



(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.CI.

A61K 38/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 38/16 (2006.01)

61/872,132 2013.08.30 US

A61K 48/00 (2006.01)

61/986,366 2014.04.30 US

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2012099441 A2, 2012.07.26

2016.03.30

Adams S等. The kynurenine pathway in

(86) PCT国际申请的申请数据

brain tumor pathogenesis.《Cancer
Research》.2012, 第72卷(第22期), 第5649-5657
页.

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药物中的用途,其中所述犬尿氨酸酶由与SEQ ID N0:8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吲哚胺-2,3-双加氧酶亚型1 (ID01)、吲哚胺-2,3-双加氧酶亚型2 (ID02) 或色氨酸2,3-双加氧酶 (TDO) 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 N0:8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 N0:8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 N0:8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kcat/ K_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。

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 (ID01或ID02) 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。ID01和ID02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ID01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ID01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ID01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TDO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TDO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TDO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由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由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 N0:8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 N0:10)、食蟹猴(*Macaca fascicularis*)犬尿氨酸酶(Genbank ID:EHH54849.1;SEQ ID N0:11)和黑猩猩(*Pan troglodytes*)犬尿氨酸酶(Genbank ID:XP_003309314.1;SEQ ID N0:12)。示例性的天然多肽包含与SEQ ID N0:8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 N0:8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 N0:8)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)”可以表示一个或多于一个。

[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 PROTEINTM 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,其通过吲哚胺-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;组胺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(giomangiosarcoma);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;肝母细胞癌;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;牙原性瘤,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,弥漫性;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以离体步骤进行。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°C,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-、巯基-、胍-、吲哚-、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、磷酰胺连接、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。可采用纯化来自包涵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(半胱氨酸残基)或氨基)PEG化。半胱氨酸-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下有强的半胱氨酸-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酸残基上进行,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酸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。幸运地是,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(*Podospora*)、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)或栗酒裂殖酵母(*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的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,以及用于施用途径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, 如各种抗细菌剂和抗真菌剂, 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、硫昔脂 (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)的组合量提供。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(如噻替哌和环磷酰胺);烷基磺酸酯类(如白消安、英丙舒凡和嗪消安);氮丙啶类(如苯佐替哌、卡波醌,美妥替哌和乌瑞替派);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(triethylenethiophosphoramide)和三羟甲蜜胺(trimethylololomelamine));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、萘氮芥、胆磷酰胺

(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氮芥、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 II和卡里奇霉素 ω II))；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(carabacin)、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-重氨基-5-氧化-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-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(folinic acid))；醋葡醛内酯；醛磷酰胺糖苷；氨基乙酰丙酸；恩尿嘧啶；安吖啶；阿莫司汀(bestramycin)；比生群；依达曲沙；地磷酰胺(defofamine)；秋水仙胺；亚丝醍；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)；米托胍腙；米托蒽醌；莫哌达醇(mopidanmol)；二胺硝吖啶(nitroerine)；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；锗螺胺；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(vertacurinaA)、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)；阿拉伯糖昔("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、甲苯肼、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(transplatin)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泛的损害。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,和赘生性细胞

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 ipilimumab)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°C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°C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°C下通过在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°C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 N0:2)。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°C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°C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苯甲基碘酰氟和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,且其在4°C下通过在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°C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(pH7.4),300mM NaCl,0.5mM磷酸吡哆醛(PLP),1mM苯甲基碘酰氟和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20,000×g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(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(pH8.4),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±0.07EU/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(pH8.4),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,确定该酶的表观分子质量。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8μM-250μM的范围。L-犬尿氨酸具有 $4,500\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 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 $\text{Abs}_{365\text{nm}}$ 监测25°C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10μM的最终浓度,且在37°C下培养。在时间点处各自取出10μL的部分,且将其加入到990μL的L-犬尿氨酸/PBS的250μM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(kynurenic acid)、3-羟基-L-犬尿氨酸和L-邻氨基苯甲酸(L-anthrancilic 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%三氯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0.45μm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(Ex=365nm, Em=480nm)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±0.8%对8.6±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±19%对4±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、rpB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一性)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程度的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苯甲基碘酰氟和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
Arenitalea lutea	13	44.1
Belliella baltica DSM 15883	14	43.3
Bizionia argentinensis	15	42.9
Candidatus Entotheonella sp.TSY2	16	44.9
Candidatus Koribacter versatilis Ellin345	17	43.3
Cecembia lonarensis	18	45.1
兽类衣原体(Chlamydia pecorum) PV3056/3	19	38.2
Chamydophila caviae GPIC	20	40.8
(珊瑚状珊瑚球菌)Corallococcus coralloides DSM 2259	21	43
Cyclobacterium marinum DSM 74	22	44.5
Cystobacter fuscus	23	43.5
Echinicola vietnamensis DSM 17526	24	44.5
(黄杆菌)Flavobacteria bacterium BBFL7	25	43.4
Flexibacter litoralis DSM 6794	26	47.5
Formosa sp.AK20	27	45.7
Fulvivirga imtechensis	28	47.1
Kangiella aquimarina	29	44.1
Kangiella koreensis DSM 16069	30	44.3
Lacinutrix sp.5H-3-7-4	31	44.2
Mariniradius saccharolyticus	32	44.5

<i>Mucilaginibacter paludis</i>	33	43.9
(拟香味类香味菌) <i>Myroides odoratimimus</i>	34	42.2
(橙色粘球菌) <i>Myxococcus fulvus</i> HW-1	35	44.5
<i>Myxococcus stipitatus</i> DSM 14675	36	44.4
(黄色黏球菌) <i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	37	45.1
<i>Nafulsella turpanensis</i>	38	48.2
<i>Niastella koreensis</i> GR20-10	39	44.8
<i>Nonlabens dokdonensis</i> DSW-6	40	44
<i>Pedobacter agri</i>	41	44.1
<i>Pedobacter</i> sp.BAL39	42	42.1
<i>Pedobacter</i> sp.V48	43	44.1
<i>Rhodonellum psychrophilum</i>	44	45.4
<i>Salinispora arenicola</i>	45	39.1
<i>Saprospira grandis</i> str.Lewin	46	43.2
(橙色标桩菌) <i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	47	42.5
(地毯草黄单孢菌) <i>Xanthomonas axonopodis</i>	48	42
<i>Psychroflexus gondwanensis</i>	49	44
<i>Lewinella cohaerens</i>	50	45.6
<i>Lewinella persica</i>	51	44.9
<i>Pontibacter roseus</i>	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(\sim 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 ${}^1T_{1/2} = 6$ h,且随后 ${}^2T_{1/2} = 150$ h(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 ${}^1T_{1/2} = 5$ h,且随后 ${}^2T_{1/2} = 73$ h(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)、300mMNaCl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)上检查该酶的表观分子质量,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外型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 N0:55) 和h-KYNU-F306L (SEQ ID N0:56)。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Holmgard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

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*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.

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

[0264] Chen and Guillemin, Kynurenone 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-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma 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 kynurenone 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] Holmgard 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 ID01 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-Kynurenone-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *International Immunopharmacology*, 11 (8) : 932-938, 2011.

[0300] Stone et al., Replacing Mn²⁺ with Co²⁺ 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-kynurenone 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
 tcttagaaata atttgttta actttaaggaa aaacattaaa ataaggagggt agcaaatggg 60
 cggtcatcat caccaccatc atgggagcgg caccacccgc aacgattgcc tggcgctgga 120
 tgccgaggat agcctggcac cgctgcgtca gcagttgcgc ctgccgaaag gtgttattta 180
 tctggatggc aacagcctgg gtgcgcgtcc ggttgcggcg ctggcgctg cgcaggcggt 240
 gattgcggaa gaatggggca acggcctgat tcgcagctgg aacagcgcgg gctggcgcga 300
 [0001] tctgagcggaa cgcctggca accgcctggc gaccctgatt ggcgcgcgg atggcgaagt 360
 ggtgggtgacc gataccacca gcattaacct gtttaaagtgc tggcgccgg cgctgcgcgt 420
 gcaggcgacc cgcagcccgaa acgcgcgt gattgtgacc gaaaccagca acttccgac 480
 cgatctgtat attgcggaaag gcctggcgga tatgcgtcag cagggctata ccctgcgcct 540
 ggtggatagc cccggaaac tgccgcggc gattgtatgc gataccgcgg tggatgtgc 600
 gaccatgtg aactataaaa ccggctatata gcatgatatg caggcgctga ccgcgcgt 660
 ccatgaatgc ggccgcgtgg cgattgggaa tctggcgcat agccgcggcg cggcgccgt 720
 ggtatgtcat caggcgccggc cggattatgc gattggctgc acctataaat atctgaacgg 780
 cggccggcggc agccaggcgt ttgtgtgggt gagccgcag ctgtgcgatc tggcgccgca 840
 gcccgtgtct gttgggttg gccatagccg ccagttgcgc atggaaaccgc gctatgaacc 900
 gagcaacggc attgcgcgtc atctgtgcgg cacccagccg attaccagcc tggcgatgtt 960
 ggaatgcggc ctggatgttgc ttgcgcagac cgatatggcg agcctgcgc gcaaaaggct 1020
 ggcgcgtgacc gatctgttta ttgaactggt ggaacagcgc tgccgcggc atgaactgac 1080
 cctgggtgacc ccgcgcgaac atgcgaaacg cggcagccat gtgagcttg aacatccgaa 1140
 aggctatgcg gtgattcagg cgctgattga tcgcggcgat attggcgatt atcgcgaacc 1200
 ggcgcattatgcg cgcattggct ttacccgcgt gtataccacc ttaccgaag tggatgtgc 1260
 ggtgcagatt ctggcgaaa ttctggatcg caaaacctgg ggcaggcgc agttcaggt 1320
 ggcgcattatgcg cgcattggct ttacccgcgt gtataccacc ttaccgaag tggatgtgc 1347
 <210> 2
 <211> 1497

<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	合成的多核苷酸					
<400>	2					
tctagaaata	atttgtta	actttaagga	caaattcaga	caacgttaag	gaggtaaaat	60
atggcggtc	atcatcacca	ccatcatggg	agcggcgaac	cgagctccct	tgaacttccg	120
gccgataccg	tgcaacggat	agcggcgaa	ttgaaatgtc	acccgaccga	cgaacgcgtc	180
gcgttacatc	tggatgagga	agacaagctg	cgtcacttcc	gcgagtgctt	ttacattccg	240
aaaattcagg	atctgcccc	agtggacttg	agcctggtca	acaaagacga	gaacgccatc	300
tacttctgg	gcaatagcct	gggcctgcaa	ccaaagatgg	tgaaaaccta	tcttgaggag	360
gagcttgaca	aatggcgaa	gatcgcggcc	tacggccatg	aagtccgaa	gcgtccctgg	420
attaccggcg	atgagtcaat	cgttgcgttg	atgaaaggata	tcgtcggcgc	gaacgagaaa	480
gaaaattgcgc	tgatgaacgc	gctgaccgtg	aatctgcac	tgctgatgct	gtcattctt	540
aageccaccc	cgaagcgcta	caaaatcctg	ctggaagcga	aagcgttcc	cagcgatcat	600
tatgcgatag	aaagccagct	gcaactgcac	ggcctgaata	tcgaggagag	catcgatgt	660
ataaaaaccgc	gcgaaggtga	ggagaccctg	cggttggagg	acatcctgga	gtgtatcgag	720
aaggaggcg	acagtatcgc	ggtgatactt	ttcagcggcg	tgcatttcta	cacggccaa	780
cacttcaata	tcccgccat	taccaagcc	ggccaggcga	aagggtgcta	tgttaggctt	840
gatctggcgc	atgcagtggg	caacgtcgaa	ctgtatctc	atgattgggg	cgttgattt	900
gctgtcttgt	gcagctataa	gtatctaat	gcccggcccg	gtggattgc	gggagccctt	960
attcatgaga	aacacgcgca	taccattaaa	ccggcgctgg	ttggctgttt	tggcacgaa	1020
ctgagcaccc	gttcaagat	ggataacaaa	ctgcaattga	ttccggcggt	gtgcggcttt	1080
cgtattagca	accccccgtat	tctgctggtc	tgcagectgc	acgcgtctct	ggagattttc	1140
aagcaggcga	ccatgaaagc	gctgcgttaag	aaaagtgtc	ttctgacggg	ctacctggag	1200
tacctgataa	agcacaacta	cgccaaggat	aaggcggcca	cgaagaagcc	ggttgtgaac	1260
attatcaccc	cgtctcatgt	ggaagaacgt	ggctgccaac	tgacgataac	gttcagcggt	1320
ccaaacaagg	acgtgttcca	agagctggag	aagcgtggcg	tggtgtgtga	taaacgttaat	1380
ccgaatggca	ttcggtggc	gcctgtccg	ctgtacaaca	gcttccacga	cgtgtataag	1440
ttcaccaacc	tgctgacgag	cattctggac	agtgcggaaa	ccaaaaacta	gggatcc	1497
<210>	3					
<211>	1492					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	合成的多核苷酸					
<400>	3					
tctagaaata	atttgtta	actttaagaa	cacggtcggg	aatataagga	ggtaaaat	60
ggcggtcat	cataccacc	atcatgggg	cgccgagccg	agcccgctgg	aactgccgt	120
tgacgcggta	cgtcgattt	cgccagaact	gaactgtgac	ccgaccgatg	aacgtgtggc	180
gctgcgtctc	gacgaagagg	acaagctctc	tcactccgt	aactgcttct	atatccctaa	240
aatgcgtgac	ctgcccggca	tcgatctgtc	tctggttct	gaagacgacg	acgcgttta	300


```
ggcacccagc cgattaccag cctggcgatg gtggaatcg gcctggatgt gtttgcgcag 900
accgatatgg cgagcctgcg ccgcaaaaagc ctggcgctga ccgatctgtt tattgaactg 960
gttggaaacagc gctgcgcggc gcatgaactg accctggta ccccgcgca aatgcgaaa 1020
cgccggcagcc atgtgagctt tgaacatccg gaaggctatg cggtgattca ggcgcgtgatt 1080
gatcgcgccg tgattggcga ttatcgcgaa ccgcgcattt a tgcgc tttgg ctttaccccg 1140
ctgtataccca cctttaccga agtgtggat gcggtgcaga ttctggcga aattctggat 1200
cgcaaaaacctt gggcgccaggc gcagtttcag gtgcgccata gcgtgaccta g 1251
```

<210> 5
<211> 1398
<212> DNA
<213> 智人

<400> 5
atggAACCGA gctccCTTGA acttCCGGCC gataCCGTGC aacGGatAGC ggcggAAATTG
aaatgtcacc cgaccgacga acgcgtcgC ttacatctgg atgagGAAGA caagctgcgt 120
cacttCCGCG agtgcTTTA cattCCGAAA attcaggATC tgCCGCCAGT ggacttgAGC
ctggTCaaca aagacgagaa cGCCatCTac ttcCTGGCA atageCTGGG cCTGcaacca 180
aagatGGtGA aaacctatct tgaggAGGAGC ctTGACAAAT gggcGAAGAT cgcggcCTAC
ggccatGAAG tcggcaAGCG tccCTGGATT accGGCGATG agtcaatCtG tggcttGATG 240
aaggatATC tcggcgcGA CGAGAAAGAA attGCGCTGA tGAACGCGCT gaccGTGAAT
ctgcATCTGC tGATGCTGTC attCTTAAG cCCACCCGA agcGCTACAA aatCCTGCTG 300
gaagcGAAAG cgttCCCAg CGATCATTAT GCGATAGAAA GCGAGCTGCA actgcacGGC
ctGAATATCG aggAGAGCAT GCGTATGATA aaACCcGCGC aaggTgAGGA gaccCTGCGG
attgaggACA tcctGGAGGT gatcGAGAAG gagGGCGACA gTatcGCGGT gataCTTtC 360
aGCGCGtGC atttCTACAC gggCCAACAC tTCATATCC CGGCCATTAC caaAGCCGGC
caggcGAAAG ggtGCTATGT aggCTTtGAT ctggcGCATG cagtGGGCAA CGTcGAACTG
tatCTTcATG attggggcGT tgatTTGCG tgctGGTGCa gCTATAAGTA tCTGAATGCC 420
ggggCCGGTg ggattGCGGG AGCCTTATT catGAGAAAC acGCGCATAc cattAAACCG
GCGCTGGTTG gctGGTTTG GcACGAACTG agcACCCGCT tcaAGATGGA taACAAACTG
caattGATTC cgggcgtGTG cggCTTGTG attAGCAACC cCCGATTCT gctGGTCTGC 480
AGCCTGcACG cgtCTCTGA gatTTCAAG caggcGACCA tGAAAGCGCT GCGTAAGAAA
AGTGTGCTTC tgacGGGCTA CCTGGAGTAC ctGATAAAGC acaACTACGG caaggATAAG
GCGGCCACGA agaAGCCGGT tgtGAACATT atCACCCGT ctCATGTGGA agAACGTGGC
tgccAACTGA CGATAACGTT cAGCGTGCcA aacaAGGAGC tgTTCCAAGA gCTGGAGAAG
cgtGGCGTGG tgtGTGATAA acGTAATCCG aatGGCATTc gtgtGGCGCC tGtGCCGCTG
tacaACAGCT tccACGACGT gtATAAGTTC accAACCTGC tgacGAGCAT tCTGGACAGT
GCGGAAACCA AAAACTAG 540
1020
1080
1140
1200
1260
1320
1380
1398

<210> 6
<211> 1395
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 6

atggagccga	gcccgttggaa	actgcccgtt	gacgcggta	gtcgattgc	ggcagaactg	60
aactgtgacc	cgaccgatga	acgtgtggcg	ctgcgtctcg	acgaagagga	caagctct	120
cacttccgt	actgttctata	tatccctaaa	atgcgtgacc	tgccgagcat	cgatctgtct	180
ctggttctg	aagacgacga	cgcgatttac	ttccctgggtt	actctctggg	tctgcagcca	240
aaaaatggttc	gtacctacct	ggaggaagag	ctggacaat	gggcgaaaat	gggtgcctac	300
ggccatgatg	tggccaaacg	cccggttgc	gtcggcgacg	aaagcattgt	gtctctcatg	360
aaggacattt	ttgggtcaca	cgagaaagaa	attgcgtga	tgaatgtct	gaccatcaac	420
ctgcacctgc	tgctcctgtc	tttcttcaag	ccgaccccg	agcgtatcaa	aatctgtct	480
gaggctaaag	cgttccgtc	tgtactactac	gcgcataat	ctcaaatcca	actgcacgg	540
ctggacgttg	agaagtctat	gcgtatggtt	aagccgcgt	aaggcgagga	gaccctccgt	600
atggaagaca	tcctcgaagt	tatcgaagaa	gaagggtact	ctatcgact	tattctgttc	660
tctggcctgc	acttttacac	cggtaactg	ttcaatatcc	cgcaatcac	caaagcggc	720
cacggeaaag	gttgcgttgc	tggtttcgac	ctggccatg	cggttggtaa	cgtggagctg	780
cgcctccacg	actgggggtgt	tgactttgcg	tgctgtgtct	cttacaaata	cctgaaactct	840
ggtgcgggtg	gtctcgccgg	tgcgttgc	cacgaaaaac	acgcgcacac	cgttaaaccg	900
gctgcgttgc	gctgggttgcg	ccacgaccc	tctacgcgtt	tcaacatgga	caacaaactc	960
cagctgatcc	caggcgccaa	cgttccgt	atctctaacc	cgcgcatact	cctgggttgc	1020
tctctgcacg	cgtctctcg	gttttccag	caggcgacca	tgaccgcct	gcgcgtaaa	1080
tctattctcc	tgacgggta	tctggaatac	atgcgtgaag	actaccactc	taaagacaac	1140
acggaaaaca	aagggtccat	cgttaacatc	atcaccctgt	ctcggtcg	agaacgtggc	1200
tgccaaactga	ccctgacctt	ctctattccg	aaaaaatctg	tttcaaaga	actggagaaa	1260
cgtgggttgc	tttgcacaa	acgtgaaccg	gacggatacc	gegttgc	ggtcccgt	1320
tacaactt	tcatgacgt	ttataagttc	attcgctgc	tcacccat	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
 145 150 155 160

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
 225 230 235 240

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
 305 310 315 320

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 Leu Asp Lys Trp Ala Lys
85 90 95

[0007]

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

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
 305 310 315 320

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

[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 15

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

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 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

[0009] 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
[0010] 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 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

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 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

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

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

[0013]

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

65	70	75	80
Lys Met Val Lys Thr Tyr Leu 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			
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	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 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> Belliella 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

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

[0017] 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> Bizioniaria argentinensis

<400> 15

Met Ser Asn Phe Lys Thr Gly Ile Asp Phe Ala Lys Glu Gln Asp Glu
[0018] 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

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

[0019]

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

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		80	
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		160	
[0020]	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		240	
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	400
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 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 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

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 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

[0025]

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

<210> 21

<211> 425

[0027]

<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 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

Met Gly Pro Thr Phe Asp Pro Leu Pro Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu
 [0028] 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 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 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

275 280 285

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

[0033]

<210> 25

<211> 420

<212> PRT

<213> 黃杆菌 BBFL7

<400> 25

Met Glu Phe Asn Thr Thr Arg Asp Tyr Ala Leu Gln Leu Asp Gln Glu
1 5 10 15Asp Ser Leu Ser Arg Phe Arg Glu Ser Phe His Ile Pro Lys His Thr
20 25 30Asp Gly Thr Asp Ser Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln
35 40 45Pro Arg Gln Thr Lys Thr Phe Leu Asn Gln Glu Leu Asp Asp Trp Ala
50 55 60Lys Leu Gly Val Glu Gly His Phe His Ala Glu Asn Pro Trp Met Pro
65 70 75 80Tyr His Glu Phe Leu Thr Glu Thr Thr Ala Gln Val Val Gly Ala Lys
85 90 95Pro His Glu Val Val Ile Met Asn Thr Leu Thr Thr Asn Leu His Leu
100 105 110Met 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 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
 [0034] 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
 [0035] 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

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

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

[0037] 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

[0038]

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

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

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	160
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	240
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	320
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

Tyr His Glu Phe Leu Thr Glu Glu Ser Ala Lys Leu Val Gly Ala Lys
[0041] 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 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 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

[0044]

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

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
---	-----	-----	-----

[0045]

Tyr Ala Asn Gly Val Val Gly Asp Trp Arg His Pro Asn Val Ile Arg	385	390	395	400
---	-----	-----	-----	-----

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	15
---	---	---	----	----

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
---	----	----	----	----

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

[0050]

Asp Trp Ala Arg Phe Gly Val Glu Gly 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 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

210

215

220

His Gly Ala Gly Asn Leu Lys Leu Ala 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 Ala
 245 250 255

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

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

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

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

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

Leu Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Glu Lys Leu Pro Pro Gly Phe
 340 345 350

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

[0051]

Ser Leu Arg Phe Lys Gly Glu Ala Gln Gly Met Leu Lys Arg Leu Ser
 370 375 380

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

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> 黃色黏球菌 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

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
 [0052] 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> Nafulsell a 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

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

[0056]

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

[0057]

Ile Thr Pro Glu Asn Pro Lys Asp Arg Gly Cys Gln Leu Ser Leu Ala
355 360 365Val Lys Asn Ala Asp Lys Ser Leu Phe Asp Ala Ile Thr Glu Lys Gly
370 375 380Val Ile Ala Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Ile Ala Pro Val
385 390 395 400Pro Leu Tyr Asn Asn Tyr Glu Asp Cys Trp Arg Phe Val Asp Val Leu
405 410 415Lys 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 15Asp Glu Leu Lys His Phe Arg Asp Gln Phe Leu Phe Pro Lys Tyr Gln
20 25 30Asp Lys Phe Phe Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro
35 40 45

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

[0058] 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
 [0059] 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

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

Arg Phe His Gly Tyr Asp Ala Lys Glu Ala Ile Val Glu Val Ala Pro
 [0061] 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

[0062]

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

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	240
---	-----	-----	-----	-----

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
---	-----	-----	-----

[0063]

Asn Ser Asn Val Leu Ala Leu Ala Ala His Gln Ser Ser Leu Asp Ile	305	310	315	320
---	-----	-----	-----	-----

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	400
---	-----	-----	-----	-----

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> Salinispura 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

[0065]

<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

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
 [0066] 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

<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

[0069]

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

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 140Lys Phe His Gly Tyr Thr Pro Glu Glu Ala Ile Ile Glu Leu Phe Pro
145 150 155 160Arg Glu Gly Glu His Thr Leu Arg Thr Glu Asp Ile Leu Lys Ser Ile
165 170 175Glu Ala Ala Gly Asp Glu Leu Ala Leu Val Leu Met Gly Gly Ile Asn
180 185 190Tyr Tyr Thr Gly Gln Val Tyr Asp Met Ala Ala Ile Thr Gln Ala Gly
195 200 205His Gly Val Gly Ala Val Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Ala Gly
210 215 220Asn Val Pro Leu Gln Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe Ala Val Trp
225 230 235 240Cys Thr Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Gly Thr Ala Gly Val
245 250 255Phe 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 285Phe Ile Pro Met Thr Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Asn Ala Gln
290 295 300Ile Leu Pro Met Ala Val His Arg Ala Ala Leu Glu Leu Phe Asp Glu
305 310 315 320Ala Gly Met Asp Asn Leu Arg Ala Lys Ser Glu Lys Leu Thr Gly Tyr
325 330 335Leu Glu Tyr Leu Ile Asp Asp Val His Val Gly Lys Glu Leu Leu Glu
340 345 350Met Ile Thr Pro Arg Asp Pro Gln Ala Arg Gly Cys Gln Ile Ser Leu
355 360 365Leu Val Lys Gln Asn Ala Arg Glu Leu Phe Asn Arg Leu Met Glu Ala
370 375 380Gly Ile Ile Val Asp Phe Arg Glu Pro Ser Val Ile Arg Val Ala Pro
385 390 395 400Thr 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
 ccatggccgg acaccatcat caccaccacg gcggcattga aaaactgaaa cagtatcacg 60
 atgaagcgat cagcctggat agccttgatc ctttacagaa attcaaagaa tgctttacat 120
 taccgaagga acctggagca ctgttattct gcagcaatag tctggcttg cccgcaaag 180
 cggttccca gaaaactggaa gaacagttac agcggtgag cgaattagc gtcgtggat 240
 gtttgaagg cgaggtaat tggtataaca gcttggaaaga gcctattgtg cgtccattga 300
 gcaaaatctt aggagccgaa agcaatgaag tgaccctgat gaatagctt accgtaaatc 360
 tgcacatgtt gttgattagt ttctatcgat cgaccaaat gcgttataag atactgattt 420
 atggcccage ctttccgtcc gatctgtat ccattaagtc gcatctgcgt tttcataaga 480
 aagaagaagg tcttattctg atagaaccgc gtccggcga acatctggt caggaagaag 540
 actttctgcg cgtgataaag aagcaaggag aggaaattgc gttgggttt ctgaactgcg 600
 tgaattttctt gagcggccag gtgctgaaag tggatgaaat caccgttat gccaaggagg 660
 ctggctgctg cgtcggttat gatctggcgc atgcagcagg caatattccc ttaagcttgc 720
 atgatcttgg cggcacttt gcggtggct gtcctacaa atatctgtc ggaggcccag 780
 gaggtccagg catagcctac gttcacgcgt cacatcacca ccaacagttc gtgcgttca 840
 gcggtggtg gggcaatgat ccgaataccg gttttactt ccccaaagag tttgtccgt 900
 atggcggtgc gagtcctgg caggtgagca ccccgatcgat tctggcggaaat ctggcgtaa 960
 ttgcggcact ggaggtgtt gaggaaagcgg gcatggagaa tatacgtaa aagagcaaga 1020
 aacaaacagc gttcctgtat accctgttag aaaaatgtcg cggcacccat tttgatatga 1080
 taacccgaa agaaccggag ctgcgtggct gtcagcttag cctgcgtatc aaatgcagcc 1140
 gtagcgaaga gatcttacgg aagctggaaac gtttaggcatt tacatgcgtat ttccgttgc 1200
 cgaacattct gcgtgtggcg ccgagccgt tgcacccag ctttacgaa atctatcgat 1260
 ttgcgtacac ctttctggaa gtcctgaaaa 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 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

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	
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	Ile	
180						185					190				

[0077]

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	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 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

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 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

[0081]

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(Chlamydophila pecorum)

<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 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

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
 145 150 155 160

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 Asp Phe Ala Val Gly Cys Ser
 225 230 235 240

[0082] Tyr Lys Tyr Leu Cys Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Ala Tyr Val
 245 250 255

His Ala Ser 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
 305 310 315 320

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

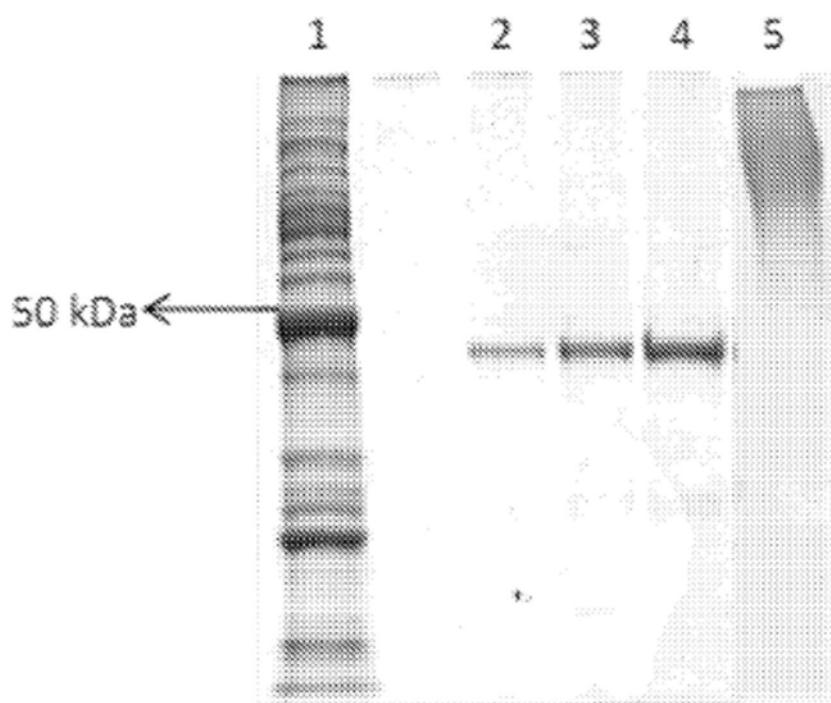


图1

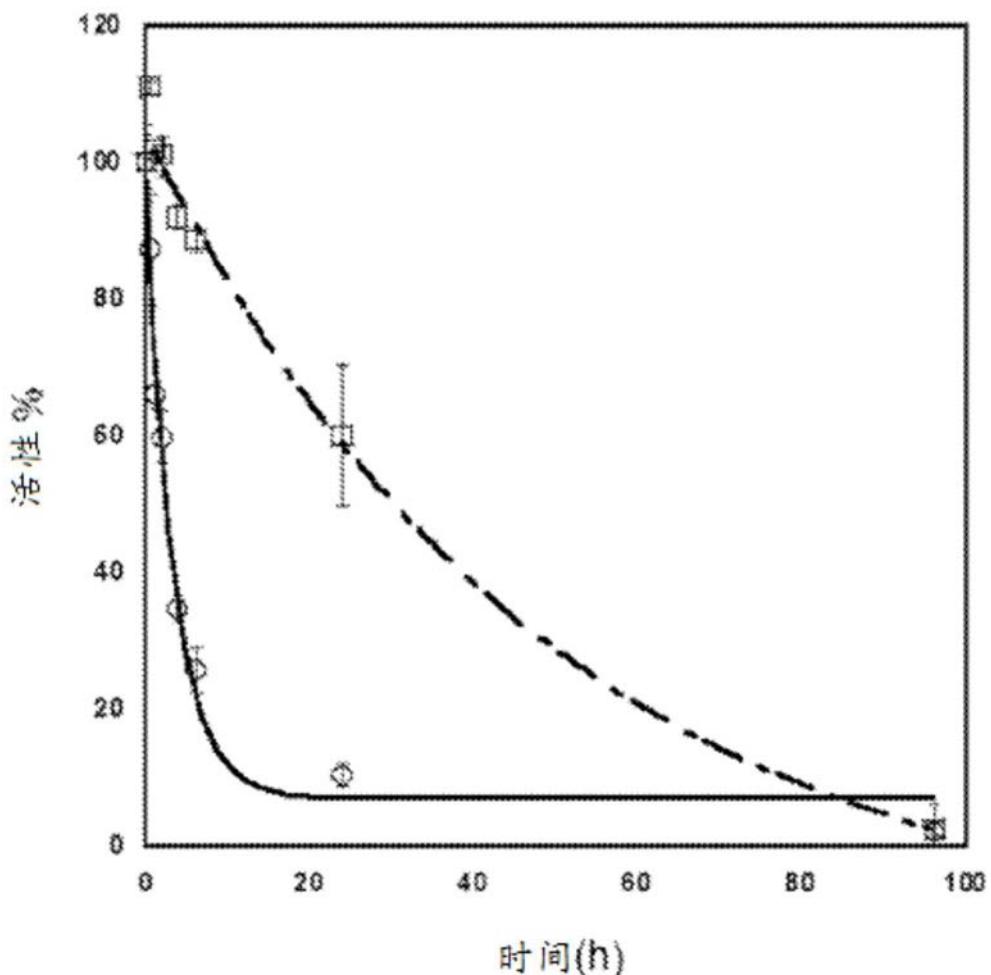


图2

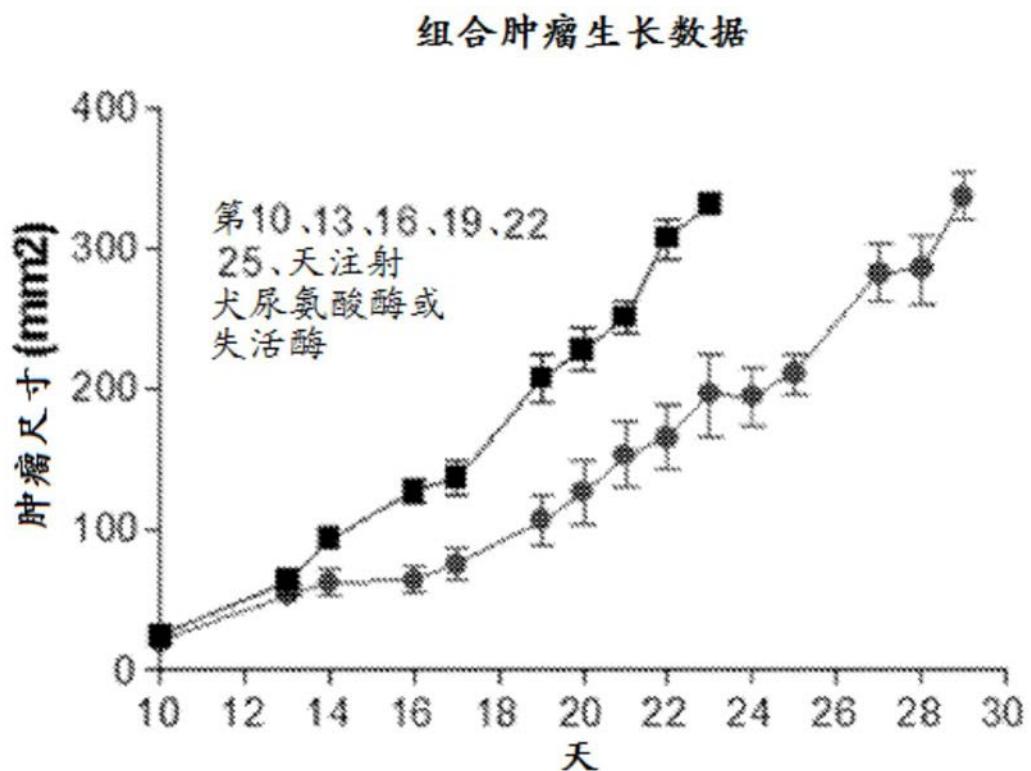


图3

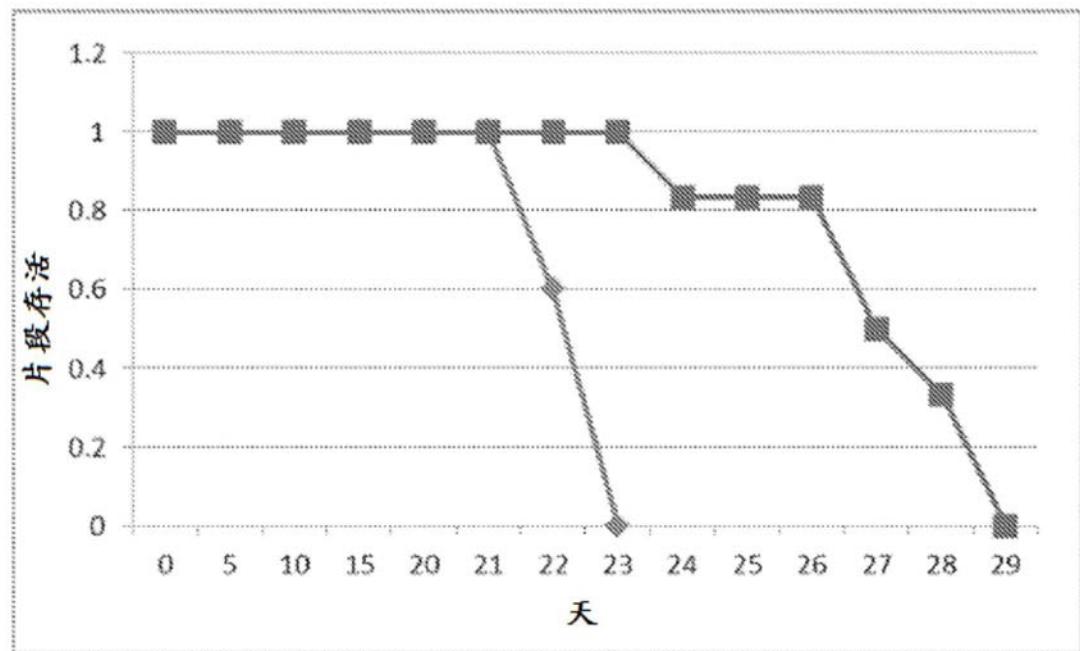


图4

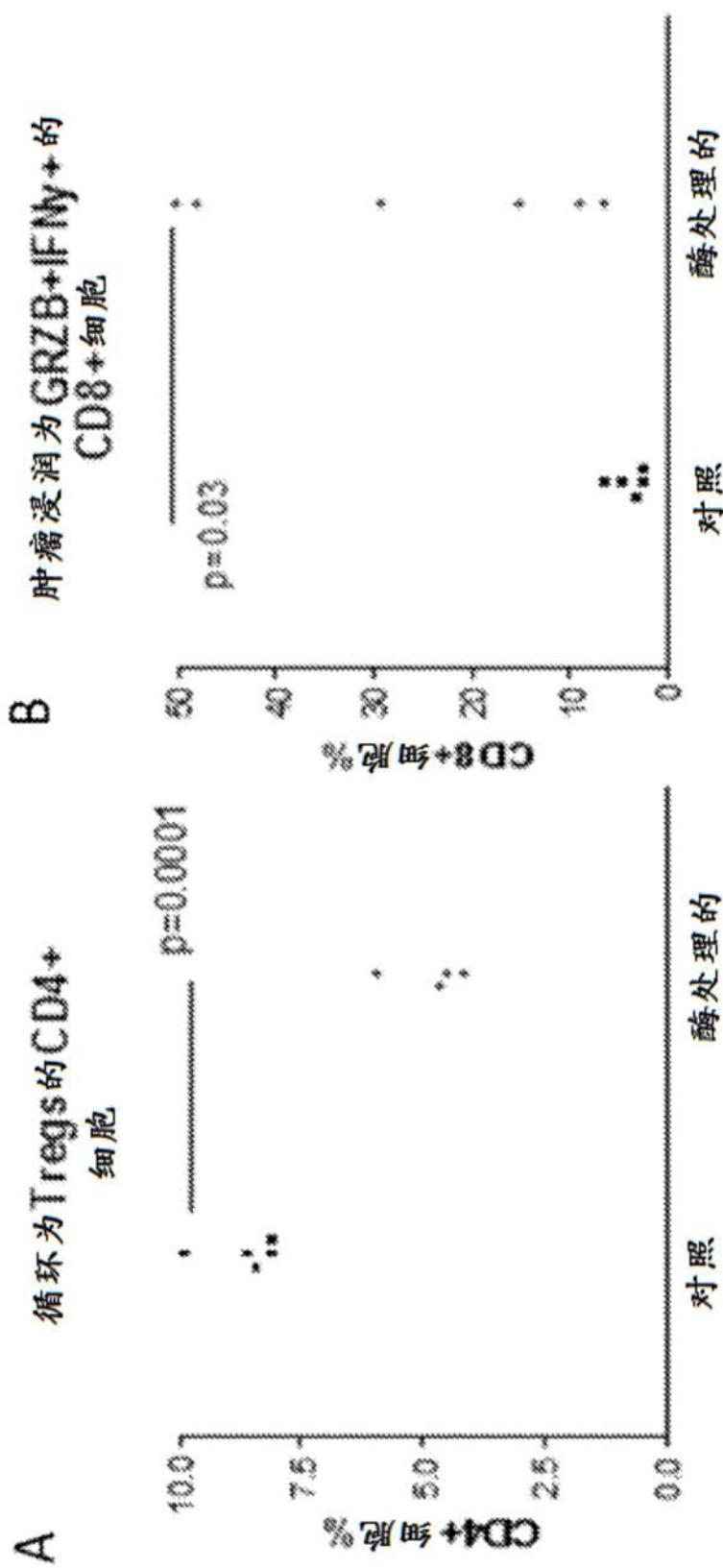


图5A-B

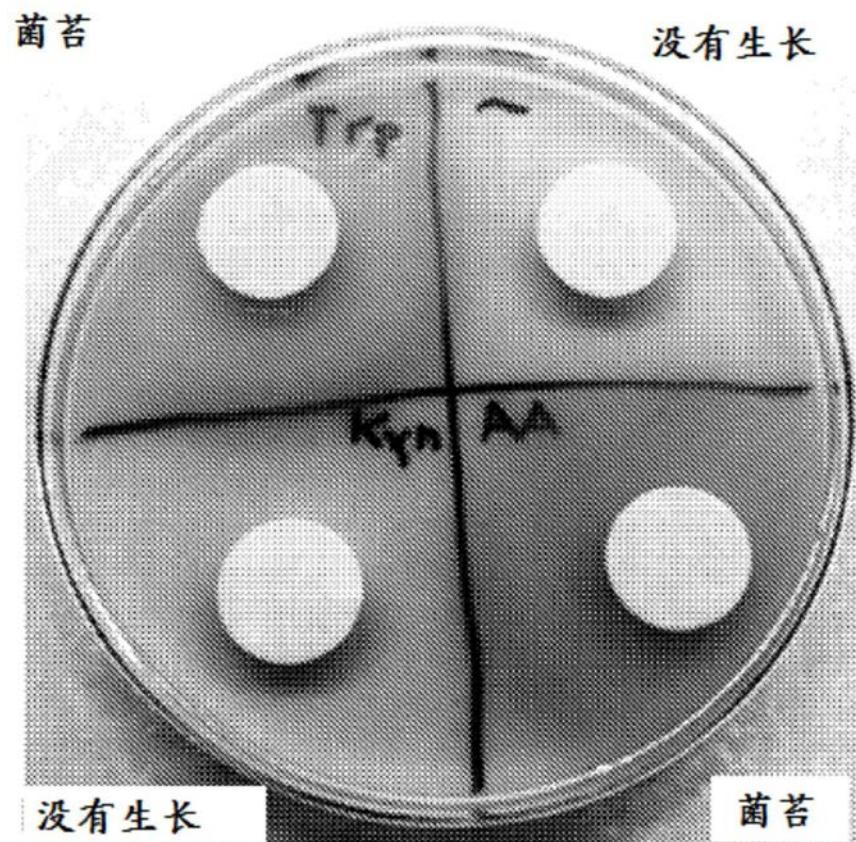


图6

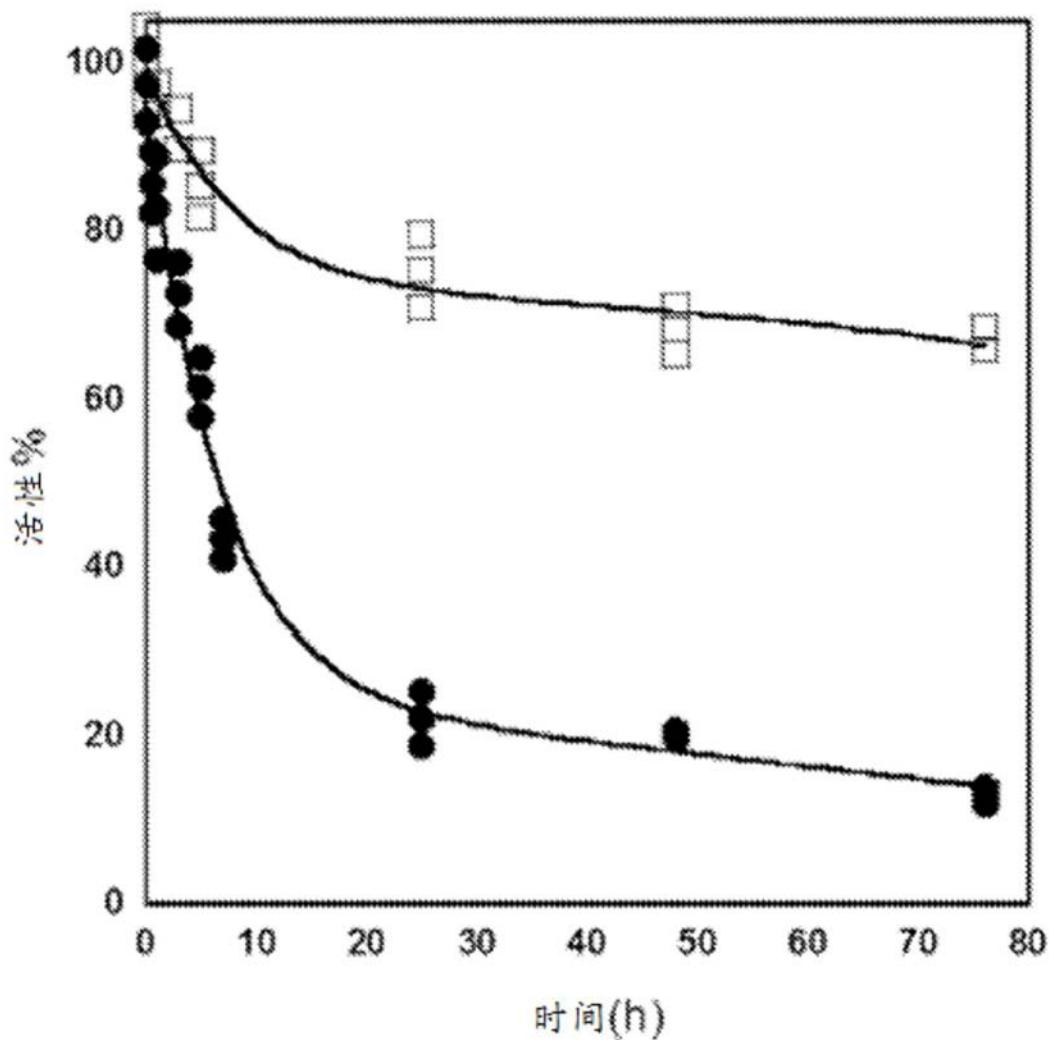


图7

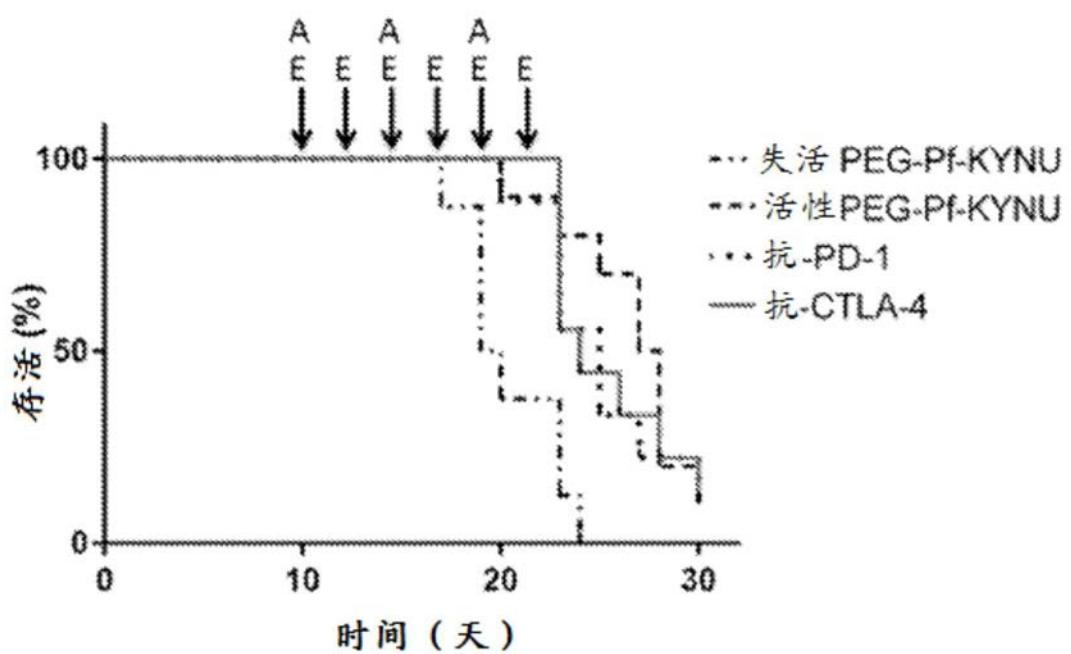


图8

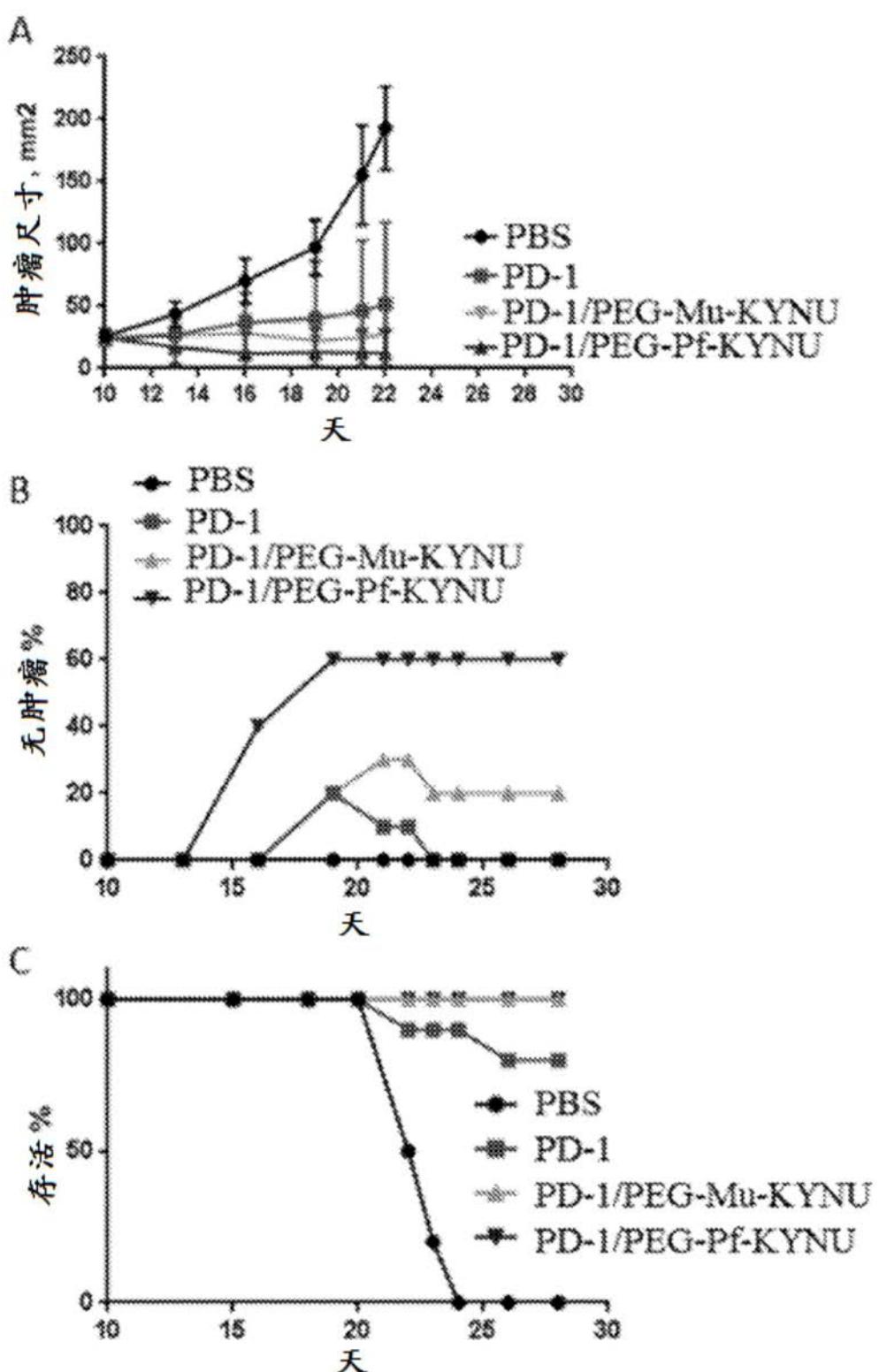


图9A-C

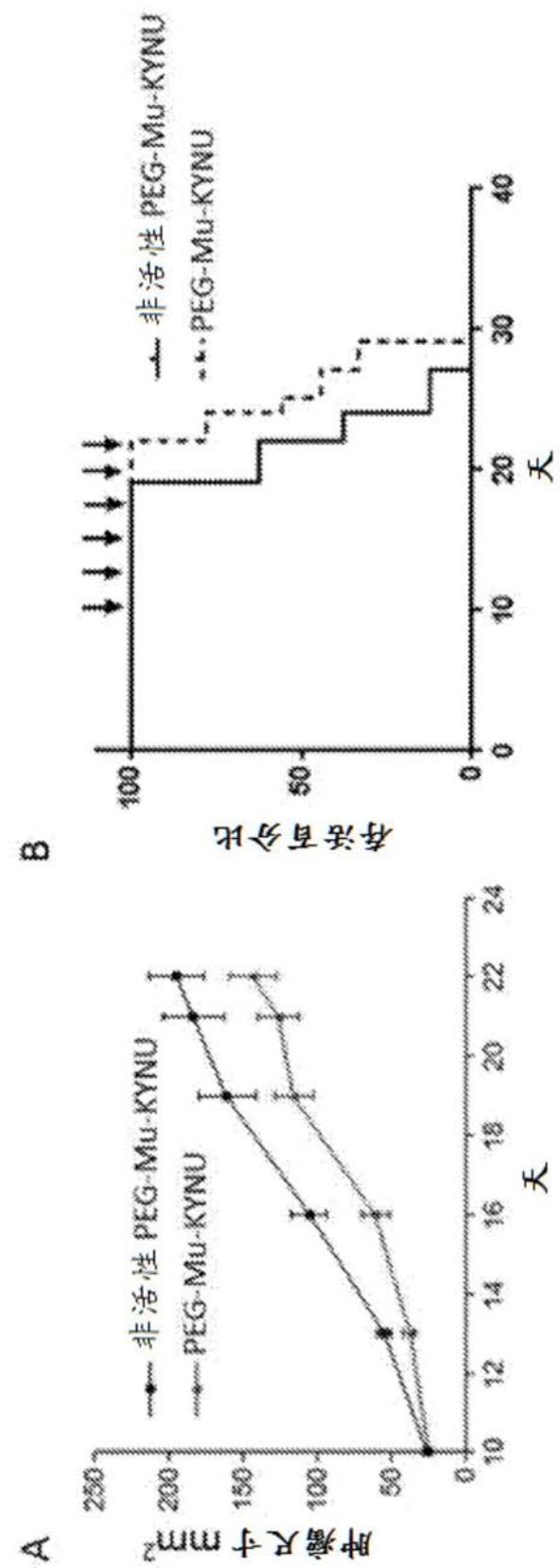


图 10A-B