyr Ile 35 40 45		
	Pro Lys Ile Gln Asp Leu Pro Pro Val Asp Leu Ser Leu Val Asn Lys 50 55 60		
	Asp Glu Asn Ala Ile Tyr Phe Leu Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro 65 70 75 80		
	Lys Met Val Lys Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Lys 85 90 95		
	Ile Ala Ala Tyr Gly His Glu Val Gly Lys Arg Pro Trp Ile Thr Gly 100 105 110		
	Asp Glu Ser Ile Val Gly Leu Met Lys Asp Ile Val Gly Ala Asn Glu 115 120 125		
	Lys Glu Ile Ala Leu Met Asn Ala Leu Thr Val Asn Leu His Leu Leu 130 135 140		
	Met Leu Ser Phe Phe Lys Pro Thr Pro Lys Arg Tyr Lys Ile Leu Leu 145 150 155 160		
	Glu Ala Lys Ala Phe Pro Ser Asp His Tyr Ala Ile Glu Ser Gln Leu 165 170 175		

[0079]

Gln Leu His Gly Leu Asn Ile Glu Glu Ser Met Arg Met Ile Lys Pro
 180 185 190

Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Ile Glu Asp Ile Leu Glu Val Ile
 195 200 205

Glu Lys Glu Gly Asp Ser Ile Ala Val Ile Leu Phe Ser Gly Val His
 210 215 220

Phe Tyr Thr Gly Gln His Phe Asn Ile Pro Ala Ile Thr Lys Ala Gly
 225 230 235 240

Gln Ala Lys Gly Cys Tyr Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Val Gly
 245 250 255

Asn Val Glu Leu Tyr Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe Ala Cys Trp
 260 265 270

Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ala Gly Ala Gly Gly Ile Ala Gly Ala
 275 280 285

Phe Ile His Glu Lys His Ala His Thr Ile Lys Pro Ala Leu Val Gly
 290 295 300

Trp Met Gly His Glu Leu Ser Thr Arg Phe Lys Met Asp Asn Lys Leu
 305 310 315 320

Gln Leu Ile Pro Gly Val Cys Gly Phe Arg Ile Ser Asn Pro Pro Ile
 325 330 335

Leu Leu Val Cys Ser Leu His Ala Ser Leu Glu Ile Phe Lys Gln Thr
 340 345 350

Met Lys Ala Leu Arg Lys Lys Ser Val Leu Leu Thr Gly Tyr Leu Glu
 355 360 365

Tyr Leu Ile Lys His Asn Tyr Gly Lys Asp Lys Ala Ala Thr Lys Lys
 370 375 380

Pro Val Val Asn Ile Ile Thr Pro Ser His Val Glu Glu Arg Gly Cys
 385 390 395 400

Gln Leu Thr Ile Thr Phe Ser Val Pro Asn Lys Asp Val Phe Gln Glu
 405 410 415

Leu Glu Lys Arg Gly Val Val Cys Asp Lys Arg Asn Pro Asn Gly Ile
 420 425 430

Arg Val Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe His Asp Val Tyr Lys
 435 440 445

Phe Thr Asn Leu Leu Thr Ser Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Lys Asn
 450 455 460

<210> 56
 <211> 464
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽

<400> 56

Met Glu Pro Ser Ser Leu Glu Leu Pro Ala Asp Thr Val Gln Arg Ile
1 5 10 15

Ala Ala Glu Leu Lys Cys His Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu His
20 25 30

Leu Asp Glu Glu Asp Lys Leu Arg His Phe Arg Glu Cys Phe Tyr Ile
35 40 45

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

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

Lys Met Val Lys Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Lys
85 90 95

Ile Ala Ala Tyr Gly His Glu Val Gly Lys Arg Pro Trp Ile Thr Gly
100 105 110

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

[0080]

Lys Glu Ile Ala Leu Met Asn Ala Leu Thr Val Asn Leu His Leu Leu
130 135 140

Met Leu Ser Phe Phe Lys Pro Thr Pro Lys Arg Tyr Lys Ile Leu Leu
145 150 155 160

Glu Ala Lys Ala Phe Pro Ser Asp His Tyr Ala Ile Glu Ser Gln Leu
165 170 175

Gln Leu His Gly Leu Asn Ile Glu Glu Ser Met Arg Met Ile Lys Pro
180 185 190

Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Ile Glu Asp Ile Leu Glu Val Ile
195 200 205

Glu Lys Glu Gly Asp Ser Ile Ala Val Ile Leu Phe Ser Gly Val His
210 215 220

Phe Tyr Thr Gly Gln His Phe Asn Ile Pro Ala Ile Thr Lys Ala Gly
225 230 235 240

Gln Ala Lys Gly Cys Tyr Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Val Gly
245 250 255

Asn Val Glu Leu Tyr Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe Ala Cys Trp
260 265 270

Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ala Gly Ala Gly Gly Ile Ala Gly Ala

275	280	285
Phe Ile His Glu Lys His Ala His Thr Ile Lys Pro Ala Leu Val Gly 290 295 300		
Trp Leu Gly His Glu Leu Ser Thr Arg Phe Lys Met Asp Asn Lys Leu 305 310 315 320		
Gln Leu Ile Pro Gly Val Cys Gly Phe Arg Ile Ser Asn Pro Pro Ile 325 330 335		
Leu Leu Val Cys Ser Leu His Ala Ser Leu Glu Ile Phe Lys Gln Thr 340 345 350		
Met Lys Ala Leu Arg Lys Lys Ser Val Leu Leu Thr Gly Tyr Leu Glu 355 360 365		
Tyr Leu Ile Lys His Asn Tyr Gly Lys Asp Lys Ala Ala Thr Lys Lys 370 375 380		
Pro Val Val Asn Ile Ile Thr Pro Ser His Val Glu Glu Arg Gly Cys 385 390 395 400		
Gln Leu Thr Ile Thr Phe Ser Val Pro Asn Lys Asp Val Phe Gln Glu 405 410 415		
Leu Glu Lys Arg Gly Val Val Cys Asp Lys Arg Asn Pro Asn Gly Ile 420 425 430		
Arg Val Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe His Asp Val Tyr Lys 435 440 445		
Phe Thr Asn Leu Leu Thr Ser Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Lys Asn 450 455 460		
<210> 57 <211> 420 <212> PRT <213> 兽类嗜衣原体(<i>Chlamydophila pecorum</i>)		
<400> 57		
Ile Glu Lys Leu Lys Gln Tyr His Asp Glu Ala Ile Ser Leu Asp Ser 1 5 10 15		
Leu Asp Pro Leu Gln Lys Phe Lys Glu Cys Phe Thr Leu Pro Lys Glu 20 25 30		
Pro Gly Ala Leu Tyr Phe Cys Ser Asn Ser Leu Gly Leu Pro Ala Lys 35 40 45		
Ala Ala Ser Gln Lys Leu Glu Glu Gln Leu Gln Arg Trp Ser Glu Leu 50 55 60		
Gly Ala Arg Gly Trp Phe Glu Gly Glu Gly Asn Trp Tyr Asn Ser Leu 65 70 75 80		
Glu Glu Pro Ile Val Arg Pro Leu Ser Lys Ile Leu Gly Ala Glu Ser 85 90 95		

[0081]

[0082]

Asn	Glu	Val	Thr	Leu	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Leu	His	Met	Leu	100	105	110
Leu	Ile	Ser	Phe	Tyr	Arg	Pro	Thr	Lys	Met	Arg	Tyr	Lys	Ile	Leu	Ile	115	120	125
Asp	Gly	Pro	Ala	Phe	Pro	Ser	Asp	Leu	Tyr	Ala	Ile	Lys	Ser	His	Leu	130	135	140
Arg	Phe	His	Lys	Lys	Glu	Glu	Gly	Leu	Ile	Leu	Ile	Glu	Pro	Arg	Pro	145	150	155
Gly	Glu	His	Leu	Val	Gln	Glu	Glu	Asp	Phe	Leu	Arg	Val	Ile	Lys	Lys	165	170	175
Gln	Gly	Glu	Glu	Ile	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asn	Cys	Val	Asn	Phe	Leu	180	185	190
Ser	Gly	Gln	Val	Leu	Lys	Val	Asp	Glu	Ile	Thr	Arg	Tyr	Ala	Lys	Glu	195	200	205
Ala	Gly	Cys	Cys	Val	Gly	Tyr	Asp	Leu	Ala	His	Ala	Ala	Gly	Asn	Ile	210	215	220
Pro	Leu	Ser	Leu	His	Asp	Leu	Gly	Gly	Asp	Phe	Ala	Val	Gly	Cys	Ser	225	230	235
Tyr	Lys	Tyr	Leu	Cys	Gly	Gly	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Ile	Ala	Tyr	Val	245	250	255
His	Ala	Ser	His	His	His	Gln	Gln	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Trp	Trp	260	265	270
Gly	Asn	Asp	Pro	Asn	Thr	Arg	Phe	Tyr	Phe	Pro	Lys	Glu	Phe	Val	Pro	275	280	285
Tyr	Gly	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Ser	Ile	Leu	Ala	290	295	300
Lys	Leu	Pro	Leu	Ile	Ala	Ala	Leu	Glu	Val	Phe	Glu	Glu	Ala	Gly	Met	305	310	315
Glu	Asn	Ile	Arg	Glu	Lys	Ser	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Phe	Leu	Tyr	Thr	325	330	335
Leu	Leu	Glu	Asn	Ala	Arg	Gly	Thr	His	Phe	Asp	Met	Ile	Thr	Pro	Lys	340	345	350
Glu	Pro	Glu	Leu	Arg	Gly	Cys	Gln	Leu	Ser	Leu	Arg	Ile	Lys	Cys	Ser	355	360	365
Arg	Ser	Glu	Glu	Ile	Leu	Arg	Lys	Leu	Glu	Arg	Leu	Gly	Ile	Thr	Cys	370	375	380
Asp	Phe	Arg	Ser	Pro	Asn	Ile	Leu	Arg	Val	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	Tyr	385	390	395
																400		

	Thr	Ser	Phe	Tyr	Glu	Ile	Tyr	Arg	Phe	Ala	Tyr	Thr	Phe	Leu	Glu	Val
					405					410					415	
[0083]																
	Leu	Lys	Thr	Ile												
				420												

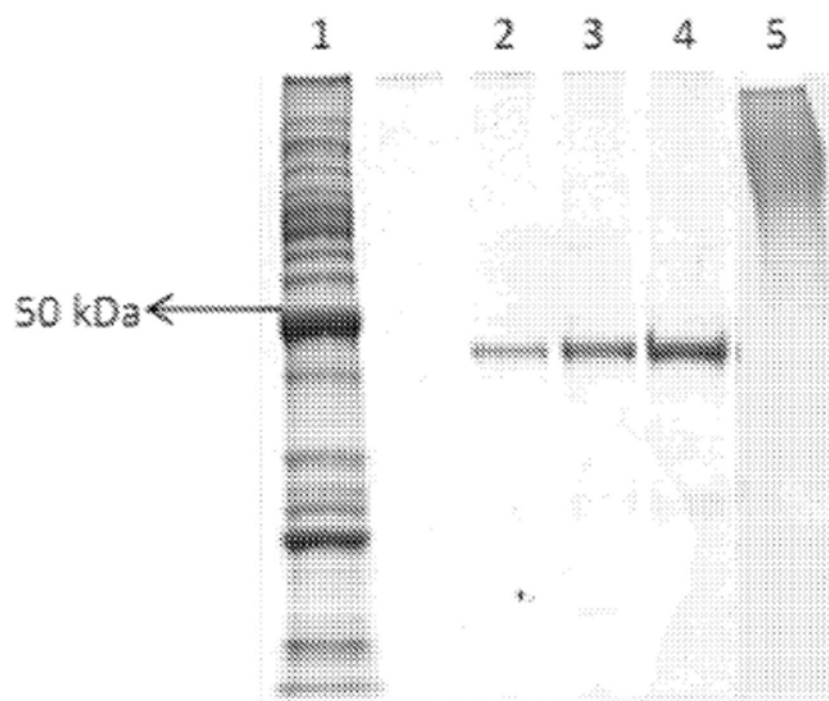


图1

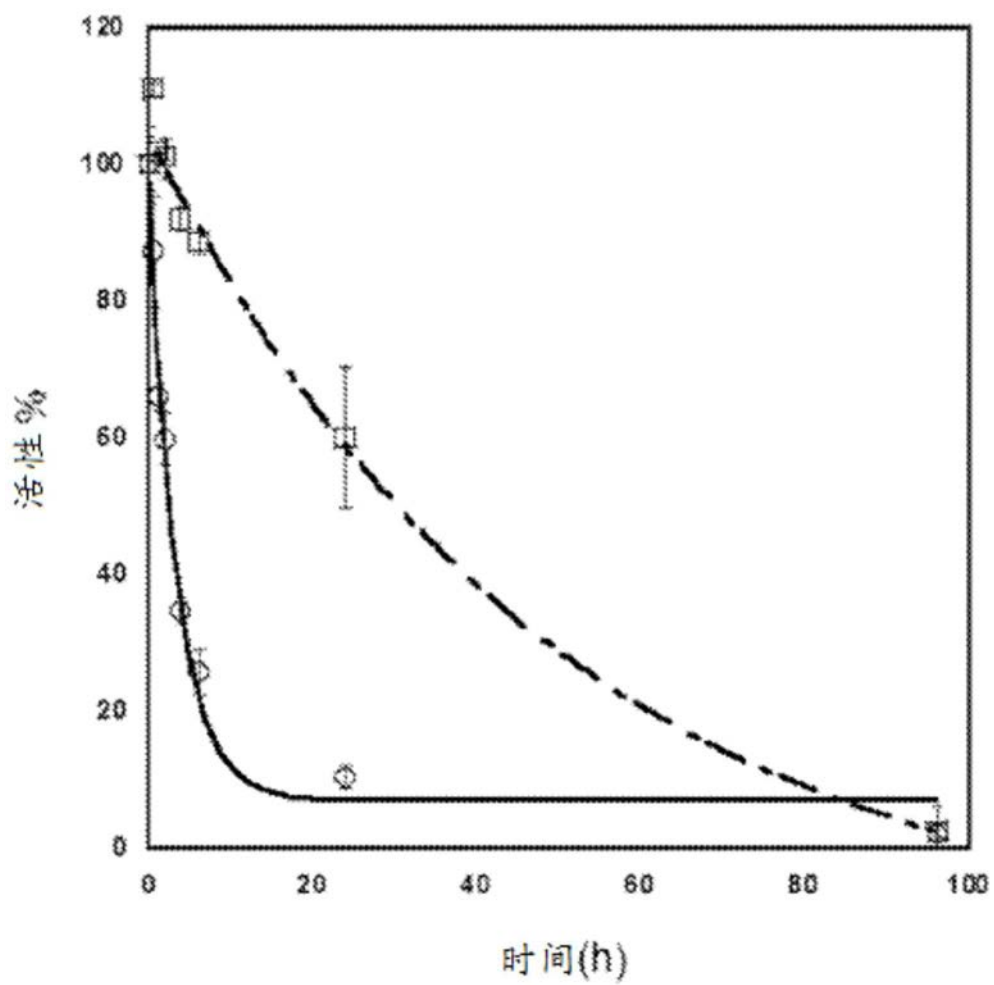


图2

组合肿瘤生长数据

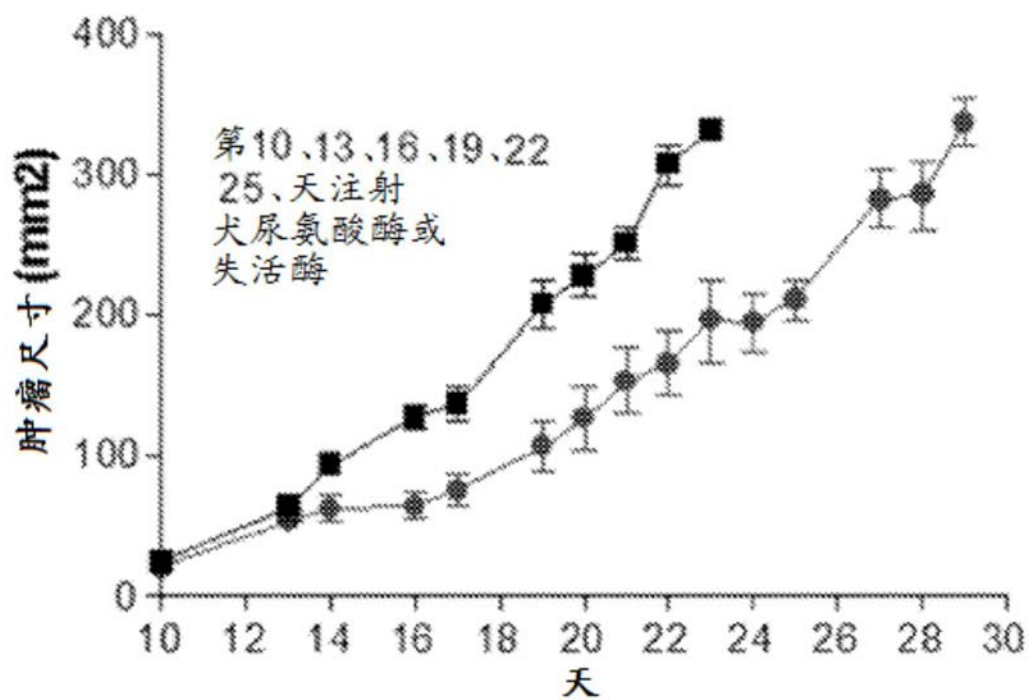


图3

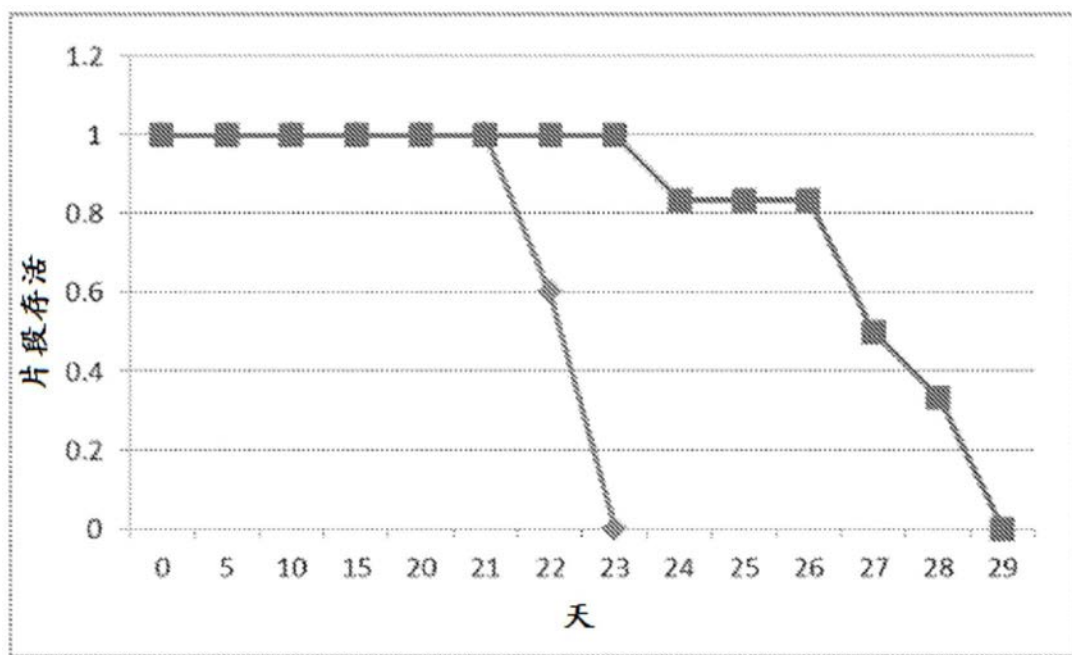


图4

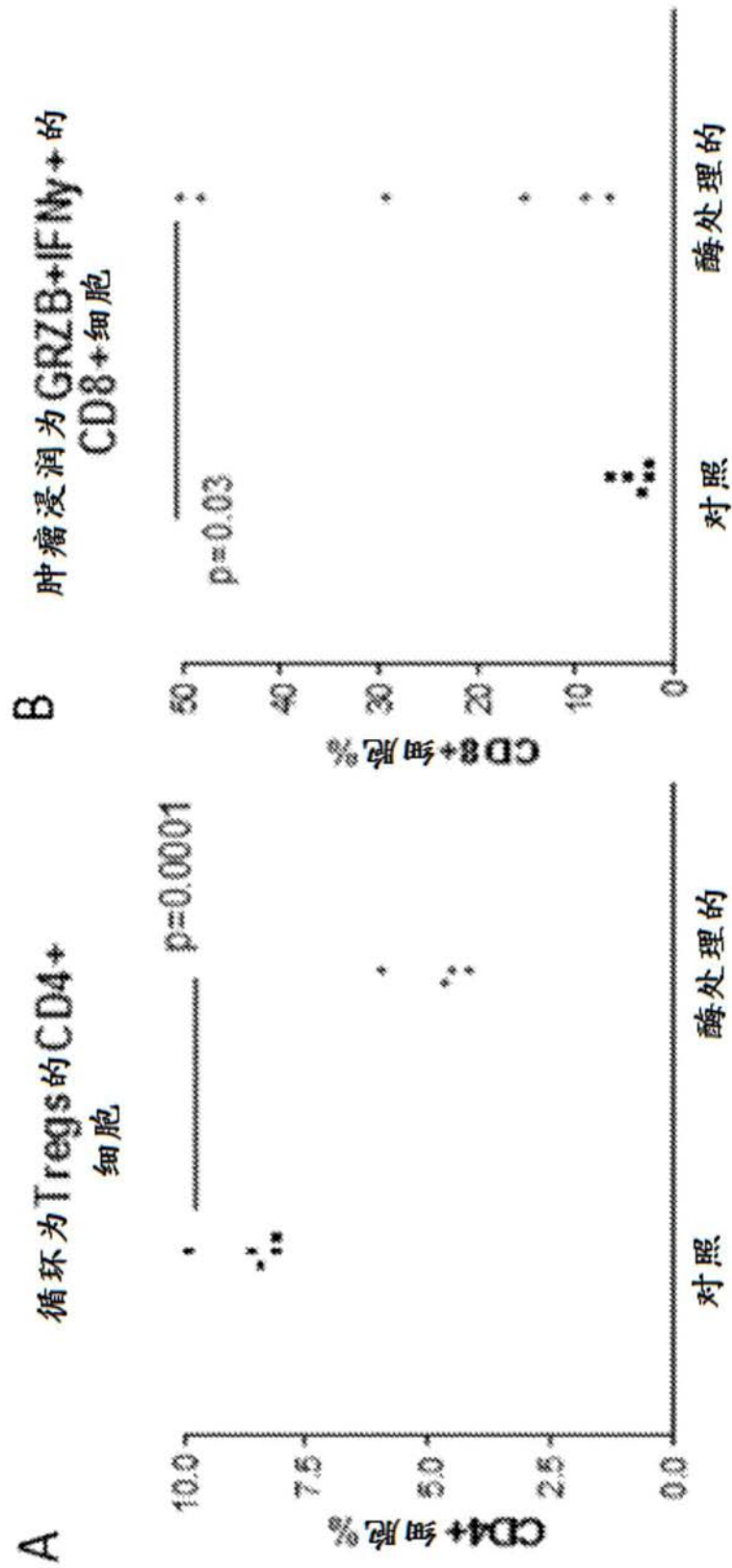


图5A-B

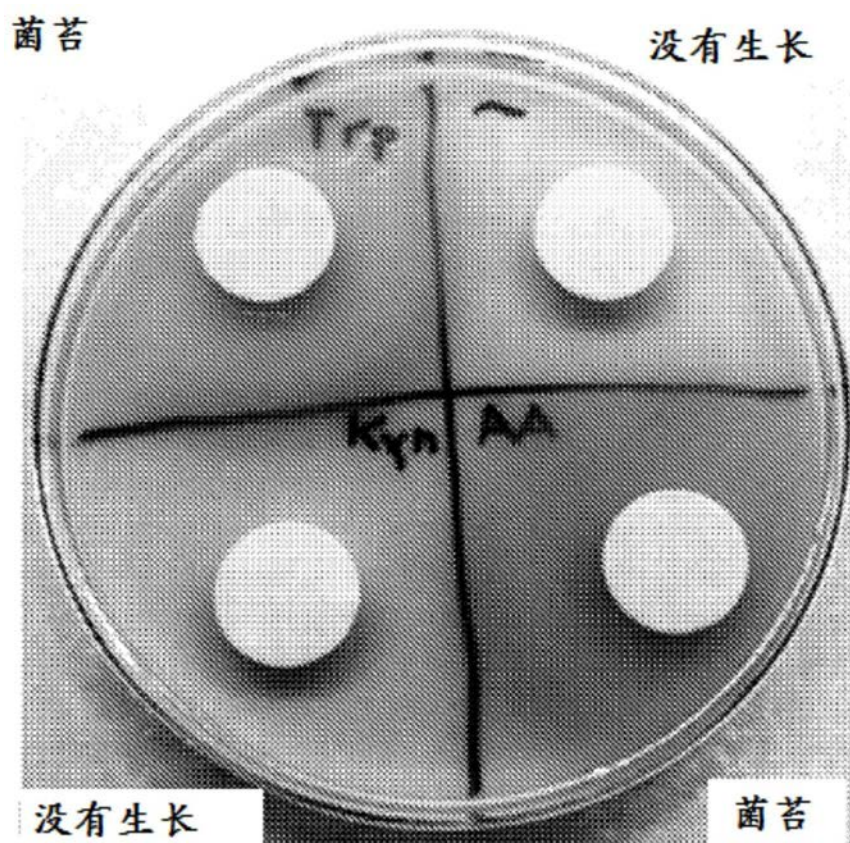


图6

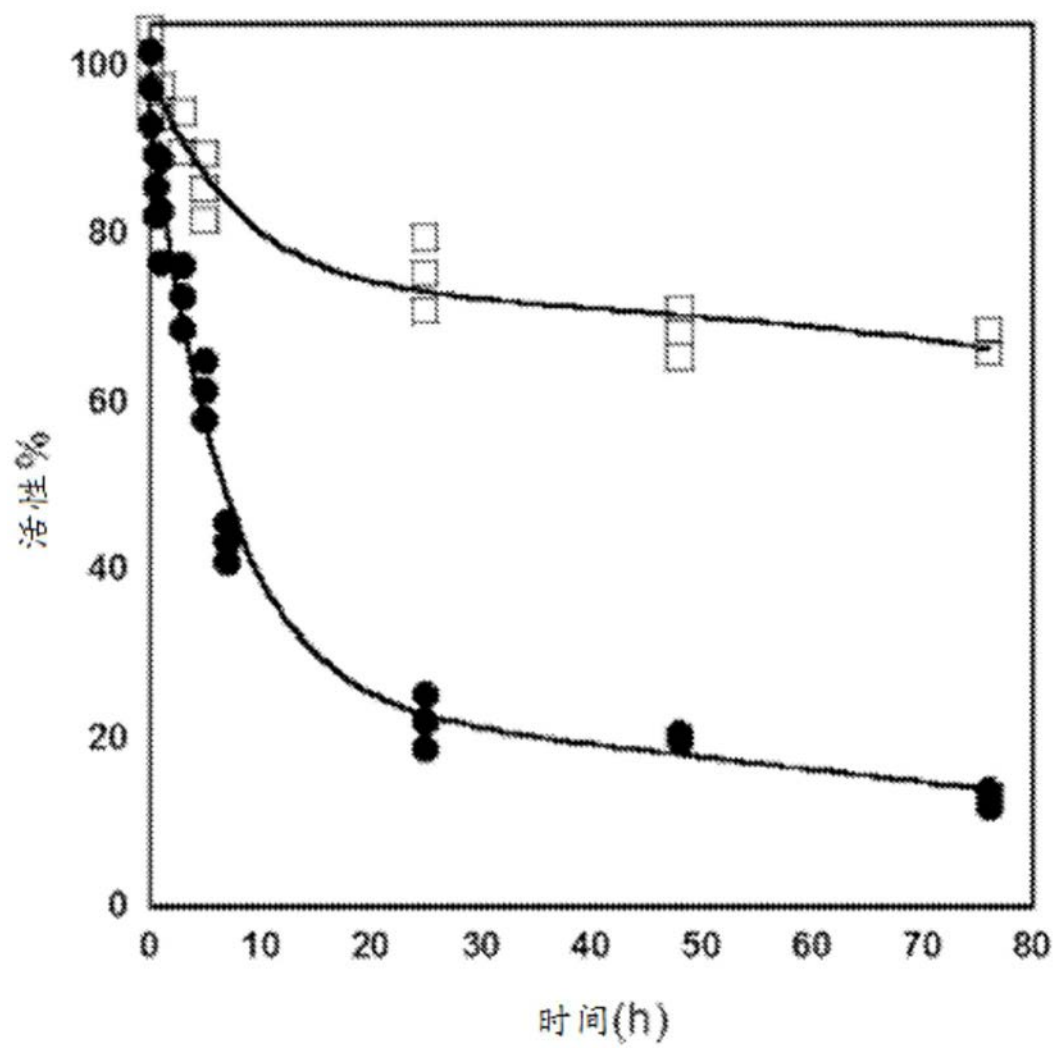


图7

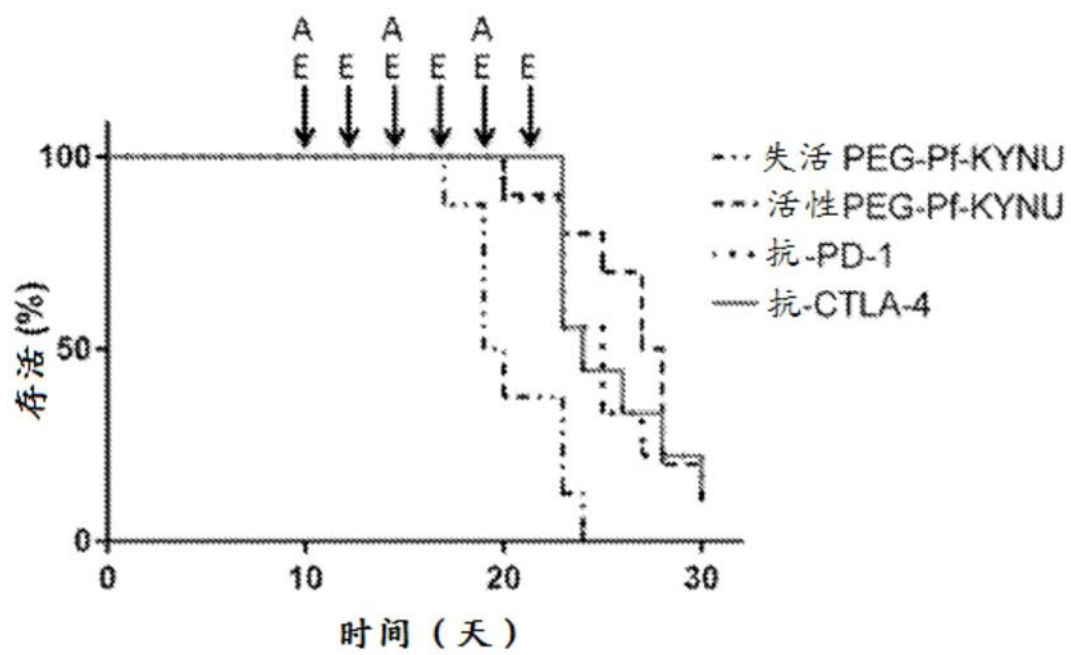


图8

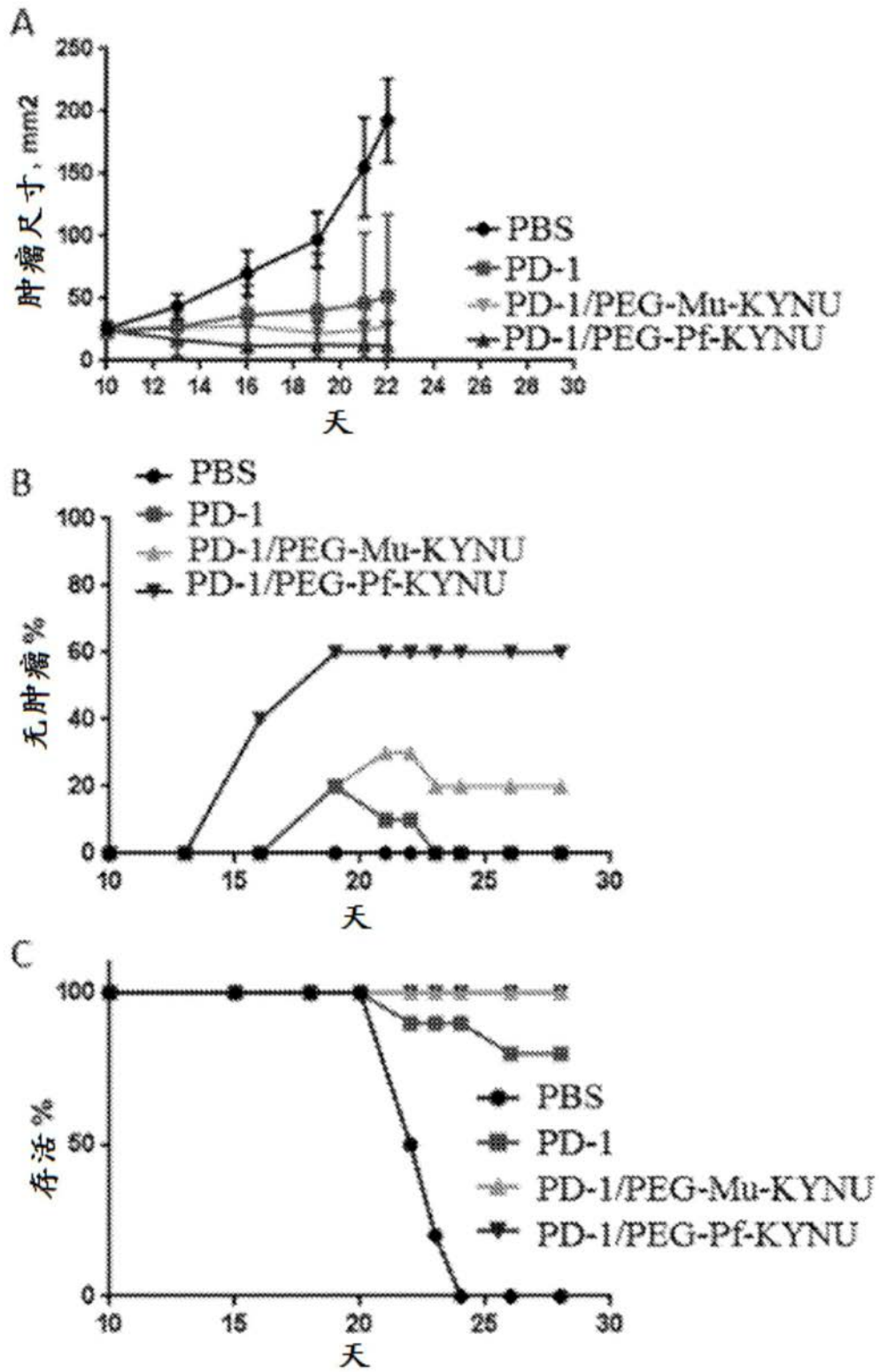


图9A-C

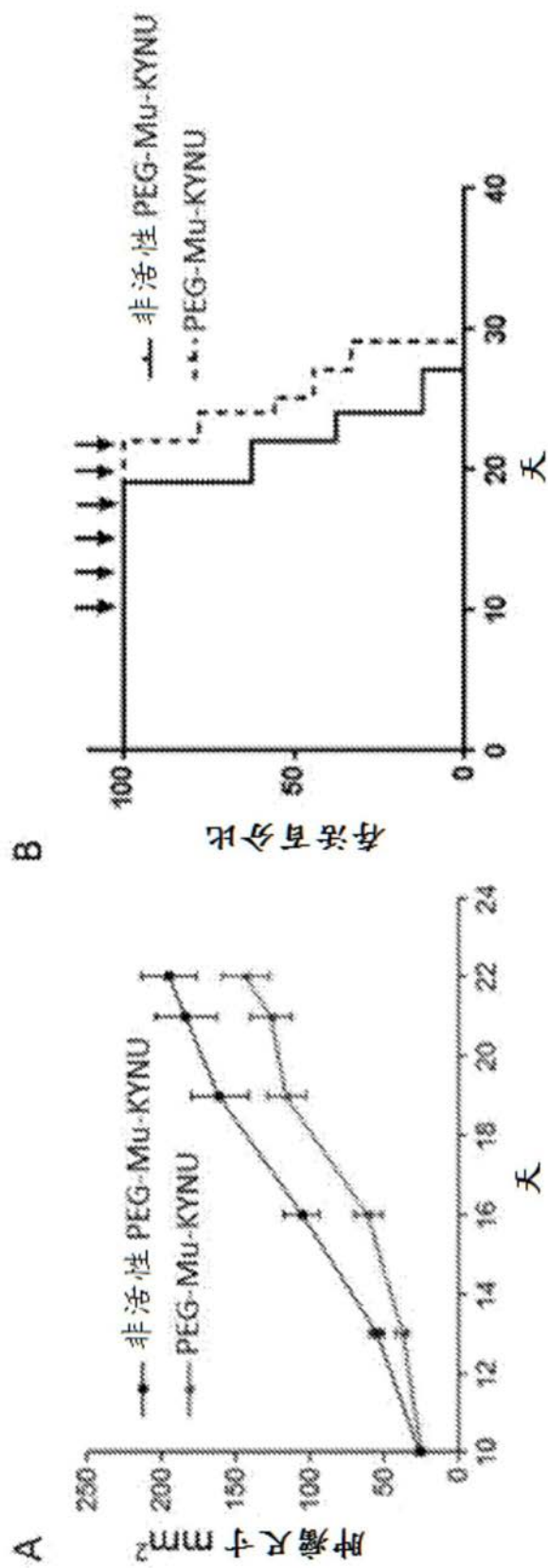


图10A-B