(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월13일
(11) 등록번호 10-2442231
(24) 등록일자 2022년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/14 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 9/96* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/14 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7019661(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년08월29일
심사청구일자 2021년07월20일
(85) 번역문제출일자 2021년06월24일
(65) 공개번호 10-2021-0082264
(43) 공개일자 2021년07월02일
(62) 원출원 특허 10-2016-7008486
원출원일자(국제) 2014년08월29일
심사청구일자 2019년08월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/053437
(87) 국제공개번호 WO 2015/031771
국제공개일자 2015년03월05일
(30) 우선권주장
61/872,132 2013년08월30일 미국(US)
61/986,366 2014년04월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020120085209 A
WO2012099441 A2
J Med Chem. 2009, Vol.52, No.2, pp.389-396
JP2008237022 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 보드 오브 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트리트
(72) 발명자
조지우 조지
미국 텍사스주 78731 오스틴 윌리엄스 럿지 웨이 6405
스톤 에버렛
미국 텍사스주 78731 오스틴 하트 레인 7503
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 17 항 심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **종양 치료를 위한 키누레닌 고갈 효소의 투여**

(57) 요 약

키누레니나제 활성을 가진 단백질을 사용하는 것과 연관된 방법 및 조성물이 기술된다. 예를 들면, 특정 양태에서 키누레닌을 분해할 수 있는 변형된 키누레니나제가 개시될 수 있다. 추가로, 본 발명의 특정 양태는 개시된 단백질 또는 핵산을 이용한 키누레닌 고갈을 통해 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류
C12N 15/52 (2013.01)
C12N 9/96 (2013.01)
C12Y 307/01003 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 8과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 변형된 키누레니나제 효소로서, 상기 변형된 효소가 서열번호 8에 비해 적어도 하나의 치환을 가지며, 이때 상기 적어도 하나의 치환이 서열번호 8의 306번 위치에서 발견되는 Phe에 대한 치환을 포함하고, 상기 변형된 효소가 서열번호 8의 효소보다 키누레닌-분해 활성이 더 높은 것인, 변형된 키누레니나제 효소.

청구항 2

제1항에 있어서, 자연적인 인간 키누레니나제의 306번 위치에서 발견되는 Phe에 대한 상기 적어도 하나의 치환이 보존적 치환인, 변형된 키누레니나제 효소.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 8과 95% 이상 동일한 것인, 변형된 키누레니나제 효소.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 적어도 하나의 치환이 Phe306Met을 포함하는 것인, 변형된 키누레니나제 효소.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 적어도 하나의 치환이 Phe306Leu을 포함하는 것인, 변형된 키누레니나제 효소.

청구항 6

제1항에 있어서, 이종 펩티드 절편을 추가로 포함하는 것인, 변형된 키누레니나제 효소.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 이종 펩티드 절편이 XTEN 펩티드, IgG Fc, 알부민 또는 알부민 결합 펩티드인 것인, 변형된 키누레니나제 효소.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 효소가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)에 결합되는 것인, 변형된 키누레니나제 효소.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 효소가 하나 이상의 리신 또는 시스테인 잔기를 통해 PEG에 결합되는 것인, 변형된 키누레니나제 효소.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 키누레니나제가 3'-OH 키누레닌보다 키누레닌에 대해 더 높은 촉매 활성을 갖는 것인, 변형된 키누레니나제 효소.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 키누레니나제가 키누레닌에 대하여 0.5 M^{-1}/s^{-1}이상의 k_{cat}/K_M를 갖는 것인, 변형된 키누레니나제 효소.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 효소를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 핵산이 박테리아, 균류, 곤충 또는 포유동물에서의 발현을 위해 코돈 최적화되는 것인, 핵산.

청구항 14

제12항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 15

제12항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 숙주 세포가 박테리아 세포, 균류 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포인 것인, 숙주 세포.

청구항 17

암에 걸린 개체의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 효소 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **발명의 배경**

[0002] 본 출원은 2013년 8월 30일에 출원된 제61/872,132호, 및 2014년 4월 30일에 출원된 제61/986,366호 미국 가출원 특허의 우선권 이익을 주장하며, 본 출원의 전체 내용은 본 명세서에 참고로서 포함된다.

[0003] 본 발명은 미 국립보건원이 수여한 인가 번호 제R01 CA154754호 하의 정부지원으로 이루어졌다. 정부가 본 발명에 특정한 권리를 갖는다.

[0004] **1. 발명의 분야**

[0005] 본 발명은 일반적으로 L-키누레닌 또는 L-3-하이드록시키누레닌을 고갈시키는 효소를 이용하여 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 더 상세하게는, 본 발명은 인간 치료를 위해 적절한 L-키누레닌 분해 활성을 가진 박테리아 및 포유류 효소의 유전자조작, 약리학적 최적화 및 사용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0006] **2. 관련 기술의 설명**

[0007] 암 세포에 의해 인돌아민-2,3-디옥시게나제 동형 (IDO1 또는 IDO2)이 과발현되는 것 또는 암 침투 백혈구가 재프로그램되어 상기 효소 중 하나를 발현하는 것이 암에 대한 후천성 면역 반응을 약화시키는 데 상당한 영향을 준다는 관찰이 있었다. 효소의 기질 세포에 의한 발현이 일부 종양에 의해 유도될 수 있는 IDO1 및 IDO2 그리고 트립토판 2,3-디옥시게나제 (TDO)는 L-키누레닌 (KYN)으로의 트립토판 (Trp) 이화작용에서 속도제한 단계를 촉매한다 (Godin-Ethier *et al.*, 2011). 종양은 LAT1-유사 아미노산 치환인자를 이용하여 세포질 KYN 분자를 세포외 Trp 분자로 치환하고 (Kaper *et al.*, 2007), 이는 면역 세포에서 국부적으로 Trp 수준을 고갈시키는 동시에 국부적으로 KYN 수준을 증가시키는 이중 효과를 지닌다. 인접한 면역 세포가 KYN를 내재화하면, 이것은 아릴 탄화수소 수용체 (AHR)에 대한 활성화 리간드가 되어 면역 세포 분화 및/또는 아폽토시스 유발을 통한 종양 내

성을 일으키는 수많은 사이토킨 및 케모카인의 발현을 야기한다 (Della Chiesa *et al.*, 2006; Opitz *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011). 또한, 키누레닌으로부터 형성된 다른 KYN-관련 화합물, 특별히 언급하자면 키누렌산은 또한 외톨이 GPCR인 GPCR35의 작용제로서 기능함으로써 면역억제 효과를 지닌다. KYN 형성의 저해 (및 따라서 IDO1 또는 TDO의 저해를 통한 키누렌산, 3-하이드록실 키누레닌산 및 퀴놀린산을 비롯한 KYN 대사 부산물 형성의 저해는 암 표적으로서 상당한 관심을 받아왔다 (Chen 및 Guillemin, 2009; Rutella *et al.*, 2009; Prendergast, 2011). IDO1을 위한 기질 유사체 저해제, 가령 1-DL-메틸트립토판이 개발되었고 이는 암 유래 종양 내성을 극복하는, 즉 종양과 싸우는 자연적인 면역 시스템의 능력을 회복시킬 가능성을 최초로 나타냈다 (Lob *et al.*, 2009). 그러나, KYN는 또한 트립토판 2,3-디옥시게나제 (TDO)에 의해 생산되는데, 상기 효소는 또한 종양에서 흔히 발현되고 1-DL-메틸트립토판에 의해 저해되지 않는다 (Pilotte *et al.*, 2012). 또한 제1 및 제2상 임상 실험에서 현재 1-DL-메틸트립토판 (1-D-MT)의 D-이성질체에 대한 추가적인 우려가 존재한다. 역설적이게도, 1-D-MT는 IDO1 발현을 상향조절하여, 사실상 KYN 수준을 증가시키고 특정 암에서 면역억제를 야기할 수 있다 (Opitz *et al.*, 2011).

[0008] KYN의 종양 생산을 조절하는 것에 많은 연구의 초점이 맞추어졌고 특히, 유방암, 난소, 교모세포종, 및 췌장 암종과 같은 암을 치료할 잠재성을 지닌다. KYN는 T 세포 및 NK 세포에서 증식을 억제할 뿐만 아니라 아폽토시스를 유발시켜 (Opitz *et al.*, 2011; Mandi 및 Vacsei, 2012) 종양이 환자의 면역 시스템에 의한 검출 및 파괴를 피할 수 있게 하는 것으로 알려져 있다. KYN는 아릴 탄화수소 수용체 (AHR)의 강력한 리간드로서 T 세포에서 활성화되면 CD25+FoxP3+ T 조절 세포 (Tregs)로의 분화를 유도한다 (Mezrich *et al.*, 2010). KYN은 또한 NK 매개 세포 살해 종양 세포주에 필수적인 특정 수용체 (NKp46 및 NKG2D)의 사이토킨 매개 상향-조절을 방해하는 것으로 나타났으며 (Della Chiesa *et al.*, 2006), 상기 작용은 또한 AHR에 대한 이의 작용제 효과에 의해서도 매개된다고 여겨진다 (Shin *et al.*, 2013). 또한 상승된 혈청 KYN 수준과 복합형 암에서 생존 감소를 연결하는 임상적 증거가 존재한다. 건강한 환자에서, 혈청 내 KYN 수준은 0.5 내지 1 μM 범위이다. 미만성 거대 B-세포 림프종과 같이, KYN을 생산하는 암 유형을 가진 환자에서 혈청 KYN 수준은 이보다 10배 더 높게 측정되며 (Yoshikawa *et al.*, 2010; de Jong *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2011) 동일한 치료 요법을 받은 림포종 환자 중의 예후는; 1.5 μM 미만의 혈청 수준을 갖는 환자의 89%가 3년의 생존률을 나타낸데 반해, 1.5 μM 이상의 KYN 수준을 갖는 환자의 58%만이 생존하는 것으로 나타났다. 이러한 생존의 차이는 KYN의 면역 억제 효과 때문인 것으로 여겨졌다 (Yoshikawa *et al.*, 2010). 소형 분자 IDO 저해제, 가령 1-D-MT의 사용은 면역 기능을 회복함에 있어서 KYN 수준을 조절하는 효용성을 나타냈지만, 1-D-MT에 의해 IDO1이 상향-조절되는 표적이탈 효과를 나타냈으며 TDO 및 IDO1 동형에 대한 저해 부족은 우려할 정도다.

[0009] 본 발명은 종양 및/또는 혈액 내 KYN 및 이의 대사산물을 특이적으로 고갈시키기 위한 효소의 사용을 개시한다. KYN 고갈 효소는 IDO1, IDO2, 또는 TDO를 발현하는 종양의 치료를 위해 KYN 농도를 낮추고 따라서 종양-매개 내성화 효과를 방지하고 그 대신 종양-제거 염증-촉진 반응을 매개하기 위해 사용된다. 특히, KYN 및 KYN 대사 부산물의 고갈을 위한 효소의 사용은 상기 논의된 IDO 동형 및 TDO의 소형 분자 저해제와 연관된 문제들을 회피하고 나아가 소형 분자 약물에 매우 흔히 동반하는 예측되지 않은 독성 및 부작용을 일으키는 표적이탈 효과를 완전히 방지한다.

발명의 내용

[0010] **발명의 요약**

[0011] 본 발명의 양태는 L-키누레닌 및 3-하이드록시-L-키누레닌을 분해하고 암 치료를 위해 요망되는 유리한 혈청 내 약동학을 내보일 수 있는 박테리아 및 포유류 폴리펩티드 서열을 포함하는 효소를 제공함으로써 당해 분야의 주요 문제점을 극복한다. 일부 양태에서, 키누레니나제 효소는 3'OH-키누레닌보다 키누레닌에 대하여 더 높은 촉매 활성을 가질 수 있다. 박테리아종으로부터의 키누레니나제가 사용될 수 있다. 그러한 효소는 서열번호 7 및 13-52으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열 또는 이들의 변형된 버전을 가질 수 있다. 특히, 치료제는 슈도모나스 플루오레슨스(*Pseudomonas fluorescens*) 효소인, 키누레니나제 (*Pf*-KYNU)로부터 유도될 수 있다. 대안적으로, 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)의 키누레니나제가 사용될 수 있다. 치료제는 무실라지니박터 팔루디스(*Mucilaginibacter paludis*) 키누레니나제 효소로부터 유도될 수 있다. 또한, 이종 키누레니나제의 면역원성으로 인한 역효과를 방지하기 위해, 인간(*Homo sapiens*) 효소 또는 인간 효소에 대해 >95% 서열 동일성을 나타내는 다른 영장류 키누레니나제가 사용될 수 있다. 예를 들면, 신규한 효소는 서열번호 7-9로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0012] 다른 양태에서, KYN을 분해할 수 있고 3-하이드록시키누레닌 또는 키누렌산을 분해하는 활성을 가지는 자연적인

또는 변형된 인간 또는 영장류 키누레니나제 중 어느 하나를 포함하는 폴리펩티드가 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 생리학적 조건 하에 KYN을 분해할 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리펩티드는 KYN (k_{cat}/K_M)에 대하여 적어도 또는 약 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 $M^{-1}s^{-1}$ 또는 이들 중 도출가능한 임의 범위의 촉매 효율을 가질 수 있다.

[0013] 위에서 논의된 변형된 폴리펩티드는 변형되지 않은 폴리펩티드(예컨대, 자연적인 폴리펩티드) 또는 본 명세서에 개시된 임의의 폴리펩티드 서열에 대하여 특정 비율의 동일성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 예를 들면, 변형되지 않은 폴리펩티드는 적어도, 또는 최대, 약 150, 200, 250, 300, 350, 400 잔기 (또는 이들 중 도출가능한 임의 범위)의 자연적인 키누레니나제를 포함할 수 있다. 상기 동일성 비율은 변형된 및 변형되지 않은 폴리펩티드, 또는 임의의 두 서열을 비교할 때 대략, 최대 또는 적어도 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% (또는 이들 중 도출가능한 임의 범위)일 수 있다. 또한 상기 논의된 동일성 비율은 폴리펩티드의 변형되지 않은 영역과 비교할 때 폴리펩티드의 특정 변형된 영역과 연관될 수 있다고 여겨진다. 예를 들면, 폴리펩티드는 키누레니나제의 변형되거나 돌연변이를 일으킨 기질 인식 부위를 포함할 수 있고 이 부위는 동일한 종 또는 다른 종으로부터의 변형되지 않았거나 돌연변이를 일으킨 키누레니나제의 아미노산 서열 대비 키누레니나제의 변형되거나 돌연변이를 일으킨 기질 인식 부위의 아미노산 서열의 동일성을 기초로 특징화될 수 있다. 예를 들면, 변형되지 않은 키누레니나제에 대해 적어도 90% 동일성을 가지는 것을 특징으로 하는 변형되거나 돌연변이를 일으킨 인간 폴리펩티드는 상기 변형되거나 돌연변이를 일으킨 인간 폴리펩티드 내 아미노산의 적어도 90%가 변형되지 않은 폴리펩티드 내 아미노산과 동일함을 의미한다.

[0014] 그러한 변형되지 않은 폴리펩티드는 자연적인 키누레니나제, 특히 인간 동형 또는 다른 영장류 동형일 수 있다. 예를 들면, 자연적인 인간 키누레니나제는 서열번호 8 서열을 가질 수 있다. 다른 자연적인 영장류 키누레니나제의 비-제한적인 예시는 폰고 아벨리(*Pongo abelii*) 키누레니나제 (Genbank ID: XP_002812508.1; 서열번호 10), 마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*) 키누레니나제 (Genbank ID: EHH54849.1; 서열번호 11), 및 판 트로글로다이츠(*Pan troglodytes*) 키누레니나제 (Genbank ID: XP_003309314.1; 서열번호 12)를 포함한다. 예시적인 자연적인 폴리펩티드는 서열번호 8 또는 10-12 또는 이들의 단편의 약, 최대 또는 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성 (또는 이들 중 도출가능한 임의 범위)을 가지는 서열을 포함한다. 예를 들면, 자연적인 폴리펩티드는 서열번호 8 또는 10-12의 서열의 적어도 또는 최대 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 415 잔기 (또는 이들 중 도출가능한 임의 범위)를 포함할 수 있다.

[0015] 일부 구체예에서, 자연적인 키누레니나제는 하나 이상의 다른 조작, 가령 화학적 개질, 치환, 삽입, 결실, 및/또는 절단에 의해 변형될 수 있다. 예를 들면, 변형은 자연적인 효소의 기질 인식 부위에 일어날 수 있다. 특정 구체예에서, 자연적인 키누레니나제는 치환에 의해 변형될 수 있다. 예를 들면, 치환의 개수는 하나, 둘, 셋, 넷 또는 그 이상일 수 있다. 추가의 구체예에서, 자연적인 키누레니나제는 기질 인식 부위 또는 기질에 특정하게 영향을 줄 수 있는 임의의 영역에 변형이 일어날 수 있다.

[0016] 한 구체예에서, 단리된, 변형된 인간 키누레니나제 효소가 제공되며, 여기서 변형된 효소는 자연적인 인간 키누레니나제에 비해 적어도 하나의 치환을 가지며 (서열번호 8을 참조), 및 여기서 적어도 하나의 치환은 자연적인 인간 키누레니나제의 306번 위치에서 일반적으로 발견되는 Phe의 Met 또는 Leu 치환을 포함할 수 있다. 따라서, 한 양태에서, Phe306Met 치환을 포함하는 단리된, 변형된 인간 키누레니나제 효소가 제공된다. 따라서, 한 양태에서, Phe306Leu 치환을 포함하는 단리된, 변형된 인간 키누레니나제 효소가 제공된다.

[0017] 일부 양태에서, 본 발명은 또한 이종 아미노산 서열에 연결된 키누레니나제를 포함하는 폴리펩티드를 고려한다. 예를 들면, 키누레니나제는 이종 아미노산 서열에 융합 단백질로서 연결될 수 있다. 특정 구체예에서, 키누레니나제는 *생체 내* 반-감기를 증가시키기 위해 아미노산 서열, 가령 IgG Fc, 알부민, 알부민 결합 단백질, 또는 XTEN 폴리펩티드에 연결될 수 있다.

[0018] 혈청 안정성을 높이기 위해, 키누레니나제는 하나 이상의 폴리에테르 분자에 연결될 수 있다. 특정 구체예에서, 폴리에테르는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)일 수 있다. 폴리펩티드는 특정한 아미노산 잔기, 가령 리신 또는 시스테인을 통해 PEG에 (*예컨대*, 공유적으로) 연결될 수 있다. 치료적 투여를 위해, 키누레니나제를 포함하는 그러한 폴리펩티드는 약제학적으로 허용되는 담체 내에 분산될 수 있다.

[0019] 일부 양태에서, 그러한 키누레니나제를 인코딩하는 핵산이 고려된다. 일부 구체예에서, 핵산은 박테리아에서 발현이 최적화된 코돈이었다. 특정한 구체예에서, 박테리아는 대장균(*E. coli*)다. 다른 양태에서, 핵산은 균류(*예컨대*, 효모), 곤충, 또는 포유동물에서 발현이 최적화된 코돈이었다. 본 발명은 추가로 벡터, 가령 그러한 핵산을 포함하는 발현 벡터를 고려한다. 특정한 구체예에서, 키누레니나제를 인코딩하는 핵산은 이종 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는 프로모터에 작동가능하도록 연결된다. 한 구체예에서, 키누레니나제는 벡터(*예컨대*, 유전자 치료 벡터)에 의해 표적 세포로 송달될 수 있다. 그러한 바이러스는 표적 세포에서 키누레니나제-인코딩 핵산의 발현이 가능하도록 재조합 DNA 기술에 의해 변형될 수 있었다. 이들 벡터는 비-바이러스성(예컨대, 플라스미드) 또는 바이러스성(예컨대, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 바이러스 또는 백시니아 바이러스) 유래의 벡터로부터 도출될 수 있다. 비-바이러스성 벡터는 바람직하게는 세포막을 통한 DNA의 유입을 가능하게 하는 물질과 복합체를 이룬다. 그러한 비-바이러스성 벡터 복합체의 예시는 DNA 축합반응 및 지질-기반 송달 시스템을 촉진하는 다중양이온성 물질을 갖는 제형을 포함한다. 지질-기반 송달 시스템의 예시로는 핵산의 리포좀 기반 송달이 포함될 수 있다.

[0020] 더욱 추가적인 양태에서, 본 발명은 추가로 그러한 벡터를 포함하는 숙주 세포를 고려한다. 숙주 세포는 박테리아(*예컨대*, *E. coli*), 균류 세포(*예컨대*, 효모), 곤충 세포, 또는 포유류 세포일 수 있다.

[0021] 일부 구체예에서, 벡터는 키누레니나제를 발현하기 위해 숙주 세포에 도입된다. 단백질은 임의의 적절한 방식으로 발현될 수 있다. 한 구체예에서, 단백질은 숙주 세포에서 단백질이 글리코실화되어 발현된다. 또다른 구체예에서, 단백질은 숙주 세포에서 단백질이 탈글리코실화되어 발현된다.

[0022] 본 발명의 특정 양태는 또한 키누레니나제 펩티드, 유전자 치료 벡터 내 키누레니나제를 인코딩하는 핵산, 또는 본 발명의 제형을 투여하는 치료 방법, 및 특히 종양 세포 또는 암을 가진 개체를 치료하는 방법을 고려한다. 개체는 임의의 동물, 가령 마우스일 수 있다. 예를 들면, 개체는 포유동물, 특히 영장류, 및 더 상세하게는 인간 환자일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 암을 가진 환자를 선별하는 단계를 포함할 수 있다.

[0023] 일부 구체예에서, 암은 키누레닌 고갈에 민감한 임의의 암이다. 한 구체예에서, 본 발명은 그러한 폴리펩티드를 포함하는 제형을 투여하는 단계를 포함하는 종양 세포 또는 암 환자를 치료하는 방법을 고려한다. 일부 구체예에서, 투여는 암 세포의 적어도 일부가 사멸되게 하는 조건하에 이루어진다. 또다른 구체예에서, 제형은 생리학적 조건 하에 키누레닌-분해 활성을 가지며 부착된 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 추가로 포함하는 그러한 키누레니나제를 포함한다. 일부 구체예에서, 제형은 상기 논의된 키누레니나제 중 어느 하나 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 제형이다. 그러한 약제학적으로 허용되는 부형제는 당해 분야의 숙련가에게 널리 공지되어 있다. 모든 상기 키누레니나제가 인간 치료에 유용할 것으로 고려될 수 있다.

[0024] 추가의 구체예에서, 종양 세포를 처리하는 방법이 또한 제공될 수 있으며 상기 방법은 키누레닌-분해 활성을 가진 비-세균성(포유류, *예컨대*, 영장류 또는 마우스) 키누레니나제 또는 이를 인코딩하는 핵산을 포함하는 제형을 투여하는 단계를 포함한다.

[0025] 투여 또는 처리는 세포의 영양 공급원에 이루어지며, 반드시 세포 자체에 부가되어야 할 필요는 없다. 그러므로, *생체 내* 적용에서, 종양 세포의 처리 단계는 종양 세포 집단을 위한 영양 매체를 키누레니나제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 구체예에서, 매체는 혈액, 림프성 유체, 척수액 등 키누레닌 고갈이 요망되는 유사 체액일 수 있다.

[0026] 본 발명의 특정 양태에 따르면, 키누레니나제를 함유하는 그러한 제형은 정맥내, 피내, 동맥내, 복강내, 병변내, 두개내, 관절내, 전립선내, 흉막내, 활막내, 기관내, 비강내, 유리체내, 질내, 직장내, 종양내, 근육내, 피하, 결막하, 소포내, 점막으로, 심막내, 탯줄내, 안내, 경구로, 국소적으로, 흡입, 주입, 연속 주입, 국부 관류에 의해, 카테터를 통해, 세척을 통해, 지질 조성물내(*예컨대*, 리포좀), 또는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 다른 방법 또는 앞서 나열한 것들의 임의 조합에 의해 투여될 수 있다.

[0027] 추가의 구체예에서, 상기 방법은 또한 적어도 2차 항암 요법을 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 2차 항암 요법은 수술 요법, 화학 요법, 방사선 요법, 한랭 요법, 호르몬 요법, 면역 요법 또는 사이토킨 요법일 수 있다. 특정 양태에서, 2차 항암 요법은 항-PD-1, 항-CTLA-4, 또는 항- PD-L1 항체일 수 있다.

[0028] 일부 구체예에서, 키메라 항원 수용체(CAR) 및 키누레니나제 효소를 포함하는 세포가 암을 가진 개체의 치료에 사용하기 위해 고려된다. 일부 양태에서, 세포는 CAR 및 키누레니나제 및, 일부 경우에, 트랜스포사제를 인코딩하는 DNA로 형질주입될 수 있다.

[0029] CAR은 예컨대 HER2, CD19, CD20, 및 GD2를 비롯한 임의의 관심의 암-세포 항원을 표적화할 수 있다. 항원 결합 부위 또는 도메인은 본 명세서에서 그 전체가 참고로서 포함되는 미국 특허 제7,109,304호에 기술된 바와 같은 특정 인간 단클론 항체로부터 유도된 단일-사슬 가변 단편 (scFv)의 V_H 및 V_L 사슬 단편을 포함할 수 있다. 단편은 또한 임의 개수의 인간 항원-특이적 항체의 상이한 항원 결합 도메인일 수 있다. 더욱 특정한 구체예에서, 단편은 인간 세포에서 발현시키려는 인간 코돈 용도로 최적화된 서열에 의해 인코딩된 항원-특이적 scFv이다. CAR의 추가적인 예시는, 예를 들면, WO 2012/031744, WO 2012/079000, WO 2013/059593, 및 미국 특허 제8,465,743호를 참조하고, 상기 문헌은 모두 그 전체가 본 명세서에 참고로서 포함된다.

[0030] 키누레니나제는 본 명세서에서 개시된 어느 한 키누레니나제일 수 있다. 세포를 형질감염시키는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있지만, 특정 양태에서, 고도로 효율적인 형질감염 방법 가령 전기천공이 사용된다. 예를 들어, 핵산은 뉴클레오펙션(nucleofection) 장치를 이용하여 세포에 주입될 수 있다. 바람직하게는, 형질감염 단계는 세포를 바이러스로 감염시키거나 형질도입하는 단계를 포함하지 않는데, 이것이 처리된 개체에서 유전독성을 일으키거나 및/또는 바이러스 서열을 포함하는 세포에 대한 면역 반응을 야기할 수 있기 때문이다.

[0031] 다양한 CAR 구조체 및 이를 위한 발현 벡터는 당해 분야에 공지되어 있으며 추가로 본 명세서에서 자세히 언급된다. 예를 들면, 일부 양태에서, CAR 발현 벡터는 DNA 발현 벡터 가령 플라스미드, 선형 발현 벡터 또는 에피솜(episome)이다. 일부 양태에서, 벡터는 추가적인 서열, 가령 CAR, 그러한 프로모터, 촉진제, 다중-A 신호, 및/또는 하나 이상의 인트론의 발현을 촉진하는 서열을 포함한다. 바람직한 양태에서, CAR 암호화 서열은 전이인자 서열의 측면에 존재하므로, 트랜스포사제의 존재는 암호화 서열이 형질주입된 세포의 유전체에 끼어들어갈 수 있게 한다.

[0032] 특정 양태에서, 세포는 CAR 암호화 서열이 형질주입된 세포의 유전체 내로 통합되도록 촉진하는 트랜스포사제로 인해 추가로 형질주입된다. 일부 양태에서, 트랜스포사제는 DNA 발현 벡터로서 제공된다. 그러나, 바람직한 양태에서, 트랜스포사제는 발현가능한 RNA 또는 단백질로서 제공되므로 트랜스포사제의 장기 발현은 형질전환 세포에서 일어나지 않는다. 본 구체예에 따라 어떠한 트랜스포사제 시스템도 사용될 수 있다. 다른 양태에서, 세포는 CAR 암호화 서열 및 키누레니나제 암호화 서열이 세포의 유전체로 통합되도록 촉진하는 렌티바이러스로 감염될 수 있다.

[0033] 한 구체예에서, 키누레니나제 또는 키누레니나제를 인코딩하는 핵산을 포함하는 조성물은 개체에서 종양을 치료하는데 사용될 수 있다. 또다른 구체예에서, 종양의 치료를 위한 의약의 제조에서 키누레니나제 또는 키누레니나제를 인코딩하는 핵산을 사용하는 방법이 제공된다. 상기 키누레니나제는 구체예 중 어느 한 키누레니나제일 수 있다.

[0034] 본 발명의 방법 및/또는 조성물의 맥락에서 논의된 구체예는 본 명세서에 기술된 임의의 다른 방법 또는 조성물에 대하여 사용될 수 있다. 따라서, 하나의 방법 또는 조성물로 존재하는 구체예는 당연히 본 발명의 다른 방법 및 조성물에 적용될 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 핵산과 관련하여 사용된 용어 "인코딩된" 또는 "인코딩하는"은 당해 분야의 숙련가가 본 발명을 쉽게 이해할 수 있게 하기 위하여 사용되었지만; 이들 용어는 "포함된" 또는 "포함하는"과 각각 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용된 "a" 또는 "an"은 하나 이상을 의미할 수 있다. 본 명세서의 청구범위(들)에서, "a" 또는 "an"은 단어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우 하나 또는 하나 이상을 의미할 수 있다.

[0037] 비록 본 개시가 단지 대안들과 "및/또는"을 나타내는 정의를 택하고 있지만, 청구범위에서 용어 "또는"의 사용은 달리 분명하게 대안만 지칭하거나 대안들이 상호배타적임을 지칭한다고 나타내지 않은 경우 "및/또는"을 의미하기 위해 사용된다. 본 명세서에서 사용된 "또다른"은 적어도 차선 또는 후선의 것들을 의미할 수 있다.

[0038] 본 명세서 전반에 걸쳐, 용어 "약"은 수치가 장비, 수치를 측정하기 위해 사용된 방법, 또는 연구 개체 중에 존재하는 변화에 대한 고유한 오차를 포함함을 나타내기 위해 사용된다.

[0039] 본 발명의 다른 목표, 특징 및 장점이 이어지는 상세한 설명을 통해 명확해질 것이다. 그러나, 당해 분야의 숙련가에게는 본 발명의 사상 및 범위 내에서 다양한 변화와 변형이 상세한 설명으로부터 명백해질 것이기 때문에, 상세한 설명 및 특정한 예시가, 본 발명의 바람직한 구체예를 나타내긴 하지만, 단지 예시의 방식으로 제공됨이 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0040] **도면의 간략한 설명**

하기의 도면은 본 명세서의 일부를 구성하며 본 발명의 특정한 양태를 추가로 설명하기 위해 포함된다. 본 발명은 본 명세서에 제시된 특정한 구체예의 상세한 설명과 함께 하나 이상의 이들 도면을 참고하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1 - (1열) PRECISION PLUS PROTEIN™ MW 표준 (BioRad)과 (2-4열) *Pf*-KYNU의 농도 증가 및 (5열) PEG 5,000 MW 변형된 *Pf*-KYNU의 SDS-PAGE.

도 2 - (개방 사각형) PBS 및 (개방 원) 인간 혈청 풀 내 *Pf*-KYNU의 안정성.

도 3 - 종양 성장 속도로 측정한 자가(autologous) B16 마우스 흑색종 모델에서 PEG-*Pf*-KYNU의 효능. (폐쇄 사각형) 열 비활성화된 PEG-*Pf*-KYNU. (폐쇄 원) 활성 PEG-*Pf*-KYNU.

도 4 - 생존으로 측정한 자가 B16 마우스 흑색종 모델에서 PEG-*Pf*-KYNU의 효능. (폐쇄 사각형) 열 비활성화된 PEG-*Pf*-KYNU. (폐쇄 원) 활성 PEG-*Pf*-KYNU.

도 5A-B - 열-비활성화된 PEG-*Pf*-KYNU로 처리된 마우스. (·) 활성 PEG-*Pf*-KYNU로 처리된 마우스. 도 5A - 순환하는 CD4+ 조절 T-세포의 집단은 활성 PEG-*Pf*-KYNU로 처리된 군에서 상당히 더 적다. 도 5B - 종양 침투 CD8+ T-세포의 집단은 상당히 더 높은 그랜자임 B 및 인터페론 γ의 발현을 보인다.

도 6 - *E. coli*에서 키누레니나제 활성에 대한 유전적 선별. L-Trp (Trp), 완충액 (-), 안트라닐산 (AA), 또는 L-Kyn (Kyn)에 적신 종이 필터 디스크가 있는 M9 최소 배지 플레이트 상에 도말한 *E. coli-ΔtrpE* 세포.

도 7 - 무실라지니박터 팔루디스(*Mucilaginibacter paludis*) 키누레니나제 (*Mu*-KYNU)의 시험관 내 안정성. 시간에 따른 *Mu*-KYNU의 활성은 37℃의 PBS(개방 사각형)에서 $^{1}T_{1/2}$ = 6 h였고 잔여 활성의 진폭은 74%, 이후의 $^{2}T_{1/2}$ = 150 h였고, 37℃의 인간 혈청 풀(폐쇄 원)에서 $^{1}T_{1/2}$ = 5 h였고 잔여 활성의 진폭은 30%, 이후의 $^{2}T_{1/2}$ = 73 h였다.

도 8 - PEG-*Pf*-KYNU (--●), 불활성화 PEG-*Pf*-KYNU (-●●), 항-PD1 (●●●), 또는 항-CTLA-4 (—) 중 어느 하나로 처리된 C57BL/6J에서 B16 동종이식편의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 플롯. 화살표는 처리 날짜를 나타내고, (A)는 항체 처리를 나타내고, (E)는 효소 처리를 나타낸다.

도 9A-C - 도 9A - PBS (원) (대조), 항-PD1 단독 (사각형), 항-PD1/PEG *Mu*-KYNU (뒤집힌 삼각형), 또는 항-PD1/PEG-*Pf*-KYNU (똑바른 삼각형)로 처리된 C57BL/6J 내포 B16 종양 동종이식편. 도 9B - 부가 효과로써 항-PD1 단독에서 0% 종양 제거와 비교할 때 항-PD1/PEG-*Pf*-KYNU 조합 처리군에서 60%의 종양 제거 및 항-PD1/PEG-*Mu*-KYNU 조합에서 20%의 종양 제거가 관찰되었다. 도 9C - 상응하는 카플란-마이어 플롯.

도 10A-B - 도 10A - 열-비활성화된 PEG-*Mu*-KYNU (■) 또는 활성 PEG-*Mu*-KYNU (▲)로 처리된 C57BL/6J 내포 B16 종양 동종이식편. 도 10B - 상응하는 카플란-마이어 플롯은 PEG-*Mu*-KYNU (---)에 대해 25일의 평균 생존 시간, 및 열-비활성화된 PEG-*Mu*-KYNU (—)에 대해 22일의 평균 생존 시간을 도시한다 (화살표는 처리 날짜를 표시).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] **예시적인 구체예의 설명**

[0042] 키누레닌은 인돌아민-2,3-디옥시게나제 (IDO) 또는 트립토판-2,3-디옥시게나제 (TDO) 중 어느 하나의 작용을 통해 생성된 아미노산 트립토판의 대사산물이다. 키누레닌은 세포 생리학에 복합적인 영향을 주며, 그중 가장 중요한 것은 T 세포 반응의 조절이다. 많은 종양 세포는 키누레닌의 국부 농도를 상승시키기 위해 IDO 및/또는 TDO의 합성을 조절하며, 이는 트립토판의 고갈을 동반한다. 높은 수준의 키누레닌은 원래는 종양을 공격했었을 종양 침투 T 세포의 기능을 저해하는 강력한 수단으로 기능한다.

[0043] 본 발명은 종양 미세환경 내 뿐만 아니라 혈청 내 국부 키누레닌 수준을 고갈시키고 따라서 T-세포 작용의 종양-매개 억제를 방지하기 위한 수단으로 키누레닌 분해 효소를 사용하는 방법을 제공한다. 키누레닌 가수분해 효소 (키누레니나제)는 키누레닌을 알라닌 및 안트라닐산으로 전환하고, 안트라닐산은 T-세포 기능에 영향을 주는

지 공지되어 있지 않다. 본 발명자는 생리학적 조건 하에 효소가 더 오랜 시간 유지되게 하는 키누레니나제 효소의 약제학적 제제를 생산했다. 본 발명자는 이후 효소의 종양내 투여가 마우스에서 공격성 종양의 성장을 극적으로 저지함을 보았다.

[0044] **I. 정의**

[0045] 본 명세서에서 사용된 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 펩티드 결합을 통해 연결된 아미노산을 포함하는 화합물을 가리키며 상호교환적으로 사용된다.

[0046] 본 명세서에서 사용된, 용어 "융합 단백질"은 비-자연적인 방식으로 작동가능하도록 연결된 단백질 또는 단백질 단편을 함유하는 키메라 단백질을 가리킨다.

[0047] 본 명세서에서 사용된, 용어 "반-감기" (½-감소기간)은 *시험관 내* 또는 *생체 내*, 예를 들면, 포유동물에게 주입 후 폴리펩티드의 농도가 반으로 떨어지는데 필요한 시간을 가리킨다.

[0048] 용어 "작동가능한 조합", "작동가능한 순서" 및 "작동가능하도록 연결된"은 그렇게 기술된 성분이 의도된 방식으로, 예컨대, 핵산 서열의 연결이 소정의 유전자의 전사 및/또는 요망되는 단백질 분자의 합성을 지시할 수 있는 방식으로, 또는 아미노산 서열의 연결이 융합 단백질을 생산하게 하는 방식으로 기능하도록 허용하는 관계에 있는 연결을 가리킨다.

[0049] 용어 "링커"는 두 가지 상이한 분자를 작동가능하도록 연결하는, 여기서 링커의 한 부분을 첫 번째 분자에 작동가능하도록 연결하고, 링커의 또다른 부분을 두 번째 분자에 작동가능하도록 연결하는 분자 가교로서 작용하는 화합물 또는 모이어티를 가리키도록 의도된다.

[0050] 용어 "페길화(PEGylated)"는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과의 접합을 가리키며, 상기 접합은 이의 높은 생체적합성 수준 및 변형의 용이성 때문에 약물 담체로서 널리 사용되고 있다. PEG는 PEG 사슬의 말단의 하이드록시 기를 통해 화학적 방법으로 활성 물질에 연결 (*예컨대*, 공유적으로 연결)될 수 있지만; PEG 그 자체는 분자당 최대 두 개의 활성 물질로 제한된다. 상이한 접근법에서, PEG 및 아미노산의 공중합체는 PEG의 생체적합성을 유지할 수 있지만, 분자당 수많은 부착점을 가지는 (따라서 더 높은 약물 로드를 제공하는) 부가적인 장점을 지니며, 다양한 적용에 적합하도록 합성을 설계할 수 있는 신규한 생체물질로서 연구되어 왔다.

[0051] 용어 "유전자"는 폴리펩티드 또는 이의 전구체의 생산을 위해 필요한 조절 및 암호화 서열을 포함하는 DNA 서열을 가리킨다. 폴리펩티드는 요망되는 효소 활성이 보유되도록 전장 암호화 서열 또는 암호화 서열의 임의 부분에 의해 인코딩될 수 있다.

[0052] 용어 "자연적인"은 유전자, 유전자 산물, 또는 자연발생적 공급원에서 단리되었을 때 유전자 또는 유전자 산물의 특징의 전형적인 형태를 가리킨다. 자연적인 형태는 자연적인 집단에서 가장 흔히 발견되며 따라서 임의로 정상 또는 야생형으로 지칭되는 형태이다. 반대로, 용어 "변형된", "변이체" 또는 "돌연변이"는 자연적인 유전자 또는 유전자 산물과 비교했을 때 서열 및 기능적 특성에서 변형 (즉, 변형된 특징)을 나타내는 유전자 또는 유전자 산물을 가리킨다.

[0053] 용어 "벡터"는 복제할 수 있는 세포 내로 도입하려는 핵산 서열을 삽입할 수 있는 캐리어 핵산 분자를 가리키기 위해 사용된다. 핵산 서열은 "외생성"일 수 있으며, 이는 그러한 서열이 벡터가 도입되는 세포에게 낯선 것이거나 서열이 세포 내 서열과 상동이나 본래 그러한 서열이 발견되지 않는 숙주 세포 핵산 내 위치에 있는 것을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스(박테리오파지, 동물 바이러스, 및 식물 바이러스), 및 인공적인 염색체 (*예컨대*, YAC)를 포함한다. 당해 분야의 숙련가는 표준 재조합 기술을 통해 벡터를 구성하는 장비를 이미 갖추었을 것이다 (예를 들면, Maniatis *et al*., 1988 및 Ausubel *et al*., 1994를 참조, 상기 문헌은 모두 본 명세서에 참고로서 포함된다).

[0054] 용어 "발현 벡터"는 전사될 수 있는 RNA를 암호화하는 핵산을 포함하는 임의 유형의 유전자 구조체를 가리킨다. 일부 경우에, RNA 분자는 이후 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드로 번역된다. 다른 경우에, 예를 들면, 안티센스 분자 또는 리보자임의 생산에서, 이들 서열은 번역되지 않는다. 발현 벡터는 다양한 "조절 서열"을 보유할 수 있고, 이는 특정 숙주 세포에서 작동가능하도록 연결된 암호화 서열의 전사 및 가능하게는 번역을 위해 필요한 핵산 서열을 가리킨다. 전사 및 번역을 관장하는 조절 서열 외에, 벡터 및 발현 벡터는 다른 기능도 수행하는 핵산 서열을 보유할 수 있고 이것들은 이하에 설명된다.

[0055] 본 명세서에서 사용된 용어 "치료적으로 효과적인 양"은 치료 효과를 얻기 위한 방법에서 사용되는 세포 및/또는 치료적 조성물 (가령 치료적 폴리뉴클레오티드 및/또는 치료적 폴리펩티드)의 양을 가리킨다. 본 명세서 전

반에서 사용된 용어 "치료적 이익" 또는 "치료적으로 효과적인"은 증상의 의학적인 치료와 관련하여 개체의 삶의 질을 증진 또는 향상시키는 임의의 것을 가리킨다. 여기에는 질환의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도 감소가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들면, 암의 치료는 예를 들면, 종양 크기의 감소, 종양 침투의 감소, 암 성장 속도의 감소, 또는 전이 방지를 포함할 수 있다. 암의 치료는 또한 암을 가진 개체의 생존 연장을 가리킬 수 있다.

[0056] 본 명세서에서 사용된 용어 "K_M"는 효소에 대한 미하엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 상수를 가리키며 소정의 효소가 효소 촉매된 반응에서 이의 최대 속도의 절반에 이르는 특정한 기질의 농도로서 정의된다. 본 명세서에서 사용된 용어 "k_{cat}"는 각각의 효소 부위가 단위 시간당 산물로 전환시키는 재생 수 또는 기질 분자의 수를 가리키며, 여기서 효소는 최대 효율로 작동한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "k_{cat}/K_M"는 효소가 얼마나 효율적으로 기질을 산물로 전환시키는지의 척도인 특이성 상수다.

[0057] 본 명세서에서 사용된 용어 "키메라 항원 수용체 (CAR)"는 인공적인 T-세포 수용체, 키메라 T-세포 수용체, 또는 키메라 면역수용체를 가리킬 수 있고, 예를 들면, 특정 면역 수식인자 세포에 대한 인공적인 특이성을 이식하는 조작된 수용체를 포함한다. CAR는 T 세포 상에 단클론 항체의 특이성을 부여하기 위해 사용될 수 있고, 이를 통해 예를 들면 입양면역 세포 치료를 위해 사용하는 수많은 특이적 T 세포를 생성할 수 있다. 특정한 구체예에서, CAR는 예를 들면 종양 연관성 항원에 대한 세포 특이성을 지시한다. 일부 구체예에서, CAR는 세포내 활성화 도메인, 막관통 도메인, 및 종양 연관성 항원 결합 부위를 포함하는 세포외 도메인을 포함한다. 특정한 양태에서, CAR는 단클론 항체에서 유래한 단일-사슬 가변 단편 (scFv)이 CD3-제타 막관통 및 막내도메인(endodomain)에 융합된 융합을 포함한다 (가령 미국 특허 제7,109,304호에 기술된 것, 상기 문헌은 본 명세서에 그 전체가 참고로서 포함된다). 다른 CAR 설계의 특이성은 수용체 리간드 (*예컨대*, 펩티드) 또는 패턴-인식 수용체, 가령 덱틴(Dectin)에서 유래될 수 있다. 특정한 구체예에서, B-계열 분자에 대해 특이적인 CAR인, CD19를 이용하여 T 세포의 특이성을 재지시함으로써 악성 B 세포를 표적화할 수 있다. 특정한 경우에, 항원-인식 도메인을 멀어지게 함으로써 활성화-유도 세포사가 감소하도록 조절할 수 있다. 특정한 경우에, CAR은 부가적인 보조-조절성 신호전달을 위한 도메인, 가령 CD3-제타, FcR, CD27, CD28, CD137, DAP10, 및/또는 OX40을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 보조-조절성 분자, 영상화를 위한 리포터 유전자(예컨대, 양전자방출 단층촬영용), 전구-약물의 부가시 T 세포를 조건적으로 제거하는 유전자 산물, 귀소 수용체, 케모카인, 케모카인 수용체, 사이토킨, 및 사이토킨 수용체를 비롯한 분자가 CAR과 동시-발현될 수 있다.

[0058] "치료" 및 "치료하는"은 질환 또는 건강-관련 용태의 치료적 이익을 얻기 위한 목적으로 치료 물질을 개체에 투여 또는 적용하는 것 또는 절차 또는 요법을 개체에 시행하는 것을 가리킨다. 예를 들면, 치료는 약제학적 유효량의 키누레니나제의 투여를 포함할 수 있다.

[0059] "개체" 및 "환자"는 인간 또는 비-인간, 가령 영장류, 포유동물, 및 척추동물 중 어느 하나를 가리킨다. 특정한 구체예에서, 개체는 인간이다.

[0060] **II. 키누레니나제 폴리펩티드**

[0061] 일부 구체예는 변형된 단백질 및 폴리펩티드에 관한 것이다. 특정한 구체예는 변형되지 않은 버전에 필적하는 적어도 하나의 기능적 활성, 바람직하게는, 키누레닌 분해 활성 또는 3'-하이드록시-키누레닌 분해 활성을 나타내는 변형된 단백질 또는 폴리펩티드에 관한 것이다. 추가의 양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 혈청 안정성을 증가시키기 위해 추가로 변형될 수 있다. 따라서, 본 출원이 "변형된 단백질" 또는 "변형된 폴리펩티드"를 언급하는 경우, 당해 분야의 숙련가는 예를 들면, 변형되지 않은 단백질 또는 폴리펩티드, 가령 키누레닌 분해 활성 또는 3'-하이드록시-키누레닌 분해 활성을 뛰어 넘는 추가적인 장점을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드가 포함됨을 이해할 것이다. 특정 구체예에서, 변형되지 않은 단백질 또는 폴리펩티드는 자연적인 키누레니나제, 바람직하게는 인간 키누레니나제 또는 슈도모나스 플루오레슨스(*Pseudomonas fluorescens*) 키누레니나제이다. "변형된 단백질"에 관련된 구체예가 "변형된 폴리펩티드"에 관해 적용될 수 있음, 그리고 역도 성립함이 특정하게 고려된다.

[0062] 활성의 측정은 당해 분야의 숙련가에게 익숙한 어세이, 특히 단백질의 활성에 관한 어세이를 이용하여 이루어질 수 있고, 비교의 목적으로, 변형된 또는 변형되지 않은 단백질 또는 폴리펩티드의 자연적인 및/또는 재조합 버전의 사용을 포함할 수 있다.

[0063] 특정 구체예에서, 변형된 폴리펩티드, 가령 변형된 키누레니나제는 키누레닌 및/또는 3'-하이드록시-키누레닌 분해 활성에서의 증가를 기초로 하여 확인될 수 있다. 예를 들면, 변형되지 않은 폴리펩티드의 기질 인식 부위

가 확인될 수 있다. 이러한 확인은 구조적 분석 또는 상동체 분석을 기반으로 할 수 있다. 그러한 기질 인식 부위의 변형을 포함하는 돌연변이 집단이 생성될 수 있다. 추가의 구체예에서, 증가된 키누레닌 분해 활성을 갖는 돌연변이가 돌연변이 집단으로부터 선택될 수 있다. 요망되는 돌연변이의 선택은, 가령 키누레닌 분해의 부산물 또는 산물을 검출하는 방법을 포함할 수 있다.

[0064] 변형된 단백질은 아미노산의 결실 및/또는 치환을 보유할 수 있고; 따라서, 결실을 갖는 단백질, 치환을 갖는 단백질, 및 결실 및 치환을 갖는 단백질은 변형된 단백질이다. 일부 구체예에서, 이들 변형된 단백질은 예를 들어, 융합 단백질 또는 링커를 갖는 단백질과 같이 추가로 삽입 또는 부가된 아미노산을 포함할 수 있다. "변형된 결실된 단백질"은 자연적인 단백질 중 하나 이상의 잔기가 결여되지만, 자연적인 단백질의 특징 및/또는 활성을 보유할 수 있다. "변형된 결실된 단백질"은 또한 감소된 면역원성 또는 항원성을 가질 수 있다. 변형된 결실된 단백질의 예시는 적어도 하나의 항원 부위 즉 특정 유기체, 가령 변형된 단백질을 투여할 수 있는 유형의 유기체에서 항원으로 결정되는 단백질의 부위에 결실된 아미노산 잔기를 가지는 단백질이다.

[0065] 치환 또는 대체 변이체는 전형적으로 단백질 내 하나 이상의 위치에서 하나의 아미노산이 다른 아미노산으로 바뀐 것을 포함하며 폴리펩티드의 하나 이상의 특성, 특히 이의 수식인자 기능 및/또는 생체이용률을 조절하도록 설계될 수 있다. 치환은 보존적일 수 있거나 아닐 수 있고, 즉 하나의 아미노산이 유사한 형태와 전하를 가진 아미노산으로 교체된다. 보존적 치환은 당해 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들면: 알라닌에서 세린으로; 아르기닌에서 리신으로; 아스파라긴에서 글루타민 또는 히스티딘으로; 아스파르테이트에서 글루타메이트로; 시스테인에서 세린으로; 글루타민에서 아스파라긴으로; 글루타메이트에서 아스파르테이트로; 글리신에서 프롤린으로; 히스티딘에서 아스파라긴 또는 글루타민으로; 이소류신에서 류신 또는 발린으로; 류신에서 발린 또는 이소류신으로; 리신에서 아르기닌으로; 메티오닌에서 류신 또는 이소류신으로; 페닐알라닌에서 티로신, 류신, 또는 메티오닌으로; 세린에서 트레오닌으로; 트레오닌에서 세린으로; 트립토판에서 티로신으로; 티로신에서 트립토판 또는 페닐알라닌으로; 및 발린에서 이소류신 또는 류신으로의 변화를 포함한다.

[0066] 결실 또는 치환 외에도, 변형된 단백질은 잔기의 삽입을 포함할 수 있고, 이는 전형적으로 폴리펩티드 내 적어도 하나의 잔기의 부가를 포함한다. 이는 표적화 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 단순히 단일 잔기의 삽입을 포함할 수 있다. 융합 단백질이라고 지칭하는 말단 부가는 하기에서 논의된다.

[0067] 용어 "생물학적 기능적 균등물"은 당해 분야에 널리 알려져 있으며 본 명세서에서 더욱 상세하게 정의된다. 따라서, 대조 폴리펩티드의 아미노산에 비해 약 70% 내지 약 80%, 또는 약 81% 내지 약 90%, 또는 심지어 약 91% 내지 약 99%의 아미노산이 동일하거나 기능적으로 균등한 서열은, 단백질의 생물학적 활성이 유지된다는 단서하에 포함된다. 변형된 단백질은 특정 양태에서 대응되는 자연적인 단백질에 대해 생물학적으로 기능적으로 균등물일 수 있다.

[0068] 또한 아미노산 및 핵산 서열이 추가적인 잔기, 가령 추가적인 N- 또는 C-말단 아미노산 또는 5' 또는 3' 서열을 포함할 수 있으며, 그럼에도 해당 서열이 단백질 발현이 관련된 생물학적 단백질 활성의 유지를 비롯하여 상기 제시된 기준에 부합하는 한 여전히 본질적으로는 본 명세서에 개시된 서열 중 하나에 제시된 바와 같음이 이해될 것이다. 말단 서열의 부가는 특히 핵산 서열에 해당하는데, 예를 들면, 암호화 부위의 5' 또는 3' 부분 중 어느 하나의 옆에 부착된 다양한 비-암호화 서열을 포함할 수 있거나 다양한 내부 서열, 즉, 유전자 내에 발생하는 것으로 공지된 인트론을 포함할 수 있다.

[0069] **III. 치료를 위한 효소적 키누레닌 분해**

[0070] 특정 양태에서, 폴리펩티드는 키누레닌을 고갈시키는 효소와 함께, 키누레닌 고갈에 민감한 암을 비롯한 질환의 치료를 위해 사용되어, 종양-매개 관용원성 효과를 방지하고 그 대신 종양-제거 염증-촉진 반응을 매개할 수 있다. 특정 양태에서, 키누레니나제는 IDO1, IDO2, 및/또는 TDO를 발현하는 종양을 치료하는데 사용하기 위해 고려된다.

[0071] 본 발명의 특정 양태는 질환, 가령 종양을 치료하기 위한 변형된 키누레니나제를 제공한다. 특히, 변형된 폴리펩티드는 인간 폴리펩티드 서열을 가질 수 있고 따라서 인간 환자에서 알러지 반응을 방지하고, 반복된 투여가 가능하며, 치료적 효능을 증가시킬 수 있다.

[0072] 본 치료 방법이 유용한 종양은 임의의 악성 세포 유형, 가령 충실성 종양 또는 혈액성 종양에서 발견되는 유형을 포함한다. 예시적인 충실성 종양은 췌장, 결장, 맹장, 위, 뇌, 머리, 목, 난소, 신, 후두, 육종, 폐, 방광, 흑색종, 전립선, 및 유방으로 이루어진 군에서 선택된 기관의 종양을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 혈액학적 종양은 골수 종양, T 또는 B 세포 악성종양, 백혈병, 림프종, 아세포종, 골수종, 등을 포함

한다. 추가로 본 명세서에 제공된 방법을 이용하여 치료될 수 있는 암의 예시는, 암종, 림프종, 아세포종, 육종, 백혈병, 편평세포 암, 폐암 (소-세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 및 폐의 편평 암종을 포함), 복막의 암, 간세포 암, 위 또는 위 암 (위장 암 및 위장 기질의 암을 포함), 췌장 암, 교모세포종, 자궁경부 암, 난소 암, 간 암, 방광 암, 유방암, 결장 암, 대장 암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신 또는 신장 암, 전립선암, 음문 암, 갑상선 암, 다양한 유형의 두경부 암, 흑색종, 표재 확장성 흑색종, 악성 흑색점 흑색종, 말단 흑색점 흑색종, 결절성 흑색종, 뿐만 아니라 B-세포 림프종 (저등급/소포성 비-호지킨(Hodgkin)성 림프종 (NHL); 소형 림프구성 (SL) NHL; 중간 등급/소포성 NHL; 중간 등급 미만성 NHL; 고등급 면역아세포 NHL; 고등급 림프모구 NHL; 고등급 소형 비-분할 세포 NHL; 거대 종양 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS-연관성 림프종; 및 발렌스트롬(Waldenstrom) 매크로글로불린혈증을 포함), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 유모세포 백혈병, 다중 골수종, 급성 골수의 백혈병 (AML) 및 만성 골수아구성 백혈병을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0073] 암은 특히 다음의 조직학적 유형을 갖지만, 이들에 제한되지 않는다: 신생물, 악성; 암종; 암종, 미분화; 거대 및 방추상세포 암종; 소세포 암종; 갑상선유두 암종; 편평세포 암종; 림프상피성 암종; 기저의 세포 암종; 모기질 암종; 이행세포 암종; 갑상선유두 이행세포 암종; 선암종; 가스트린, 악성; 담관암종; 간세포 암종; 혼합 간세포 암종 및 담관암종; 육주상 선암종; 선모낭포 암종; 선종성 폴립 내 선암종; 선암종, 가족성 대장용종증; 고체 암종; 유암종 종양, 악성; 세기관지-폐포성 선암종; 갑상선유두 선암종; 난염성세포 암종; 호산성구 암종; 호산소구 선암종; 호염기구 암종; 투명세포 선암종; 과립 세포 암종; 소포성 선암종; 갑상선유두 및 소포성 선암종; 비피막성 경화성 암종; 부신 피질 암종; 자궁내막 암종; 피부 부속 암종; 아포크린 선암종; 피지 선암종; 귀지 선암종; 점액상피 암종; 췌장낭선암종; 갑상선유두 췌장낭선암종; 갑상선유두 장액성 췌장낭선암종; 점액성 췌장낭선암종; 점액성 선암종; 반지세포 위선 암종; 침투 도관 암종; 수질 암종; 소엽 암종; 염증 암종; 파젯(paget) 질환, 유방; 소엽 세포 암종; 선편평세포 암종; 선암종 w/편평 화생; 흉선종, 악성; 난소 기질의 종양, 악성; 협막세포종, 악성; 과립막세포 종양, 악성; 남성아세포종, 악성; 세르톨리 세포 암종; 레이디히 세포 종양, 악성; 지질 세포 종양, 악성; 부신경절종, 악성; 외-유선 부신경절종, 악성; 갈색세포종; 사구맥관육종; 악성 흑색종; 무흑색소성 흑색종; 표재 확장성 흑색종; 거대 색소침착 모반 내 악성 흑색종; 유상피 세포 흑색종; 청색 모반, 악성; 육종; 섬유육종; 섬유성 조직구종, 악성; 점액육종; 지방육종; 평활근육종; 횡문근육종; 배아 횡문근육종; 폐포성 횡문근육종; 기질의 육종; 혼합 종양, 악성; 뮐러 혼합 종양; 신아세포종; 간모세포종; 암육종증; 간엽세포종, 악성; 브레너 종양, 악성; 엽상 종양, 악성; 활막 육종; 중피종, 악성; 미분화배세포종; 배아 암종; 기형종, 악성; 난소갑상샘종, 악성; 융모암; 중신종, 악성; 혈관육종; 혈관내피종, 악성; 카포시(kaposi) 육종; 혈관주위세포종, 악성; 림프관육종; 골육종; 방피질성 골육종; 연골육종; 연골모세포종, 악성; 간엽 연골육종; 뼈의 거세포 종양; 유잉(ewing) 육종; 치성 종양, 악성; 사기질모세포성 치아육종; 에나멜상피종, 악성; 사기질모세포성 섬유육종; 송과체종, 악성; 척색종; 신경교, 악성; 상의세포종; 성상세포종; 원형질성 성상세포종; 섬유성 성상세포종; 성상모세포종; 교모세포종; 핍지교종; 핍지모세포종; 원시성 신경외배엽성; 소뇌 육종; 신경절아세포종; 신경모세포종; 망막모세포종; 후각 신경인성 종양; 뇌수막종, 악성; 신경섬유육종; 신경초종, 악성; 과립 세포 종양, 악성; 악성 림프종; 호지킨 질환; 호지킨; 파라육아종; 악성 림프종, 소세포성 림프구성; 악성 림프종, 대세포, 미만성; 악성 림프종, 소포성; 균상식육종; 다른 명시된 비-호지킨 림프종; 악성 조직구증; 다중 골수종; 비만세포 육종; 면역증식성 소장 질환; 백혈병; 림프양 백혈병; 혈장 세포 백혈병; 적백혈병; 림프육종 세포 백혈병; 골수의 백혈병; 호염기성 백혈병; 호산구 백혈병; 단세포성 백혈병; 비만세포 백혈병; 거대모구성 백혈병; 골수의 육종; 및 유모세포 백혈병.

[0074] 본 명세서에서 키누레니나제는 종양 조직, 또는 암을 가진 포유동물의 순환계로부터 키누레닌 및/또는 3'-하이드록시-키누레닌을 고갈시키기 위한, 또는 키누레닌의 고갈이 요망된다고 고려되는 경우에 키누레닌을 고갈시키기 위한 다양한 요법에서 항종양 물질로서 사용될 수 있다.

[0075] 고갈은 포유동물의 순환계에서는 *생체 내*, 조직 배양 또는 다른 생물학적 배지 내 키누레닌 및 3'-하이드록시-키누레닌 고갈이 요망되는 경우에 *시험관 내*, 및 생물학적 유체, 세포, 또는 조직이 신체 외부에서 조작되고 나중에 환자 포유동물의 신체로 되돌려지는 경우 *생체외* 절차에서 수행될 수 있다. 순환계, 배양 배지, 생물학적 유체, 또는 세포로부터 키누레닌의 고갈은 처리되는 물질에 접근가능한 키누레닌의 양을 감소시키기 위해 수행되며, 그러므로 접촉되는 물질에서 주변 키누레닌을 분해하도록 키누레닌-고갈 조건 하에서 고갈되어야 하는 물질을 키누레닌을-고갈시킬 양의 키누레니나제와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0076] 고갈은 세포의 영양 공급원에 이루어지며, 세포 자체에 부가되어야 할 필요는 없다. 그러므로, *생체 내* 적용에서, 종양 세포의 처리 단계는 종양 세포 집단을 위한 영양 매체를 키누레니나제와 접촉시키는 단계를 포함한다.

상기 구체예에서, 배지는 혈액, 림프성 유체, 척수액 등 키누레닌 고갈이 요망되는 유사 체액일 수 있다.

[0077] 키누레닌- 및 3'-하이드록시-키누레닌-고갈 효율은 적용에 따라, 및 전형적으로는 물질 내에 존재하는 키누레닌의 양, 요망되는 고갈 속조, 및 키누레니나제에 도출되어야 하는 물질의 내성에 따라 매우 달라질 수 있다. 물질 내 키누레닌 및 키누레닌 대사산물 수준, 및 따라서 물질로부터 키누레닌 및 키누레닌 대사산물이 고갈되는 속도는 당해 분야에 널리 공지된 다양한 화학 및 생화학적 방법에 의해 쉽게 관찰할 수 있다. 예시적인 키누레닌-고갈 양이 추가로 본 명세서에 기술되며, 처리되는 물질의 밀리리터(mL)당 0.001 내지 100 단위 (U) 키누레니나제, 바람직하게는 약 0.01 내지 10 U, 및 더 바람직하게는 약 0.1 내지 5 U 키누레니나제 범위일 수 있다. 전형적인 투여량이 체중을 기초로 투여될 수 있고, 약 5-1000 U/킬로그램 (kg)/일, 바람직하게는 약 5-100 U/kg/일, 더 바람직하게는 약 10-50 U/kg/일, 및 더 바람직하게는 약 20-40 U/kg/일의 범위이다.

[0078] 키누레닌-고갈 조건은 키누레니나제의 생물학적 활성에 적합한 완충액 및 온도 조건이며, 효소에 적합한 온화한 온도, 염, 및 pH 조건, 예를 들면, 생리학적 조건을 포함한다. 예시적인 조건은 약 4-40℃, 약 0.05 내지 0.2 M NaCl와 동등한 이온 강도, 및 약 5 내지 9의 pH이며, 생리학적 조건도 포함된다.

[0079] 특정 구체예에서, 본 발명은 항종양 물질로서 키누레니나제를 사용하는 방법을 고려하며, 그러므로 종양 세포 집단을 치료적으로 효과적인 양의 키누레니나제와 종양 세포 성장을 저해하기에 충분한 기간 동안 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0080] 한 구체예에서, *생체 내* 접촉시키는 단계는 치료적으로 효과적인 양의 생리학적으로 용인되는 본 발명의 키누레니나제를 포함하는 조성물을 환자에게 투여함으로써, 정맥내 복강내, 또는 종양내 주입함으로써 달성되며, 이를 통해 환자에게 존재하는 종양 세포의 키누레닌 공급원을 고갈시킨다.

[0081] 키누레니나제의 치료적으로 효과적인 양은 요망되는 효과를 얻게하도록, 즉, 종양 조직 또는 환자의 순환계에서 키누레닌을 고갈시키고, 이를 통해 종양-제거 염증-촉진 반응을 매개하도록 산출되어 설정된 양이다. 따라서, 본 발명의 키누레니나제의 투여를 위한 투여량 범위는 종양 세포 분열 및 세포 순환의 증상이 감소되는 요망되는 효과를 생성하기에 충분히 큰 범위이다. 투여량은 과점조도 증후군, 폐 수종, 울혈성 심부전, 신경학적 효과, 등과 같은 유해한 부작용을 일으킬 정도로 커서는 안 된다. 일반적으로, 투여량은 환자의 연령, 상태, 성별, 및 질환 정도에 따라 달라지며 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다. 투여량은 임의의 합병증이 발생한 경우 개인의 전문의에 의해 조정될 수 있다.

[0082] 키누레니나제는 주사 또는 시간에 따른 점진적인 주입에 의해 비경구적으로 투여될 수 있다. 키누레니나제는 정맥내, 복강내, 경구, 근육내, 피하, 체강내, 경피, 진피로 투여될 수 있고, 연동적 수단에 의해 전달될 수 있으며, 종양 세포를 포함하는 조직으로 직접 주입될 수 있고, 또는 키누레닌에 대한 가능한 생체센서를 포함할 수 있는 카테커에 연결된 펌프로 투여될 수 있다.

[0083] 키누레니나제를 포함하는 치료적 조성물은 통상적으로 정맥내, 예를 들면, 단위 용량을 주입함으로써 투여된다. 치료적 조성물에 관하여 사용되는 경우 용어 "단위 용량"은 개체에게 한 번에 투여하기에 적절하도록 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 요망되는 희석제, 즉, 담체, 또는 비히클과 함께 요망되는 치료 효과를 만들도록 산출된 소정량 의 활성 물질을 함유한다.

[0084] 조성물은 투여 제형에 적합한 방식으로, 및 치료적으로 효과적인 양으로 투여된다. 투여되는 양은 치료받는 개체, 활성 성분을 이용할 개체 시스템의 크기, 및 요망되는 치료 효과의 정도에 의존적이다. 투여되어야 하는 활성 성분의 정확한 양은 전문의의 판단에 의존적이며 각 개체에 따라 달라진다. 그러나, 전신 투여를 위해 적절한 투여 범위가 본 명세서에 개시되며 투여의 경로에 의존적이다. 최초 투여 및 보강 투여(booster shot)를 위한 적절한 계획이 또한 고려되며 전형적으로는 초기 투여 이후 추가적인 주입 또는 다른 투여에 의해 한 시간 이상의 간격으로 반복 투여가 이루어진다. 예시적인 다중 투여가 본 명세서에 기술되며 지속적으로 높은 키누레니나제의 혈청 및 조직 수준 및 역으로 낮은 키누레닌의 혈청 및 조직 수준을 유지하는 것이 특히 바람직하다. 대안적으로, *생체 내* 요법을 위해 규정된 범위로 혈액내 농도를 유지하기에 충분한 연속적인 정맥내 주입이 고려된다.

[0085] **IV. 접합체**

[0086] 본 발명의 조성물 및 방법은, 가령 이종 펩티드 조각 또는 중합체, 가령 폴리에틸렌 글리콜을 갖는 접합체를 형성함으로써 변형된 키누레니나제를 포함한다. 추가의 양태에서, 키누레니나제는 PEG에 연결되어 효소의 수화 반경을 증가시키고 따라서 혈청 지속성을 증가시킬 수 있다. 특정 양태에서, 개시된 폴리펩티드는 임의의 표적화 물질, 가령 외부 수용체 또는 종양 세포의 결합 부위에 특정하고 안정하게 결합하는 능력을 가진 리간드에 공액

결합될 수 있다 (미국 특허 공보 제2009/0304666호).

[0087] **A. 융합 단백질**

[0088] 본 발명의 특정 구체예는 융합 단백질에 관한 것이다. 이들 분자는 N- 또는 C-말단에서 이종 도메인에 연결된 자연적인 또는 변형된 키누레니나제를 가질 수 있다. 예를 들면, 융합은 또한 다른 종으로부터의 선도 서열을 사용하여 이종 숙주에서 단백질의 재조합 발현을 가능하게 할 수 있다. 또다른 유용한 융합은 융합 단백질의 정제를 용이하게 하기 위한 단백질 친화성 태그, 가령 혈청 알부민 친화성 태그 또는 여섯 히스티딘 잔기, 또는 면역학적 활성 도메인, 가령 항체 에피토프, 바람직하게는 절단가능한 에피토프의 부가를 포함한다. 비-제한적인 친화성 태그는 폴리히스티딘, 키틴 결합 단백질 (CBP), 말토오스 결합 단백질 (MBP), 및 글루타티온-S-전이효소 (GST)를 포함한다.

[0089] 특정 구체예에서, 키누레니나제는 *생체 내* 반-감기를 증가시키는 펩티드, 가령 XTEN 폴리펩티드 (Schellenberger *et al.*, 2009), IgG Fc 도메인, 알부민, 또는 알부민 결합 펩티드에 연결될 수 있다.

[0090] 융합 단백질을 생성하는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 널리 공지되어 있다. 그러한 단백질은 예를 들면, 완전한 융합 단백질의 신생(*de novo*) 합성에 의해, 또는 이종 도메인을 인코딩하는 DNA 서열의 부착, 이후 온전한 융합 단백질의 발현에 의해 생산될 수 있다.

[0091] 모 단백질의 기능적 활성을 회복하는 융합 단백질의 생산은 나란히 연결된 폴리펩티드 사이에 끼어든 펩티드 링커를 인코딩하는 가교 DNA 조각과 유전자를 연결함으로써 촉진될 수 있다. 링커는 생성된 융합 단백질의 적절한 접힘을 허용하기에 충분한 길이일 수 있다.

[0092] **B. 링커**

[0093] 특정 구체예에서, 키누레니나제는 이관능성 가교-연결 시약을 이용하여 화학적으로 공액결합되거나 단백질 수준에서 펩티드 링커와 융합될 수 있다.

[0094] 이관능성 가교-연결 시약은 친화성 매트릭스의 제조, 다양한 구조의 변형 및 안정화, 리간드 및 수용체 결합 부위의 식별, 및 구조 연구를 비롯한 다양한 목적을 위해 광범위하게 사용되어 왔다. 적절한 펩티드 링커, 가령 Gly-Ser 링커가 또한 키누레니나제를 연결하기 위해 사용될 수 있다.

[0095] 두 개의 동일한 관능기를 지니는 동종이관능성 시약은 동일한 및 상이한 거대분자 또는 거대분자의 하위 단위 사이의 가교-연결을 비롯하여, 이들의 특정한 결합 부위에 대한 폴리펩티드 리간드의 연결에 있어서 고도로 효율적인 것으로 증명되었다. 이종이관능성 시약은 두 개의 상이한 관능기를 보유한다. 두 가지 상이한 관능기의 차별적인 반응성을 이용함으로써, 가교-연결은 선택적으로 및 연속적으로 동시에 제어될 수 있다. 이관능성 가교-연결 시약은 이들의 관능기에 대한 특이성에 따라, *예컨대*, 아미노-, 설프히드릴-, 구아니딘-, 인돌-, 카르복실-특이적 기로 구분될 수 있다. 이들 중에서, 유리 아미노 기를 겨냥하는 시약은 이들의 상업적인 이용가능성, 합성의 용이성, 이들을 적용할 수 있는 온화한 반응 조건으로 인해 특히 널리 애용되어 왔다.

[0096] 대부분의 이종이관능성 가교-연결 시약은 일차 아민-반응기 및 티올-반응기를 지닌다. 또다른 예에서, 이종이관능성 가교-연결 시약 및 가교-연결 시약을 이용하는 방법이 기술된다(미국 특허 제5,889,155호, 그 전체가 특정하게 본 명세서에 참고로서 포함됨). 가교-연결 시약은 친핵성 히드라지드 잔기를 친전자성 말레이미드 잔기와 조합시켜, 한 예에서, 알데히드가 유리 티올과 커플링되게 한다. 가교-연결 시약은 다양한 관능기를 가교-연결시키기 위해 변형될 수 있다.

[0097] 추가적으로, 키누레니나제를 조합하기 위해 당해 분야의 숙련가에게 공지된 임의의 다른 연결/커플링 물질 및/또는 메커니즘, 가령, 예를 들면, 항체-항원 상호작용, 아비딘 비오틴 연결, 아미드 연결, 에스테르 연결, 티오에스테르 연결, 에테르 연결, 티오에테르 연결, 포스포에스테르 연결, 포스포아미드 연결, 무수물 연결, 이황화 연결, 이온 및 소수성 상호작용, 이중특이적 항체 및 항체 단편, 또는 이들의 조합이 사용될 수 있다.

[0098] 혈액에서 합리적인 안정성을 가지는 가교-연결제를 사용하는 것이 바람직하다. 표적화 및 치료/예방 물질을 공액결합시키기 위해 성공적으로 사용될 수 있는 링커를 내포하는 수많은 유형의 이황화-결합이 공지되어 있다. 입체 장애를 갖는 이황화 결합을 보유하는 링커는 생체 내에서 더 높은 안정성을 부여할 것으로 확인될 것이다. 이들 링커는 따라서 연결 물질의 한 군이다.

[0099] 장애를 갖는 가교-연결제 외에도, 장애가 없는 링커가 또한 본 명세서에 따라 사용될 수 있다. 보호된 이황화물을 보유하거나 생성한다고 간주되지 않는 다른 유용한 가교-연결제는 SATA, SPDP, 및 2-이미노티올란을 포함한

다 (Wawrzynczak 및 Thorpe, 1987). 그러한 가교-연결제의 사용은 당해 분야에서 널리 알려져 있다. 또다른 구체예는 유연한 링커의 사용을 포함한다.

[0100] 일단 화학적으로 공액결합되면, 펩티드는 일반적으로 공액결합되지 않은 물질 및 다른 오염물질로부터 접합체를 분리하여 정제될 것이다. 가공되어 임상적으로 사용될 수 있을만한 충분한 순도를 갖는 접합체를 제공하는데 사용하기 위해 수많은 정제 기술이 이용가능하다.

[0101] 크기 배제, 가령 겔 여과, 겔 투과, 또는 높은 성능 액체 크로마토그래피를 기반으로 하는 정제 방법이 일반적으로 가장 많이 사용될 것이다. 다른 크로마토그래피 기술, 가령 블루-세파로스 분리가 또한 사용될 수 있다. 봉입체로부터 융합 단백질을 정제하기 위한 통상적인 방법, 가령 나트륨 N-라우로일-사르코신 (SLS)과 같은 약한 세제를 이용하는 방법이 유용할 수 있다.

[0102] **C. 페길화(PEGylation)**

[0103] 본 발명의 특정 양태에서, 키누레니나제의 페길화에 관련된 방법 및 조성물이 개시된다. 예를 들면, 키누레니나제는 본 명세서에 개시된 방법에 따라 페길화될 수 있다.

[0104] 페길화는 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체 사슬을 또다른 분자, 일반적으로는 약물 또는 치료적 단백질에 공유적으로 부착시키는 과정이다. 페길화는 표적 거대분자와 PEG의 반응성 유도체를 항온처리함으로써 일상적으로 얻어진다. 약물 또는 치료적 단백질에의 PEG의 공유적 부착은 숙주의 면역 시스템으로부터 물질을 "차폐"시키거나 (면역원성 및 항원성을 감소) 또는 물질의 유체역학 크기 (용액 내 크기)를 증가시킬 수 있고, 이는 신장 배출을 감소시킴으로써 물질의 순환 기간을 연장시킨다. 페길화는 또한 소수성 약물 및 단백질에 수용해성을 제공할 수 있다.

[0105] 페길화의 첫 번째 단계는 하나 또는 양 말단에서 PEG 중합체를 적절히 관능화하는 것이다. 동일한 반응성 모이어티로 각 말단에서 활성화된 PEG는 "동종이관능성"으로 공지되며 여기서 만일 존재하는 관능기가 상이한 경우, PEG 유도체는 "이종이관능성" 또는 "이종관능성"이라고 지칭된다. 요망되는 분자에 PEG를 부착하기 위해 PEG 중합체의 화학적으로 활성인 또는 활성화된 유도체가 제조된다.

[0106] PEG 유도체를 위해 적절한 관능기의 선택은 PEG에 연결될 분자에 있는 이용가능한 반응기의 유형을 기반으로 한다. 단백질에 있어서, 전형적인 반응성 아미노산은 리신, 시스테인, 히스티딘, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 및 티로신을 포함한다. N-말단 아미노 기 및 C-말단 카르복실산이 또한 사용될 수 있다.

[0107] 제1 세대 PEG 유도체를 형성하기 위해 사용되는 기술은 일반적으로 PEG 중합체를 하이드록실 기, 전형적으로 무수물, 산 클로라이드, 클로로포르메이트, 및 카르보네이트와 반응성인 기와 반응시키는 것이다. 제2 세대 페길화 화학은 공액 결합을 위해 이용가능한 더 효율적인 관능기, 가령 알데히드, 에스테르, 아미드, 등으로 이루어진다.

[0108] 페길화 적용이 더욱 더 발전하고 복잡해짐에 따라, 공액 결합을 위한 이종이관능성 PEG에 대한 수요가 증가해왔다. 이들 이종이관능성 PEG은 친수성, 유연성, 및 생체적합성 스페이서를 필요로 하는 두 가지 독립체를 연결하는데 매우 유용하다. 이종이관능성 PEG를 위한 바람직한 말단 기는 말레이미드, 비닐 설폰, 피리딜 디설파이드, 아민, 카르복실산, 및 NHS 에스테르이다.

[0109] 가장 공통적인 변형 물질, 또는 링커는 메톡시 PEG (mPEG) 분자를 기반으로 한다. 이들의 활성은 알코올 말단에 단백질-변형 기를 부가하는데 의존적이다. 일부 경우에 폴리에틸렌 글리콜 (PEG 디올)은 전구체 분자로서 사용된다. 디올은 나중에 이종- 또는 동종-이량체 PEG-연결된 분자를 만들기 위해 양쪽 말단이 변형된다.

[0110] 단백질은 일반적으로 친핵성 부위, 가령 비보호된 티올 (시스테이닐 잔기) 또는 아미노 기에 페길화된다. 시스테이닐-특이적 변형 시약의 예시는 PEG 말레이미드, PEG 아이오도아세테이트, PEG 티올, 및 PEG 비닐설폰을 포함한다. 상기 네 가지는 온화한 조건 및 중성 내지 알칼리 pH에서 강하게 시스테이닐-특이적이지만 각각 단점을 일부 지닌다. 말레이미드로 형성된 티오에테르는 알칼리 조건 하에 다소 불안정할 수 있으며 따라서 이 링커에는 제형화 선택지에 있어서 일부 제약이 존재할 수 있다. 아이오도 PEG로 형성된 카르바모티오에이트 연결은 더 안정하지만, 유리 요오드가 일부 조건 하에 티로신 잔기를 변형시킬 수 있다. PEG 티올은 단백질 티올과 함께 이황화 결합을 형성하지만, 이 연결 또한 알칼리 조건 하에 불안정할 수 있다. PEG-비닐설폰 반응성은 말레이미드 및 아이오도 PEG에 비해 비교적 느리지만; 그러나, 형성된 티오에테르 연결은 상당히 안정하다. 이의 더 느린 반응 속도는 또한 PEG-비닐설폰 반응을 더 쉽게 제어하도록 만들 수 있다.

[0111] 자연적인 시스테이닐 잔기에서의 부위-특이적 페길화는 거의 수행되지 않는데, 이들 잔기가 일반적으로 디설파

이드 결합의 형태이거나 생물학적 활성을 위해 필요하기 때문이다. 반면에, 부위-겨냥성 돌연변이유발 방법은 티올-특이적 링커를 위한 시스테이닐 페길화 부위를 도입하기 위해 사용될 수 있다. 시스테인 돌연변이는 이것이 페길화 시약과 접촉할 수 있으면서도 페길화 후에도 여전히 생물학적으로 활성이도록 설계되어야 한다.

[0112] 아민-특이적 변형 물질은 PEG NHS 에스테르, PEG 트레실레이트, PEG 알데히드, PEG 이소티오시아네이트, 및 기타 여러가지를 포함한다. 모든 반응은 온화한 조건 하에 일어나며 아미노 기에 매우 특이적이다. PEG NHS 에스테르는 아마도 더 반응성인 물질 중 하나이지만; 그러나, 이의 높은 반응성은 대규모 공정에서 페길화 반응을 제어하기 어렵게 만들 수 있다. PEG 알데히드는 아미노 기와 함께 이민을 형성하며, 이민은 이후 나트륨 시아노보로하이드라이드를 통해 이차 아민으로 환원된다. 나트륨 보로하이드라이드와 달리, 나트륨 시아노보로하이드라이드는 디설파이드 결합을 환원시키지 않을 것이다. 그러나, 상기 화학 물질은 고도로 독성이며 특히 이것이 휘발성이 되는 더 낮은 pH에서 주의해서 취급해야 한다.

[0113] 대부분의 단백질에 있는 복수의 리신 잔기로 인해, 부위-특이적 페길화가 어려울 수 있다. 다행히, 이들 시약이 양자화되지 않은 아미노 기와 반응하기 때문에, 더 낮은 pH에서 반응을 수행함으로써 더 낮은-pK 아미노 기에 페길화를 진행할 수 있다. 일반적으로알파-아미노 기의 pK는 리신 잔기의 엡실론-아미노 기보다 더 낮은 1-2 pH 단위이다. PH 7 이하에서 분자를 페길화함으로써, N-말단에 대한 높은 선택성을 흔히 얻을 수 있다. 그러나, 이는 단백질의 N-말단 부분이 생물학적 활성을 위해 요구되지 않는 경우에만 가능하다. 하지만, 페길화로부터의 약동학적 이익은 *시험관 내* 생체활성의 상당한 손실을 능가하며, 페길화 화학과 관계없이 훨씬 더 큰 *생체 내* 생체활성을 갖는 산물을 생성한다.

[0114] 페길화 절차를 개발할 때 고려해야 할 몇 가지 변수가 존재한다. 다행히, 일반적으로 최대 넷 또는 다섯 가지 핵심 변수만이 존재한다. 페길화 조건의 최적화를 위한 "실험 설계" 접근법은 아주 유용할 수 있다. 티올-특이적 페길화 반응에 있어서, 고려할 변수는: 단백질 농도, PEG-대-단백질 비율 (몰 기준), 온도, pH, 반응 시간, 및 일부 경우에는, 산소의 배제를 포함한다. (산소는 단백질에 의한 분자간 디설파이드 형성을 야기할 수 있고, 이는 페길화 산물의 수율을 감소시킬 것이다.) 아민-특이적 변형을 위해 (산소의 배제를 포함하여) 동일한 요인을 고려해야 하지만 예외적으로 pH는, 특히 N-말단 아미노 기를 표적하는 경우 훨씬 더 중요할 수 있다.

[0115] 아민- 및 티올-특이적 변형 모두를 위해, 반응 조건은 단백질의 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 이는 온도, 단백질 농도, 및 pH를 제한할 수 있다. 또한, 페길화 반응을 시작하기 전에 PEG 링커의 반응성을 알아야 한다. 예를 들어, 페길화 물질이 단지 70 퍼센트 활성이라면, 사용되는 PEG의 양은 단백질-대-PEG 반응 화학양론에서 반드시 활성 PEG 분자만 계산에 포함되도록 해야 한다.

[0116] **V. 단백질 및 펩티드**

[0117] 특정 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 단백질 또는 펩티드, 가령 키누레니나제를 포함하는 신규한 조성물에 관한 것이다. 이들 펩티드는 융합 단백질에 포함되거나 상기 기술된 바와 같은 물질에 공액결합될 수 있다.

[0118] 본 명세서에서 사용된, 단백질 또는 펩티드는 일반적으로 약 200 아미노산을 초과하여, 유전자로부터 번역된 전장 서열까지의 단백질; 약 100 아미노산을 초과하는 폴리펩티드; 및/또는 약 3 내지 약 100 아미노산의 펩티드를 가리키지만, 이에 제한되지 않는다. 편의를 위해, 용어 "단백질", "폴리펩티드", 및 "펩티드"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

[0119] 본 명세서에서 사용된, "아미노산 잔기"는 당해 분야에 공지된 임의의 자연발생적 아미노산, 임의의 아미노산 유도체, 또는 임의의 아미노산 모방체를 가리킨다. 특정 구체예에서, 단백질 또는 펩티드의 잔기는 연속적이며, 아미노산 잔기의 서열을 중단시키는 어떠한 비-아미노산도 없다. 다른 구체예에서, 서열은 하나 이상의 비-아미노산 모이어티를 포함할 수 있다. 특정한 구체예에서, 단백질 또는 펩티드 잔기의 서열은 하나 이상의 비-아미노산 모이어티에 의해 중단될 수 있다.

[0120] 따라서, 용어 "단백질 또는 펩티드"는 자연발생적 단백질에서 발견되는 20가지 공통 아미노산 중 적어도 하나, 또는 적어도 하나의 변형된 또는 이례적 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포괄한다.

[0121] 단백질 또는 펩티드는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 임의의 기술, 가령 표준 분자생물학적 기술을 통한 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드의 발현, 천연 공급원에서 단백질 또는 펩티드의 단리, 또는 단백질 또는 펩티드의 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다. 다양한 유전자에 상응하는 뉴클레오티드 및 단백질, 폴리펩티드, 및 펩티드 서열은 이미 개시된 바 있으며, 당해 분야의 숙련가에게 공지된 컴퓨터에 기록된 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 그러한 데이터베이스 중 하나는 국립 생명과학기술 정보센터(National Center for Biotechnology Information)의 유전자은행(Genbank) 및 유전자단백질(GenPept) 데이터베이스(웹주소 ncbi.nlm.nih.gov/로 접

근가능)다. 공지된 유전자를 위한 암호화 부위는 본 명세서에 개시된 기술을 이용하거나 당해 분야의 숙련가에게 공지된 기술을 이용하여 증폭 및/또는 발현될 수 있다. 대안적으로, 단백질, 폴리펩티드, 및 펩티드의 다양한 상업적인 제조방법이 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다.

[0122] **VI. 핵산 및 벡터**

[0123] 본 발명의 특정 양태에서, 키누레니나제 또는 키누레니나제를 내포하는 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열이 개시될 수 있다. 사용되는 발현 시스템에 따라, 핵산 서열은 통상적인 방법을 기반으로 선택될 수 있다. 예를 들어, 키누레니나제가 인간 키누레니나제에서 유도되고 *E. coli*에서 거의 사용되지 않는 복수의 코돈을 내포하는 경우, 이것이 발현을 방해할 수 있다. 그러므로, 각각의 유전자 또는 이들의 변이체는 *E. coli* 발현을 위해 최적화된 코돈일 수 있다. 다양한 벡터가 또한 관심의 단백질을 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 벡터는 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터, 전이인자, 또는 리포좀-계 벡터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0124] **VII. 숙주 세포**

[0125] 숙주 세포는 키누레니나제 및 이들의 접합체의 발현과 분비를 허용하도록 변환될 수 있는 것이면 어느 것이나 될 수 있다. 숙주 세포는 박테리아, 포유류 세포, 효모, 또는 사상균일 수 있다. 다양한 박테리아는 대장균(*Escherichia*) 및 간균(*Bacillus*)을 포함한다. 사카로미세스(*Saccharomyces*), 키유베로미세스(*Kiuyveromyces*), 한세눌라(*Hansenula*), 또는 피키아(*Pichia*)속에 속하는 효모가 적합한 숙주 세포로 사용될 수 있다. 다음 속을 포함하는 다양한 종의 사상균이 발현 숙주로 사용될 수 있다: 아스퍼길루스(*Aspergillus*), 트리코더마(*Trichoderma*), 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실륨(*Penicillium*), 세팔로스포리움(*Cephalosporium*), 아킬라(*Achlya*), 포도스포라(*Podospora*), 엔도티아(*Endothia*), 무코어(*Mucor*), 코킬로볼루스(*Cochliobolus*), 및 피리쿨라리아(*Pyricularia*).

[0126] 이용가능한 숙주 생물의 예시는 박테리아, 예컨대, 에세리아 콜라이(*Escherichia coli*) MC1061, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) BRB1 유도체(Sibakov *et al.*, 1984), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) SAI123 (Lordanescu, 1975) 또는 스트렙토코쿠스 리비단스(*Streptococcus lividans*) (Hopwood *et al.*, 1985); 효모, *예컨대*, 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) AH 22 (Mellor *et al.*, 1983) 또는 쉬조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 및 사상균, *예컨대*, 아스퍼길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스퍼길루스 아와모리(*Aspergillus awamori*) (Ward, 1989), 또는 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) (Penttila *et al.*, 1987; Harkki *et al.*, 1989)를 포함한다.

[0127] 포유류 숙주 세포의 예시는 중국 햄스터 난소 세포 (CHO-K1; ATCC CCL61), 래트 뇌하수체 세포 (GH1; ATCC CCL82), HeLa S3 세포 (ATCC CCL2.2), 래트 간암 세포 (H-4-II-E; ATCCCRL 1548), SV40-형질전환 원숭이 신 세포 (COS-1; ATCC CRL 1650), 및 쥐의 배아 세포 (NIH-3T3; ATCC CRL 1658)를 포함한다. 상술된 내용은 예시적이며 당해 분야에 공지된 많은 가능한 숙주 생물을 배제하는 것이 아니다. 원칙적으로, 분비 능력이 있는 모든 숙주가 원핵생물이든 진핵생물이든 사용될 수 있다.

[0128] 키누레니나제 및/또는 이들의 융합 단백질을 발현하는 포유류 숙주 세포는 모세포주를 배양하기 위해 전형적으로 사용되는 조건 하에 배양된다. 일반적으로, 세포는 전형적으로 5%-10% 혈청, 가령 소의 태아 혈청으로 보충된 생리학적 염분 및 영양분을 함유하는 표준 배지, 가령 표준 RPMI, MEM, IMEM, 또는 DMEM에서 배양된다. 배양 조건은 또한 표준이며, *예컨대*, 배양물질은 요망되는 수준의 단백질이 얻어질 때까지 37℃의 고정 또는 유동 배양기에서 배양된다.

[0129] **VIII. 단백질 정제**

[0130] 단백질 정제 기술은 당해 분야의 숙련가에게 널리 공지되어 있다. 이들 기술은 공통적으로 세포, 조직, 또는 기관을 균질화하고 크게 폴리펩티드 및 비-폴리펩티드 분획으로 분리하는 단계를 포함한다. 관심의 단백질 또는 폴리펩티드는 달리 명시되지 않은 경우 크로마토그래피 및 전기영동 기술을 이용하여 더욱 정제되어 부분적으로 또는 완전히 정제될 수 있다 (또는 균질하게 정제될 수 있다). 순수한 펩티드의 제조에 특히 적합한 분석적 방법은 이온-교환 크로마토그래피, 겔 배제 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 친화성 크로마토그래피, 면역친화성 크로마토그래피, 및 등전점 맞춤이다. 펩티드를 정제하는데 특히 효율적인 방법은 고속-성능 액체 크로마토그래피 (FPLC) 또는 균등한 고-성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)이다.

[0131] 정제된 단백질 또는 펩티드는 다른 성분으로부터 단리가능한 조성물을 가리키는 것으로 의도되며, 여기서 단백질 또는 펩티드는 자연적으로-얻을 수 있는 상태에 비해 임의의 정도까지 정제된다. 단리된 또는 정제된 단백질 또는 펩티드는, 그러므로, 또한 자연적으로 발생할 수 있는 환경으로부터 유리된 단백질 또는 펩티드를 가리킨

다. 일반적으로, "정제된"은 분별을 거쳐 다양한 다른 성분들이 제거된 단백질 또는 펩티드 조성물을 가리킬 것이며, 상기 조성물은 발현되는 생물학적 활성을 실질적으로 보유한다. 용어 "실질적으로 정제된"이 사용되는 경우, 이러한 표현은 단백질 또는 펩티드가 조성물의 주요 성분을 구성하는, 가령 조성물 내 단백질의 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 또는 그 이상을 구성하는 조성물을 가리킬 것이다

[0132] 단백질 정제에서 사용하기에 적절한 다양한 기술은 당해 분야의 숙련가에게 널리 공지되어 있다. 이들은, 예를 들면, 암모늄 설페이트, PEG, 항체 등을 이용한, 또는 열 변성에 의한 침전, 이후 원심분리; 크로마토그래피 단계, 가령 이온 교환, 겔 여과, 역상, 하이드록시아파타이트, 및 친화성 크로마토그래피; 등전점 맞춤; 겔 전기영동; 및 이들 및 다른 기술의 조합을 포함한다. 일반적으로 당해 분야에 공지된 바와 같이, 다양한 정제 단계의 수행 순서는 달라질 수 있거나, 혹은 특정 단계가 빠질 수 있지만 여전히 실질적으로 정제된 단백질 또는 펩티드의 제조를 위해 적절한 방법을 구성하는 것으로 생각된다.

[0133] 단백질 또는 펩티드의 정제 정도를 정량화하기 위한 다양한 방법을 당해 분야의 숙련가는 본 개시에 비추어 알 것이다. 이들은, 예를 들면, SDS/PAGE 분석에 의해 활성 분획의 특이적 활성을 측정, 또는 분획 내 폴리펩티드의 양을 측정하는 것을 포함한다. 분획의 순도를 측정하기 위해 바람직한 방법은 분획의 특이적 활성을 계산하고, 이를 초기 추출물의 특이적 활성과 비교하고, 이를 통해 "-배 정제 수"로 평가한 분획의 순도를 산출하는 것이다. 활성의 양을 나타내기 위해 사용되는 실제 단위는, 물론, 정제 후 선택되는 특정한 분석 기술에 따라, 및 발현된 단백질 또는 펩티드가 검출가능한 활성을 나타내는지 여부에 따라 달라질 것이다.

[0134] 단백질 또는 펩티드가 항상 이의 가장 순수한 상태로 제공되어야 하는 일반적인 조건은 존재하지 않는다. 실제로, 실질적으로 덜 정제된 산물이 특정 구체예에서 사용될 수 있음이 고려된다. 부분적인 정제가 더 적은 정제 단계를 조합하거나, 상이한 형태의 동일한 일반 정제 계획을 사용하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, HPLC 장치를 이용하여 수행된 양이온-교환 컬럼 크로마토그래피가 저압 크로마토그래피 시스템을 이용한 동일한 기술에 비해 일반적으로 더 높은 "-배" 정제를 성취할 것임이 이해된다. 더 낮은 상대 정제 정도를 나타내는 방법은 단백질 산물의 총 회수에, 또는 발현된 단백질의 활성을 유지하는데 장점을 가질 수 있다.

[0135] 특정 구체예에서 단백질 또는 펩티드, 예를 들면, 키누레니나제, 키누레니나제를 내포하는 융합 단백질, 또는 페길화 후 변형된 키누레니나제가 단리 또는 정제될 수 있다. 예를 들면, His 태그 또는 친화성 에피토프가 정제를 용이하게 하기 위해 그러한 키누레니나제에 포함될 수 있다. 친화성 크로마토그래피는 단리될 물질과 이것이 특이적으로 결합할 수 있는 분자 사이의 특이적인 친화성을 기반으로 하는 크로마토그래피 절차이다. 이는 수용체-리간드 유형의 상호작용이다. 컬럼의 물질은 불용성 매트릭스에 결합 파트너 중 하나를 공유적으로 결합시켜 합성된다. 컬럼의 물질은 이후 용액으로부터 물질을 특이적으로 흡수할 수 있게 된다. 용리는 결합이 일어나지 않는 방향으로 조건을 변화시킴으로써 (예컨대, pH, 이온 강도, 온도, 등의 변화) 일어난다. 매트릭스는 어떠한 상당한 정도로든 분자를 흡수하지 않으며 광범위하게 화학적, 물리적, 및 열적 안정성을 가지는 물질이어야 한다. 리간드는 이의 결합 특성에 영향을 주지 않는 방식으로 연결되어야 한다. 리간드는 또한 비교적 긴밀한 결합을 제공해야 한다. 샘플이나 리간드를 파괴하지 않고 물질을 용리할 수 있어야 한다.

[0136] 크기 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography, SEC)는 용액 내 분자가 이들의 크기, 또는 더 기술적으로 말하면, 이들의 유체역학적 부피를 기초로 하는 크로마토그래피 방법이다. 상기 기술은 보통 대형 분자 또는 거대분자 복합체, 가령 단백질 및 산업적 중합체에 적용된다. 전형적으로, 컬럼을 통해 샘플을 전달하기 위해 수성 용액이 사용되는 경우, 이는 겔 여과 크로마토그래피로 공지되며, 반면 이동상으로서 유기 용매가 사용되는 경우 이는 겔 투과 크로마토그래피라고 부른다.

[0137] SEC의 기본 원리는 상이한 크기의 입자가 고정된 상을 통해 상이한 속도로 용리(여과)되는 것이다. 그 결과 입자의 용액이 크기에 따라 분리된다. 모든 입자가 동시에 또는 거의 동시에 주입된다는 전제 하에, 동일한 크기의 입자들은 함께 용리될 것이다. 각각의 크기 배제 컬럼은 분리될 수 있는 분자량 범위를 가진다. 배제 한계는 범위의 상한에 해당하는 분자량으로 정의되며 이는 분자가 고정상에 포획되기에 너무 거대한 지점이다. 투과 한계는 분리 범위의 하한에 해당하는 분자량으로 정의되며 여기서 충분히 작은 크기의 분자는 고정상의 공극을 완전히 투과하고 상기 분자량 미만의 모든 분자는 너무 작기 때문에 단일 밴드로서 용리된다.

[0138] 고-성능 액체 크로마토그래피 (또는 고압 액체 크로마토그래피, HPLC)는 화합물을 분리, 규명 및 정량하기 위해 생화학 및 분석 화학에서 자주 사용되는 컬럼 크로마토그래피의 한 형태이다. HPLC는 크로마토그래피 충전 물질(고정상)을 고정하는 컬럼, 컬럼을 통해 이동상(들)을 이동시키는 펌프, 및 분자의 체류 시간을 표시하는 검출기를 이용한다. 체류 시간은 고정상, 분석되는 분자, 및 사용되는 용매(들) 사이의 상호작용에 따라 달라진다.

[0139] **IX. 약학 조성물**

[0140] 신규한 키누레니나제가 국부적으로 진행된 또는 전이성 암을 가진 암 환자에서 종양 세포 성장을 저해하기 위해 및, 가장 바람직하게는, 암 세포를 죽이기 위해 전신 또는 국부적으로 투여될 수 있음이 고려된다. 이들은 정맥내, 척추강내, 및/또는 복강내로 투여될 수 있다. 이들은 단독으로 또는 항-증식 약물과 조합되어 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 이들은 수술 또는 다른 절차 전에 환자에서 암의 부피를 줄이기 위해 투여된다. 대안적으로, 이들은 수술 후에 잔여하는 임의의 암(예컨대, 수술에서 제거되지 못한 암)이 생존하지 못하도록 보장하기 위해 투여될 수 있다.

[0141] 본 발명이 치료 제제의 특정한 성질에 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 예를 들면, 그러한 조성물은 생리학적으로 허용되는 액체, 겔, 또는 고체 담체, 희석제, 및 부형제를 갖는 제형으로 제공될 수 있다. 이들 치료 제제는 포유동물에게, 수의학적 용도를 위해, 가령 가축에게, 및 임상 용도를 위해 인간에게 다른 치료제와 유사한 방식으로 투여될 수 있다. 일반적으로, 치료적 효능를 위해 요망되는 투여는 투여의 목적 및 방식, 뿐만 아니라 개별적인 개체의 특화된 요구조건에 따라 달라질 것이다.

[0142] 그러한 조성물은 전형적으로 주사가능한 액체 용액 또는 현탁액으로 제조된다. 적절한 희석제 및 부형제는, 예를 들면, 물, 식염수, 덱스트로스, 글리세롤, 등, 및 이들의 조합이다. 또한, 요망되는 경우, 조성물은 미량의 보조제, 가령 습윤제 또는 유화제, 안정화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다.

[0143] 임상적인 적용이 고려되는 경우, 의도되는 적용을 위해 적절한 형태로 단백질, 항체, 및 약물을 포함하는 약제학적 조성물을 제조하는 것이 필요할 수 있다. 일반적으로, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체에 용해되거나 분산된 유효량의 하나 이상의 키누레니나제 또는 부가적인 물질을 포함할 수 있다. 표현 "약제학 또는 약리학적으로 허용되는"은 동물, 가령, 예를 들면, 인간에게, 적절히 투여될 때 부작용, 알러지, 또는 다른 원치않는 반응을 일으키지 않는 분자 독립체 및 조성물을 가리킨다. 본 명세서에 개시된 방법으로 단리된 적어도 하나의 키누레니나제, 또는 부가적인 활성 성분을 함유하는 약제학적 조성물의 제조를 당해 분야의 숙련가는 본 명세서에 참고로서 포함된 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990에 예시된 바와 같이, 본 개시에 비추어 알 것이다. 게다가, 동물 (*예컨대*, 인간) 투여에 있어서, 제조는 FDA 생물 표준청에서 요구하는 무균성, 발열원성, 일반적 안전성, 및 순도 표준에 부합해야 함이 이해될 것이다.

[0144] 본 명세서에서 사용된, "약제학적으로 허용되는 담체"는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 바와 같은 임의의 및 모든 용매, 분산 매체, 코팅제, 계면활성제, 항산화제, 보존제 (*예컨대*, 항생제, 항진균제), 등장화제, 흡수지연제, 염, 보존제, 약물, 약물 안정화제, 겔, 결합제, 부형제, 붕해제, 활택제, 감미제, 착향 물질, 염료, 이들의 유사 물질 및 이들의 조합을 포함한다(예를 들면, 본 명세서에 참고로서 포함된 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990를 참고). 임의의 통상적인 담체는 활성 성분에 적합하지 않을 경우를 제외하고, 약제학적 조성물 내 사용이 고려된다.

[0145] 본 발명의 특정 구체예는 고체, 액체, 또는 에어로졸 형태로 투여되는지 여부, 및 투여의 경로, 가령 주사를 위해 무균이어야 하는지 여부에 따라 상이한 유형의 담체를 포함한다. 조성물은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 바와 같이 정맥내, 피내, 경피, 척추강내, 동맥내, 복강내, 비강내, 질내, 직장내, 근육내, 피하, 점막으로, 경구, 국소, 국부적으로, 흡입 (*예컨대*, 에어로졸 흡입)에 의해, 주사에 의해, 주입에 의해, 연속 주입에 의해, 세포를 직접 표적하는 국소 관류 목욕에 의해, 카테터를 통해, 세척을 통해, 지질 조성물 (*예컨대*, 리포좀) 내, 또는 다른 방법에 의해 또는 상기 서술한 것들의 조합에 의해 투여될 수 있다 (예를 들면, 본 명세서에서 참고로서 포함된 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990를 참고).

[0146] 변형된 폴리펩티드는 유리 염기, 중성, 또는 염 형태의 조성물로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 산 부가 염, *예컨대*, 단백질성 조성물의 유리 아미노 기를 통해 형성된 것들, 또는 무기산, 가령, 예를 들면, 염산 또는 인산을 통해, 또는 유기산, 가령 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 또는 만델산을 통해 형성된 것들을 포함한다. 유리 카르복실 기를 통해 형성된 염은 또한 무기 염기, 가령, 예를 들면, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 제2철 하이드록사이드; 또는 유기 염기 가령 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 또는 프로카인으로부터 유도될 수 있다. 제형에 따라, 용액은 투여 제형에 적합한 방식으로 및 치료적으로 효과적인 양으로 투여될 것이다. 제형은 다양한 투여 형태, 가령 비경구 투여를 위해 제형화된 형태, 가령 주사 용액, 또는 폐로 송달하기 위한 에어로졸, 또는 경구 투여를 위해 제형화된 형태, 가령 약물 방출 캅셀 등으로 용이하게 투여된다.

[0147] 추가로 본 발명의 특정한 양태에 따르면, 투여를 위해 적절한 조성물은 불활성 희석제와 함께 또는 없이 약제학

적으로 허용되는 담체 내에 제공될 수 있다. 담체는 소화가 가능해야 하며 액체, 반-고체, 즉, 페이스트, 또는 고체 담체를 포함한다. 임의의 통상적인 매체, 물질, 희석제, 또는 담체는 수용자 또는 이것이 함유된 조성물의 치료 효과에 유해한 경우를 제외하고는, 본 방법의 실시에서 사용하기 위한 투여가능한 조성물에 사용하는 것이 적절하다. 담체 또는 희석제의 예시는 지방, 오일, 물, 식염수 용액, 지질, 리포좀, 수지, 결합제, 충전제, 등, 또는 이들의 조합을 포함한다. 조성물은 또한 하나 이상의 성분의 산화를 지연시키기 위해 다양한 항산화제를 포함할 수 있다. 추가적으로, 파라벤 (*예컨대*, 메틸파라벤, 프로필파라벤), 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 보존제, 가령 다양한 항생 및 항진균 물질에 의해 미생물 작용의 방지가 이루어질 수 있다.

[0148] 본 발명의 특정 양태에 따르면, 조성물은 임의의 편리하고 실용적인 방식으로 즉, 용해, 현탁, 유화, 배합, 캡슐화, 흡수, 등에 의해 담체와 조합된다. 그러한 절차는 당해 분야의 숙련가에게 일상적인 것이다.

[0149] 본 발명의 특정한 구체예에서, 조성물은 반-고체 또는 고체 담체와 충분히 조합 또는 혼합된다. 혼합은 분쇄와 같은 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 안정화제가 또한 혼합 과정에서 위장 내 변성과 같은 치료 활성의 손실로부터 조성물을 보호하기 위해 부가될 수 있다. 조성물에서 사용하기 위한 안정화제의 예시는 완충제, 아미노산, 가령 글리신 및 리신, 탄수화물, 가령 덱스트로스, 만노스, 갈락토스, 프럭토스, 락토스, 수크로스, 말토오스, 소르비톨, 만니톨, 등을 포함한다.

[0150] 추가의 구체예에서, 본 발명은 키누레니나제, 하나 이상의 지질, 및 수성 용매를 포함하는 약제학적 지질 비히클 조성물에 관한 것일 수 있다. 본 명세서에서 사용된, 용어 "지질"은 물에서 불용성이고 유기 용매로 용출될 수 있음을 특징으로 하는 광범위한 물질 중 어느 하나를 포함하는 것으로 정의될 것이다. 이러한 폭넓은 부류의 화합물은 당해 분야의 숙련가에게 널리 공지되어 있으며, 본 명세서에서 용어 "지질"이 사용될 때 이는 임의의 구체적인 구조에 제한되지 않는다. 예시는 긴-사슬 지방족 탄화수소 및 이들의 유도체를 함유하는 화합물을 포함한다. 지질은 자연발생적 또는 합성 (즉, 인공적으로 설계되거나 제조된 것)일 수 있다. 그러나, 지질은 보통 생물학적 물질이다. 생물학적 지질은 당해 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들면, 중성 지방, 인지질, 포스포글리세라이드, 스테로이드, 테르펜, 리소리피드, 글리코스핑고리피드, 글리코리피드, 설파타이드, 에테르- 및 에스테르-연결된 지방산을 갖는 지질, 중합가능한 지질, 및 이들의 조합을 포함한다. 물론, 본 명세서에 구체적으로 기술된 것들 외에 당해 분야의 숙련가에게 지질로서 이해되는 화합물이 또한 본 조성물 및 방법에 포함된다.

[0151] 당해 분야의 숙련가는 지질 비히클 내에 조성물을 분산하기 위해 사용되는 기술 범위에 익숙할 것이다. 예를 들면, 키누레니나제 또는 이의 융합 단백질은 지질을 함유하는 용액 내에 분산되거나, 지질에 용해되거나, 지질과 함께 유화되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질에 공유적으로 결합되거나, 현탁액으로서 지질 내에 내포되거나, 미셀(micelle) 또는 리포좀 내에 내포되거나 복합체를 이루거나, 또는 달리 당해 분야의 숙련가에게 공지된 임의의 수단에 의해 지질 또는 지질 구조와 연관될 수 있다. 분산은 리포좀을 형성하거나 형성하지 못할 수 있다.

[0152] 동물 환자에게 투여되는 조성물의 실제 투여량은 물리적 및 생리적 요인, 가령 체중, 용태의 중증도, 치료되는 질환의 유형, 사전 또는 현재의 치료 개입, 환자의 특발증, 및 투여의 경로에 의해 결정될 수 있다. 투여량 및 투여의 경로에 따라서, 바람직한 투여량 및/또는 유효량의 투여 횟수는 개체의 반응에 따라 달라질 수 있다. 투여를 담당하는 전문의는 어떠한 경우에도, 개별적인 개체에 대한 조성물 내 활성 성분(들)의 농도 및 적절한 투여량(들)을 결정할 것이다.

[0153] 특정 구체예에서, 약제학적 조성물은, 예를 들면, 적어도 약 0.1%의 활성 화합물을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 활성 화합물은 예를 들면, 단위의 중량의 약 2% 내지 약 75%, 또는 약 25% 내지 약 60%, 및 이들 중 도출가능한 임의 범위를 포함할 수 있다. 자연적으로, 각각의 치료적으로 유용한 조성물 내 활성 화합물(들)의 양은 어떠한 소정의 단위 용량의 화합물에서도 적절한 투여가 이루어지게 될 방식으로 제조될 수 있다. 용해성, 생체이용률, 생물학적 반-감기, 투여 경로, 산물의 사용 기한, 뿐만 아니라 다른 약리학적 고려사항과 같은 요인들이 그러한 약제학적 제형을 제조하는 당해 분야의 기술자에게 고려될 것이며, 따라서 다양한 투여 및 치료 계획이 바람직할 수 있다.

[0154] 다른 비-제한적인 예시에서, 투여량은 또한 투여당 약 1 마이크로그램/kg/체중, 약 5 마이크로그램/kg/체중, 약 10 마이크로그램/kg/체중, 약 50 마이크로그램/kg/체중, 약 100 마이크로그램/kg/체중, 약 200 마이크로그램/kg/체중, 약 350 마이크로그램/kg/체중, 약 500 마이크로그램/kg/체중, 약 1 밀리그램/kg/체중, 약 5 밀리그램/kg/체중, 약 10 밀리그램/kg/체중, 약 50 밀리그램/kg/체중, 약 100 밀리그램/kg/체중, 약 200 밀리그램/kg/

체중, 약 350 밀리그램/kg/체중, 약 500 밀리그램/kg/체중, 내지 약 1000 밀리그램/kg/체중 또는 그 이상, 및 이들 중 도출가능한 임의 범위를 포함할 수 있다. 본 명세서에 나열된 수치로부터 도출가능한 범위의 비-제한적인 예시에서, 약 5 밀리그램/kg/체중 내지 약 100 밀리그램/kg/체중, 약 5 마이크로그램/kg/체중 내지 약 500 밀리그램/kg/체중 범위, 등이 상기 기술된 수치를 기초로 하여 투여될 수 있다.

[0155] **X. 병행 치료**

[0156] 특정 구체예에서, 본 구체예의 조성물 및 방법은 키누레니나제의 투여를 차선 또는 추가의 요법과 병행하는 것을 포함한다. 그러한 요법은 키누레닌 의존성과 연관된 임의의 질환의 치료에 적용될 수 있다. 예를 들면, 질환은 암일 수 있다.

[0157] 병행 치료를 포함하는 방법 및 조성물은 치료 또는 보호 효과를 증진하며, 및/또는 또다른 항-암 또는 항-과다증식 요법의 치료 효과를 증가시킨다. 치료 및 예방 방법 및 조성물은 암 세포 사멸 및/또는 세포 과다증식의 저해와 같은 요망되는 효과를 얻기에 효과적인 조합된 양으로 제공될 수 있다. 이러한 과정은 키누레니나제 및 2차 요법을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 2차 요법은 직접적인 세포독성 효과을 가질 수 있거나 가지지 않을 수 있다. 예를 들면, 2차 요법은 직접적인 세포독성 효과는 없지만 면역 시스템을 상향조절하는 물질일 수 있다. 조직, 종양, 또는 세포는 하나 이상의 물질 (*예컨대*, 키누레니나제 또는 항암제)을 포함하는 하나 이상의 조성물 또는 약리학적 제형(들)에 노출되거나 조직, 종양, 및/또는 세포는 둘 이상의 개별 조성물 또는 제형에 노출될 수 있고, 여기서 하나의 조성물은 1) 키누레니나제, 2) 항암제, 또는 3) 키누레니나제 및 항암제를 둘다 제공한다. 또한, 그러한 병행 요법이 화학 요법, 방사선 요법, 수술 요법, 또는 면역 요법과 함께 사용될 수 있음이 고려된다.

[0158] 용어 "접촉된" 및 "노출된"은 세포에 적용되는 경우 본 명세서에서 치료적 구조체 및 화학요법제 또는 방사선치료제가 표적 세포에 송달되거나 표적 세포와 가까이 위치하도록 배치되는 과정을 설명하기 위해 사용된다. 세포 사멸을 얻기 위해, 예를 들어 물질은 모두 세포를 사멸시키거나 세포 분열을 막기에 효과적인 양으로 조합되어 세포로 송달된다.

[0159] 키누레니나제는 항-암 치료 전, 도중, 이후, 또는 다양한 조합으로 투여될 수 있다. 투여는 동시 내지 수 분 내지 수 일 내지 수 주의 간격으로 이루어질 수 있다. 키누레니나제가 항암제와 별도로 환자에게 제공되는 경우의 구체예에서, 각각의 송달 시간 사이에 상당한 기간이 경과하지 않게 하여, 두 가지 화합물이 여전히 환자에게 유리하게 조합된 효과를 전달할 수 있도록 보장해야 한다. 그러한 경우에, 환자에게 키누레니나제 및 항암 요법을 약 12 내지 24 또는 72 시간 이내에 각각 및, 더 상세하게는, 약 6-12 시간 이내에 각각 제공할 수 있음이 고려된다. 일부 경우에 각각의 투여 사이에 수 일 (2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일) 내지 수 주 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주) 간격을 띄우는, 치료를 위한 기간을 상당히 연장하는 것이 요망될 수 있다.

[0160] 특정 구체예에서, 치료 과정은 1-90 일 또는 그 이상 지속될 것이다 (이러한 범위는 개입하는 날을 포함한다). 하나의 물질이 제1일 내지 제90일 중 아무 날짜 (이러한 범위는 개입하는 날을 포함한다) 또는 이중 임의의 조합에 제공되고, 및 또다른 물질이 제1일 내지 제90일 중 아무 날짜 (이러한 범위는 개입하는 날을 포함한다) 또는 이중 임의의 조합에 제공될 수 있음이 고려된다 하루 이내에 (24-시간 동안), 환자는 물질(들)의 일회 또는 다회 투여를 받을 수 있다. 게다가, 치료 기간 후에, 항-암 치료제가 투여되지 않는 일정 기간이 존재함이 고려된다. 이러한 기간은 환자의 조건, 가령 이들의 예후, 체력, 건강, 등에 따라 1-7 일, 및/또는 1-5 주, 및/또는 1-12 달 또는 그 이상이 걸릴 수 있다 (이러한 범위는 개입하는 날을 포함한다). 치료 주기는 필요에 따라 반복될 수 있음이 예상된다.

[0161] 다양한 조합이 사용될 수 있다. 하기 실시예에서 키누레니나제는 "A"이고 항암 요법은 "B"이다:

[0162] 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

[0163] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0164] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0165] 환자에게 본 구체예의 화합물 또는 요법 중 어느 하나의 투여는 해당하는 경우, 물질의 독성을 고려하여, 그러한 화합물의 투여를 위한 일반 프로토콜을 따를 것이다. 그러므로, 일부 구체예에서 병행 요법으로 인한 독성을 관찰하는 단계가 존재한다.

[0166] **A. 화학 요법**

[0167] 다양한 화학요법제가 본 구체예에 따라 사용될 수 있다. 용어 "화학 요법"은 암을 치료하기 위한 약물의 사용을 가리킨다. "화학요법제"는 암의 치료에서 사용되는 화합물 또는 조성물을 통칭하기 위해 사용된다. 이들 물질 또는 약물은 세포 내 이들의 활성 방식, 예를 들면, 이들이 세포 주기에 영향을 주는지 및 어떤 단계에서 영향을 주는지에 따라 분류된다. 대안적으로, 물질은 이것이 DNA를 직접 가교-연결하거나, DNA에 끼어들거나, 또는 핵산 합성에 영향을 주어 염색체 및 유사분열 변이를 일으키는지를 기초로 하여 특징화될 수 있다.

[0168] 화학요법제의 예시는 알킬화제, 가령 티오테파 및 시클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 가령 부설판, 임프로설판, 및 피포설판; 아지리딘, 가령 벤조도파, 카르보쿠온, 마투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 가령 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드, 및 트리메틸로로멜라민; 아세토제닌 (특별히 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도제레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1를 포함); 엘류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코틱틴; 스폰지스타틴; 질소 머스터드, 가령 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 염화수소산염, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 및 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 가령 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님누스틴; 항생제, 가령 에네딘 항생제 (*예컨대*, 칼리케아미신, 특별히 칼리케아미신 감마1I(gammaI) 및 칼리케아미신 오메가I1(omegaI1)); 디네미신, 가령 디네미신 A; 비스포스포네이트, 가령 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 연관 색소단백질 에네딘 항생 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라르니신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모미시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신을 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 가령 미토마이신 C, 미코페놀 산, 노갈아르니신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 및 조루비신; 항-대사산물, 가령 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 가령 데노프테린, 프테로프테린, 및 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 가령 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 가령 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 및 플록스우리딘; 안드로겐, 가령 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 및 테스토락톤; 항-부신, 가령 미토탄 및 트릴로스탄; 폴산 보충제, 가령 후롤린 산; 아세토글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린 산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데모콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 가령 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미토잔트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로소잔트론; 포도필린 산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK 다당류 복합체; 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존 산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특별히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안귀딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 탁소이드, 예컨대, 파클리탁셀 및 도세탁셀 젬시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 백금 배위 복합체, 가령 시스플라틴, 옥살리플라틴, 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토잔트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (*예컨대*, CPT-11); 토포이소머라제 저해제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 가령 레티노산; 카페시타빈; 카르보플라틴, 프로카르바진, 플리코마이신, 젬시타비엔, 나벨빈, 파르네실-단백질 전이효소 저해제, 트랜스플래티넘, 및 상기 언급된 것들 중 임의의 약제학적으로 허용되는 염, 산, 또는 유도체를 포함한다.

[0169] **B. 방사선요법**

[0170] DNA 손상을 일으키며 광범위하게 사용되어 온 다른 요인은 γ-선, X-선, 및/또는 방사성 동위원소를 종양 세포로 유도 전달하는 것으로 흔히 공지되어 있다. DNA 손상 요인의 다른 형태로는 또한, 마이크로웨이브, 양성자빔 방사선 (미국 특허 제5,760,395호 및 제4,870,287호), 및 UV-방사선 같은 것들이 고려된다. 모든 이들 요인들은 DNA 상에, DNA의 전구체에, DNA의 복제 및 복구에, 및 염색체의 조립 및 유지에 광범위한 손상을 일으키는 것으로 여겨진다. X-선량 범위는 오랜 기간(3 내지 4주) 동안 매일 50 내지 200 뢴트겐 선량부터, 2000 내지 6000 뢴트겐의 단일 선량까지의 범위이다. 방사성 동위원소의 투여량 범위는 크게 달라지며, 동위원소의 반-감

기, 방출되는 방사선의 강도 및 유형, 및 신생물 세포에 의한 흡수에 의존한다.

[0171] **C. 면역 요법**

[0172] 당해 분야의 숙련가는 면역 요법이 구체예의 방법과 병행되어 또는 조합되어 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 암 치료의 맥락에서, 면역요법제는, 일반적으로, 면역 수식인자 세포 및 분자를 사용하여 암 세포를 표적하고 파괴하는 방법에 의존한다. 리툭시맙(RITUXAN®)이 그러한 예시이다. 관문 저해제, 가령, 예를 들면, 이필루미맙이 또다른 그러한 예시이다. 면역 수식인자는 예를 들면, 종양 세포의 표면에 있는 일부 마커에 특이적인 항체일 수 있다. 항체가 단독으로 치료의 수식인자로 기능할 수 있거나 다른 세포를 조종하여 실제로 세포 사멸에 영향을 줄 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소 (화학요법제, 방사선핵종, 리신 A 사슬, 콜레라 독소, 백일해 독소, 등)에 공액결합되어 단지 표적화 물질로서 기능할 수 있다. 대안적으로, 수식인자는 직접 또는 간접적으로, 종양 세포 표적과 상호작용하는 표면 분자를 지닌 림프구일 수 있다. 다양한 수식인자 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다.

[0173] 면역 요법의 한 양태에서, 종양 세포는 표적화하기 쉬운, 즉 대부분의 다른 세포에는 존재하지 않는 일부 마커를 지녀야 한다. 많은 종양 마커가 존재하며 이들 중 임의의 것들이 본 구체예의 맥락에서 표적화를 위해 적절할 수 있다. 흔한 종양 마커는 CD20, 암배아 항원, 티로시나제 (p97), gp68, TAG-72, HMFG, 시알릴 루이스 (Sialyl Lewis) 항원, MucA, MucB, PLAP, 라미닌 수용체, erb B, 및 p155를 포함한다. 면역 요법의 대안적인 양태는 면역 자극 효과와 항암 효과를 조합한 것이다. 다음을 비롯한 면역 자극 분자가 또한 존재한다: 사이토킨, 가령 IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, 감마-IFN, 케모카인, 가령 MIP-1, MCP-1, IL-8, 및 성장 인자, 가령 FLT3 리간드.

[0174] 현재 조사중이거나 사용되는 면역 요법의 예시는 면역 어쥬번트, *예컨대*, 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*), 플라스모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 디니트로클로로벤젠, 및 방향족 화합물 (미국 특허 제5,801,005호 및 제5,739,169호; Hui 및 Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998); 사이토킨 요법, *예컨대*, 인터페론 α, β 및 γ, IL-1, GM-CSF, 및 TNF (Bukowski *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1998; Hellstrand *et al.*, 1998); 유전자 요법, *예컨대*, TNF, IL-1, IL-2, 및 p53 (Qin et al., 1998; Austin-Ward 및 Villaseca, 1998; 미국 특허 제5,830,880호 및 제5,846,945호); 및 단클론 항체, *예컨대*, 항-CD20, 항-강글리오사이드 GM2, 및 항-p185 (Hollander, 2012; Hanibuchi *et al.*, 1998; 미국 특허 제5,824,311호)이다. 하나 이상의 항-암 요법이 본 명세서에 기술된 항체 요법과 함께 사용될 수 있음이 고려된다.

[0175] **D. 수술**

[0176] 암을 가진 사람의 대략 60%가 어떤 유형이든 수술을 받으며 수술은 예방적, 진단적 또는 단계적, 치유적, 일시적인 수술을 포함한다. 치유적 수술은 암 조직 전체 또는 일부가 물리적으로 제거, 절단, 및/또는 파괴되는 절제를 포함하며 다른 요법, 가령 본 구체예로의 처리, 화학 요법, 방사선요법, 호르몬 요법, 유전자 요법, 면역요법, 및/또는 대안적인 요법과 함께 사용될 수 있다. 종양 절제는 종양의 적어도 일부를 물리적으로 제거하는 것을 가리킨다. 종양 절제 외에도, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 저온 수술, 전기 외과술 및 현미경-제어 수술 (Mohs 수술)을 포함한다.

[0177] 암성 세포, 조직, 또는 종양 전체 또는 부분의 절제시, 신체에 공동이 형성될 수 있다. 추가적인 항암 요법과 함께 해당 영역의 관류, 직접 주입, 또는 국소 적용에 의한 처리가 이루어질 수 있다. 그러한 처리는, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7 일마다, 또는 1, 2, 3, 4, 및 5 주마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 달마다 반복될 수 있다. 이들 처리는 물론 다양한 투여량을 가질 수 있다.

[0178] **E. 기타 물질**

[0179] 치료의 치유 효능을 향상하기 위해 본 구체예의 특정 양태와 함께 따른 물질이 사용될 수 있음이 고려된다. 이들 추가적인 물질은 세포 표면 수용체 및 GAP 연결부의 상향조절에 영향을 주는 물질, 세포분열억제제 및 양성분화제, 세포 부착 저해제, 과증식성 세포의 아폽토시스 유도제에 대한 민감성을 증가시키는 물질, 또는 다른 생물학적 물질을 포함한다. GAP 연결부의 수를 증가시켜 세포간 신호전달을 증가시키는 것은 이웃하는 과다증식성 세포 집단에 대한 항-과다증식 효과를 증가시킬 수 있다. 다른 구체예에서, 세포분열억제제 또는 양성분화제는 치료의 항-과다증식성 효능을 향상하기 위해 본 구체예의 특정 양태와 함께 사용될 수 있다. 세포 부착 저해제는 본 구체예의 효능을 향상하는 것으로 생각된다. 세포 부착 저해제의 예시는 초점 접착 키나아제 (focal adhesion kinase, FAK) 저해제 및 로바스타틴이다. 과다증식성 세포의 아폽토시스에 대한 민감성을 증가시키는 다른 물질, 가령 항체 c225가 치료 효능을 향상하기 위해 본 구체예의 특정 양태와 함께 사용될 수 있음이 추가

로 고려된다.

[0180] **XI. 키트**

[0181] 본 발명의 특정 양태는 키트, 가령 치료 키트를 제공할 수 있다. 예를 들면, 키트는 본 명세서에 기술된 바와 같은 하나 이상의 약제학적 조성물 및 임의로 이의 사용에 대한 설명서를 포함할 수 있다. 키트는 또한 그러한 조성물의 투여를 달성하기 위한 하나 이상의 장치를 포함할 수 있다. 예를 들면, 해당 키트는 약제학적 조성물 및 조성물을 암 종양으로 직접 정맥내 주입할 수 있게 하기 위한 카테터를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 해당 키트는 송달 장치를 통해 사용하도록, 임의로 약품으로 제형화된, 또는 동결건조된 키누레니나제를 사전에 -충전한 앰풀을 포함할 수 있다.

[0182] 키트는 라벨이 달린 용기를 포함할 수 있다. 적절한 용기는, 예를 들면, 병, 바이알, 및 시험관을 포함한다. 용기는 다양한 재료, 가령 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 상기 기술된 바와 같은 치료적 또는 비-치료적 용도를 위해 효과적인 키누레니나제를 포함하는 조성물을 담을 수 있다. 용기의 라벨은 조성물이 특정한 치료 또는 비-치료적 적용을 위해 사용됨을 나타낼 수 있고, 또한 상기 기술된 바와 같은 *생체 내* 또는 *시험관 내* 용도를 위한 설명을 나타낼 수 있다. 본 발명의 키트는 전형적으로 상기 기술된 용기 및 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 포장 삽입물과 사용을 위한 설명서를 포함하는 상업적 및 사용자적 입장에서 바람직한 물질들을 포함하는 하나 이상의 다른 용기를 포함할 것이다.

[0183] **XII. 실시예**

[0184] 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 구체예를 보여주기 위해 포함되었다. 당해 분야의 숙련가는 하기의 실시예에 개시된 기술이 본 발명의 실시에서 본 발명자에 의해 잘 기능하는 것으로 확인된 기술을 나타내며, 따라서 본 발명의 실시의 바람직한 방식을 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 이해해야 할 것이다. 그러나, 당해 분야의 숙련가는, 본 개시에 비추어, 개시된 특정 구체예에서 많은 변화가 이루어질 수 있으며 본 발명의 정신과 범위에서 벗어나지 않으면서도 유사하거나 비슷한 결과를 얻음을 이해해야 할 것이다.

[0185] **실시예 1 - 슈도모나스 플루오레센스(*Psuedomonas fluorescens*) 키누레니나제의 유전자 구성, 발현, 및 정제**

[0186] *슈도모나스 플루오레슨스* (*Pseudomonas fluorescens*)로부터의 키누레니나제 효소의 발현을 위한 유전자(Pf-KYNU)를 DNA-Works 소프트웨어를 이용하여 설계된 네 코돈 최적화된 유전자 블록을 오버랩 연장(overlap extension) 중합효소 사슬 반응 (PCR)시킴으로써 구성하였다(Hoover 및 Lubkowski, 2002). 전장 유전자는 N-말단 *Xba*I 제한 효소 부위 (뉴클레오티드 1-6), 최적화된 리보솜 결합 부위 (RBS; 뉴클레오티드 29-55), 출발 코돈 (뉴클레오티드 56-58), N-말단 His_6 태그 (뉴클레오티드 59-91), *E. coli* 코돈 최적화된 *Pf*-KYNU 유전자 (뉴클레오티드 92-1336), 중지 코돈 (뉴클레오티드 1337-1342), 및 C-말단 *Bam*HI 제한 효소 부위 (뉴클레오티드 1342-1347)를 포함한다 (서열번호 1을 참조). 전술된 제한 효소 부위를 사용하여 조립된 유전자를 pET-28a+ 벡터 (Novagen)로 클로닝하였다. 이러한 구조체를 사용하여 이후 발현을 위한 BL21 (DE3) *E. coli* 로 형질전환시켰다. 세포를 50 mg/L의 카나마이신이 담긴 최소 배지 (Terrific Broth, TB)에서 210 rpm으로 교반하면서 37℃에서 성장시켰다. OD_{600} ~1.0에 도달하면 IPTG (0.5 mM 최종농도)를 부가함으로써 발현을 유도시키고 37℃에서 밤새 계속 교반하였다. 세포를 이후 원심분리하여 수확하고 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.5 mM 피리독실 포스페이트 (PLP), 1 mM 페닐메틸설포닐플루오라이드, 및 1 μg/mL DNA 가수분해효소로 이루어진 용해 완충액에 재-현탁시켰다. 세포 용해를 프렌치 프레스(French press)로 성취하고 용해물을 4℃에서 1시간 동안 20,000 x g로 원심분리하여 입자를 제거하였다. 상청액을 이후 5 μm 주사기 필터를 통해 여과시키고 pH 7.4의 50 mM 나트륨 포스페이트, 300 mM NaCl, 및 0.1 mM PLP로 이루어진 완충액 내에 미리-평형화시킨 Ni-NTA/아가로스 컬럼 (Qiagen)에 도포하였다. 용해물을 컬럼 상에 로딩한 후에, 수지를 5 컬럼 부피 (CV)의 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 및 0.1 mM PLP로 30 mM 이미다졸과 함께 세척하였다. 이후, 유속을 느리게 설정하여 컬럼을 밤새 0.1 mM PLP 및 1% v/v TRITON® X114이 함유된 100 CV의 무-내독소 PBS (Corning) 완충액으로 세척하였다. 밤새 세척함으로써 박테리아 발현 시스템의 전형적인 오염물질인 지질다당류 (LPS 또는 내독소)가 제거된다. 세척된 효소를 이후 250 mM 이미다졸과 0.1 mM PLP를 함유한 5 CV의 무-내독소 PBS로 용리하였고, 수지를 두 번째로 0.1 mM PLP가 담긴 5 CV 분량의 내독소가 없는 PBS로 헹구었다. 이 시점에서, 효소의 완충액을 신선한 PBS로 교환하여 이미다졸을 제거하고, 10% 글리세롤을 부가하고 분취액을 저장하기 위해 -80℃의 액체 질소에서 급속 냉동시켰다. 대안적으로, 효소의 완충액을 즉시 갓 제조한, 무균 100 mM 나트륨 포스페이트, pH 8.4의 완충액으로 교환하여, 이미다졸을 제거하고 페길화를 준비한다 (실시예 4를 참조). 효소 순도는 SDS-PAGE 분석을 기준으로 전형적으로 >95%였고 전형적인 수율은 평균 약 75 mg/배양물의 L였다.

$Abs_{280\ nm}$를 측정하고 산출된 63,745 $M^{-1}cm^{-1}$의 효소 흡광 계수를 이용함으로써 단백질 함량을 측정하였다.

[0187] **실시예 2 - 인간(*Homo sapiens*) 키누레니나제의 유전자 구성, 발현, 및 정제**

[0188] 인간(Homo sapiens)으로부터의 키누레니나제 효소의 발현을 위한 유전자(*h*-KYNU)를 DNA-Works 소프트웨어를 이용하여 설계된 네 코돈 최적화된 유전자 블록을 오버랩 연장 중합효소 사슬 반응 (PCR)시킴으로써 얻었다 (Hoover 및 Lubkowski, 2002). 전장 유전자는 N-말단 *Xba*I 제한 효소 부위 (뉴클레오티드 1-6), 최적화된 RBS (뉴클레오티드 28-60), 출발 코돈 (뉴클레오티드 61-63), N-말단 His_6 태그 (뉴클레오티드 64-96), *E. coli* 코돈 최적화된 *h*-KYNU 유전자 (뉴클레오티드 97-1488), 중지 코돈 (뉴클레오티드 1489-1491), 및 C-말단 *Bam*HI 제한 효소 부위 (뉴클레오티드 1492-1497)를 포함한다 (서열번호 2를 참조). 전술된 제한 효소 부위를 사용하여 조립된 유전자를 pET-28a+ 벡터 (Novagen)로 클로닝하였다. 이러한 구조체를 사용하여 이후 발현을 위한 BL21 (DE3) *E. coli* 로 형질전환시켰다. 세포를 50 mg/L의 카나마이신이 담긴 최소 배지 (Terrific Broth, TB)에서 210 rpm으로 교반하면서 37℃에서 성장시켰다. OD_{600} ~1.0에 도달하면 IPTG (0.5 mM 최종농도)를 부가함으로써 발현을 유도시키고 37℃에서 밤새 계속 교반하였다. 세포를 이후 원심분리하여 수확하고 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.5 mM 피리독실 포스페이트 (PLP), 1 mM 페닐메틸설포닐플루오라이드, 및 1 μg/mL DNA 가수분해효소로 이루어진 용해 완충액에 재-현탁시켰다. 세포 용해를 프렌치 프레스(French press)로 성취하고 용해물을 4℃에서 1시간 동안 20,000 x g로 원심분리하여 입자를 제거하였다. 상청액을 이후 5 μm 주사기 필터를 통해 여과시키고 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 및 0.1 mM PLP 완충액 내에 미리-평형화시킨 Ni-NTA/아가로스 컬럼 (Qiagen)에 도포하였다. 용해물을 컬럼 상에 로딩한 후에, 수지를 5 컬럼 부피 (CV)의 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 및 0.1 mM PLP로 30 mM 이미다졸과 함께 세척하였다. 이후, 유속을 느리게 설정하여 컬럼을 밤새 0.1 mM PLP 및 1% v/v TRITON® X114이 함유된 100 CV의 무-내독소 PBS (Corning) 완충액으로 세척하였다. 밤새 세척함으로써 효소의 박테리아 발현에서 전형적인 오염물질인 지질다당류(LPS 또는 내독소)가 제거된다. 세척된 효소를 이후 250 mM 이미다졸과 0.1 mM PLP를 함유한 5 CV의 내독소가 없는 PBS로 용리하였고, 수지를 두 번째로 0.1 mM PLP가 담긴 5 CV 분량의 내독소가 없는 PBS로 헹구었다. 이 시점에서, 효소의 완충액을 신선한 PBS로 교환하여 이미다졸을 제거하고, 10% 글리세롤을 부가하고 분취액을 저장하기 위해 -80℃의 액체 질소에서 급속 냉동시켰다. 대안적으로, 효소의 완충액을 갓 제조한, 무균 100 mM 나트륨 포스페이트, pH 8.4의 완충액으로 교환하여, 이미다졸을 제거하고 페길화를 준비할 수 있다 (실시예 4를 참조). 효소 순도는 SDS-PAGE로 측정하여 전형적으로 >95%였고 전형적인 수율은 평균 약 20 mg/액체 배양물의 L였다. $Abs_{280\ nm}$를 측정하고 산출된 76,040 $M^{-1}cm^{-1}$의 효소 흡광 계수를 이용함으로써 단백질 함량을 측정하였다.

[0189] **실시예 3 - 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 키누레니나제의 유전자 구성, 발현, 및 정제**

[0190] 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)으로부터의 키누레니나제 효소의 발현을 위한 유전자(*m*-KYNU)를 DNA-Works 소프트웨어를 이용하여 설계된 세 코돈 최적화된 유전자 블록을 오버랩 연장 중합효소 사슬 반응 (PCR)시킴으로써 얻었다(Hoover *et al.*, 2002). 전장 유전자는 N-말단 *Xba*I 제한 효소 부위 (뉴클레오티드 1-6), 최적화된 RBS (뉴클레오티드 29-58), 출발 코돈 (뉴클레오티드 59-61), N-말단 His_6 태그 (뉴클레오티드 62-94), *E. coli* 코돈 최적화된 *m*-KYNU 유전자 (뉴클레오티드 95-1483), 중지 코돈 (뉴클레오티드 1484-1486), 및 C-말단 *Bam*HI 제한 효소 부위 (뉴클레오티드 1487-1492)를 포함한다 (서열번호 3 참조). 전술된 제한 효소 부위를 사용하여 조립된 유전자를 pET-28a+ 벡터 (Novagen)로 클로닝하였다. 이러한 구조체를 사용하여 이후 발현을 위한 BL21 (DE3) *E. coli* 로 형질전환시켰다. 세포를 50 mg/L의 카나마이신이 담긴 최소 배지 (Terrific Broth, TB)에서 210 rpm으로 교반하면서 37℃에서 성장시켰다. OD_{600} ~1.0에 도달하면 0.5 mM IPTG를 부가함으로써 발현을 유도시키고 37℃에서 밤새 지속하였다. 세포를 원심분리하여 수확하고 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.5 mM 피리독실 포스페이트 (PLP), 1 mM 페닐메틸설포닐플루오라이드, 및 1 μg/mL DNA 가수분해효소로 이루어진 용해 완충액에 재-현탁시켰다. 세포 용해를 프렌치 프레스(French press)로 성취하고 용해물을 4℃에서 1시간 동안 20,000 x g로 원심분리하여 입자를 제거하였다. 상청액을 5 μm 주사기 필터를 통해 여과시키고 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 및 0.1 mM PLP 완충액 내에 미리-평형화시킨 Ni-NTA/아가로스 컬럼 (Qiagen)에 도포하였다. 용해물을 컬럼 상에 로딩한 후에, 수지를 5 컬럼 부피 (CV)의 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 및 0.1 mM PLP로 30 mM 이미다졸과 함께 세척하였다. 이후 유속을 느리게 설정하여 밤새 0.1 mM PLP 및 1% v/v TRITON® X114이 함유된 100 CV의 무-내독소 PBS (Corning) 완충액으로 세척하였다. 밤새 세척함으로써 효소의 박테리아 발현에서 전형적인 오염물질인 지질다당류(LPS 또는 내독소)가 제거된다. 세척된 효소를 250 mM 이미다졸과 0.1 mM PLP를 함유한 5 CV의 내독소가 없는 PBS로 용리하였고, 수지

를 두 번째로 0.1 mM PLP가 담긴 5 CV 분량의 내독소가 없는 PBS로 헹구었다. 이 시점에서, 효소의 완충액을 신선한 PBS로 교환하여 이미다졸을 제거하고, 10% 글리세롤을 부가하고 분취액을 저장하기 위해 -80℃의 액체 질소에서 급속 냉동시켰다.

[0191] **실시예 4 - 슈도모나스 플루오레슨스(*Pseudomonas fluorescens*) 키누레니나제의 약리학적 제조**

[0192] *생체 내에서* 효소의 순환 시간을 증가시키기 위해, KYNU 효소를 PEG에 접합시킴으로써 단백질의 표면 반응기를 관능화하여 효소의 수화 반경을 증가시켰다. 한 구체예에서, *Pf*-KYNU는 표면 리신 잔기를 메톡실 PEG 석신이미딜 카르보네이트 5000 MW (NANOCS)와 반응시켜 관능화시켰다. 정제된, 무-내독소 효소의 완충액을 갖 제조한 100 mM 나트륨 포스페이트, pH 8.4로 완전히 교환하고, 10 mg/mL까지 농축시켰다. 생성된 용액을 100:1 몰과량의 고체 PEG 시약에 직접 부가하고 실온에서 1 시간동안 반응하게 두었다 (도 1). 100 kDa 차단(cut off) 원심분리 여과 장치(AMICON®)에서 완충액을 신선한, 무-내독소 PBS로 완전히 교환하여 용액으로부터 미-반응된 PEG를 제거하였다. 효소의 명목상 몰 질량을 이후 PBS 내 크기 배제 HPLC 컬럼 (Phenomenex)에서 확인하였다. BioRad사의 MW 표준 용액을 사용하여 단백질 표준의 수치와 비교한 표준화 곡선 및 효소 체류 시간을 생성하였다. 표준 곡선을 기준으로, 비-페길화된 효소는 40 kDa의 명목 질량을 가지며, 이는 *Pf*-KYNU의 단량체 하나의 질량과 유사하다. 페길화 버전의 효소는 1,300 kDa의 명목 질량을 가지는 것으로 나타났으며, 즉 변형되지 않은 효소보다 실질적으로 더 컸다. Chromo-LAL 역학 발색성 내독소 시험 키트 (Associates of Cape Cod, Inc.)를 이용하여 내독소 수준을 정량화하였다. 상기 기술된 방식으로 세척한 효소는 전형적으로 정제된 *Pf*-KYNU의 0.19 ± 0.07 EU/mg의 내독소 수준을 보였다.

[0193] **실시예 5 - 인간(*Homo sapiens*) 키누레니나제의 약리학적 제조**

[0194] *생체 내에서* 인간 효소의 순환계 체류 시간을 증가시키기 위해, *h*-KYNU를 PEG에 접합시킴으로써 단백질의 표면 반응기를 관능화하여 이의 수화 반경을 증가시켰다. 한 구체예에서, *h*-KYNU는 표면 리신 잔기를 메톡실 PEG 석신이미딜 카르보네이트 5000 MW (NANOCS)와 반응시켜 관능화시켰다. 정제된, 무-내독소 효소의 완충액을 갖 제조한 100 mM 나트륨 포스페이트, pH 8.4로 완전히 교환하고, 10 mg/mL까지 농축시켰다. 생성된 용액을 100:1 몰과량의 고체 PEG 시약에 직접 부가하고 실온에서 1 시간동안 반응하게 두었다. 100 kDa 차단(cut off) 원심분리 여과 장치(AMICON®)에서 완충액을 신선한, 무-내독소 PBS로 완전히 교환하여 용액으로부터 미-반응된 PEG를 제거하였다. 효소의 명목상 몰 질량을 PBS로 평형화시킨 크기 배제 HPLC 컬럼 (Phenomenex)을 이용하여 측정하였고 체류 시간을 MW 표준 용액(BioRad)과 비교하였다. Chromo-LAL 역학 발색성 내독소 시험 키트 (Associates of Cape Cod, Inc.)를 이용하여 내독소 수준을 정량화하였다.

[0195] **실시예 6 - 키누레니나제의 역학 변수를 측정하기 위한 어세이**

[0196] *Pf*-KYNU 및 *h*-KYNU, 뿐만 아니라 실시예 4 및 5에 기술된 바와 같은 이들의 페길화 버전의 역학 변수를 분광측정 어세이로 정량화하였고, 여기서 효소 기질인, L-키누레닌의 최대 흡광도의 감소를 시간의 경과에 따라 관찰하였다. L-키누레닌 용액을 pH 7.4의 PBS 완충액에 제조하여, 8 μM 내지 250 μM 범위의 최종 농도를 만들었다. L-키누레닌은 365 nm에서 λ_{max}와 함께 4,500 $M^{-1}cm^{-1}$ 의 흡광 계수를 가지는 반면 키누레니나제 반응의 산물인, L-안트라닐산 및 L-알라닌은 365 nm에서 주목할만한 흡수를 보이지 않았다. 효소 용액 (~20 nM 최종)을 기질 용액에 부가하고 빠르게 혼합시켜 반응을 개시하고 시간에 따른 $Abs_{365\ nm}$를 측정하여 25℃에서 기질 KYN의 손실을 관찰하였다. 생성된 데이터를 처리하고 미하엘리스-멘텐 등식에 대입하여 역학 상수를 산출하였다. 페길화된 *Pf*-KYNU 효소의 동역학을 동일한 방식으로 측정하였다. 비-페길화된 효소에 있어서, k_{cat}/K_M = 1.0×10^5 $M^{-1}s^{-1}$였고 페길화 형태에 있어서, k_{cat}/K_M = 1.3×10^5 $M^{-1}s^{-1}$였다. 3-하이드록시-L-키누렌산의 가수분해에 대한 역학 변수를 또한 본 명세서에 기술된 바와 같이 측정하였다.

[0197] **실시예 7 - 키누레니나제의 *시험관 내* 안정성**

[0198] *Pf*-KYNU의 시험관 내 안정성을 측정하기 위해, 효소를 PBS 완충액 또는 인간 혈청 풀(pool)에 10 μM의 최종 농도로 부가하고 37℃에서 배양하였다. 10 μL 분량을 각각 시점마다 분취하고 990 μL의 250 μM L-키누레닌/PBS 용액에 부가하였다. 실시예 3에 기술된 바와 같이 시간에 따라 365 nm에서 흡광도의 감소를 측정하여 반응의 초기 속도를 관찰하였다. L-키누레닌 촉매반응의 초기 속도를 각 시점의 속도와 비교하고 시간 = 0에서의 속도와 비교함으로써 효소 안정성을 측정하였다. 생성된 데이터를 % 활성 대 시간으로 도표화하고 지수 등식에 대입하여 반-감기 (T1/2)를 측정하였다. *Pf*-KYNU 효소는 PBS에서 $T_{1/2}$ = 34.3 시간을 가지고 인간 혈청 풀에서 T1/2 =

2.4 시간을 가지는 것이 확인되었다 (도 2).

[0199] **실시예 8 - *생체 내* 키누레닌 및 트립토판 수준을 정량화하기 위한 어세이**

[0200] L-키누레닌, 트립토판, 키누레닌산, 3-하이드록시-L-키누레닌 및 L-안트라닐산 (키누레니나제 촉매반응의 산물 중 하나)의 *생체 내* 수준을 정량화하고 HPLC로 관찰하였다. 마우스를 부검하여, 혈액, 종양, 비장, 및 간 샘플을 제거하였다. 혈액 샘플을 원심분리하여 혈청과 전혈을 분리하였다. 조직 샘플을 먼저 균질화하고, 이후 원심분리하여 고체 부분을 제거하였다. 각각의 액체 분량에 1:10 v/v 분량의 100% 트리클로로아세트산을 부가하여 거대분자를 침전시켰다. 고체를 다시 원심분리하여 제거하고 상청액을 0.45 μm 주사기 필터로 통과시켰다. 처리한 상청액을 HPLC (Shimadzu)에 직접 적용하고 표준 분석용 C-18 컬럼에서 0% 용액 B에서 출발하여 100% 용액 B이 되는 구배를 이용하여 분리하였고 여기서 용액 A는 H_2O + 0.1% 트리플루오로아세트산이고 용액 B는 아세토니트릴 + 0.1% 트리플루오로아세트산이다. 190 nm 내지 900 nm 범위의 전체 흡광도를 지속적으로 수집하여 모든 가능한 분자를 지속적으로 관찰하였고 형광 분광학 (Ex = 365 nm, Em = 480 nm)을 동시에 수집하여 키누레닌 수준을 특정하게 관찰하였다. 농도 및 체류 시간을 순수한 분자 (Sigma)로 제조한 표준 용액을 이용하여 측정하였다.

[0201] **실시예 9 - 자가 B16 마우스 흑색종 모델에서 PEG-*Pf*-KYNU의 효능**

[0202] B6-WT 마우스 (n = 20)에게 2.5×10^5 B16 쥐의 흑색종 세포를 피하 옆구리 주사로 접종하였다. 종양을 10일간 정착되게 한 뒤 (종양 평균 = 20 mm^2) 마우스를 각각 n=10인 두 군으로 나누었다. 대조군에게 이후 20 mg/kg의 열 비활성화된 PEG-*Pf*-KYNU를 종양이 350 mm^2 크기가 될때까지 매 3일마다 종양내 주사하였다. 실험군에게 20 mg/kg의 활성 PEG-*Pf*-KYNU를 종양이 350 mm^2 크기 종말점에 도달할 때까지 매 3일마다 종양내 주사하는 것을 제외하고 동일한 방식으로 처리하였다. B16 흑색종 종양의 성장 속도는 동일하게 처리한 열-비활성 PEG-*Pf*-KYNU 군(도 3)에 비해 활성 PEG-*Pf*-KYNU를 투여한 처리군에서 상당히 지연되어 상당한 수명 연장을 가져왔다(도 4). 대조군 및 실험 처리군으로부터 단리한 림프구를 항체의 패널로 평가하였고 (즉, 항-CD45, CD4, Nk1.1, CD25, FoxP3, CD8, 그랜자임 B, IFNγ, CTLA4, CD11c, CD11b, F4/80, GR-1, 및 Ly6-C) 이는 순환하는 CD4+ CD25+ FoxP3+ 조절 T-세포의 집단이 활성 PEG-*Pf*-KYNU로 처리한 군에서 상당히 더 낮음을 나타내었다 (4.8 ± 0.8% *vs.* 8.6 ± 0.8%). 또한, 종양 침투성 CD8+ 그랜자임 B 및 인터페론 γ를 발현하는 T-세포의 집단은 활성 효소로 처리한 마우스에서 상당히 더 높았다 (26 ± 19% *vs.* 4 ± 2%) (도. 5A-B).

[0203] **실시예 10 - 종양 표적화를 위한 키누레니나제-scFv 융합 단백질**

[0204] 일부 양태에서, 본 발명은 또한 이종 아미노산 서열에 연결된 변형된 박테리아 또는 포유류 키누레니나제를 포함하는 폴리펩티드를 고려한다. 예를 들면, 자연적인 또는 변형된 키누레니나제는 특정한 세포 표면 종양 항원에 결합하는 단-사슬 가변 단편 (scFv) 항체에 연결될 수 있다. 이러한 구체예에서 공지의 종양 항원, 바람직하게는 더 느린 속도로 내면화하는 종양 특이적 항원, *예컨대*, MUC-1에 대해 특이적인 친화성을 가지는 단백질의 scFv 부분을 갖는 scFv-키누레니나제 융합 단백질은, 융합 단백질의 키누레니나제 부분을 종양 세포로 송달하여 KYN를 분해하게 할 수 있다. 한 예시는 scFv 부분이 특정 유형의 유방암에서 상향조절되는 인간 상피 성장 인자 수용체 2 (HER2)를 표적화하고 결합하는 scFv-키누레니나제 융합 단백질일 것이다.

[0205] 이러한 구체예에서 자연적인 또는 변형된 키누레니나제-항-HER2-scFV 융합 단백질은 종양 표면에 키누레니나제를 직접 표적화하고 농축하도록 작용하고 종양-생산된 KYN을 분해하도록 작용할 것이다.

[0206] **실시예 11 - 키누레니나제-항-CTLA4-scFv 융합 단백질**

[0207] 일부 양태에서, 본 발명은 또한 이종 아미노산 서열에 연결된 변형된 박테리아 또는 포유류 키누레니나제를 포함하는 폴리펩티드를 고려한다. 예를 들면, 자연적인 또는 변형된 키누레니나제는 세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA-4) 수용체, 예정세포사 1 (PD-1), 또는 예정세포사 리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 단-사슬 가변 단편 (scFv) 항체에 연결될 수 있디. 항체 또는 항체 단편에 반대로 작용함에 의한 CTLA-4, PD-1, 또는 PD-L1의 봉쇄는 저해성 T-세포 신호전달이 역으로 일어나게 하여 CD28가 T-세포 활성화를 촉진하게 만든다. 이러한 구체예에서 자연적인 또는 변형된 키누레니나제-항-CTLA4-, 항-PD-1-, 또는 항-PD-L1-scFv 융합 단백질은 저해성 단백질:단백질 상호작용 신호전달 및 저해제 키누레닌 신호전달을 모두 제거하도록 작용할 것이다. 자연적인 또는 변형된 키누레니나제-scFv 융합 단백질의 이러한 구체예는 T-세포 활성화를 강하게 상향조절하고 격렬한 항-종양 반응을 촉진할 것으로 예상된다.

[0208] **실시예 12 - 키누레니나제를 T 세포로 보내기 위한 키메라 항원 수용체 구조체**

[0209] 일부 양태에서, 본 발명은 또한 변형된 박테리아 또는 포유류 키누레니나제가 CAR 구조체와 더불어 동시-발현되도록 키메라 항원 수용체 (CAR) 구조체로 T 세포를 형질감염시키기에 적절한 렌티바이러스 벡터를 고려한다. CAR 구조체는 CD3-ζ 사슬로부터의 막관통 및 세포질 신호전달 도메인에 융합된 세포외 항원 결합 도메인 및 흔히 CD28 분자를 내포하는 단백질이다 (Ahmed *et al.*, 2010). 항원 결합 도메인은 종양 세포에 의해 발현된 항원, 가령 교모세포종 또는 골육종에 의해 발현되는 HER2, 다양한 B-세포 악성종양에 의해 발현되는 CD19 또는 CD20, 또는 신경모세포종에 의해 발현되는 GD2 (Lipowska-Bhalla *et al.*, 2012) 또는 임의의 다른 관련 표적과 결합하도록 설계된 scFv일 수 있다. 이러한 구체예에서 적절한 CAR 구조체를 T 세포에 전달하는 렌티바이러스 벡터는, 또한 세포질에서 자연적인 또는 변형된 박테리아 또는 포유류 키누레니나제를 동시-발현시킬 수 있다. 이러한 CAR/키누레니나제 구조체를 함유하는 T 세포는 1) 특정한 종양 세포에 결합하고 및 2) KYN를 분해하고, 조절성 표현형 및 또는 아폽토시스의 KYN 유도를 차단하는 이중의 능력을 가질 수 있다. 또다른 구체예에서 T 세포는 CD19+ 또는 CD20+ 미만성 거대 B-세포 림프종에 결합하는 CAR 구조체를 발현시키는 동시에 이러한 종양 유형에 의해 흔히 야기되는 고농도의 KYN을 분해하기 위한 키누레니나제를 동시-발현시킬 수 있다 (Yoshikawa *et al.*, 2010; de Jong *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2011).

[0210] **실시예 13 - 키누레니나제 활성에 대한 유전적 선별**

[0211] 아미노산 L-트립토판 (L-Trp)은 *trp* 생합성 유전자의 발현에 의해 펜토스 유래 전구체, 코리스미산염으로부터 합성된다. *E. coli*와 같은 박테리아에서 *trp* 생합성 유전자는 다섯 가지 유전자; *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB*, 및 *trpA*로 구성된 오페론으로 조직된다. TrpE 및 TrpD 단백질은 코리스미산염 및 L-글루타민을 안트라닐산 및 L-글루타메이트로 전환하는 첫 번째 단계를 촉매하는 안트라닐산염 합성효소 복합체의 성분이다. 안트라닐산은 이후 나중에 TrpC, TrpA, 및 TrpB의 작용에 의해 L-Trp로 전환된다. 관능적 안트라닐산염 합성효소 유전자가 결여된 세포는 L-Trp를 영양분으로 요구하며 트립토판이 없는 최소 배지에서 성장하지 못한다. 본 발명자는 키누레닌이 많은 유기체의 세포질로 수송될 수 있기 때문에, 충분히 높은 촉매 활성을 보이며 재조합 L-키누레니나제 효소를 발현하는 세포는 세포질의 L-키누레닌을 안트라닐산으로 전환할 수 있으며 후자는 이후에 L-Trp의 합성을 가능하게 할 것으로 가정하였다. 대조적으로, 효소를 발현하지 못하거나 낮은 촉매 활성을 가진 변이체를 발현하는 세포는 L-키누레닌이 존재하는 최소 배지에서 각각 전혀 성장하지 않거나 매우 낮은 성장을 보일 것이었다.

[0212] *E. coli trpE* 및 *trpD* 결실 돌연변이를 Yale CGSC의 유전자 공급업체(Genetic Resources)로부터 얻었다. 균주 유전형은 각각 (F-,Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ-, ΔtrpE772::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514) 및 (F-, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3),λ-,ΔtrpD771::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514)였다. 세포를 M9 최소 배지 플레이트에 도말하였다. L-Trp, L-Kyn, 안트라닐산, 또는 완충액 중 어느 하나를 적신 필터 페이퍼 디스크를 이후 플레이트에 배치한 후에 37℃에서 배양하였다. *E. coli-ΔtrpD* 세포는 L-Trp의 존재에서만 성장하지만, *E. coli-ΔtrpE*는 또한 안트라닐산의 존재에서는 성장하지만 완충액 또는 L-Kyn에서 성장하지 못하므로, 이는 trpC, trpA, 및 trpB가 발현되어, 중간 대사산물로서 안트라닐산을 갖는 L-Trp 영양요구변이체를 생존시킬 수 있음을 증명한다 (도 6). 더 나아가, *Pf*-KYNU 유전자를 내포하는 플라스미드로 형질전환된 *E. coli-ΔtrpE* 세포는 L-Kyn의 존재에서 M9 최소 배지 플레이트에서 급격히 성장하였다.

[0213] **실시예 14 - 키누레닌에 대해 높은 촉매 활성을 보이며 인간 키누레니나제에 동일성을 나타내는 박테리아 키누레니나제의 유전자 구성, 발현 및 정제**

[0214] 다른 진핵생물 키누레니나제와 유사하게 인간(*Homo sapiens*) 효소는 3'-OH 키누레닌의 가수분해에 대해 고도로 선택적이며 키누레닌에 대하여 약 1,000-배 더 낮은 촉매 활성을 갖는다. 키누레닌에 대한 빈약한 촉매 활성으로 인해, 인간 효소는 치료 목적으로 적절하지 못하다. 페길화 *Pf*-KYNU (실시예 9), *Mu*-KYNU (실시예 22 및 실시예 23), 또는 *Cp*-KYNU (실시예 17) (이들 모두는 3'-OH 키누레닌 대신에 키누레닌에 대하여 높은 촉매 활성을 보인다)의 투여는 실시예 9에 나타난 바와 같이 종양 성장을 지연시켰다 (도 3). 그러나, 유사하거나 더 높은 투여량으로의 페길화 인간 키누레니나제의 투여는 B16 흑색종 종양 (n = 4)의 성장에 효과가 없었다. 그러나, 실시예 20에 나타난 바와 같이, *h*-KYNU의 조작은 인간 효소의 L-키누레닌 분해 활성을 높일 수 있다. 그렇게 조작된 *h*-KYNU 변이체는 페길화 *Pf*-KYNU (실시예 9), *Mu*-KYNU (실시예 22 및 실시예 23), 및 *Cp*-KYNU (실시예 17)에서 나타난 바와 같이 종양 성장을 지연시킬 수 있었다.

[0215] *Pf*-KYNU는 인간 대응물에 대해 낮은 서열 동일성을 나타낸다 (24% 아미노산 동일성). 인간 단백질에 대한 낮은 서열 동일성으로 인해, *Pf*-KYNU는 환자에서뿐 아니라 중성화 항체의 생산에서 유해한 면역 반응을 일으킬 수 있다. 그러므로 키누레닌에 대해 높은 촉매 활성 및 선택성을 나타내고 인간(*Homo sapiens*) 키누레니나제에 대해

더 높은 수준의 아미노산 동일성을 가지는 키누레니나제 효소를 발견하는 것이 중요하다. 본 발명자는 인간(*Homo sapiens*) 키누레니나제에 대해 >38% 아미노산 동일성을 나타내고 또한 높은 키누레닌 가수분해 활성을 가지는 수많은 박테리아 효소를 확인하였다. 이들 효소의 서열은 서열번호 13-52로 제공된다. 인간(*Homo sapiens*) 키누레니나제와 비교한 이들의 효소의 동일성 백분율은 표 1에 제공된다. 대표적인 예시로서, *무실라지니박터 팔루디스*(*Mucilaginibacter paludis*)로부터 키누레니나제 효소를 발현하기 위한 유전자(*Mu*-KYNU) (서열번호 33)를 DNA-Works 소프트웨어를 이용하여 설계된 두 코돈 최적화된 유전자 블록을 오버랩 연장 중합효소 사슬 반응 (PCR)시킴으로써 구성하였다(Hoover 및 Lubkowski, 2002). 전장 유전자는 N-말단 *Nco*I 제한 효소 부위, 최적화된 RBS, N-말단 His_6 태그, *E. coli* 코돈 최적화된 *Mu*-KYNU 유전자, 중지 코돈 및 C-말단 *Eco*RI 제한 효소 부위를 포함한다. 전술된 제한 효소 부위를 사용하여 조립된 유전자를 pET-28a+ 벡터 (Novagen)로 클로닝하였다. 이러한 구조체를 사용하여 이후 발현을 위한 BL21 (DE3) *E. coli* 로 형질전환시켰다. 세포를 50 mg/L의 카나마이신이 담긴 최소 배지 (Terrific Broth, TB)에서 210 rpm으로 교반하면서 37℃에서 성장시켰다. OD_{600} ~1.0에 도달하면 IPTG (0.5 mM 최종농도)를 부가함으로써 발현을 유도시키고 37℃에서 밤새 계속 교반하였다. 세포를 이후 원심분리하여 수확하고 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.5 mM 피리독실 포스페이트 (PLP), 1 mM 페닐메틸설포닐플루오라이드, 및 1 μg/mL DNA 가수분해효소로 이루어진 용해 완충액에 재-현탁시켰다. 세포 용해를 프렌치 프레스(French press)로 성취하고 용해물을 4℃에서 1시간 동안 20,000 x g로 원심분리하여 입자를 제거하였다. 상청액을 이후 5 μm 주사기 필터를 통해 여과시키고 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 및 0.1 mM PLP 완충액 내에 미리-평형화시킨 Ni-NTA/아가로스 컬럼 (Qiagen)에 도포하였다. 용해물을 컬럼 상에 로딩한 후에, 수지를 5 컬럼 부피 (CV)의 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 및 0.1 mM PLP로 30 mM 이미다졸과 함께 세척하였다. 세척된 효소를 이후 250 mM 이미다졸과 0.1 mM PLP를 함유한 5 CV의 PBS로 용리하였다. 이 시점에서, 효소의 완충액을 신선한 PBS로 교환하여 이미다졸을 제거하고, 10% 글리세롤을 부가하고 분취액을 저장하기 위해 -80℃의 액체 질소에서 급속 냉동시켰다. 효소 순도는 SDS-PAGE 분석을 기준으로 전형적으로 >95%였고 전형적인 수율은 평균 약 75 mg/배양물의 L였다. $Abs_{280\ nm}$를 측정하고 산출된 78,185 $M^{-1}cm^{-1}$의 효소 흡광 계수를 이용함으로써 단백질 함량을 측정하였다.

[0216] **표 1.** 인간(*Homo sapiens*) 키누레니나제와 비교한 진정세균 키누레니나제 효소의 동일성 백분율.

표 1

종	SEQID NO	% 동일성
아레니타레아 루테아(Arenitalea lutea)	13	44.1
벨리엘라 발티카(Belliella baltica) DSM15883	14	43.3
비지오니아 아르젠티넨시스(Bizionia argentinensis)	15	42.9
칸디다투스 엔토테오넬라(Candidatus Entotheonella) sp. TSY2	16	44.9
칸디다투스 코리박터 베르사틸리스(Candidatus Koribacter versatilis) 엘린345(Ellin345)	17	43.3
체쳄비아 로나렌시스(Cecembia lonarensis)	18	45.1
클라미디아 페코룸(Chlamydia pecorum) PV3056/3	19	38.2
클라미도필라 카비에(Chlamydophila caviae) GPIC	20	40.8
코랄로코쿠스 코랄로이데스(Corallococcus coralloides) DSM2259	21	43
시클로박테리움 마리눔(Cyclobacterium marinum) DSM74	22	44.5
시스토박터 푸쿠스(Cystobacter fuscus)	23	43.5
에키니콜라 베트나멘시스(Echinicola vietnamensis) DSM17526	24	44.5

[0217]

종	SEQID NO	% 동일성
플라보박테리아 박테리움(Flavobacteria bacterium) BBFL7	25	43.4
플렉시박터 리토랄리스(Flexibacter litoralis) DSM6794	26	47.5
페르모사(Formosa) sp. AK20	27	45.7
펄비비르가 임테켄시스(Fulvivirga imtechensis)	28	47.1
칸지엘라 아쿠이마리나(Kangiella aquimarina)	29	44.1
칸지엘라 코레엔시스(Kangiella koreensis) DSM16069	30	44.3
라시누트릭스(Lacinutrix) sp. 5H-3-7-4	31	44.2
마리니라디우스 사카롤리티쿠스(Mariniradius saccharolyticus)	32	44.5
무실라기니박터 팔루디스(Mucilaginibacter paludis)	33	43.9
미로이데스 오도라티미무스(Myroides odoratimimus)	34	42.2
믹소코쿠스 펄부스(Myxococcus fulvus) HW-1	35	44.5
믹소코쿠스 스티피타투스(Myxococcus stipitatus) DSM14675	36	44.4
믹소코쿠스 잔투스(Myxococcus xanthus) DK1622	37	45.1
나펄셀라 투르파넨시스(Nafulsella turpanensis)	38	48.2
니아스텔라 코레엔시스(Niastella koreensis) GR20-10	39	44.8
논라벤스 독도넨시스(Nonlabens dokdonensis) DSW-6	40	44
페도박터 아그리(Pedobacter agri)	41	44.1
페도박터(Pedobacter) sp. BAL39	42	42.1
페도박터(Pedobacter) sp. V48	43	44.1
로도넬룸 싸이크로필룸(Rhodonellum psychrophilum)	44	45.4
살리니스포라 아레니콜라(Salinispora arenicola)	45	39.1
사프로스피라 그란디스(Saprospira grandis) str. 르윈(Lewin)	46	43.2
스티그마텔라 아우란티아카(Stigmatella aurantiaca) DW4/3-1	47	42.5
잔토모나스 악소노포디스(Xanthomonas axonopodis)	48	42
싸이크로플렉서스 곤드와넨시스(Psychroflexus gondwanensis)	49	44
르위넬라 코헤렌스(Lewinella cohaerens)	50	45.6

[0218]

종	SEQID NO	% 동일성
르위넬라 페르시카(Lewinella persica)	51	44.9
폰티박터 로세우스(Pontibacter roseus)	52	44.8

[0219]

[0220] **실시예 15 - *무실라지니박터 팔루디스(Mucilaginibacter paludis)* 키누레니나제 (*Mu*-KYNU)의 역학 변수**

[0221] *Mu*-KYNU 의 역학 변수를 분광측정 어세이로 정량화하였고, 여기서 효소 기질인, L-키누레닌의 최대 흡광도의 감소를 시간의 경과에 따라 관찰하였다. L-키누레닌 용액을 pH 7.4의 PBS 완충액에 제조하여, 16 μM 내지 500 μM 범위의 최종 농도를 만들었다. L-키누레닌은 365 nm에서 λ_{max}와 함께 4,500 $M^{-1}cm^{-1}$ 의 흡광 계수를 가지는 반면 키누레니나제 반응의 산물인, L-안트라닐산 및 L-알라닌은 365 nm에서 주목할만한 흡수를 보이지 않았다. 효소 용액 (~ 20 nM 최종 농도)을 기질 용액에 부가하고 빠르게 혼합시켜 반응을 개시하고 시간에 따른 $Abs_{365\ nm}$를

측정하여 25℃에서 기질의 손실을 관찰하였다. 생성된 데이터를 처리하고 미하엘리스-멘텐 등식에 대입하여 역학 상수를 산출하였다. *Mu*-KYNU는 k_{cat}/K_M = 1.2 × 10^5 $M^{-1}s^{-1}$를 가지는 것으로 측정되었다.

[0222] **실시예 16 - 무실라지니박터 팔루디스(*Mucilaginibacter paludis*) 키누레니나제 (*Mu*-KYNU)의 *시험관 내* 안정성**

[0223] *Mu*-KYNU의 *시험관 내* 안정성을 측정하기 위해, 효소를 PBS 완충액 또는 인간 혈청 풀(pool)에 10 μM의 최종 농도로 부가하고 37℃에서 배양하였다. 10 μL 분량을 각각 시점마다 분취하고 990 μL의 250 μM L-키누레닌/PBS 용액에 부가하였다. 실시예 3에 기술된 바와 같이 시간에 따라 365 nm에서 흡광도의 감소를 측정하여 반응의 초기 속도를 관찰하였다. L-키누레닌 촉매반응의 초기 속도를 각 시점의 속도와 비교하고 시간 = 0에서의 속도와 비교함으로써 효소 안정성을 측정하였다. 생성된 데이터를 시간에 대한 백분율 활성으로 도표화하고 이-상성 감소 모델(Stone *et al.*, 2010)에 대입하여 반-감기 ($T_{1/2}$)를 측정하였다. PBS에서 *Mu*-KYNU 효소의 활성은 $^1T_{1/2}$ = 6 h였고 잔여 활성의 진폭은 74%, 이후의 $^2T_{1/2}$ = 150 h인 것으로 측정되었다 (도 7). 인간 혈청 풀에서 *Mu*-KYNU 효소의 안정성은 $^1T_{1/2}$ = 5 h였고 잔여 활성의 진폭은 30%, 이후의 $^2T_{1/2}$ = 73 h인 것으로 측정되었다 (도 7).

[0224] **실시예 17 - 클라미도필라 페코룸(*Chlamydophila pecorum*) 키누레니나제의 유전자 구성, 발현, 및 정제**

[0225] 클라미도필라 페코룸 (*Chlamydophila pecorum*)로부터 키누레니나제 효소를 발현하기 위한 유전자 (*Cp*-KYNU)를 *E. coli*-코돈 최적화된 유전자 블록을 이용하여 합성하였다. 전장 유전자는 N-말단 *Nco*I 제한 효소 부위 (뉴클레오티드 1-6), 출발 코돈 (뉴클레오티드 3-5), N-말단 His_6 태그 (뉴클레오티드 6-35), *E. coli* 코돈 최적화된 *Cp*-KYNU 유전자 (뉴클레오티드 36-1295), 중지 코돈 (뉴클레오티드 1296-1298), 및 C-말단 *Eco*RI 제한 효소 부위 (뉴클레오티드 1299-1304)를 포함한다 (서열번호 53). 전술된 제한 효소 부위를 사용하여 조립된 유전자를 pET-28a+ 벡터 (Novagen)로 클로닝하였다. 이러한 구조체를 사용하여 이후 발현을 위한 BL21 (DE3) *E. coli* 로 형질전환시켰다. 세포를 50 mg/L의 카나마이신이 담긴 최소 배지 (Terrific Broth, TB)에서 210 rpm으로 교반하면서 37℃에서 성장시켰다. OD_{600} ~1.0에 도달하면 IPTG (0.5 mM 최종농도)를 부가함으로써 발현을 유도시키고 16℃에서 밤새 계속 교반하였다. 세포를 이후 원심분리하여 수확하고 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.5 mM 피리독실 포스페이트 (PLP), 1 mM 페닐메틸설포닐플루오라이드, 및 1 μg/mL DNA 가수분해효소로 이루어진 용해 완충액에 재-현탁시켰다. 세포 용해를 프렌치 프레스(French press)로 성취하고 용해물을 4℃에서 1시간 동안 20,000 x g로 원심분리하여 입자를 제거하였다. 상청액을 이후 5 μm 주사기 필터를 통해 여과시키고 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 및 0.1 mM PLP 완충액 내에 미리-평형화시킨 Ni-NTA/아가로스 컬럼 (Qiagen)에 도포하였다. 용해물을 컬럼 상에 로딩한 후에, 수지를 10 컬럼 부피 (CV)의 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 7.4, 300 mM NaCl, 및 0.1 mM PLP로 30 mM 이미다졸과 함께 세척하였다. 세척된 효소를 이후 0.1 mM PLP 및 250 mM 이미다졸과 5 CV의 PBS로 용리하였다. 용리된 효소의 완충액을 신선한 PBS로 교환하여 이미다졸을 제거하고, 10% 글리세롤을 부가하고 분취액을 저장하기 위해 -80℃의 액체 질소에서 급속 냉동시켰다.

[0226] **실시예 18 - 클라미도필라 페코룸(*Chlamydophila pecorum*) 키누레니나제 (*Cp*-KYNU)의 역학 변수**

[0227] *Cp*-KYNU (서열번호 57) 의 역학 변수를 분광측정 어세이로 정량화하였고, 여기서 효소 기질인, L-키누레닌의 최대 흡광도의 감소를 시간의 경과에 따라 관찰하였다. L-키누레닌 용액을 pH 7.4의 PBS 완충액에 제조하여, 16 μM 내지 500 μM 범위의 최종 농도를 만들었다. L-키누레닌은 365 nm에서 λ_{max}와 함께 4,500 $M^{-1}cm^{-1}$ 의 흡광계수를 가지는 반면 키누레니나제 반응의 산물인, 안트라닐산염 및 L-알라닌은 365 nm에서 주목할만한 흡수를 보이지 않았다. 효소 용액 (200 nM 최종 농도)을 기질 용액에 부가하고 빠르게 혼합시켜 반응을 개시하고 시간에 따른 $Abs_{365\ nm}$를 측정하여 25℃에서 기질의 손실을 관찰하였다. 생성된 데이터를 처리하고 미하엘리스-멘텐 등식에 대입하여 역학 상수를 산출하였다. *Cp*-KYNU는 k_{cat}/K_M = 3 × 10^4 $M^{-1}s^{-1}$를 가지는 것으로 측정되었다.

[0228] **실시예 19 - 무실라지니박터 팔루디스(*Mucilaginibacter paludis*) 키누레니나제의 약리학적 제조**

[0229] *생체 내에서* 효소의 순환 시간을 증가시키기 위해, *Mu*-KYNU를 PEG에 접합시킴으로써 단백질의 표면 반응기를 관능화하여 효소의 수화 반경을 증가시켰다. 한 구체예에서, *Mu*-KYNU는 표면 리신 잔기를 메톡실 PEG 석신이미딜 카르보네이트 5000 MW (NANOCS)와 반응시켜 페길화시켰다. 정제된 *Mu*-KYNU는 하기 기술된 바와 같이, 매우 낮은 내독소 수준 (<20 EU/mg)을 보유하는 것으로 측정되었다. 이것의 완충액을 갖 제조한 100 mM 나트륨 포스페이트

완충액, pH 8.4로 완전히 교환하고, 1 mg/mL 이상으로 농축시켰다. 생성된 용액을 100:1 몰과량의 고체 PEG 시약에 직접 부가하고 실온에서 1 시간동안 교반하면서 반응하게 두었다. 100 kDa 차단 원심분리 여과 장치(Amicon)에서 완충액을 신선한, 무-내독소 PBS로 완전히 교환하여 용액으로부터 미-반응된 PEG를 제거하였다. 효소의 명목상 몰 질량을 이후 PBS 내 크기 배제 HPLC 컬럼 (Phenomenex)에서 확인하고 BioRad사의 MW 표준 용액을 사용하여 표준화 곡선을 생성하고, 효소 체류 시간을 단백질 표준의 수치와 비교하였다. Chromo-LAL 역학 발색성 내독소 시험 키트 (Associates of Cape Cod, Inc.)를 이용하여 내독소 수준을 정량화하였다.

[0230] **실시예 20 - 조작된 인간 키누레니나제 변이체에서 증진된 L-키누레닌 분해**

[0231] *h*-KYNU 효소는 3'-OH 키누레닌의 가수분해에 대해 고도로 선택적이며 L-키누레닌에 대하여 약 1,000배 더 낮은 촉매 활성을 갖는다. L-키누레닌에 대한 빈약한 촉매 활성으로 인해, 야생형 인간 효소는 치료 목적으로 적절하지 못하다. 향상된 L-키누레닌 분해 활성을 *h*-KYNU에 도입시키기 위해, *h*-KYNU 유전자 및 아미노산 F306에 상응하는 코돈의 돌연변이를 유도하도록 설계된 한 쌍의 올리고뉴클레오티드를 이용하는 오버랩 연장 중합효소 사슬 반응 (PCR)에 의해 포화 돌연변이유발 라이브러리를 구성하였다. F306은 기질 결합에 중요한 역할을 수행한다고 여겨지는 *h*-KYNU의 활성 부위 내에 위치한다. F306 포화 라이브러리를 실시예 6의 미세적정 플레이트 키누레니나제 어세이를 이용하여 활성에 대해 선별하였다. 열 두 가지 이상의 클론이 야생형 *h*-KYNU보다 상당히 더 높은 활성을 나타냈고 추가의 분석을 위해 선별되었다. 이들 클론의 서열 분석을 통해 위치 F306에서의 두 개의 아미노산 치환, 즉 *h*-KYNU-F306M (서열번호 55) 및 *h*-KYNU-F306L (서열번호 56)이 향상된 L-키누레닌 분해 활성을 생성함이 드러났다. 이들 변이체를 이후 균일하도록 정제하였고 구체적인 역학 분석은 L-키누레닌에 대한 k_{cat}/K_M이 h-KYNU-F306M 및 *h*-KYNU-F306L에 있어서 야생형 *h*-KYNU에 비해 각각 2-배 및 5-배 증가했음을 나타내었다.

[0232] **실시예 21 - 자가 B16 마우스 흑색종 모델에서 *Pf*-KYNU, 항-PD1, 및 항-CTLA-4 요법의 비교**

[0233] 페길화된 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescence*) 키누레니나제 (PEG-*Pf*-KYNU)를 B16 흑색종 마우스 모델에서 항-PD1 (클론 RMP1-14, BioXCell # BE0146) 또는 항-CTLA-4 (클론 UC10-4F10-11, BioXCell # BE0032) 면역 관문 저해제(immune checkpoint inhibitor) 항체와 나란히 비교하여 평가하였다. 5만 개의 B16 세포를 C57BL/6J 마우스의 옆구리에 이식하였다 (제0일, 각 군의 n = 8 마리 마우스). 명백한 종양이 발생하면 (제10일), 동물을 250 μg의 표시된 시간에 항-PD1, 100 μg 항-CTLA-4 (Holmgaard *et al*. (2013)에 따르면 최초 투여는 200 μg), 또는 500 μg의 PEG-*Pf*-KYNU로 처리하였다 (도 8). 열-비활성화된 PEG-*Pf*-KYNU를 대조로서 사용하였다. PEG-*Pf*-KYNU의 투여는 비활성화된 효소 또는 PBS 단독에 대비한 PEG-*Pf*-KYNU에 있어서 항-PD1 또는 항-CTLA-4 관문 저해제 항체에서 관찰된 것과 구별하기 어려울 정도의 상당한 종양 성장 지연 및 생존 연장을 가져왔다(도 8).

[0234] **실시예 22 - 자가 B16 마우스 흑색종 모델에서 *Mu*-KYNU 또는 *Pf*-KYNU 및 항-PD1 병행 요법의 효능**

[0235] 페길화된 효소 (PEG-*Pf*-KYNU 및 PEG-*Mu*-KYNU)를 항-PD1 면역 관문 저해제 항체와 함께 B16 흑색종 동종이식편에서 평가하였다(Curran *et al*., 2010). 네 군의 C57BL/6J 마우스 (군당 10마리)에 50,000개 B16 세포를 이식하고 (제0일) 종양이 성장하게 하였다. 명백한 종양이 발생하면 (제10일), 동물의 종양 부위 부근에 500 μg PEG-*Pf*-KYNU 또는 500 μg PEG-*Mu*-KYNU 피하(s.c.) 주사하거나 하지 않고, 제10일, 제13일, 및 제16일에 250 μg의 항-PD1을 정맥내(IP) 주사하여 (클론 RMP1-14, BioXCell # BE0146) 처리하였다. 마우스는 제10일과 제25일 사이에 총 여섯 차례 KYNU를 투여받았다. 하나의 군에는 PD-1에 대한 대조로서 PBS를 정맥내(i.p.) 주사하였다. PBS 대조에 비교할 때 모든 처리받은 군에서 종양 성장은 급격하게 약회되거나 심지어 역행했다 (도 9A). 중요하게는, 항-PD1를 KYNU와 함께 투여한 경우에 PEG-*Pf*-KYNU/항-PD1 처리군에서 종양의 60%가, PEG-*Mu*-KYNU/항-PD1 처리군에서 종양의 20%가 완전히 경감되는 부가적인 효과가 관찰되었다(도 9B). 상응하는 카플란-마이어 플롯이 도 9C에 제공된다.

[0236] **실시예 23 - 자가 B16 마우스 흑색종 모델에서 PEG-*Mu*-KYNU 요법의 효능**

[0237] 페길화된 무실라지니박터 팔루디스(*Mucilaginibacter paludis*) 키누레니나제 (PEG-*Mu*-KYNU)를 B16 흑색종 마우스 모델에서 평가하였다. 50,000 개의 B16 세포를 C57BL/6J 마우스의 옆구리에 이식하여 동종이식편을 개시하였다 (제0일, 군당 n = 9 마리 마우스). 명백한 종양이 발생하면 (제10일), 동물에게 500 μg의 PEG-*Mu*-KYNU를 종양 부위 부근에 매 3일마다 피하 주사하여 총 6차례 처리하였다. 열-비활성화된 PEG-*Mu*-KYNU을 이용한 동일한 처리 계획을 대조로서 사용하였다. PEG-*Mu*-KYNU의 투여는 열-비활성화된 PEG-*Mu*-KYNU 대조에서의 22일(도 10B)에 비해 25일로 연장된 중간 생존 시간을 가지며 종양 성장 지연을 나타냈다 (도 10A).

[0238] * * *

[0239] 본 명세서에 개시되고 청구된 모든 방법은 본 개시에 비추어 무수한 실험을 하지 않고도 이행하고 실시할 수 있다. 본 발명의 구성 및 방법이 바람직한 구체예의 방식으로 기술되었지만, 본 발명의 개념, 사상 및 범위에서 벗어나지 않고서 본 명세서에 기술된 방법 및 방법의 단계 또는 단계의 순서에서 변화들이 적용될 수 있음이 당해 분야의 숙련가에게는 명백할 것이다. 더 상세하게는, 화학적으로 및 생리학적으로 연관된 특정 물질이 본 명세서에 기술된 물질을 대체할 수 있으며 동시에 동일하거나 유사한 결과를 도출할 수 있음이 명백할 것이다. 당해 분야의 숙련가에게 명백한 그러한 모든 유사한 치환 및 변형은 첨부되는 청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 사상, 범위 및 개념 내에 속하는 것으로 간주된다.

[0240] **참고문헌**

[0241] 하기의 참고문헌은, 본 명세서에 제시된 것들에 예시적이고 절차적이거나 달리 세부 사항을 보충하는 내용을 제공하는 한도 내에서, 본 명세서에 참고로서 특정하게 포함된다.

[0242] 미국 특허 제4,870,287호

[0243] 미국 특허 제5,739,169호

[0244] 미국 특허 제5,760,395호

[0245] 미국 특허 제5,801,005호

[0246] 미국 특허 제5,824,311호

[0247] 미국 특허 제5,830,880호

[0248] 미국 특허 제5,846,945호

[0249] 미국 특허 제5,889,155호

[0250] 미국 특허 제7,109,304호

[0251] 미국 특허 제8,465,743호

[0252] 미국 특허 공보 제2009/0304666호

[0253] WO 2012/031744

[0254] WO 2012/079000

[0255] WO 2013/059593

[0256] 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.

[0257] Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

[0258] Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.

[0259] Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

[0260] Chen and Guillemin, Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *Int J Tryptophan Res*, 2:1-19, 2009.

[0261] Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.

[0262] 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.

[0263] Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.

[0264] de Jong *et al.*, Serum tryptophan and kynurenine concentrations as parameters for indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with endometrial, ovarian, and vulvar cancer. *Int J Gynecol Cancer*,

21(7):1320-1327, 2011.

[0265] 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.

[0266] Godin-Ethier *et al.*, Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Expression in Human Cancers: Clinical and Immunologic Perspectives. *Clinical Cancer Research*, 17(22):6985-6991, 2011.

[0267] Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.

[0268] Harkki *et al.*, *BioTechnology*, 7:596-603, 1989.

[0269] Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.

[0270] Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.

[0271] Holmgaard *et al.*, Indoleamine 2, 3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *The Journal of Experimental Medicine*, 210:1389-1402, 2013.

[0272] Hoover and Lubkowski, DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Research*, 30(10):e43-e43, 2002.

[0273] Hopwood *et al.*, In: *Genetic Manipulation of Streptomyces*, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, Conn., 1985.

[0274] Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.

[0275] Ito *et al.*, *J. Biochem.*, 79:1263, 1976.

[0276] Kaper *et al.*, Nanosensor detection of an immunoregulatory tryptophan influx/kynurenine efflux cycle. *PLoS Biology*, 5(10):e257, 2007.

[0277] Lipowska-Bhalla *et al.*, Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 61(7):953-962, 2012.

[0278] 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.

[0279] Lordanescu, *J. Bacteriol*, 12:597 601, 1975.

[0280] Mandi and Vecsei, The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm*, 119(2):197-209, 2012.

[0281] Maniatis, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.

[0282] Mellor *et al.*, *Gene*, 24:1-14, 1983.

[0283] 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.

[0284] Opitz *et al.*, The Indoleamine-2, 3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor 1-Methyl-D-tryptophan Upregulates IDO1 in Human Cancer Cells. PLoS One, 6(5):e19823, 2011.

[0285] Opitz *et al.*, An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368):197-203, 2011.

[0286] Penttila *et al.*, *Gene*, 61:155-164, 1987.

[0287] Pilotte *et al.*, Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(7):2497-2502, 2012.

[0288] Prendergast, Cancer: Why tumours eat tryptophan. *Nature*, 478(7368):192-194, 2011.

[0289] Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.

[0290] Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.

[0291] 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.

[0292] Schellenberger *et al.*, *Nature Biotech.*, 27:1186-1190, 2009.

[0293] Shin *et al.*, Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(30):12391-12396, 2013.

[0294] Sibakov *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 145:567 572, 1984.

[0295] Song *et al.*, L-Kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *International Immunopharmacology*, 11(8):932-938, 2011.

[0296] Stone *et al.*, Replacing Mn^{2+} with Co^{2+} in human arginase I enhances cytotoxicity toward L-arginine auxotrophic cancer cell lines. *ACS Chemical Biology*, 5:333-342, 2010.

[0297] Ward, Proc, Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Helsinki, 119-128, 1989.

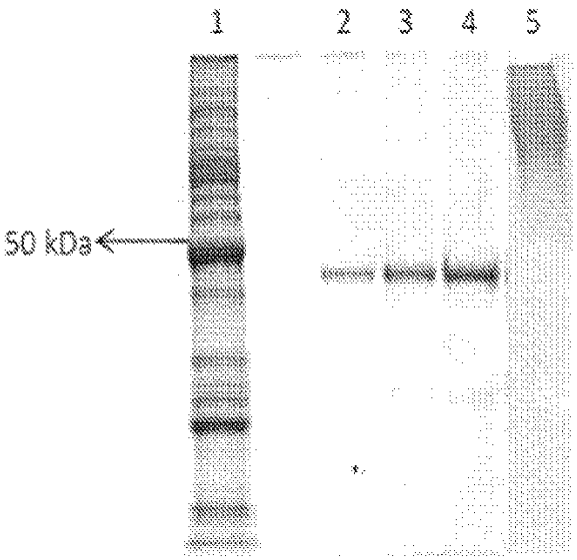
[0298] Wawrzynczak and Thorpe, In: *Immunoconjugates, Antibody Conuugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.

[0299] Yao *et al.*, Serum metabolic profiling and features of papillary thyroid carcinoma and nodular goiter. *Mol Biosyst*, 7(9):2608-2614, 2011.

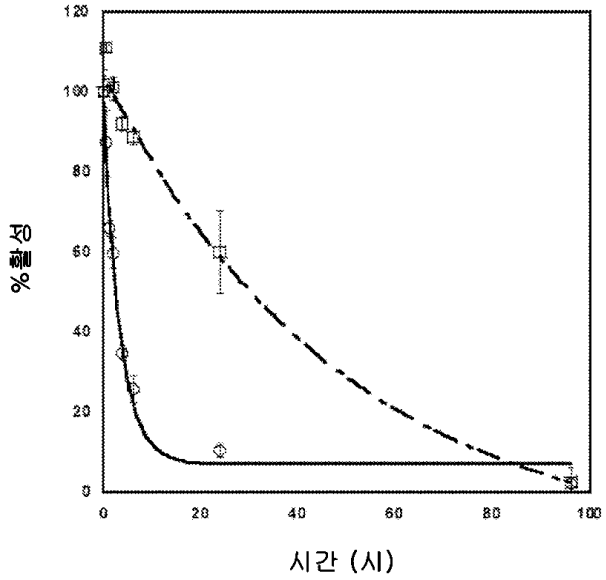
[0300] Yoshikawa *et al.*, Serum concentration of L-kynurenine predicts the clinical outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Eur J Haematol*, 84(4):304-309, 2010.

도면

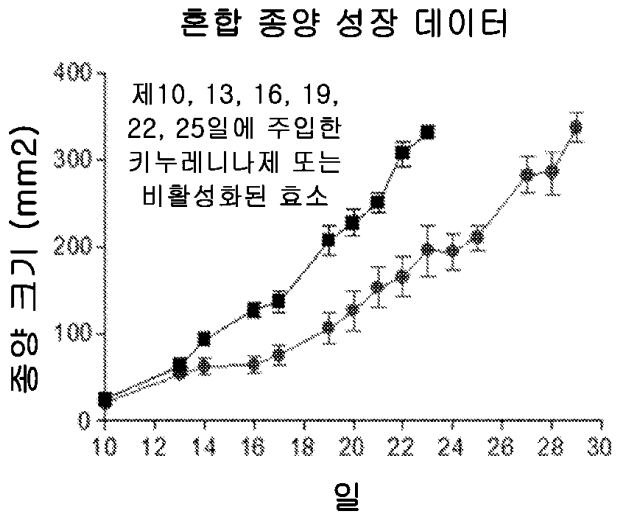
도면1



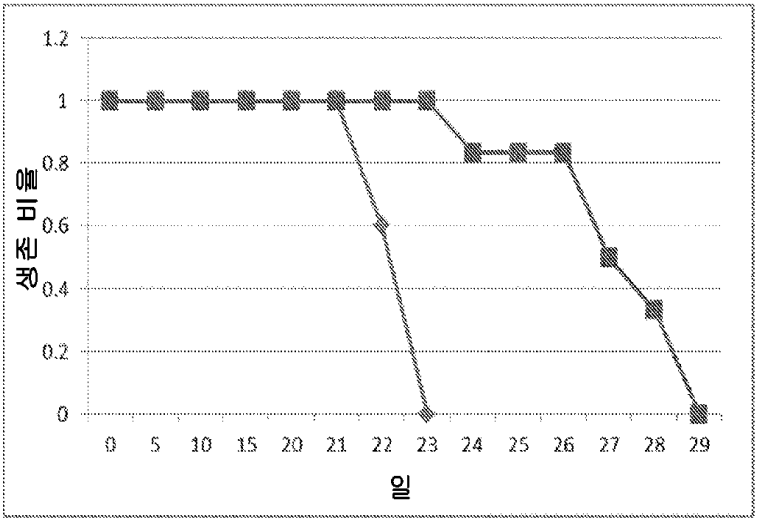
도면2


%활성
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
시간 (시)

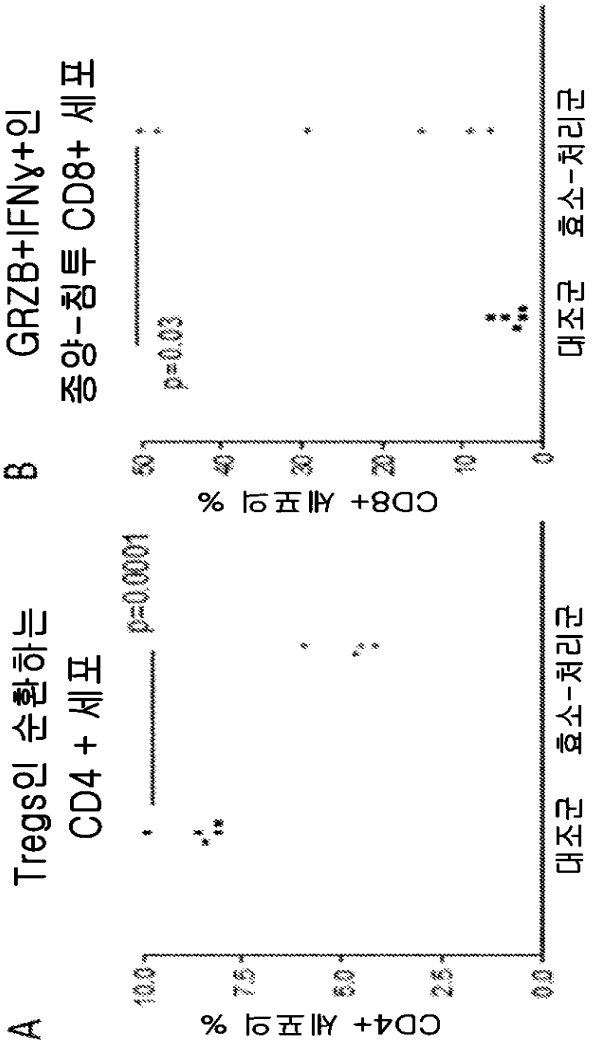
도면3


혼합 종양 성장 데이터
제10, 13, 16, 19, 22, 25일에 주입한 키누레니나제 또는 비활성화된 효소
종양 크기 (mm2)
400
300
200
100
0
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
일

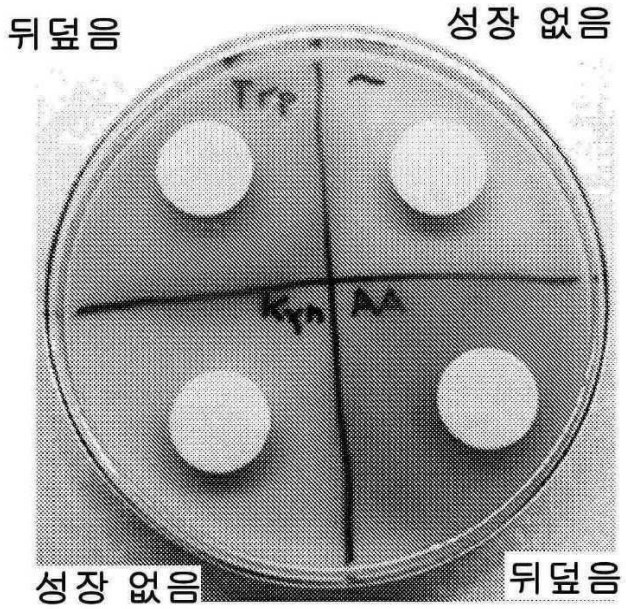
도면4


생존 비율
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 5 10 15 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
일

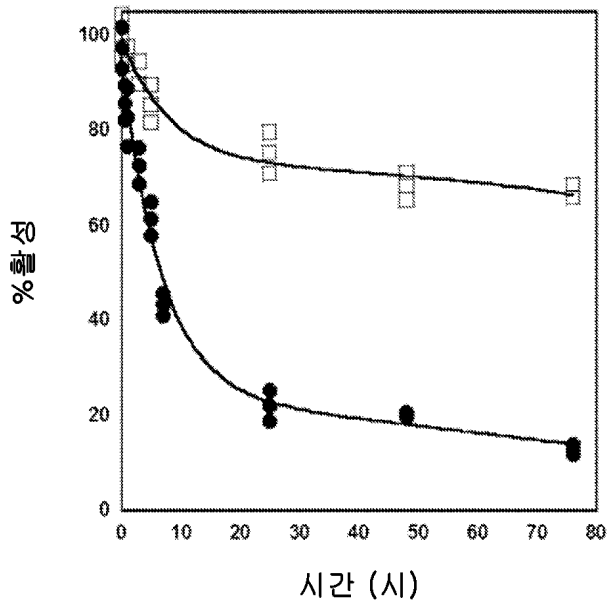
도면5


A
Tregs인 순환하는
CD4 + 세포
p=0.0001
CD4+ 세포의 %
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
대조군
효소-처리군
B
GRZB+IFNγ+인
중양-침투 CD8+ 세포
p=0.03
CD8+ 세포의 %
40
30
20
10
0
대조군
효소-처리군

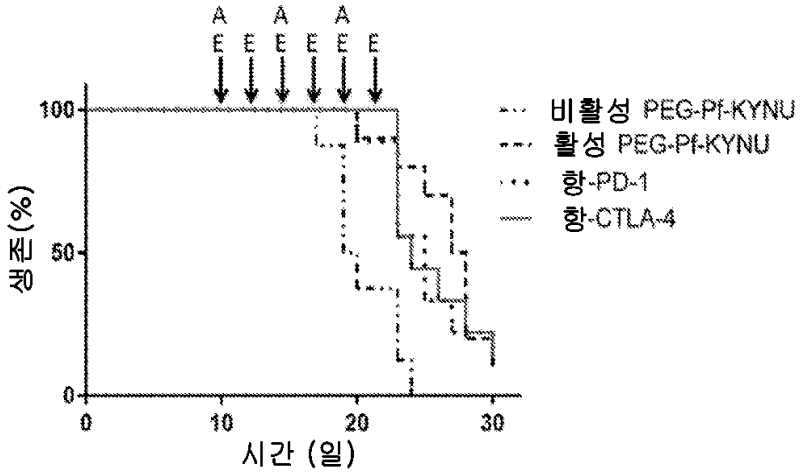
도면6


뒤덮음
성장 없음
Trp
Kyn
AA
성장 없음
뒤덮음

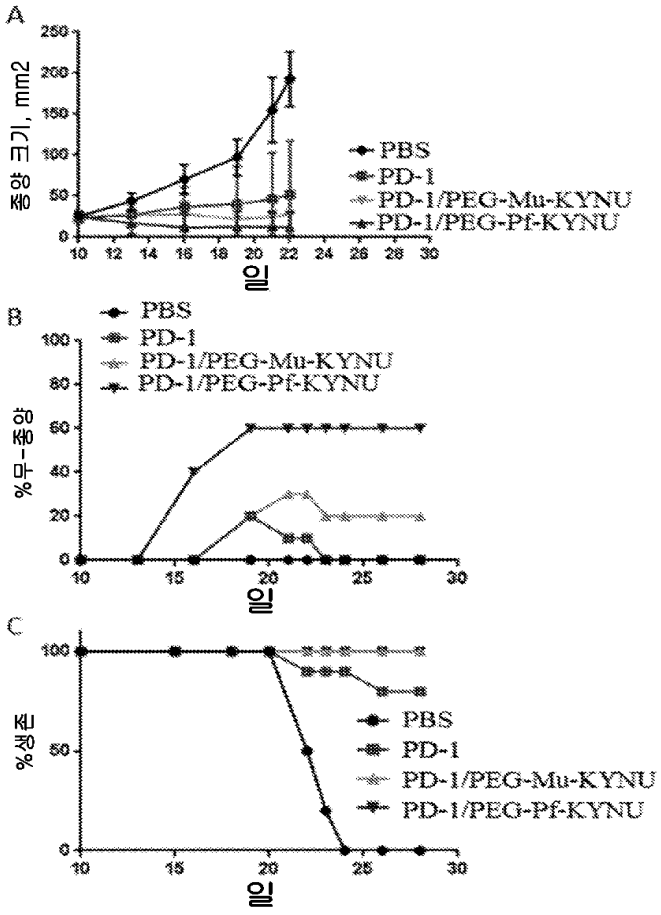
도면7


100
80
60
40
20
0
%활성
0
10
20
30
40
50
60
70
80
시간 (시)

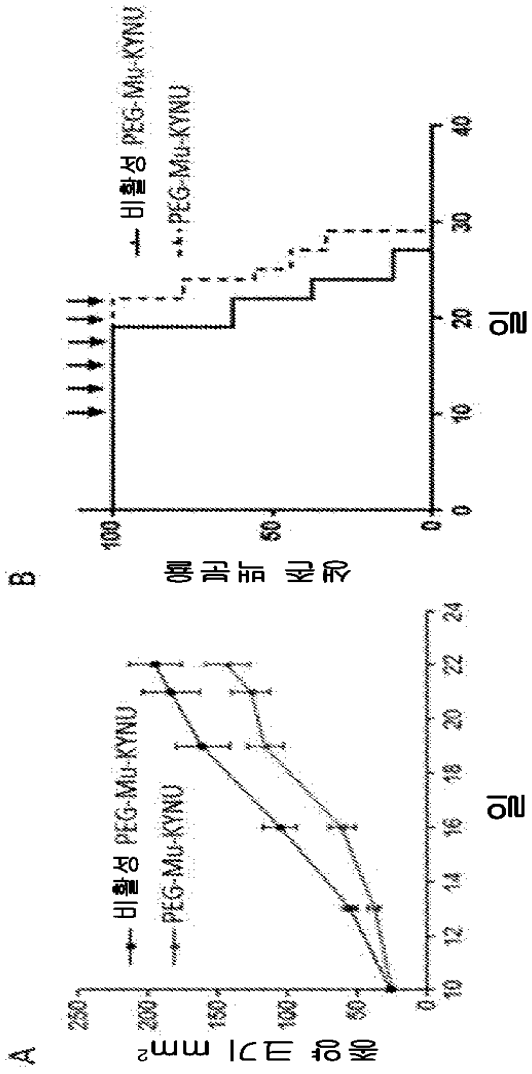
도면8


A
E
100
50
0
생존(%)
0
10
20
30
시간 (일)
비활성 PEG-Pf-KYNU
활성 PEG-Pf-KYNU
항-PD-1
항-CTLA-4

도면9


A
종양 크기, mm2
일
PBS
PD-1
PD-1/PEG-Mu-KYNU
PD-1/PEG-Pf-KYNU
B
%무-종양
일
C
%생존
일

도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> ADMINISTRATION OF KYNURENINE DEPLETING ENZYMES FOR TUMOR THERAPY

<130> UTFB.P1018WO

<150> US 61/872,132

<151> 2013-08-30

<150> US 61/986,366

<151> 2014-04-30

<160> 57

<170> KopatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 1

tctagaaata attttgttta actttaagga aaacattaaa ataaggaggt agcaaatggg 60

cggtcatcat caccaccatc atgggagcgg caccacccgc aacgattgcc tggcgctgga 120

tgcgcaggat agcctggcac cgctgcgtca gcagtttgcg ctgccggaag gtgttattta 180

tctggatggc aacagcctgg gtgcgcgtcc ggttgcggcg ctggcgcgtg cgcaggcggt 240

gattgcggaa gaatggggca acggcctgat tcgcagctgg aacagcgcgg gctggcgcga 300

tctgagcgaa cgcctgggca accgcctggc gaccctgatt ggcgcgcgcg atggcgaagt 360

ggtggtgacc gataccacca gcattaacct gtttaaagtg ctgagcgcgg cgctgcgcgt 420

gcaggcgacc cgcagcccgg aacgccgcgt gattgtgacc gaaaccagca actttccgac 480

cgatctgtat attgcggaag gcctggcgga tatgctgcag cagggctata ccctgcgcct 540

ggtggatagc ccggaagaac tgccgcaggc gattgatcag gataccgcgg tggtgatgct 600

gacccatgtg aactataaaa ccggctatat gcatgatatg caggcgctga ccgcgctgag 660

ccatgaatgc ggcgcgctgg cgatttggga tctggcgcat agcgcgggcg cggtgccggt 720

ggatctgcat caggcgggcg cggattatgc gattggctgc acctataaat atctgaacgg 780

cggcccgggc agccaggcgt ttgtgtgggt gagcccgcag ctgtgcgatc tggtgccgca 840

gccgctgtct ggttggtttg gccatagccg ccagtttgcg atggaaccgc gctatgaacc 900

gagcaacggc attgcgcgct atctgtgcgg cacccagccg attaccagcc tggcgatggt 960

ggaatgcggc ctggatgtgt ttgcgcagac cgatatggcg agcctgcgcc gcaaaagcct 1020

ggcgctgacc gatctgttta ttgaactggt ggaacagcgc tgcgcggcgc atgaactgac 1080

cctggtgacc ccgcgcgaac atgcgaaacg cggcagccat gtgagctttg aacatccgga 1140

aggctatgcg gtgattcagg cgctgattga tcgcggcgtg attggcgatt atcgcgaacc 1200

gcgcattatg cgctttggct ttaccccgct gtataccacc tttaccgaag tgtgggatgc 1260

ggtgcagatt ctgggcgaaa ttctggatcg caaaacctgg gcgcaggcgc agtttcaggt 1320

gcgccatagc gtgacctagt aggatcc 1347

<210> 2

<211> 1497

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 2

tctagaaata attttgttta actttaagga caaatcagga cacagttaag gaggtaaaat 60

atgggcggtc atcatcacca ccatcatggg agcggcgaac cgagctccct tgaacttccg 120

gccgataccg tgcaacggat agcggcggaa ttgaaatgtc acccgaccga cgaacgcgtc 180

gcgttacatc tggatgagga agacaagctg cgtcacttcc gcgagtgctt ttacattccg 240

aaaattcagg atctgccgcc agtggacttg agcctggtca acaaagacga gaacgccatc 300

tacttcctgg gcaatagcct gggcctgcaa ccaaagatgg tgaaaaccta tcttgaggag 360

gagcttgaca aatgggcgaa gatcgcggcc tacggccatg aagtcggcaa gcgtccctgg 420

attaccggcg atgagtcaat cgttggcttg atgaaggata tcgtcggcgc gaacgagaaa 480

gaaattgcgc tgatgaacgc gctgaccgtg aatctgcatc tgctgatgct gtcattcttt 540

aagcccaccc cgaagcgcta caaaatcctg ctggaagcga aagcgtttcc cagcgatcat 600

tatgcgatag aaagccagct gcaactgcac ggcctgaata tcgaggagag catgcgtatg 660

ataaaaccgc gcgaaggtga ggagaccctg cggattgagg acatcctgga ggtgatcgag 720

aaggagggcg acagtatcgc ggtgatactt ttcagcggcg tgcatttcta cacgggccaa 780

cacttcaata tcccggccat taccaaagcc ggccaggcga aagggtgcta tgtaggcttt 840

gatctggcgc atgcagtggg caacgtcgaa ctgtatcttc atgattgggg cgttgatttt 900

gcgtgctggt gcagctataa gtatctgaat gccggggccg gtgggattgc gggagccttt 960

attcatgaga aacacgcgca taccattaaa ccggcgctgg ttggctggtt tgggcacgaa 1020

ctgagcaccc gcttcaagat ggataacaaa ctgcaattga ttccgggcgt gtgcggcttt 1080

cgtattagca acccccccgat tctgctggtc tgcagcctgc acgcgtctct ggagattttc 1140

aagcaggcga ccatgaaagc gctgcgtaag aaaagtgtgc ttctgacggg ctacctggag 1200

tacctgataa agcacaacta cggcaaggat aaggcggcca cgaagaagcc ggttgtgaac 1260

attatcaccc cgtctcatgt ggaagaacgt ggctgccaac tgacgataac gttcagcgtg 1320

ccaaacaagg acgtgttcca agagctggag aagcgtggcg tggtgtgtga taaacgtaat 1380

ccgaatggca ttcgtgtggc gcctgtgccg ctgtacaaca gcttccacga cgtgtataag 1440

ttcaccaacc tgctgacgag cattctggac agtgcggaaa ccaaaaacta gggatcc 1497

<210> 3

<211> 1492

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 3

tctagaaata attttgttta actttaagaa cacggtcggg aatataagga ggtaaaatat 60

gggcggtcat catcaccacc atcatgggag cggcgagccg agcccgctgg aactgccggt 120

tgacgcggta cgtcgtattg cggcagaact gaactgtgac ccgaccgatg aacgtgtggc 180

gctgcgtctc gacgaagagg acaagctctc tcacttccgt aactgcttct atatccctaa 240

aatgcgtgac ctgccgagca tcgatctgtc tctggtttct gaagacgacg acgcgattta 300

cttcctgggt aactctctgg gtctgcagcc aaaaatggtt cgtacctacc tggaggaaga 360

gctggacaaa tgggcgaaaa tgggtgccta cggccatgat gtgggcaaac gcccgtggat 420

cgtcggcgac gaaagcattg tgtctctcat gaaggacatt gttggtgcac acgagaaaga 480

aattgcgctg atgaatgctc tgaccatcaa cctgcacctg ctgctcctgt ctttcttcaa 540

gccgaccccg aagcgtcata aaatcctgct cgaggctaaa gcgttcccgt ctgatcacta 600

cgcgatcgaa tctcaaatcc aactgcacgg tctggacgtt gagaagtcta tgcgtatggt 660

taagccgcgt gaaggcgagg agaccctccg tatggaagac atcctcgaag ttatcgaaga 720

agaaggtgac tctatcgcag ttattctgtt ctctggcctg cacttttaca ccggtcaact 780

gttcaatatc ccggcaatca ccaaagcggg ccacgcgaaa ggttgcttcg ttggtttcga 840

cctggcccat gcggttggta acgtggagct gcgcctccac gactggggtg ttgactttgc 900

gtgctggtgc tcttacaaat acctgaactc tggtgcgggt ggtctcgcgg gtgcgttcgt 960

ccacgaaaaa cacgcgcaca ccgttaaacc ggcgctggtt ggctggttcg gccacgacct 1020

ctctacgcgt ttcaacatgg acaacaaact ccagctgatc ccaggcgcca acggtttccg 1080

tatctctaac ccgccgatcc tcctggtttg ctctctgcac gcgtctctcg aggttttcca 1140

gcaggcgacc atgaccgccc tgcgccgtaa atctattctc ctgacgggtt atctggaata 1200

catgctgaag cactaccact ctaaagacaa cacggaaaac aaaggtccga tcgttaacat 1260

catcaccccg tctcgtgcgg aagaacgtgg ctgccaactg accctgacct tctctattcc 1320

gaaaaaatct gttttcaaag aactggagaa acgtggtgtt gtttgcgaca aacgtgaacc 1380

ggacggtatc cgcgttgctc cggtcccgct gtacaactct ttccatgacg tttataagtt 1440

cattcgtctg ctcacctcca tcctggactc tagcgaacgc tcctaaggat cc 1492

<210> 4

<211> 1251

<212> DNA

<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 4

atgaccaccc gcaacgattg cctggcgctg gatgcgcagg atagcctggc accgctgcgt 60

cagcagtttg cgctgccgga aggtgttatt tatctggatg gcaacagcct gggtgcgcgt 120

ccggttgcgg cgctggcgcg tgcgcaggcg gtgattgcgg aagaatgggg caacggcctg 180

attcgcagct ggaacagcgc gggctggcgc gatctgagcg aacgcctggg caaccgcctg 240

gcgaccctga ttggcgcgcg cgatggcgaa gtggtggtga ccgataccac cagcattaac 300

ctgtttaaag tgctgagcgc ggcgctgcgc gtgcaggcga cccgcagccc ggaacgccgc 360

gtgattgtga ccgaaaccag caactttccg accgatctgt atattgcgga aggcctggcg 420

gatatgctgc agcagggcta taccctgcgc ctggtggata gcccggaaga actgccgcag 480

gcgattgatc aggataccgc ggtggtgatg ctgacccatg tgaactataa aaccggctat 540

atgcatgata tgcaggcgct gaccgcgctg agccatgaat gcggcgcgct ggcgatttgg 600

gatctggcgc atagcgcggg cgcggtgccg gtggatctgc atcaggcggg cgcggattat 660

gcgattggct gcacctataa atatctgaac ggcggcccgg gcagccaggc gtttgtgtgg 720

gtgagcccgc agctgtgcga tctggtgccg cagccgctgt ctggttggtt tggccatagc 780

cgccagtttg cgatggaacc gcgctatgaa ccgagcaacg gcattgcgcg ctatctgtgc 840

ggcacccagc cgattaccag cctggcgatg gtggaatgcg gcctggatgt gtttgcgcag 900

accgatatgg cgagcctgcg ccgcaaaagc ctggcgctga ccgatctgtt tattgaactg 960

gtggaacagc gctgcgcggc gcatgaactg accctggtga ccccgcgcga acatgcgaaa 1020

cgcggcagcc atgtgagctt tgaacatccg gaaggctatg cggtgattca ggcgctgatt 1080

gatcgcggcg tgattggcga ttatcgcgaa ccgcgcatta tgcgctttgg ctttaccccg 1140

ctgtatacca cctttaccga agtgtgggat gcggtgcaga ttctgggcga aattctggat 1200

cgcaaaacct gggcgcaggc gcagtttcag gtgcgccata gcgtgaccta g 1251

<210> 5

<211> 1398

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atggaaccga gctcccttga acttccggcc gataccgtgc aacggatagc ggcggaattg 60

aaatgtcacc cgaccgacga acgcgtcgcg ttacatctgg atgaggaaga caagctgcgt 120

cacttccgcg agtgctttta cattccgaaa attcaggatc tgccgccagt ggacttgagc 180

ctggtcaaca aagacgagaa cgccatctac ttcctgggca atagcctggg cctgcaacca 240

aagatggtga aaacctatct tgaggaggag cttgacaaat gggcgaagat cgcggcctac 300

ggccatgaag tcggcaagcg tccctggatt accggcgatg agtcaatcgt tggcttgatg 360

aaggatatcg tcggcgcgaa cgagaaagaa attgcgctga tgaacgcgct gaccgtgaat 420

ctgcatctgc tgatgctgtc attctttaag cccaccccga agcgctacaa aatcctgctg 480

gaagcgaaag cgtttcccag cgatcattat gcgatagaaa gccagctgca actgcacggc 540

ctgaatatcg aggagagcat gcgtatgata aaaccgcgcg aaggtgagga gaccctgcgg 600

attgaggaca tcctggaggt gatcgagaag gagggcgaca gtatcgcggt gatacttttc 660

agcggcgtgc atttctacac gggccaacac ttcaatatcc cggccattac caaagccggc 720

caggcgaaag ggtgctatgt aggctttgat ctggcgcatg cagtgggcaa cgtcgaactg 780

tatcttcatg attggggcgt tgattttgcg tgctggtgca gctataagta tctgaatgcc 840

ggggccggtg ggattgcggg agcctttatt catgagaaac acgcgcatac cattaaaccg 900

gcgctggttg gctggtttgg gcacgaactg agcacccgct tcaagatgga taacaaactg 960

caattgattc cgggcgtgtg cggctttcgt attagcaacc ccccgattct gctggtctgc 1020

agcctgcacg cgtctctgga gattttcaag caggcgacca tgaaagcgct gcgtaagaaa 1080

agtgtgcttc tgacgggcta cctggagtac ctgataaagc acaactacgg caaggataag 1140

gcggccacga agaagccggt tgtgaacatt atcaccccgt ctcatgtgga agaacgtggc 1200

tgccaactga cgataacgtt cagcgtgcca aacaaggacg tgttccaaga gctggagaag 1260

cgtggcgtgg tgtgtgataa acgtaatccg aatggcattc gtgtggcgcc tgtgccgctg 1320

tacaacagct tccacgacgt gtataagttc accaacctgc tgacgagcat tctggacagt 1380

gcggaaacca aaaactag 1398

<210> 6

<211> 1395

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

atggagccga gcccgctgga actgccggtt gacgcggtac gtcgtattgc ggcagaactg 60

aactgtgacc cgaccgatga acgtgtggcg ctgcgtctcg acgaagagga caagctctct 120

cacttccgta actgcttcta tatccctaaa atgcgtgacc tgccgagcat cgatctgtct 180

ctggtttctg aagacgacga cgcgatttac ttcctgggta actctctggg tctgcagcca 240

aaaatggttc gtacctacct ggaggaagag ctggacaaat gggcgaaaat gggtgcctac 300

ggccatgatg tgggcaaacg cccgtggatc gtcggcgacg aaagcattgt gtctctcatg 360

aaggacattg ttggtgcaca cgagaaagaa attgcgctga tgaatgctct gaccatcaac 420

ctgcacctgc tgctcctgtc tttcttcaag ccgaccccga agcgtcataa aatcctgctc 480

gaggctaaag cgttcccgtc tgatcactac gcgatcgaat ctcaaatcca actgcacggt 540

ctggacgttg agaagtctat gcgtatggtt aagccgcgtg aaggcgagga gaccctccgt 600

atggaagaca tcctcgaagt tatcgaagaa gaaggtgact ctatcgcagt tattctgttc 660

tctggcctgc acttttacac cggtcaactg ttcaatatcc cggcaatcac caaagcgggc 720

cacgcgaaag gttgcttcgt tggtttcgac ctggcccatg cggttggtaa cgtggagctg 780

cgcctccacg actggggtgt tgactttgcg tgctggtgct cttacaaata cctgaactct 840

ggtgcgggtg gtctcgcggg tgcgttcgtc cacgaaaaac acgcgcacac cgttaaaccg 900

gcgctggttg gctggttcgg ccacgacctc tctacgcgtt tcaacatgga caacaaactc 960

cagctgatcc caggcgccaa cggtttccgt atctctaacc cgccgatcct cctggtttgc 1020

tctctgcacg cgtctctcga ggttttccag caggcgacca tgaccgccct gcgccgtaaa 1080

tctattctcc tgacgggtta tctggaatac atgctgaagc actaccactc taaagacaac 1140

acggaaaaca aaggtccgat cgttaacatc atcaccccgt ctcgtgcgga agaacgtggc 1200

tgccaactga ccctgacctt ctctattccg aaaaaatctg ttttcaaaga actggagaaa 1260

cgtggtgttg tttgcgacaa acgtgaaccg gacggtatcc gcgttgctcc ggtcccgctg 1320

tacaactctt tccatgacgt ttataagttc attcgtctgc tcacctccat cctggactct 1380

agcgaacgct cctaa 1395

<210> 7

<211> 416

<212> PRT

<213> Pseudomonas fluorescens

<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

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> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Pro Ser Ser Leu Glu Leu Pro Ala Asp Thr Val Gln Arg Ile

1 5 10 15

Ala Ala Glu Leu Lys Cys His Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu His

20 25 30

Leu Asp Glu Glu Asp Lys Leu Arg His Phe Arg Glu Cys Phe Tyr Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Met Val Lys Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Lys

85 90 95

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

100 105 110

Asp Glu Ser Ile Val Gly Leu Met Lys Asp Ile Val Gly Ala Asn Glu

115 120 125

Lys Glu Ile Ala Leu Met Asn Ala Leu Thr Val Asn Leu His Leu Leu

130 135 140

Met Leu Ser Phe Phe Lys Pro Thr Pro Lys Arg Tyr Lys Ile Leu Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Ile Glu Asp Ile Leu Glu Val Ile

195 200 205

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

210 215 220

Phe Tyr Thr Gly Gln His Phe Asn Ile Pro Ala Ile Thr Lys Ala Gly

225 230 235 240

Gln Ala Lys Gly Cys Tyr Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Val Gly

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
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> Mus musculus
<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 Glu Leu Asp Lys Trp Ala Lys
85 90 95
Met Gly Ala Tyr Gly His Asp Val Gly Lys Arg Pro Trp Ile Val Gly

100 105 110

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

115 120 125

Lys Glu Ile Ala Leu Met Asn Ala Leu Thr Ile Asn Leu His Leu Leu

130 135 140

Leu Leu Ser Phe Phe Lys Pro Thr Pro Lys Arg His Lys Ile Leu Leu

145 150 155 160

Glu Ala Lys Ala Phe Pro Ser Asp His Tyr Ala Ile Glu Ser Gln Ile

165 170 175

Gln Leu His Gly Leu Asp Val Glu Lys Ser Met Arg Met Val Lys Pro

180 185 190

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

195 200 205

Glu Glu Glu Gly Asp Ser Ile Ala Val Ile Leu Phe Ser Gly Leu His

210 215 220

Phe Tyr Thr Gly Gln Leu Phe Asn Ile Pro Ala Ile Thr Lys Ala Gly

225 230 235 240

His Ala Lys Gly Cys Phe Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Val Gly

245 250 255

Asn Val Glu Leu Arg Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe Ala Cys Trp

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Trp Phe Gly His Asp Leu Ser Thr Arg Phe Asn Met Asp Asn Lys Leu

305 310 315 320

Gln Leu Ile Pro Gly Ala Asn Gly Phe Arg Ile Ser Asn Pro Pro Ile

325 330 335

Leu Leu Val Cys Ser Leu His Ala Ser Leu Glu Val Phe Gln Gln Ala

340 345 350

Thr Met Thr Ala Leu Arg Arg Lys Ser Ile Leu Leu Thr Gly Tyr Leu
355 360 365
Glu Tyr Met Leu Lys His Tyr His Ser Lys Asp Asn Thr Glu Asn Lys
370 375 380
Gly Pro Ile Val Asn Ile Ile Thr Pro Ser Arg Ala Glu Glu Arg Gly

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

450 455 460

<210> 10
<211> 466
<212> PRT
<213> Pongo abelii
<400> 10
Met Glu Pro Ser Ser Leu Glu Leu Pro Ala Asp Thr Val Gln Arg Ile
1 5 10 15
Ala Ala Glu Leu Lys Cys His Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu His
20 25 30
Leu Asp Glu Glu Asp Lys Leu Arg His Phe Arg Glu Tyr Phe Tyr Ile
35 40 45

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

100 105 110

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

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
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> Macaca fascicularis
<400> 11
Met Glu Pro Ser Pro Leu Glu Leu Pro Ala Asp Thr Val Gln Arg Ile
1 5 10 15
Ala Thr Glu Leu Lys Cys His Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu His

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

Lys Met Val Lys Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Lys

85 90 95

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

100 105 110

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

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> Pan troglodytes

<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 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
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

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

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

Leu Gln Ser Ile Lys Glu Gln Gly Glu Glu Leu Ala Leu Val Met Met
180 185 190

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

Ala Gln Ala Val Lys Asp Glu Gly Ala Phe Val Gly Phe Asp Leu Ala
210 215 220

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

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

Val Ser Gly Ile Phe Val His Glu Asn His Ala Glu Lys Pro Asp Met
260 265 270

Ile Arg Phe Ala Gly Trp Trp Gly His Asp Glu Gly Glu Arg Phe Lys
275 280 285

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

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

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

<210> 15

<211> 422
<212> PRT
<213> Bizionia argentinensis
<400> 15
Met Ser Asn Phe Lys Thr Gly Ile Asp Phe Ala Lys Glu Gln Asp Glu
1 5 10 15
Asn Asp Thr Leu Ser Cys Tyr Arg Asn Gln Phe His Ile Pro Lys Asp
20 25 30
Lys Gln Gly Asn Asp Met Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu
35 40 45
Gln Pro Lys Ala Thr Lys Asp Tyr Ile Asn Gln Glu Leu Glu Asp Trp

50 55 60
Ala Asn Leu Gly Val Glu Gly His Thr His Ala Lys Asn Pro Trp Leu
65 70 75 80
Gly Tyr His Glu Phe Leu Thr Asp Ser Met Ala Lys Val Val Gly Ala

85 90 95

Lys Pro Ile Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Thr Ala Asn Leu His

100 105 110

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

115 120 125

Ile Ile Glu Ala Asp Ala Phe Pro Ser Asp Lys Tyr Ala Val Glu Ser

130 135 140

Gln Leu Arg His His Gly Tyr Asp Asp Lys Glu Gly Leu Leu Leu Trp

145 150 155 160

Lys Ala Arg Glu Gly Glu Glu Leu Leu Arg Tyr Glu Asp Leu Glu Ala

165 170 175

Ile Leu Lys Glu His Gly Asp Asp Val Ala Leu Val Met Ile Gly Gly

180 185 190

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

195 200 205

Leu Gly His Lys His Gly Cys Met Val Gly Phe Asp Cys Ala His Gly

210 215 220

Ala Gly Asn Val Glu Leu Asn Leu His Asp Ser Gly Ala Asp Phe Ala

225 230 235 240

Val Trp Cys Thr Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Ser Leu Gly

245 250 255

Gly Cys Phe Val His Glu Arg His Ala His Asn Lys Arg Leu Asn Arg

260 265 270

Phe Thr Gly Trp Trp Ser His Asn Lys Glu Thr Arg Phe Lys Met Arg

275 280 285

Asp Glu Phe Asp Ala Ile Pro Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Asn

290 295 300

Pro Pro Ile Leu Ser Met Ala Ala Ile Lys Ala Ser Leu Asp Ile Phe

305 310 315 320

Glu Glu Ile Gly Met Lys Lys Leu Asn Glu Lys Ser Arg Ala Leu Thr

325 330 335

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

370 375 380
Gly Val Ile Ser Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Cys Ala Pro
385 390 395 400
Ile Pro Leu Tyr Asn Ser Tyr Gln Asp Val Tyr His Met Val Glu Arg
405 410 415
Leu Lys Asn Ile Leu Glu
420

<210> 16
<211> 431
<212> PRT
<213> Candidatus Entotheonella sp. TSY2
<400> 16
Met Thr Ala Phe His Ala His Phe Gln Pro Thr Arg Glu Ala Ala Leu

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

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

Met Ala Ala Ala Ala Phe Asp Thr Thr Glu Asn Phe Ala Ile Glu Met
1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Arg Phe Ala Gly Trp Trp Gly His Asp Gln Glu Thr Arg Phe Lys
275 280 285
Met Gly Pro Glu Phe His Pro Met Ala Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu
290 295 300
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
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> Chlamydia pecorum PV3056/3

<400> 19

Met Ile Glu Lys Leu Lys Gln Tyr His Asp Glu Ala Ile Ser Leu Asp

1 5 10 15

Ser Leu Asp Pro Leu Gln Lys Phe Lys Glu Cys Phe Thr Leu Pro Lys

20 25 30

Glu Pro Gly Ala Leu Tyr Phe Cys Ser Asn Ser Leu Gly Leu Pro Ala

35 40 45

Lys Ala Ala Ser Gln Lys Leu Glu Glu Gln Leu Gln Arg Trp Ser Glu

50 55 60

Leu Gly Ala Arg Gly Trp Phe Glu Gly Glu Gly Asn Trp Tyr Asn Ser

65 70 75 80

Leu Glu Glu Ser Ile Val Arg Pro Leu Ser Lys Ile Leu Gly Ala Glu

85 90 95

Ser Asn Glu Val Thr Leu Met Asn Ser Leu Thr Val Asn Leu His Met

100 105 110

Leu Leu Ile Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Lys Thr Arg Tyr Lys Ile Leu

115 120 125

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

130 135 140

Leu Arg Phe His Lys Lys Glu Glu Gly Leu Ile Leu Ile Glu Pro Arg

145 150 155 160

Pro Gly Glu His Leu Val Gln Glu Glu Asp Phe Leu Arg Val Ile Lys

165 170 175

Ile Gln Gly Glu Glu Ile Ala Leu Val Phe Leu Asn Cys Val Asn Phe

180 185 190

Leu Ser Gly Gln Val Leu Lys Val Asp Glu Ile Thr Arg Tyr Ala Lys

195 200 205

Glu Ala Gly Cys Cys Val Gly Tyr Asp Leu Ala His Ala Ala Gly Asn

210 215 220

Ile Pro Leu Ser Leu His Asp Leu Gly Gly Asp Phe Ala Val Gly Cys

225 230 235 240

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

245 250 255

Val His Ala Ser His His His Gln Gln Phe Val Arg Phe Ser Gly Trp

260 265 270

Trp Gly Asn Asp Pro Asn Thr Arg Phe Tyr Phe Pro Lys Glu Phe Val

275 280 285

Pro Tyr Gly Gly Ala Ser Ser Trp Gln Val Ser Thr Pro Ser Ile Leu

290 295 300

Ala Lys Leu Pro Leu Ile Ala Ala Leu Glu Val Phe Glu Glu Ala Gly

305 310 315 320

Met Glu Asn Ile Arg Glu Lys Ser Lys Lys Gln Thr Ala Phe Leu Tyr

325 330 335

Thr Leu Leu Glu Asn Ala Arg Gly Thr His Phe Asp Met Ile Thr Pro

340 345 350

Lys Glu Pro Glu Leu Arg Gly Cys Gln Leu Ser Leu Arg Ile Lys Cys

355 360 365

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

370 375 380

Cys Asp Phe Arg Ser Pro Asn Ile Leu Arg Val Thr Pro Ser Pro Leu

385 390 395 400

Tyr Thr Ser Phe Tyr Glu Ile Tyr Arg Phe Ala Tyr Thr Phe Leu Glu

405 410 415

Val Leu Lys Thr Ile

420

<210

> 20

<211> 425

<212> PRT

<213> Chlamydophila caviae GPIC

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<212> PRT

<213> Corallococcus coralloides DSM 2259

<400> 21

Met Thr Ala Pro Val Tyr Glu Asn Thr Asp Val Phe Ala Tyr Gly Leu

1 5 10 15

Asp Ala Ala Asp Pro Leu Arg Pro Leu Arg Asp Glu Phe Leu Phe Pro

20 25 30

Pro Ala Pro Ser Gly Ala Pro Ala Ile Tyr Leu Ala Gly Asn Ser Leu

35 40 45

Gly Leu Gln Pro Arg Lys Ala Arg Lys Tyr Val Gln Met Glu Met Glu

50 55 60

Asp Trp Glu Arg Leu Gly Val Glu Gly His Val His Gly Arg His Pro

65 70 75 80

Trp Leu Pro Tyr His Glu Gln Leu Thr Asp Met Val Ala Arg Val Val

85 90 95

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

100 105 110

Leu His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Arg Glu Arg Phe

115 120 125

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

130 135 140

Ala Ser Gln Ala Arg Phe His Gly Tyr Asp Pro Lys Glu Ala Ile Val

145 150 155 160

Arg Leu Met Pro Arg Glu Gly Glu Asp Thr Leu Arg Ser Glu Asp Ile

165 170 175

Leu Glu Ala Ile Glu Arg His Gly Lys Glu Leu Ala Leu Val Met Leu

180 185 190

Gly Ser Val Asn Tyr Leu Thr Gly Gln Ala Phe Asp Leu Arg Glu Ile

195 200 205

Thr Arg Val Ala His Ala Gln Gly Cys Lys Val Gly Phe Asp Leu Ala

210 215 220

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

225 230 235 240

Phe Ala Val Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Gly Gly Pro Gly Ser

245 250 255

Leu Gly Gly Val Phe Val His Glu Arg His Ala His Ser Pro Gln Leu

260 265 270

Pro Arg Phe Glu Gly Trp Trp Gly His Asn Lys Ala Thr Arg Phe Glu

275 280 285

Met Gly Pro Thr Phe Asp Pro Leu Pro Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu

290 295 300

Ser Asn Pro Pro Ile Phe Gln Leu Ala Ala Leu Arg Ser Ser Leu Glu

305 310 315 320

Leu Phe Asp Lys Ala Thr Met Ala Ala Leu Arg Thr Lys Ser Asp Gln

325 330 335

Leu Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Asp Arg Leu Pro Ala Gly Tyr

340 345 350

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

355 360 365

Ser Leu Arg Phe Lys Gly Glu Pro Lys Arg Leu Leu Gln Arg Leu Ser

370 375 380

Ala Ala Gly Ile Ile Cys Asp Phe Arg Glu Pro Asp Ile Ile Arg Ala

385 390 395 400

Ala Pro Thr Pro Leu Tyr Asn Thr Tyr Leu Asp Val Phe Arg Phe Val

405 410 415

Lys Ala Leu Glu Ala His Ala Leu Glu

420 425

<210> 22

<211> 426

<212> PRT

<213> Cyclobacterium marinum DSM 745

<400> 22

Met Asp Gln Ile Ala Phe Glu Leu Thr Pro Glu Phe Ala Arg Lys Met

1 5 10 15

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

20 25 30

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

85 90 95
Ala Asn Glu Gln Glu Val Val Ala Met Asn Ser Leu Ser Val Asn Leu
100 105 110
His Leu Leu Met Val Ser Phe Tyr Gln Pro Lys Gly Lys Lys Phe Lys
115 120 125
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

<210> 23

<211> 426

<212> PRT

<213> Cystobacter fuscus

<400> 23

Met Ser Gly Glu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Glu Ala Phe Ala Arg

1 5 10 15

Arg Met Asp Ala Glu Asp Pro Leu Arg Ser Phe Arg Glu Glu Phe Leu

20 25 30

Phe Pro Val His Gly Asp Gly His Glu Leu Tyr Leu Leu Gly Asn Ser

35 40 45

Leu Gly Leu Gln Pro Arg Lys Ala Lys Glu Tyr Val Leu Ala Ala Met

50 55 60

Glu Asp Trp Ala Arg Leu Gly Val Asp Gly His Phe Lys Gly Ser Pro
65 70 75 80
Pro Trp Met Glu Phe His Val Gly Leu Gly Glu Gln Met Ala Arg Val
85 90 95
Val Gly Ala Arg Pro Glu Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Thr Val

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

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

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

290 295 300

Asn Val Leu Gly Met Ala Ala His Gln Ala Ser Leu Asp Ile Phe Gln

305 310 315 320

Glu Ala Gly Met Val His Leu Arg Lys Lys Ser Val Gln Leu Thr Gly

325 330 335

Phe Leu Ala Phe Leu Ile Arg Glu Ile Ser Gly Glu Ser Gly Val Leu

340 345 350

Glu Val Ile Thr Pro Asn Ala Glu Ala Glu Arg Gly Cys Gln Leu Ser

355 360 365

Leu Leu Ile His Lys Gly Gly Lys Ala Val Phe Asp Glu Phe Tyr Gln

370 375 380

Asn Gly Ile Val Gly Asp Trp Arg Asn Pro Asn Val Ile Arg Ile Ala

385 390 395 400

Pro Thr Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Val Phe Arg Phe Ala Lys

405 410 415

Ile Leu Glu Gln Ser Leu Ser Lys Phe Ala

420 425

<210> 25

<211> 420

<212> PRT

<213> Flavobacteria bacterium BBFL7

<400> 25

Met Glu Phe Asn Thr Thr Arg Asp Tyr Ala Leu Gln Leu Asp Gln Glu

1 5 10 15

Asp Ser Leu Ser Arg Phe Arg Glu Ser Phe His Ile Pro Lys His Thr

20 25 30

Asp Gly Thr Asp Ser Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln

35 40 45

Pro Arg Gln Thr Lys Thr Phe Leu Asn Gln Glu Leu Asp Asp Trp Ala

50 55 60

Lys Leu Gly Val Glu Gly His Phe His Ala Glu Asn Pro Trp Met Pro

65 70 75 80

Tyr His Glu Phe Leu Thr Glu Thr Thr Ala Gln Val Val Gly Ala Lys

85 90 95

Pro His Glu Val Val Ile Met Asn Thr Leu Thr Thr Asn Leu His Leu

100 105 110

Met Met Val Ser Phe Tyr Gln Pro Lys Gly Lys Arg Thr Lys Ile Ile

115 120 125

Ile Glu Ala Asp Ala Phe Pro Ser Asp Arg Tyr Ala Val Ala Ser Gln

130 135 140

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

195 200 205

Gly His Ala Ala Gly Ala Met Val Gly Phe Asp Cys Ala His Gly Ala
210 215 220
Gly Asn Val Asp Leu Gln Leu His Asp Ser Gly Ala Asp Phe Ala Val
225 230 235 240
Trp Cys Thr Tyr Lys Tyr Met Asn Ser Gly Pro Gly Ser Leu Gly Gly
245 250 255
Cys Phe Val His Glu Arg His Ala Asn Asn Ser Glu Leu Pro Arg Phe

260 265 270

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

325 330 335

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

370 375 380

Val Ile Ala Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Ile Ala Pro Val

385 390 395 400

Pro Leu Tyr Asn Asn Tyr Glu Asp Cys Trp Arg Phe Val Asp Val Leu

405 410 415

Lys Ser Glu Leu

420

<210> 26

<211> 442

<212> PRT

<213> Flexibacter litoralis DSM 6794

<400> 26

Met Asn Phe Glu Thr Thr Lys Asn Phe Ala Ser Gln Leu Asp Asn Asn

1 5 10 15

Asp Ser Leu Ala His Phe Arg Asp Lys Phe Trp Ile Pro Thr Leu Asn

20 25 30

Ser Ile Ser Lys Asn Thr Asn Ser Ser Asn Glu Lys Gly Lys Glu Lys

35 40 45

Val Val Tyr Phe Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro Lys Thr Thr

50 55 60

Lys Ala Tyr Ile Glu Gln Glu Leu Glu Asp Trp Lys Asn Leu Gly Val

65 70 75 80

Glu Gly His Phe His Gly Lys Asn Pro Trp Leu Ser Tyr His Lys Leu

85 90 95

Leu Thr Asn Gln Thr Ala Lys Ile Val Gly Ala Lys Pro Ile Glu Val

100 105 110

Val Val Met Asn Asn Leu Thr Val Asn Leu His Leu Leu Met Val Ser

115 120 125

Phe Tyr Arg Pro Asn Gln Lys Arg Phe Lys Ile Leu Met Glu Gly Gly

130 135 140

Ala Phe Pro Ser Asp Gln Tyr Ala Ile Glu Ser Gln Val Lys Phe His

145 150 155 160

Gly Phe Ser Pro Asp Asp Ala Ile Val Glu Met Met Pro Arg Lys Asn

165 170 175

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

180 185 190

Lys Ile Glu Glu Leu Gly Asp Glu Leu Ala Leu Val Met Phe Gly Gly

195 200 205

Val Asn Tyr Tyr Thr Gly Gln Phe Phe Asp Leu Glu Lys Ile Thr Gln

210 215 220

Ala Ala His Lys Val Gly Ala Thr Ala Gly Phe Asp Leu Ala His Ala

225 230 235 240

Ala Gly Asn Val Pro Leu Lys Leu His Asp Trp Lys Val Asp Phe Ala

245 250 255

Thr Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Ala Gly Gly Thr Ser

260 265 270

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

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
Ala Trp Cys Thr Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Ser Leu Gly
245 250 255
Gly Leu Phe Val His Glu Lys His Ala His Asn Lys Lys Leu Lys Arg
260 265 270
Phe Ala Gly Trp Trp Ser His Asn Lys Ala Thr Arg Phe Asn Met Arg

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

340 345 350
Ile Ile Thr Pro Ser Asn Pro Lys Glu Arg Gly Cys Gln Leu Ser Ile
355 360 365
Gln Val Arg Asp Ala Asp Lys Ser Leu His Lys Lys Leu Thr Lys Ala
370 375 380
His Ile Ile Thr Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Cys Ala Pro
385 390 395 400
Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Val Tyr Arg Met Val Asp Lys

405 410 415

Leu Lys Gln Ile Leu Asn Thr

420

<210> 28

<211> 429

<212> PRT

<213> Fulvivirga imtechensis

<400> 28

Met Ala Lys Asp Ile Leu His Met Thr Tyr Glu Asn Ser Leu Thr Phe

1 5 10 15

Ala Gln Asp Leu Asp Arg Asp Asp Pro Leu Arg His Phe Arg Asn Lys

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Leu Glu Gly Trp Ala Thr Leu Gly Val Asp Gly His Phe His Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Ile Val Gly Ala Lys Pro Ser Glu Val Val Ser Met Asn Asn

100 105 110

Leu Thr Val Asn Leu His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr

115 120 125

Ser Ser Arg Phe Lys Ile Met Ile Glu Ala Gly Ala Phe Pro Ser Asp

130 135 140

Gln Tyr Ala Val Glu Ser Gln Ile Lys Phe His Gly Tyr Asn Tyr Glu

145 150 155 160

Asp Ala Leu Ile Glu Ile Ser Pro Arg Glu Gly Glu Tyr His Leu Arg

165 170 175

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

180 185 190

Leu Val Leu Phe Gly Gly Val Gln Tyr Tyr Thr Gly Gln Leu Phe Asp
195 200 205
Ile Gly Ser Ile Thr Ala Ala Gly His Trp Ala Gly Ala Ile Val Gly
210 215 220
Phe Asp Leu Ala His Ala Ala Gly Asn Val Pro Leu Asn Leu His Asn

225 230 235 240
Asp Gln Val Asp Phe Ala Ala Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser
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
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
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

Glu Ala Ala Gly Val Thr Cys Asp Phe Arg His Pro Asn Val Ile Arg

385 390 395 400

Val Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Ala Tyr Arg Phe

405 410 415

Val Ser Ile Leu Lys Asp Ser Leu Gln

420 425

<210> 31

<211> 421

<212> PRT

<213> Lacinutrix sp. 5H-3-7-4

<400> 31

Met Ser Asn Tyr Thr Leu Gly Arg Asp Phe Ala Gln Gln Leu Asp Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ala Asn Leu Gly Val Glu Gly His Thr Glu Gly Lys Asn Pro Trp Leu

65 70 75 80

Pro Tyr His Glu Phe Leu Thr Glu Ser Met Ala Lys Val Val Gly Ala

85 90 95

Lys Pro Ile Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Thr Ala Asn Leu His

100 105 110

Phe Met Met Val Ser Phe Tyr Lys Pro Thr Lys Lys Arg Tyr Lys Ile

115 120 125

Leu Ile Glu Ala Asp Ala Phe Pro Ser Asp Lys Tyr Ala Val Glu Ser

130 135 140

Gln Leu Arg His His Gly Phe Asp Asp Lys Glu Gly Leu Val Leu Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

Ile Leu Glu Ala Gln Gly Asp Glu Ile Ala Leu Ile Met Ile Gly Gly

180 185 190

Val Asn Tyr Tyr Thr Gly Gln Phe Phe Asp Phe Lys Arg Ile Ala Ala

195 200 205

Leu Gly His Lys Asn Gly Cys Met Val Gly Phe Asp Cys Ala His Gly

210 215 220

Ala Gly Asn Val Asn Leu Asp Leu His Asn Ser Gly Ala Asp Phe Ala

225 230 235 240

Val Trp Cys Thr Tyr Lys Tyr Met Asn Ala Gly Pro Gly Ser Leu Ser

245 250 255

Gly Cys Phe Val His Glu Arg His Ala His Asn Lys Asp Leu Asn Arg

260 265 270

Phe Thr Gly Trp Trp Ser His Asn Lys Glu Thr Arg Phe Asn Met Arg

275 280 285

Gly Glu Phe Asp Gln Leu Pro Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Asn

290 295 300

Pro Pro Ile Leu Ser Met Ala Ala Ile Lys Ala Ser Ala Asp Ile Phe

305 310 315 320

Ala Glu Val Gly Met Glu Lys Leu Thr Gln Lys Ser Lys Lys Leu Thr

325 330 335

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

340 345 350

Ile Ile Thr Pro Ser Asn Pro Asn Glu Arg Gly Cys Gln Leu Ser Ile

355 360 365

Gln Val Lys Asn Ala Asp Lys Ala Leu His His Lys Leu Thr Glu Ser

370 375 380

Gly Val Ile Ser Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Cys Ala Pro

385 390 395 400

Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Val Tyr Asn Met Val Glu Arg

405 410 415

Leu Lys Ala Cys Leu

420

<210> 32

<211> 428

<212> PRT

<213> Cecembia lonarensis

<400> 32

Met Thr Thr Thr Asp Phe Glu Tyr Thr Glu Asp Phe Ala Lys Arg Met

1 5 10 15

Asp Asp Leu Asp Pro Phe Arg His Phe Arg Ser Met Phe His Phe Pro

20 25 30

Tyr Val Asn Gly Lys Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Gly Asn Ser Leu Gly

35 40 45

Leu Gln Pro Lys Ser Val Arg Glu Tyr Leu Asp Arg Glu Leu Lys Asn

50 55 60

Trp Glu Leu Met Ala Val Asp Gly His Phe His Gly Glu Asp Ala Trp
65 70 75 80
Tyr His Val Arg Lys Lys Ser Lys Pro Ala Leu Ala Glu Ile Val Gly

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

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

210 215 220
Ala Ala Gly Asn Ile Pro Leu Arg Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe
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

305 310 315 320

Phe Gln Glu Ala Gly Met Glu Arg Leu Arg Thr Lys Ser Glu Leu Leu

325 330 335

Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Ile Arg Lys Val Gly Phe Ala Asn Gly

340 345 350

Val Leu Glu Ile Ile Thr Pro Asn Asn Pro Lys Glu Arg Gly Cys Gln

355 360 365

Leu Ser Leu Leu Val His Lys Gly Gly Lys Leu Val Phe Asp His Leu

370 375 380

Tyr Ala Asn Gly Val Val Gly Asp Trp Arg His Pro Asn Val Ile Arg

385 390 395 400

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

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> 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
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

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> 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
Ile Thr Lys Ala Ala His Ala Lys Gly Cys Leu Val Gly Phe Asp Leu
210 215 220
Ala His Gly Ala Gly Asn Leu Lys Leu Ser Leu His Asp Asp Gly Pro
225 230 235 240
Asp Phe Ala Val Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ala Gly Pro Gly

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

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

370 375 380
Gly Asp Ala Gly Ile Val Cys Asp Phe Arg Lys Pro Asp Ile Ile Arg

385 390 395 400

Ala Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Thr Asp Val Tyr Arg Phe

405 410 415

Val Lys Ala Leu Glu Gly Tyr Ala Arg Glu

420 425

<210> 36

<211> 425

<212> PRT

<213> Myxococcus stipitatus DSM 14675

<400> 36

Met Thr Thr His Ser Phe Glu Asp Thr Glu Asp Phe Ala Arg Arg Ala

1 5 10 15

Asp Glu Ala Asp Ala Leu Arg Ser Phe Arg Asp Ala Phe His Phe Pro

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Gln Pro Lys Asn Ala Ala Arg Tyr Val Gln Glu Glu Leu Glu

50 55 60

Asp Trp Ala Arg Phe Gly Val Glu Gly His His His Gly Arg His Pro

65 70 75 80

Trp Leu His Tyr His Glu Leu Val Thr Glu Gln Ala Ala Arg Leu Val

85 90 95

Gly Ala Lys Pro Gln Glu Val Val Val Met Asn Thr Leu Thr Val Asn

100 105 110

Leu His Leu Met Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Lys Thr Arg Phe

115 120 125

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

130 135 140

Ala Ser Gln Ala Arg Phe His Gly Tyr Asp Pro Arg Glu Ala Ile Leu

145 150 155 160

Glu Leu Lys Pro Arg Pro Gly Glu Glu Thr Leu Arg Thr Glu Asp Ile

165 170 175

```
Leu Ala Thr Leu Asp Gln His Gly His Glu Val Ala Leu Val Met Leu
            180                 185                 190
Gly Ser Val Asn Tyr Leu Thr Gly Gln Ala Phe Asp Ile Pro Ala Ile

        195                 200                 205
Thr Lys Thr Ala His Ala Lys Gly Cys Phe Val Gly Phe Asp Leu Ala
    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
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> 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

210 215 220

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

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

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

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

275 280 285

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

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

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

Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Asp Arg Leu Pro Glu Gly

340 345 350

Phe Val Arg Ile Thr Thr Pro Arg Asp Val Lys Gln Arg Gly Ala Gln

355 360 365

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

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

Ala Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Thr Asp Val Tyr Arg Phe

405 410 415

Val Lys Thr Leu Glu Gly His Ala Arg Glu

420 425

<210> 38

<211> 428

<212> PRT

<213> Nafulsella turpanensis

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ala Gly Gln Ala Ala Gly Ala Lys Val Gly Phe Asp Leu Ala His
210 215 220

Ala Ala Gly Asn Val Pro Leu Gln Leu His Asp Trp Gly Val Asp Phe

225 230 235 240

Ala Ala Trp Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gly Ser Asn

245 250 255

Ser Gly Ile Phe Val His Glu Arg Tyr Ala Asn Gln Ala Glu Leu Pro

260 265 270

Arg Phe Ala Gly Trp Trp Gly His Asp Glu Lys Glu Arg Phe Leu Met

275 280 285

Gln Lys Gly Phe Lys Pro Met Tyr Gly Ala Asp Gly Trp Gln Leu Ser

290 295 300

Asn Gly Asn Ile Leu Pro Leu Ala Ala Gln Arg Ala Ser Leu Glu Ile

305 310 315 320

Phe Glu Gln Ala Gly Met Asp Asn Leu Arg Gln Lys Ser Ile Gln Leu

325 330 335

Thr Gly Tyr Leu Glu Tyr Leu Ile Arg Glu Glu Val Ser Ser Lys Ala

340 345 350

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
Tyr Tyr Thr Gly Gln Leu Phe Asp Met Ala Ala Ile Thr Lys Ala Ala
195 200 205
Gln Ala Val Gly Ala Lys Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Ala Gly
210 215 220
Asn Val Pro Leu Gln Leu His Asn Trp Asn Val Asp Phe Ala Ala Trp
225 230 235 240

Cys Ser Tyr Lys Tyr Met Asn Ser Gly Pro Gly Gly Ile Gly Gly Ala
245 250 255
Tyr Ile His Glu Arg Tyr His Asn Asp Thr Ser Leu Pro Arg Phe Ala

260 265 270

Gly Trp Trp Gly Tyr Asp Lys Ala Thr Arg Phe Leu Met Gln Lys Gly

275 280 285

Phe Asn Ala Thr Arg Ser Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Thr Pro Ser

290 295 300

Pro Leu Leu Tyr Ala Ala His Arg Ala Ala Leu Asp Leu Phe Met Glu

305 310 315 320

Ala Gly Phe Asn Arg Leu Gln Asn Lys Arg Gln Leu Leu Asn Lys Trp

325 330 335

Leu Trp Phe Leu Leu Asp Asp Leu Asn Asn Ala Gln Thr Glu Pro Val

340 345 350

Val Glu Phe Ile Thr Pro Arg Asn Glu Ala Glu Arg Gly Cys Gln Val

355 360 365

Ser Met Leu Met Leu Gln Gln Gly Lys Gln Val Phe Asp Glu Leu Ala

370 375 380

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

385 390 395 400

Ala Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Glu Val Trp Gln Phe Thr

405 410 415

Asn Ile Leu Arg Gln Ile Leu Gln Leu Gln His Ala

420 425

<210> 40

<211

> 420

<212> PRT

<213> Nonlabens dokdonensis DSW-6

<400> 40

Met Asn Phe Lys Thr Asp His Asn Phe Ala Ile Glu Leu Asn Lys Ser

1 5 10 15

Asp Ser Leu Ser Arg Phe Arg Glu Ser Phe His Ile Pro Lys His Thr

20 25 30

Asp Gly Thr Asp Ser Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln

35 40 45

Pro Arg Gln Thr Lys Thr Phe Leu Asn Gln Glu Leu Asp Asp Trp Ala

50 55 60

Arg Leu Gly Val Glu Gly His Phe His Ala Ala His Pro Trp Met Pro

65 70 75 80

Tyr His Glu Phe Leu Thr Glu Thr Thr Ala Gln Ile Val Gly Ala Lys

85 90 95

Pro His Glu Val Val Ile Met Asn Thr Leu Thr Thr Asn Leu His Leu

100 105 110

Met Met Val Ser Phe Tyr Gln Pro Lys Gly Lys Arg Thr Lys Ile Ile

115 120 125

Ile Glu Ala Asp Ala Phe Pro Ser Asp Arg Tyr Ala Val Ala Ser Gln

130 135 140

Val Lys Phe His Gly His Asp Asp Lys Glu Asn Ile Ile Glu Trp Ser

145 150 155 160

Pro Arg Ala Gly Glu His Thr Pro Arg Ile Glu Asp Leu Glu Asn Leu

165 170 175

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

180 185 190

Asn Tyr Tyr Thr Gly Gln Phe Phe Asp Leu Lys Lys Ile Thr Glu Leu

195 200 205

Gly His Ala Ala Gly Ala Met Val Gly Phe Asp Cys Ala His Gly Ala

210 215 220

Gly Asn Val Asp Leu Gln Leu His Asn Ser Gly Ala Asp Phe Ala Val

225 230 235 240

Trp Cys Thr Tyr Lys Tyr Met Asn Ser Gly Pro Gly Ser Leu Gly Gly

245 250 255

Cys Phe Val His Glu Arg His Ala Ser Asn Ser Asp Leu Pro Arg Phe

260 265 270

Thr Gly Trp Trp Gly His Asn Lys Asp Thr Arg Phe Lys Met Arg Asp

275 280 285

Asp Phe Glu Pro Met His Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Asn Pro

290 295 300

Pro Ile Leu Ser Met Val Ala Ile Arg Ala Ser Leu Asp Leu Phe Ala

305 310 315 320

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

325 330 335

Tyr Leu Glu Tyr Leu Leu Ser Asn Leu Glu Gly Asp Arg Ile Ser Ile

340 345 350

Ile Thr Pro Glu Asn Pro Lys Asp Arg Gly Cys Gln Leu Ser Leu Ala

355 360 365

Val Lys Asn Ala Asp Lys Ser Leu Phe Asp Ala Ile Thr Glu Lys Gly

370 375 380

Val Ile Ala Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Ile Ala Pro Val

385 390 395 400

Pro Leu Tyr Asn Asn Tyr Glu Asp Cys Trp Arg Phe Val Asp Val Leu

405 410 415

Lys Ser Glu Leu

420

<210> 41

<211> 431

<212> PRT

<213> Pedobacter agri

<400> 41

Met Lys Leu Glu Asn Thr Leu Ala Phe Ala Lys Glu Gln Asp Glu Lys

1 5 10 15

Asp Glu Leu Lys His Phe Arg Asp Gln Phe Leu Phe Pro Lys Tyr Gln

20 25 30

Asp Lys Phe Phe Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ala Val Glu Gly Trp Phe Asp Gly Glu Glu Pro Trp Met Tyr Tyr

65 70 75 80

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

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

Met Ile Ser Phe Tyr Gln Pro Gln Gly Lys Arg Phe Lys Ile Ile Met
115 120 125

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

Arg Phe His Gly Phe Asp Pro Ser Asp Ala Ile Ile Glu Val Phe Pro
145 150 155 160

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

Lys Glu His Gly Asp Glu Ile Ala Leu Leu Leu Phe Gly Gly Ile Asn
180 185 190

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

His Ser Ile Gly Ala Met Val Gly Trp Asp Leu Ala His Ala Ala Gly
210 215 220

Asn Val Pro Val Lys Leu His Asp Trp Asn Val Asp Phe Ala Cys Trp
225 230 235 240

Cys Ser Tyr Lys Tyr Gln Asn Ala Gly Pro Gly Gly Ile Ser Gly Ile
245 250 255

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

Gly Trp Trp Gly Tyr Gln Glu Asn Lys Arg Phe Lys Met Glu Lys Gly
275 280 285

Phe Val Pro Glu Ala Gly Ala Asp Gly Trp Gln Val Ser Cys Thr Gln
290 295 300

Val Met Pro Met Ala Leu Tyr His Ala Ser Leu Gln Ile Phe Lys Glu
305 310 315 320

Ala Gly Phe Leu Asn Thr Leu Arg Asn Lys Ser Ile Ser Leu Thr Ser
325 330 335

Tyr Leu Glu Phe Val Val Asn Glu Leu Asn Ile Glu Leu Glu Lys Glu
340 345 350
Gln Tyr Lys Ile Ile Thr Pro Lys Asn Ser Ala Glu Arg Gly Ala Gln
355 360 365
Leu Ser Ile Ile Ala Ala Arg Asn Gly Lys Glu Ile Phe Asp Gly Leu
370 375 380
Leu Ala His Gly Ile Leu Gly Asp Trp Arg Glu Pro Asn Val Ile Arg
385 390 395 400

Leu Ser Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Ile Tyr Gln Thr
405 410 415
Gly Lys Ala Leu Ser Glu Val Thr Arg Lys Ile Leu Thr Thr Ala
420 425 430

<210> 42
<211> 449
<212> PRT
<213> Pedobacter sp. BAL39
<400> 42
Met Lys Val Val Asp Asn Lys Lys Thr Gly Leu Phe Asn Tyr Ile Pro
1 5 10 15
Phe Leu Trp Ile Phe Gly Thr Met Asn Phe Glu Asn Thr Leu Ala Phe

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

85 90 95

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

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

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

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

Tyr Leu Phe His Ile Val Asn Gln Val Asn Lys Leu Leu Ser Cys Glu

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Leu Ser Pro Val Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Val Phe Arg Thr

405 410 415

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

420 425

<210> 44

<211> 428

<212> PRT

<213> Rhodonellum psychrophilum

<400> 44

Met Lys Asp Ile Lys Tyr Glu Tyr Ser Glu Phe Phe Ala Arg Gln Leu

1 5 10 15

Asp Asn Glu Asp Pro Leu Lys Asp Phe Arg Asn Glu Phe Tyr Phe Pro

20 25 30

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

35 40 45

Leu Gln Pro Arg Ser Thr Lys Glu Tyr Ile Gln Arg Glu Leu Asp Asn

50 55 60

Trp Ala Glu Leu Ala Val Asp Gly His Phe Lys Gly Glu Asp Ala Trp

65 70 75 80

Tyr His Val Arg Lys Lys Ser Lys Pro Ala Leu Ser Glu Ile Val Gly

85 90 95

Ala His Glu His Glu Val Val Ala Met Asn Asn Leu Ser Ser Asn Leu

100 105 110

His Phe Leu Met Val Ser Phe Tyr Arg Pro Ser Lys Thr Arg Phe Lys

115 120 125

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

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
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> Salinispora arenicola

<400> 45

Met Asn Lys Glu Glu Leu Asp Gln Glu Glu Lys Ala Ala Asn Arg Leu

1 5 10 15

Asp Thr Ala Asp Pro Gly His Arg His Leu Phe His Leu Pro Pro Ser

20 25 30

Asp Gly Gly Arg Tyr Gln Gln Ala Ala Tyr Leu Ala Gly Asn Ser Leu

35 40 45

Gly Leu Gln Pro Leu Ala Thr Arg Asp Glu Leu Leu Ala Asp Leu Asp

50 55 60

Ala Trp Arg Arg Leu Gly Val Glu Gly His Leu Glu Ala Asp Arg Pro

65 70 75 80

Trp Leu Pro Tyr His Glu Leu Leu Thr Ala Pro Thr Ala Arg Leu Val

85 90 95

Gly Ala Arg Pro Ala Glu Val Val Val Met Asn Ser Leu Thr Val Asn

100 105 110

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

115 120 125

Arg Ile Val Ile Glu Asp Asn Ala Phe Pro Ser Asp Ser Tyr Ala Val

130 135 140

Arg Ser Gln Ala Arg Phe His Gly Leu Asp Pro Asp Thr Thr Val Val

145 150 155 160

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

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

Met Ser Pro Val Ala Arg Pro Pro Ala Thr Ala Glu Ala Trp Gln Val
290 295 300
Ser Asn Pro Pro Ile Phe Ala Met Gly Pro Val Arg Thr Ser Leu Glu
305 310 315 320
Leu Phe Asp Ser Val Gly Met Thr Ala Leu Arg Glu Arg Ser Val Arg
325 330 335
Leu Thr Gly Tyr Leu Glu Trp Leu Leu Asp Gln Ile Thr Pro Gly Arg
340 345 350

Gln Leu Ala Val Val Thr Pro Arg Asp Pro Asp Arg Arg Gly Ala Gln
355 360 365
Leu Ser Val Arg Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Glu Leu Thr Lys Arg
370 375 380
Leu Arg Cys Glu Tyr Gly Val Ile Ala Asp Ala Arg Glu Pro Asp Ile
385 390 395 400

Val Arg Phe Ala Pro Val Pro Leu Tyr Ser Thr Tyr His Asp Cys Trp
405 410 415

Arg Val Ala Asp Ala Leu Ala Ala Thr Val Glu Val Arg Gly
420 425 430

<210> 46
<211> 425
<212> PRT
<213> Saprospira grandis str. Lewin
<400> 46

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

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

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

165 170 175

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

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

290 295 300
Ser Asn Ala Pro Ile Leu Ala Met Val Pro Met Arg Ala Ser Leu Ala
305 310 315 320
Leu Phe Asn Glu Ala Gly Met Asp Arg Leu Leu Ala Lys Ser Lys Lys
325 330 335
Leu Thr Ala Tyr Leu Glu Phe Leu Leu Asn Gln Leu Pro Thr Asp Arg
340 345 350
Ile Arg Ile Leu Thr Pro Lys Asp Pro Lys Asp Arg Gly Ala Gln Leu

355 360 365
Ser Ile Gln Val Lys Gly Ala Asp Arg Ser Leu Phe Asp Asp Leu Val
370 375 380
Lys Asn Gly Val Ile Gly Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Ile
385 390 395 400
Ser Pro Ala Pro Ile Tyr Asn Ser Phe Glu Asp Val Tyr Arg Met Val
405 410 415
Gln Ile Leu Lys Lys Cys Leu Gln Leu

420 425

<210> 47

<211> 427

<212> PRT

<213> 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

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> Xanthomonas axonopodis

<400> 48

Met Thr Asp Pro Leu Ser Arg Ala His Ala Ala Ala Leu Asp Ala Ala

1 5 10 15

Asp Pro Leu Arg Asn Leu Arg Asp Ala Phe Val Phe Pro Gln His Gly

20 25 30

Asp Asp Asp Gln Thr Tyr Phe Val Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro

35 40 45

Arg Ala Ala Arg Ala Met Val Asp Glu Val Leu Asp Gln Trp Gly Ala

50 55 60

Leu Ala Val Glu Gly His Phe Thr Gly Pro Thr Gln Trp Leu Thr Tyr

65 70 75 80

His Gln Leu Val Arg Asp Ala Leu Ala Arg Val Val Gly Ala Gln Pro

85 90 95

Gly Glu Val Val Ala Met Asn Thr Leu Ser Val Asn Leu His Leu Met

100 105 110

Met Ala Ser Phe Tyr Arg Pro Thr Ala Glu Arg Gly Ala Ile Leu Ile

115 120 125

Glu Ala Gly Ala Phe Pro Ser Asp Arg His Ala Val Glu Ser Gln Leu

130 135 140

Arg Leu His Gly Leu Asp Pro Ala Thr His Leu Ile Glu Val Glu Ala

145 150 155 160

Asp Glu Pro Asn Gly Thr Val Ser Met Ser Ala Ile Ala Glu Ala Ile

165 170 175

Ala Gln His Gly Pro His Leu Ala Leu Val Leu Trp Pro Gly Ile Gln

180 185 190

Tyr Arg Thr Gly Gln Ala Phe Asp Leu Ala Glu Ile Val Arg Leu Ala

195 200 205

Arg Ala Gln Gly Ala Ala Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Val Gly

210 215 220

Asn Leu Pro Leu Thr Leu His Asp Asp Gly Val Asp Phe Ala Val Trp

225 230 235 240

Cys His Tyr Lys Tyr Leu Asn Ala Gly Pro Gly Ala Val Gly Gly Cys

245 250 255

Phe Val His Ala Arg His Ala Thr Ser Asp Leu Pro Arg Met Ala Gly

260 265 270

Trp Trp Gly His Glu Gln Gln Thr Arg Phe Arg Met Asp Pro Gln Phe

275 280 285

Val Pro Ser Pro Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Asn Pro Pro Val

290 295 300

Leu Ala Leu Ala Pro Leu Arg Ala Ser Leu Ala Leu Phe Asp Gln Ala

305 310 315 320

Gly Met Ala Ala Leu Arg Ala Lys Ser Glu Gln Leu Thr Gly His Leu

325 330 335

Glu Gln Leu Ile His Ala Arg Ala Pro Gln Val Leu Gln Ile Val Thr

340 345 350

Pro Val Glu Pro Ala Arg Arg Gly Cys Gln Leu Ser Leu Arg Val Ala

355 360 365

Gly Gly Arg Ala Arg Gly Arg Ala Leu Phe Glu His Leu His Ala Ala

370 375 380

Gly Val Leu Gly Asp Trp Arg Glu Pro Asp Val Ile Arg Ile Ala Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

Val Glu Ala Trp Ala Ala Ala

420

<210> 49

<211> 422

<212> PRT

<213> Psychroflexus gondwanensis

<400> 49

Met Lys Tyr Gln Asn Thr Lys Ser Phe Ala Glu Gln Leu Asp Glu Ala

1 5 10 15

Asp Pro Leu Lys Ala Tyr Arg Ser Glu Phe Leu Phe Pro Lys Ala Lys

20 25 30

Asp Gly Ser Pro Lys Val Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln

35 40 45

Pro Lys Gln Thr Ser Ala Phe Ile Gln Gln Glu Leu Gln Asp Trp Ala

50 55 60

Asp Leu Gly Val Glu Gly His Ser His Ala Thr His Pro Trp Met Thr

65 70 75 80

Ser Asn Glu Asp Leu Ala Asp Ser Met Ala Lys Ile Val Gly Ala Gln

85 90 95

Pro Gln Glu Val Val Ile Met Asn Thr Leu Thr Val Asn Leu His Leu

100 105 110

Met Met Val Ser Phe Tyr Lys Pro Thr Pro Lys Lys Phe Lys Ile Leu

115 120 125

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

<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

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

<210> 52

<211> 424

<212> PRT

<213> Pontibacter roseus

<400> 52

Met Asn Tyr Gln Asn Thr Leu Ala Phe Ala Gln Glu Gln Asp Asn Leu

1 5 10 15

Asp Pro Leu Lys His Phe Lys Asp Arg Phe Tyr Phe Pro Gln Val Asn

20 25 30

Gly Arg Asp Ala Ile Tyr Phe Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu Gln Pro

35 40 45

Lys Ser Ala Gln Met Tyr Ile Asp Asn Glu Met Tyr Lys Trp Ala Asn

50 55 60

Tyr Ala Val Glu Gly His Phe Lys Val Glu Glu Pro Trp Phe Asn Tyr

65 70 75 80

His Arg Leu Leu Thr Asp Gly Ala Ala Arg Val Val Gly Ala Arg Pro

85 90 95

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

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

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

260 265 270
Gly Trp Trp Gly His Asp Ala Ser Val Arg Phe Gln Met Lys Lys Gly
275 280 285
Phe Ile Pro Met Thr Gly Ala Glu Gly Trp Gln Leu Ser Asn Ala Gln
290 295 300
Ile Leu Pro Met Ala Val His Arg Ala Ala Leu Glu Leu Phe Asp Glu
305 310 315 320
Ala Gly Met Asp Asn Leu Arg Ala Lys Ser Glu Lys Leu Thr Gly Tyr

325 330 335
Leu Glu Tyr Leu Ile Asp Asp Val His Val Gly Lys Glu Leu Leu Glu

340 345 350

Met Ile Thr Pro Arg Asp Pro Gln Ala Arg Gly Cys Gln Ile Ser Leu

355 360 365

Leu Val Lys Gln Asn Ala Arg Glu Leu Phe Asn Arg Leu Met Glu Ala

370 375 380

Gly Ile Ile Val Asp Phe Arg Glu Pro Ser Val Ile Arg Val Ala Pro

385 390 395 400

Thr Pro Leu Tyr Asn Ser Phe Glu Glu Val Tyr Arg Phe Ser Glu Ile

405 410 415

Leu His Asp Cys Leu Gln Ser His

420

<210> 53

<211> 1304

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 53

ccatgggcgg acaccatcat caccaccacg gcggcattga aaaactgaaa cagtatcacg 60

atgaagcgat cagcctggat agccttgatc ccttacagaa attcaaagaa tgctttacat 120

taccgaagga acctggagca ctgtatttct gcagcaatag tctgggcttg cccgcgaaag 180

cggcttccca gaaactggaa gaacagttac agcggtggag cgaattaggc gctcgtggat 240

ggtttgaagg cgagggtaat tggtataaca gcttggaaga gcctattgtg cgtccattga 300

gcaaaatctt aggagcggaa agcaatgaag tgaccctgat gaatagcttg accgtgaatc 360

tgcacatgtt gttgattagt ttctatcgtc cgaccaaaat gcgttataag atactgattg 420

atggcccagc ctttccgtcc gatctgtatg ccattaagtc gcatctgcgt tttcataaga 480

aagaagaagg tcttattctg atagaaccgc gtccgggcga acatctggtg caggaagaag 540

actttctgcg cgtgataaag aagcaaggag aggaaattgc gttggtgttt ctgaactgcg 600

tgaattttct gagcggccag gtgctgaaag tggatgaaat cacccgttat gccaaggagg 660

ctggctgctg cgtcggttat gatctggcgc atgcagcagg caatattccc ttaagcttgc 720

atgatcttgg cggcgacttt gcggtgggct gctcctacaa atatctgtgc ggaggcccag 780

gaggtccagg catagcctac gttcacgcgt cacatcacca ccaacagttc gtgcgtttca 840

gcgggtggtg gggcaatgat ccgaataccc ggttttactt ccccaaagag tttgtgccgt 900

atggcggtgc gagctcctgg caggtgagca ccccgtcgat tctggcgaaa ctgccgttaa 960

ttgcggcact ggaggtgttt gaggaagcgg gcatggagaa tatacgtgaa aagagcaaga 1020

aacaaacagc gttcctgtat accctgttag aaaatgctcg cggcacccat tttgatatga 1080

taaccccgaa agaaccggag ctgcgtggct gtcagcttag cctgcgtatc aaatgcagcc 1140

gtagcgaaga gatcttacgg aagctggaac gtttaggcat tacatgcgat ttccgttcgc 1200

cgaacattct gcgtgtggcg ccgagcccgt tgtacaccag cttttacgaa atctatcgtt 1260

ttgcgtacac ctttctggaa gtcctgaaaa ccatttgaga attc 1304

<210> 54

<211> 431

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 54

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

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

Lys Phe Lys Glu Cys Phe Thr Leu Pro Lys Glu Pro Gly Ala Leu Tyr
35 40 45

Phe Cys Ser Asn Ser Leu Gly Leu Pro Ala Lys Ala Ala Ser Gln Lys

50 55 60

Leu Glu Glu Gln Leu Gln Arg Trp Ser Glu Leu Gly Ala Arg Gly Trp
65 70 75 80

Phe Glu Gly Glu Gly Asn Trp Tyr Asn Ser Leu Glu Glu Pro Ile Val
85 90 95

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

Met Asn Ser Leu Thr Val Asn Leu His Met Leu Leu Ile Ser Phe Tyr

115 120 125

Arg Pro Thr Lys Met Arg Tyr Lys Ile Leu Ile Asp Gly Pro Ala Phe
130 135 140

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

180 185 190
Ala Leu Val Phe Leu Asn Cys Val Asn Phe Leu Ser Gly Gln Val Leu
195 200 205
Lys Val Asp Glu Ile Thr Arg Tyr Ala Lys Glu Ala Gly Cys Cys Val
210 215 220
Gly Tyr Asp Leu Ala His Ala Ala Gly Asn Ile Pro Leu Ser Leu His
225 230 235 240
Asp Leu Gly Gly Asp Phe Ala Val Gly Cys Ser Tyr Lys Tyr Leu Cys

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

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

370 375 380
Leu Arg Lys Leu Glu Arg Leu Gly Ile Thr Cys Asp Phe Arg Ser Pro

385 390 395 400

Asn Ile Leu Arg Val Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Thr Ser Phe Tyr Glu

405 410 415

Ile Tyr Arg Phe Ala Tyr Thr Phe Leu Glu Val Leu Lys Thr Ile

420 425 430

<210> 55

<211> 464

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 55

Met Glu Pro Ser Ser Leu Glu Leu Pro Ala Asp Thr Val Gln Arg Ile

1 5 10 15

Ala Ala Glu Leu Lys Cys His Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu His

20 25 30

Leu Asp Glu Glu Asp Lys Leu Arg His Phe Arg Glu Cys Phe Tyr Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Met Val Lys Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Lys

85 90 95

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

100 105 110

Asp Glu Ser Ile Val Gly Leu Met Lys Asp Ile Val Gly Ala Asn Glu

115 120 125

Lys Glu Ile Ala Leu Met Asn Ala Leu Thr Val Asn Leu His Leu Leu

130 135 140

Met Leu Ser Phe Phe Lys Pro Thr Pro Lys Arg Tyr Lys Ile Leu Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Ile Glu Asp Ile Leu Glu Val Ile

195 200 205

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

210 215 220

Phe Tyr Thr Gly Gln His Phe Asn Ile Pro Ala Ile Thr Lys Ala Gly

225 230 235 240

Gln Ala Lys Gly Cys Tyr Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Val Gly

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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 56

Met Glu Pro Ser Ser Leu Glu Leu Pro Ala Asp Thr Val Gln Arg Ile

1 5 10 15

Ala Ala Glu Leu Lys Cys His Pro Thr Asp Glu Arg Val Ala Leu His

20 25 30

Leu Asp Glu Glu Asp Lys Leu Arg His Phe Arg Glu Cys Phe Tyr Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Met Val Lys Thr Tyr Leu Glu Glu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Lys

85 90 95

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

100 105 110

Asp Glu Ser Ile Val Gly Leu Met Lys Asp Ile Val Gly Ala Asn Glu

115 120 125

Lys Glu Ile Ala Leu Met Asn Ala Leu Thr Val Asn Leu His Leu Leu

130 135 140

Met Leu Ser Phe Phe Lys Pro Thr Pro Lys Arg Tyr Lys Ile Leu Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Arg Glu Gly Glu Glu Thr Leu Arg Ile Glu Asp Ile Leu Glu Val Ile

195 200 205

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

210 215 220

Phe Tyr Thr Gly Gln His Phe Asn Ile Pro Ala Ile Thr Lys Ala Gly

225 230 235 240

Gln Ala Lys Gly Cys Tyr Val Gly Phe Asp Leu Ala His Ala Val Gly

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Phe Ile His Glu Lys His Ala His Thr Ile Lys Pro Ala Leu Val Gly

290 295 300

Trp Leu Gly His Glu Leu Ser Thr Arg Phe Lys Met Asp Asn Lys Leu

305 310 315 320

Gln Leu Ile Pro Gly Val Cys Gly Phe Arg Ile Ser Asn Pro Pro Ile

325 330 335

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

340 345 350

Met Lys Ala Leu Arg Lys Lys Ser Val Leu Leu Thr Gly Tyr Leu Glu

355 360 365

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

370 375 380

Pro Val Val Asn Ile Ile Thr Pro Ser His Val Glu Glu Arg Gly Cys

385 390 395 400

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

405 410 415

Leu Glu Lys Arg Gly Val Val Cys Asp Lys Arg Asn Pro Asn Gly Ile

420 425 430

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

435 440 445

Phe Thr Asn Leu Leu Thr Ser Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Lys Asn

450 455 460

<210> 57

<211> 420

<212> PRT

<213> 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 Gly Asn Trp Tyr Asn Ser Leu

65 70 75 80

Glu Glu Pro Ile Val Arg Pro Leu Ser Lys Ile Leu Gly Ala Glu Ser

85 90 95

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 Gly Asp Phe Ala Val Gly Cys Ser
225 230 235 240
Tyr Lys Tyr Leu Cys Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Ala Tyr Val
245 250 255

His Ala Ser His His His Gln Gln Phe Val Arg Phe Ser Gly Trp Trp
260 265 270
Gly Asn Asp Pro Asn Thr Arg Phe Tyr Phe Pro Lys Glu Phe Val Pro
275 280 285
Tyr Gly Gly Ala Ser Ser Trp Gln Val Ser Thr Pro Ser Ile Leu Ala
290 295 300
Lys Leu Pro Leu Ile Ala Ala Leu Glu Val Phe Glu Glu Ala Gly Met
305 310 315 320

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

Leu Lys Thr Ile

420