

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 707 711**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2014 PCT/US2014/053437**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15031771**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2014 E 14840339 (7)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 3038636**

(54) Título: **Administración de enzimas reductoras de quinurenina para tratamiento tumoral**

(30) Prioridad:

**30.08.2013 US 201361872132 P
30.04.2014 US 201461986366 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2019

(73) Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
210 West 7th Street
Austin, TX 78701, US**

(72) Inventor/es:

GEORGIOU, GEORGE y STONE, EVERETT

(74) Agente/Representante:

INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E INVENCIONES, SLP

ES 2 707 711 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Administración de enzimas reductoras de quinurenina para tratamiento tumoral

5 Antecedentes de la invención

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de las solicitudes provisionales de Estados Unidos número 61/872.132, presentada el 30 de agosto de 2013 y 61/986.366, presenta el 30 de abril de 2014.

10 La invención se hizo con el apoyo gubernamental con la subvención n.º R01 CA154754 otorgada por los National Institutes of Health. El Gobierno tiene determinados derechos sobre la invención.

1. Campo de la invención

15 La invención se refiere en general a composiciones para su uso en un método para el tratamiento del cáncer con enzimas que reducen la L-quinurenina o L-3-hidroxiquinurenina. Más particularmente, se refiere a la genomanipulación, optimización farmacológica y uso de enzimas bacterianas y de mamífero con actividad degradante de L-quinurenina adecuadas para tratamiento de seres humanos.

20 **2. Descripción de la técnica relacionada**

La sobreexpresión de las isoformas de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO1 o IDO2) por las células cancerosas o la reprogramación de los leucocitos de infiltración en cáncer para que expresen estas enzimas ha demostrado tener un efecto profundo sobre la atenuación de respuestas inmunitarias adaptativas contra el cáncer. IDO1 e IDO2, así como

25 la enzima triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), cuya expresión por las células estromales puede inducirse por algunos tumores, catalizan la etapa limitante de la velocidad en el catabolismo de triptófano (Trp) en L-quinurenina (KYN) (Godin-Ethier *et al.*, 2011). Los tumores intercambian una molécula de KYN citosólica por una molécula de Trp extracelular usando un intercambiador de aminoácidos de tipo LAT1 (Kaper *et al.*, 2007), que tiene el efecto doble sobre las células inmunitarias de elevar localmente los niveles de KYN mientras reduce localmente los niveles de Trp.

30 Las células inmunitarias adyacentes internalizan KYN, donde es un ligando activador para el receptor de hidrocarburo arilo (AHR) que provoca la expresión de numerosas citocinas y quimiocinas que dan lugar a tolerancia tumoral mediante diferenciación de células inmunitarias y/o inducción de apoptosis (Della Chiesa *et al.*, 2006; Opitz *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011). Adicionalmente, otros compuestos relacionados con KYN formados a partir de quinurenina, muy notablemente el ácido quinurénico también ejercen un efecto inmunosupresor funcionando como agonistas del

35 GPCR huérfano GPCR35. La inhibición de la formación de KYN (y, por tanto, la inhibición de la formación de subproductos de metabolismo de KYN, incluyendo el ácido quinurénico, 3-hidroxil quinurenina y ácido quinolínico, mediante la inhibición de IDO1 o TDO ha recibido una cantidad significativa de atención como diana contra el cáncer (Chen y Guillemin, 2009; Rutella *et al.*, 2009; Prendergast, 2011). Se han desarrollado inhibidores de análogos de sustrato, tales como 1-DL-metiltriptófano, para IDO1 y han resultado inicialmente prometedores en la superación de

40 la tolerancia tumoral inducida por cáncer, restaurando de este modo la capacidad del sistema inmunitario nativo de combatir los tumores (Lob *et al.*, 2009). Sin embargo, KYN también se produce por la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), que también se expresa frecuentemente en tumores, y esta enzima no se inhibe por 1-DL-metiltriptófano (Pilotte *et al.*, 2012). También hay preocupaciones adicionales con el isómero de D 1-DL-metiltriptófano (1-D-MT) actualmente en ensayos clínicos en fase 1 y 2. Paradójicamente, 1-D-MT puede regular por aumento la expresión de IDO1, aumentando realmente los niveles de KYN e induciendo la inmunosupresión en determinados cánceres (Opitz *et al.*, 2011).

45 El control de la producción tumoral de KYN es el centro de muchas investigaciones y tiene el potencial de tratar, entre otros, cánceres tales como cáncer de mama, carcinoma de ovario, glioblastoma y carcinoma pancreático. Se sabe que KYN suprime la proliferación, así como que induce la apoptosis en linfocitos T y linfocitos NK (Opitz *et al.*, 2011; Mandi y Vacsei, 2012) posibilitando que los tumores evadan la detección y destrucción por el sistema inmunitario de un paciente. KYN es un ligando potente del receptor de hidrocarburo arilo (AHR) cuya activación en linfocitos T induce la diferenciación en linfocitos T reguladores (Treg) CD25+FoxP3+ (Mezrich *et al.*, 2010). También se ha demostrado que KYN evita la regulación por aumento mediada por citocinas de receptores específicos (NKP46 y NKG2D) necesaria

55 para la eliminación celular mediada por NK en líneas de células tumorales (Della Chiesa *et al.*, 2006), una acción que también está mediada probablemente por su efecto agonista sobre AHR (Shin *et al.*, 2013). También hay evidencias clínicas de la vinculación de niveles de KYN en suero elevados y la supervivencia disminuida en múltiples tipos de cáncer. En pacientes sanos, los niveles de KYN en suero están en el intervalo de 0,5 a 1 µM. En pacientes con tipo de cáncer que producen KYN, tales como linfoma difuso de linfocitos B grandes, los niveles de KYN en suero se

60 midieron en como mucho 10 veces mayores (Yoshikawa *et al.*, 2010; de Jong *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2011) y fueron pronósticos de supervivencia entre pacientes con linfoma que reciben el mismo régimen de tratamiento; aquellos con niveles en suero por debajo de 1,5 µM mostraban una tasa de supervivencia en 3 años de un 89 %, en comparación con únicamente un 58 % de supervivencia para aquellos con niveles de KYN por encima de 1,5 µM. Esta diferencia en la supervivencia se atribuyó a los efectos inmunosupresores de KYN (Yoshikawa *et al.*, 2010). El uso de inhibidores de IDO de molécula pequeña, tales como 1-D-MT, ha demostrado la utilidad de controlar los niveles de KYN en la restauración de la función inmunitaria, pero los efectos inespecíficos de la regulación por aumento de IDO1 por 1-D-

MT y la ausencia de inhibición de TDO y la isoforma IDO1 son preocupantes.

La presente invención divulga el uso de enzimas para la reducción específica de KYN y sus metabolitos en tumores y/o en la sangre. Se usan enzimas reductoras de KYN para disminuir las concentraciones de KYN para el tratamiento de tumores que expresan IDO1, IDO2 o TDO, evitando de este modo los efectos tolerogénicos mediados por el tumor y mediando en su lugar las respuestas proinflamatorias de ablación tumoral. De forma notable, el uso de enzimas para la reducción de KYN y los subproductos metabólicos de KYN evita los problemas asociados con inhibidores de moléculas pequeña de las isoformas de IDO y de TDO analizados anteriormente y evita completamente además los efectos inespecíficos que acompañan muy habitualmente a los fármacos de molécula pequeña y dan lugar a toxicidades imprevisibles y los efectos secundarios.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende una quinureninasa o un ácido nucleico que codifica una quinureninasa para su uso en un método para el tratamiento de un tumor en un sujeto. Aspectos de la presente invención superan una deficiencia principal en la técnica de proporcionar enzimas que comprenden secuencias polipeptídicas bacterianas y de mamífero que puedan degradar la L-quinurenina y 3-hidroxi-L-quinurenina y presentar farmacocinética favorable en suero como se desea para el tratamiento del cáncer. En algunos aspectos, la enzima quinureninasa puede tener mayor actividad catalítica hacia quinurenina que hacia 3'OH-quinurenina. Puede usarse una quinureninasa de una especie bacteriana. Dicha enzima puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7 y 13-52 o una versión modificada de las mismas. En particular, el agente terapéutico puede obtenerse de la enzima quinureninasa de *Pseudomonas fluorescens*, (*Pf-KYNU*). Como alternativa, puede usarse una quinureninasa de *Saccharomyces cerevisiae* o *Neurospora crassa*. El agente terapéutico puede obtenerse se la enzima quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis*. Además, para evitar los efectos adversos debidos a la inmunogenicidad de las quinureninasas heterólogas, puede usarse la enzima de *Homo sapiens* u otras quinureninasas de primate que presentan un >95 % de identidad de secuencia con la enzima humana. Por ejemplo, una enzima novedosa puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7-9.

En otros aspectos, un polipéptido que comprende una quinureninasa humana o de primate nativa o modificada que puede degradar KYN y que tiene actividad hacia la degradación de 3-hidroxiquinurenina o ácido quinurénico puede estar comprendido en la composición de la presente invención. En algunas realizaciones, el polipéptido puede tener capacidad de degradación de KYN en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, el polipéptido puede tener una eficacia catalítica por KYN (K_{cat}/K_m) de al menos o aproximadamente, 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 $^{-1}$ o cualquier intervalo derivable en los mismos.

Un polipéptido modificado como se analiza anteriormente puede caracterizarse por tener un determinado porcentaje de identidad en comparación con un polipéptido no modificado (por ejemplo, un polipéptido nativo) o con cualquier secuencia polipeptídica divulgada en este documento. por ejemplo el polipéptido no modificado puede comprender al menos, o hasta, aproximadamente 150, 200, 250, 300, 350, 400 restos (o cualquier intervalo derivable en los mismos) de una quinureninasa nativa. El porcentaje de identidad puede ser de aproximadamente, de como mucho o de al menos un 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % (o cualquier intervalo derivable en los mismos) entre los polipéptidos modificado y no modificado, o entre dos secuencias cualesquiera en comparación. También se contempla que el porcentaje de identidad analizado anteriormente puede referirse a una región modificada particular de un polipéptido en comparación con una región no modificada de un polipéptido. por ejemplo, un polipéptido puede contener un sitio de reconocimiento de sustrato modificado o mutante de una quinureninasa que puede caracterizarse basándose en la identidad de la secuencia de aminoácidos del sitio de reconocimiento de sustrato modificado o mutante de la quinureninasa con el de una quinureninasa no modificada o mutante de la misma especie o entre las especies. Un polipéptido humano modificado o mutante caracterizado, por ejemplo, con al menos un 90 % de identidad con una quinureninasa no modificada significa que al menos un 90 % de los aminoácidos en ese polipéptido humano modificado o mutante son idénticos a los aminoácidos en el polipéptido no modificado.

Dicho polipéptido no modificado puede ser una quinureninasa nativa, particularmente una isoforma humana u otras isoformas de primate. Por ejemplo, la quinureninasa humana nativa puede tener la secuencia de la SEQ ID NO: 8. Ejemplos no limitantes de otras quinureninasas de primate nativas incluyen la quinureninasa de *Pongo abelii* (Genbank ID: XP_002812508.1; SEQ ID NO: 10), la quinureninasa de *Macaca fascicularis* (Genbank ID: EHH54849.1; SEQ ID NO: 11), y la quinureninasa de *Pan troglodytes* (Genbank ID: XP_003309314.1; SEQ ID NO: 12). Los polipéptidos nativos ejemplares incluyen una secuencia que tiene aproximadamente, de como mucho o de al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad (o cualquier intervalo derivable en los mismos) de la SEQ ID NO: 8 o 10-12 o un fragmento de las mismas. Por ejemplo, el polipéptido nativo puede comprender al menos o hasta aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 415 restos (o cualquier intervalo derivable en los mismos) de la secuencia de la SEQ ID NO: 8 o 10-12.

En algunas realizaciones, la quinureninasa nativa puede modificarse por una o más modificaciones diferentes, tales

como modificaciones químicas, sustituciones, inserciones, eliminaciones y/o truncamientos. Por ejemplo, las modificaciones pueden ser en un sitio de reconocimiento de sustrato de la enzima nativa. En una realización particular, la quinureninasa nativa puede modificarse por sustituciones. Por ejemplo, el número de sustituciones puede ser una, dos, tres, cuatro o más. En realizaciones adicionales, la quinureninasa nativa puede modificarse en el sitio de reconocimiento de sustrato o cualquier ubicación que pueda afectar a la especificidad de sustrato.

5 En una realización, está comprendida una quinureninasa humana modificada y aislada, en la que la enzima modificada tiene al menos una sustitución respecto a una quinureninasa humana nativa (véase la SEQ ID NO: 8) y en la que la al menos una sustitución incluye una sustitución de Met o Leu por una Phe normalmente encontrada en la posición 306 10 de quinureninasa humana nativa. Por tanto, en un aspecto, se proporciona una enzima quinureninasa humana modificada y aislada que comprende una sustitución Phe306Met. En otro aspecto, se proporciona una enzima quinureninasa humana modificada y aislada que comprende una sustitución Phe306Leu.

15 En algunos aspectos, la presente invención también contempla polipéptidos que comprende una quinureninasa unida a una secuencia de aminoácidos heteróloga. Por ejemplo, la quinureninasa puede unirse a la secuencia de aminoácidos heteróloga como una proteína de fusión. En una realización particular, la quinureninasa puede unirse a secuencias de aminoácidos, tales como un Fc de IgG, albúmina, una proteína de unión a albúmina o un polipéptido XTEEN para aumentar la semivida *in vivo*.

20 Para la estabilidad en suero, la quinureninasa puede unirse a una o más moléculas de poliéter. En una realización particular, el poliéter puede ser polietilenglicol (PEG). El polipéptido puede unirse (por ejemplo, covalentemente) a PEG mediante resto de aminoácidos específicos, tales como lisina o cisteína. Para la administración terapéutica, dicho polipéptido que comprende la quinureninasa puede dispersarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En algunos aspectos, un ácido nucleico que codifica dicha quinureninasa está comprendido en la composición de la presente invención. En algunas realizaciones, el ácido nucleico tiene los codones optimizados para su expresión en bacterias. En realizaciones particulares, la bacteria es *E. coli*. En otros aspectos, el ácido nucleico tiene los codones optimizados para su expresión en hongos (por ejemplo, levaduras), insectos o mamíferos. La presente invención contempla además vectores, tales como vectores de expresión, que contienen dichos ácidos nucleicos. En 30 realizaciones particulares, el ácido nucleico que codifica la quinureninasa está unido de forma funcional a un promotor, incluyendo aunque sin limitación, promotores heterólogos. En una realización, una quinureninasa puede suministrarse a una célula diana mediante un vector (por ejemplo, un vector de genoterapia). Dichos virus pueden haberse modificado por tecnología de ADN recombinante para posibilitar la expresión del ácido nucleico que codifica quinureninasa en la célula diana. Estos vectores pueden obtenerse de vectores de origen no vírico (por ejemplo, plásmidos) o vírico (por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociado, retrovirus, lentivirus, herpesvirus o virus vaccinia). Los vectores no víricos preferiblemente están en complejo con agentes para facilitar la entrada del ADN a través de la membrana celular. Los ejemplos de dichos complejos de vector no vírico incluyen la formulación con agentes poliactiónicos que facilitan la condensación del ADN y sistemas de suministro basados en lípidos. Un ejemplo de un sistema de suministro basado en lípidos incluiría el suministro basado en liposomas de ácidos nucleicos.

40 40 En otros aspectos más, células hospedadoras que comprenden dichos vectores están comprendidas en la composición de la presente invención. Las células hospedadoras pueden ser bacterias (por ejemplo, *E. coli*, células fúngicas (por ejemplo, levaduras), células de insecto o células de mamífero).

45 En algunas realizaciones, los vectores se introducen en células hospedadoras para expresar la quinureninasa. Las proteínas pueden expresarse de cualquier manera adecuada. En una realización, las proteínas se expresan en una célula hospedadora de modo que la proteína se glucosile. En otra realización, las proteínas se expresan en una célula hospedadora de modo que la proteína se aglucosile.

50 La presente invención contempla la composición de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento mediante la administración del péptido quinureninasa, el ácido nucleico que codifica la quinureninasa en un vector de genoterapia, o la formulación de la presente invención, o para tratar células tumorales o sujetos con cáncer. El sujeto puede ser cualquier animal, tal como un ratón. Por ejemplo, el sujeto puede ser un mamífero, particularmente un primate, y más particularmente un paciente humano. En algunas realizaciones, el método puede comprender seleccionar un paciente con cáncer.

55 En algunas realizaciones, el cáncer es cualquier cáncer que sea sensible a reducción de quinurenina. En una realización, la presente invención contempla un método de tratamiento de una célula tumoral o un paciente con cáncer, que comprende administrar una formulación que comprende dicho polipéptido. En algunas realizaciones, la administración se produce en condiciones de modo que al menos una parte de las células del cáncer se eliminan. En otra realización, la formulación comprende dicha quinureninasa con actividad degradante de quinurenina en condiciones fisiológicas y que comprende además una cadena de polietilenglicol unida. En alguna realización, la formulación es una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de las quinureninas analizadas anteriormente y excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichos excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos para los expertos en la materia. Todas las quinureninas anteriores pueden contemplarse como útiles para tratamiento de seres humanos.

En una realización adicional, el método de tratamiento de una célula tumoral puede comprender la administración de una formulación que comprende una quinureninasa no bacteriana (de mamífero, por ejemplo, de primate o ratón) que tiene actividad degradante de quinurenina o un ácido nucleico que codifica la misma.

5 La administración o tratamiento puede estar dirigido a la fuente de nutrientes de las células, y no necesariamente a las propias células. Por lo tanto, en una aplicación *in vivo*, el tratamiento de una célula tumoral incluye poner en contacto el medio nutriente para una población de células tumorales con la quinureninasa. En esta realización, el medio puede ser sangre, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y líquidos corporales similares donde se desea la
10 reducción de quinurenina.

De acuerdo con determinados aspectos de la presente invención, dicha formulación que contiene la quinureninasa puede administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intrasinoval, intratraqueal, intransal, intravítreo, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, a la mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, por inhalación, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada, mediante un catéter, mediante un lavado, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas) o por otro método o cualquier combinación de los anteriores como sabría un experto en la materia.

20 En una realización adicional, el método también puede comprender la administración de al menos un segundo tratamiento antineoplásico al sujeto. El segundo tratamiento antineoplásico puede ser un tratamiento quirúrgico, quimioterapia, radioterapia, crioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia o tratamiento con citocinas. En determinados aspectos, el segundo tratamiento antineoplásico puede ser un anticuerpo anti-PD-1, anti-CTLA-4 o anti-PD-L1.

25 En alguna realización, se contempla una célula que comprende un receptor de antígeno químérico (CAR) y una enzima quinureninasa para su uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer. En algunos aspectos, la célula puede transfectarse con un ADN que codifica el CAR y la quinureninasa y, en algunos casos, una transposasa.

30 El CAR puede estar dirigido a cualquier antígeno de célula cancerosa de interés, incluyendo, por ejemplo, HER2, CD19, CD20 y GD2. Las regiones o dominio de unión a antígeno pueden comprender un fragmento de las cadenas V_H y V_L de un fragmento variable monocatenario (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal humano particular, tal como los descritos en la patente de Estados Unidos 7.109.304. El fragmento puede ser innumerables dominios de unión a antígeno diferentes de un anticuerpo humano específico de antígeno. En una realización más específica, el fragmento es un scFv específico de antígeno codificado por una secuencia que está optimizada para el uso de codones humanos para su expresión en células humanas. Para ejemplos adicionales de CAR, véase, por ejemplo, el documento WO 2012/031744, el documento WO 2012/079000, el documento WO 2013/059593 y la patente de Estados Unidos 8.465.743.

35 La quinureninasa puede ser cualquier quinureninasa divulgada en este documento. Los métodos de transfección de células son bien conocidos en la técnica, pero en determinados aspectos, se emplean métodos de transfección altamente eficaces tales como electroporación. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden introducirse en células usando un aparato de nucleofeción. Preferiblemente, la etapa de transfección no implica infectar o transducir las células con virus, que puede causar genotoxicidad y/o dar lugar a una respuesta inmunitaria contra las células que contienen las secuencias víricas en un sujeto tratado.

40 45 Se conoce una amplia gama de construcciones de CAR y vectores de expresión para las mismas en la técnica y se detallan adicionalmente en este documento. Por ejemplo, en algunos aspectos, el vector de expresión de CAR es un vector de expresión de ADN tal como un plásmido, vector de expresión lineal o un episoma. En algunos aspectos, el vector comprende secuencias adicionales, tales como secuencias que facilitan la expresión del CAR, tal como un promotor, potenciador, señal de poli-A y/o uno o más intrones. En aspectos preferidos, la secuencia codificante de CAR está flanqueada por secuencias de transposón, de modo que la presencia de una transposasa permite que la secuencia codificante se integre en el genoma de la célula transfectada.

50 55 En determinados aspectos, las células se transfectan además con una transposasa que facilita la integración de una secuencia codificante de CAR en el genoma de las células transfectadas. En algunos aspectos, la transposasa se proporciona como vector de expresión de ADN. Sin embargo, en aspectos preferidos, la transposasa se proporciona como un ARN expresable o una proteína, de modo que no se produzca expresión a largo plazo de la transposasa en las células transgénicas. Puede usarse cualquier sistema de transposasa de acuerdo con las realizaciones. En otros aspectos, las células pueden infectarse con un lentivirus para facilitar la integración de la secuencia codificante de CAR y la secuencia codificante de quinureninasa en el genoma de la célula.

60 65 En la presente invención, se proporciona una composición que comprende una quinureninasa o un ácido nucleico que codifica una quinureninasa para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto. Dicha quinureninasa puede ser cualquier quinureninasa de las realizaciones.

Pueden emplearse realizaciones analizadas en el contexto de métodos y/o composiciones de la invención con

respecto a cualquier otro método o composición descrito en este documento. Por tanto, una realización que se refiere a un método o composición puede aplicarse a otros métodos y composiciones de la invención también.

5 Como se usa en este documento, los términos "codificar" o "codificador", con referencia a un ácido nucleico, se usan para hacer que la invención sea fácilmente comprensible para los expertos en la materia; sin embargo, estos términos pueden usarse indistintamente con "comprender" o "comprendiendo", respectivamente.

10 Como se usa en la memoria descriptiva de este documento, "un" o "uno/a" puede significar uno/a o más. Como se usa en este documento, en la reivindicación o reivindicaciones, cuando se usa junto con la palabra "comprendiendo", las palabras "un" o "uno/a" puede significar uno/a o más de uno/a.

15 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para indicar "y/o" salvo que se indique explícitamente que se hace referencia a alternativas únicamente o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación mantiene una definición que se refiere a únicamente alternativas e "y/o". Como se usa en este documento, "otro" puede indicar al menos un segundo o más.

20 Durante toda esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, empleándose el método para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

25 Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración únicamente.

25 Breve descripción de los dibujos

30 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en este documento.

FIG. 1 - SDS-PAGE del (carril 1) patrón de PM PRECISION PLUS PROTEIN™ (BioRad) (carriles 2-4) concentraciones crecientes de *Pf-KYNU* y (carril 5) *Pf-KYNU* modificado con PEG de 5000 de PM.

35 **FIG. 2** - Estabilidad de *Pf-KYNU* en (cuadrado vacío) PBS y (círculo vacío) suero humano combinado.

FIG. 3 - Eficacia de PEG-*Pf-KYNU* en un modelo de melanoma de ratón B16 autólogo medida por tasas de crecimiento tumoral. (Cuadrado relleno) PEG-*Pf-KYNU* inactivada por calor. (Círculo relleno) PEG-*Pf-KYNU* activa.

40 **FIG. 4** - Eficacia de PEG-*Pf-KYNU* en un modelo de melanoma de ratón B16 autólogo medida por supervivencia. (Cuadrado relleno) PEG-*Pf-KYNU* inactivada por calor. (Círculo relleno) PEG-*Pf-KYNU* activa.

45 **FIG. 5A-B** - Ratones tratados con PEG-*Pf-KYNU* inactivada por calor. (•) Ratones tratados con PEG-*Pf-KYNU* activa. FIG. 5A - La población de linfocitos T reguladores CD4+ en circulación es significativamente más pequeña en el grupo tratado con PEG-*Pf-KYNU* activa. FIG. 5B - La población de linfocitos T CD8+ de infiltración tumoral muestra expresión significativamente mayor de granzima B e interferón γ.

50 **FIG. 6** - Selección genética de la actividad quinureninasa en *E. coli*. Células de *E. coli*-*AtpE* sembradas en placas de medio mínimo M9 con discos de papel de filtro en L-Trp (Trp), tampón (-), ácido antranílico (AA) o L-Kyn (Kyn).

55 **FIG. 7** - Estabilidad *in vitro* de quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis* (*Mu-KYNU*). Actividad como una función del tiempo de *Mu-KYNU* (cuadrado vacío) en PBS a 37 °C con una $^1T_{1/2} = 6$ h con una amplitud de un 74 % de actividad restante y una posterior $^2T_{1/2} = 150$ h y (círculo relleno) en suero humano combinado a 37 °C con una $^1T_{1/2} = 5$ h con una amplitud de un 30 % de actividad restante y una posterior $^2T_{1/2} = 73$ h.

60 FIG. 8 - Diagrama de Kaplan-Meier de aloinjertos B16 en ratones C57BL/6J tratados con PEG-*Pf-KYNU* (--) PEG-*Pf-KYNU* desactivada (-•), anti-PD1 (••) o anti-CTLA-4 (■). Las flechas indican los días de tratamiento, (A) indica tratamiento con anticuerpo, (E) indica tratamiento con enzima.

65 **FIG. 9A-C** - FIG. 9A - Ratones C57BL/6J que albergan aloinjertos de tumor B16 tratados con PBS (círculo) (control), anti-PDI en solitario(cuadrado), anti-PD1/PEG-*Mu-KYNU* (triángulo invertido) o anti-PD1/PEG-*Pf-KYNU* (triángulo bocarriba). FIG. 9B - Se observaron efectos aditivos con el tratamiento de combinación de anti-PD1/PEG-*Mu-KYNU* que elimina un 60 % de los tumores y la combinación de anti-PD1/PEG-*Mu-KYNU* que elimina un 20 % de los tumores en combinación con una eliminación tumoral de un 0 % con anti-PDI en solitario. FIG. 9C - Diagrama de Kaplan-Meier correspondiente.

FIG. 10A-B - FIG. 10A - Ratones C57BL/6J que albergan aloinjertos de tumor B16 tratados con PEG-Mu-KYNU inactivada por calor (■) o PEG-Mu-KYNU activa (▲). FIG. 10B - Diagrama de Kaplan-Meier correspondiente que representa la mediana del tiempo de supervivencia de 25 días para PEG-Mu-KYNU (---) y la mediana del tiempo de supervivencia de 22 días para PEG-Mu-KYNU inactivada por calor (—) (las flechas indican los días de tratamiento).

Descripción de realizaciones ilustrativas

10 La quinurenina es un metabolito del aminoácido triptófano generado mediante la acción de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) o triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO). La quinurenina ejerce múltiples efectos sobre la fisiología celular, uno de los más importantes de los cuales es la modulación de las repuestas de linfocitos T. Muchas células tumorales regulan la síntesis de IDO y/o TDO elevando la concentración local de quinurenina, que viene acompañada por la reducción de triptófano. Los altos niveles de quinurenina sirven como un potente medio para inhibir la función de los linfocitos T de infiltración tumoral que de lo contrario atacarían al tumor.

15 La presente invención proporciona composiciones que comprenden enzimas degradantes de quinurenina como un medio para reducir los niveles de quinurenina locales en el microentorno tumoral, así como en el suero y, por tanto prevenir la supresión mediada por el tumor de la acción de los linfocitos T. Las enzimas hidrolizantes de quinurenina (quinureninasas) convierten la quinurenina en alanina y ácido antranílico, el último de los cuales no se conoce por afectar a la función de linfocitos T. Los autores de la invención generaron una preparación farmacéutica de enzima quinureninasa para posibilitar que la enzima persista durante tiempos prolongados en condiciones fisiológicas. Los autores de la invención entonces mostraron que la administración intratumoral de la enzima provoca un retardo drástico del crecimiento de un tumor agresivo en ratones.

25 I. Definiciones

Como se usa en este documento, los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a compuestos que comprenden aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos y se usan indistintamente.

30 Como se usa en este documento, la expresión "proteína de fusión" se refiere a una proteína químérica que contiene proteínas o fragmentos proteínicos unidos de forma funcional de una manera no nativa.

35 Como se usa en este documento, el término "semivida" (vida ½) se refiere al tiempo que se requeriría para que la concentración de un polipéptido disminuyera en la mitad *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, después de inyección en un mamífero.

40 Las expresiones "en combinación funcional", "en orden funcional" y "unido de forma funcional" se refieren a una unión en la que los componentes así descritos están en una relación que les permiten funcionar de su manera pretendida, por ejemplo, una unión de secuencias de ácido nucleico de tal manera que una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la transcripción de un gen dado y/o la síntesis de la molécula proteínica deseada, o una unión de secuencias de aminoácidos de tal manera que se produce una proteína de fusión.

45 Se entiende que el término "conector" se refiere a un compuesto o resto que actúa como puente molecular para unir de forma funcional dos moléculas diferentes, en el que una parte del conector está unido de forma funcional a una primera molécula y en el que otra parte del conector está unido de forma funcional a una segunda molécula.

50 El término "PEGilado" se refiere a la conjugación con polietilenglicol (PEG), que se ha usado ampliamente como vehículo de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. El PEG puede acoplarse (por ejemplo, unirse covalentemente) a agentes activos mediante los grupos hidroxilo al final de la cadena de PEG mediante métodos químicos; sin embargo, el propio PEG está limitado a como mucho dos agentes activos por molécula. En una estrategia diferente, se han explorado copolímeros de PEG y aminoácidos como biomaterial novedoso que retendría la biocompatibilidad de PEG, pero que tendría la ventaja añadida de numerosos puntos de adhesión por molécula (proporcionando, por tanto, mayor carga de fármaco) y que puede diseñarse sintéticamente para adecuarse a una diversidad de aplicaciones.

55 El término "gen" se refiere a una secuencia de ADN que comprende secuencias de control y codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor del mismo. El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia codificante para que se retenga la actividad enzimática deseada.

60 El término "nativo" se refiere a la forma típica de un gen, un producto génico o una característica de ese gen o producto génico cuando se aísle de una fuente de origen natural. Una forma nativa es aquella que se observa más frecuentemente en una población natural y, por tanto, se denomina arbitrariamente la forma normal o de tipo silvestre. Por el contrario, el término "modificado", "variante" o "mutante" se refiere a un gen o producto génico que presenta modificación en la secuencia y propiedades funcionales (es decir, características alteradas) en comparación con el gen nativo o producto génico.

- El término "vector" se usa para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico transportadora en que puede insertarse una secuencia de ácidos nucleicos para su introducción en una célula donde puede replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es foránea a la célula en la que se está introduciendo el vector o que la secuencia es homologa a una secuencia de la célula, pero está una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en que no se encuentra habitualmente la secuencia. Los vectores incluyen plásmidos, cósidos, virus (bacteriófagos, virus de animales y virus de plantas) y cromosomas artificiales (por ejemplo YAC). Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes convencionales (véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1988 y Ausubel *et al.*, 1994).
- La expresión "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifica un ARN que puede transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN después se traducen en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas de antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida de forma funcional en una célula hospedadora particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que cumplen otras funciones también y se describen *infra*.
- La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en este documento, se refiere a una cantidad de células y/o composición terapéutica (tal como un polinucleótido terapéutico y/o polipéptido terapéutico) que se emplea en métodos para conseguir un efecto terapéutico. La expresión "beneficio terapéutico" o "terapéuticamente eficaz", como se usa durante toda esta solicitud se refiere a cualquier cosa que promueve o potencia el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de esta afección. Esto incluye, aunque sin limitación, una reducción en la frecuencia o gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento del cáncer puede implicar, por ejemplo, una reducción en el tamaño de un tumor, una reducción en la capacidad de invasión de un tumor, reducción en la tasa de crecimiento del cáncer o prevención de la metástasis. El tratamiento del cáncer también puede referirse a prolongar la supervivencia de un sujeto con cáncer.
- El término " K_m ", como se usa en este documento, se refiere a la constante de Michaelis-Menten para una enzima y se define como la concentración del sustrato específico a la que una enzima dada produce la mitad de su velocidad máxima en una reacción catalizada por enzima. El término " k_{cat} ", como se usa en este documento, se refiere al número de recambio o el número de moléculas de sustrato que cada sitio enzimático convierte en producto por unidad de tiempo, y en que la enzima está funcionando a eficacia máxima. El término " k_{cat}/K_m ", como se usa en este documento, es la constante de especificidad, que es una medida de la eficacia con que una enzima convierte un sustrato en producto.
- La expresión "receptores de antígeno químicos (CAR)", como se usa en este documento, puede referirse a receptores de linfocitos T artificiales, receptores de linfocito T químicos o inmunorreceptores químicos, por ejemplo, y abarcan receptores genomanejados que injertan una especificidad artificial en una célula efectora inmunitaria particular. Los CAR pueden emplearse para conferir la especificidad de un anticuerpo monoclonal a un linfocito T, permitiendo de ese modo que se genere una gran cantidad de linfocitos T específicos, por ejemplo, para su uso en tratamiento celular adoptivo. En realizaciones específicas, los CAR dirigen la especificidad de la célula a un antígeno asociado a tumor, por ejemplo. En algunas realizaciones, los CAR comprenden un dominio de activación intracelular, un dominio transmembranario y un dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno asociado a tumor. En aspectos particulares, los CAR comprenden fusiones de fragmentos variables monocatenarios (scFv) derivados de anticuerpos monoclonales (tales los descritos en la patente de estos unidos 7.109.304), fusionados a dominios transmembranarios CD3-zeta y endodomínios. La especificidad de otros diseños de CAR puede obtenerse de ligandos de receptores (por ejemplo, péptidos) o de receptores de reconocimiento de patrones, tales como lectinas. En realizaciones particulares, se pueden abordar linfocitos B malignos redirigiendo la especificidad de los linfocitos T usando un CAR específico para la molécula de linaje B, CD19. En determinados casos, el espaciado del dominio de reconocimiento de antígeno puede modificarse para reducir la muerte celular inducida por activación. En determinados casos, los CAR comprenden dominios para señalización coestimuladora adicional, tal como CD3-zeta, FcR, CD27, CD28, CD137, DAP10 y/u OX40. En algunos casos, pueden coexpresarse moléculas con el CAR, incluyendo moléculas coestimuladoras, genes indicadores para imágenes (por ejemplo, para tomografía de emisión de positrones), productos génicos que destruyen de forma condicionada los linfocitos T tras la adición de un profármaco, receptores de migración dirigida, quimiocinas, receptores de quimiocinas, citocinas y receptores de citocinas.
- "Tratamiento" y "tratar" se refieren a la administración o aplicación de un agente terapéutico a un sujeto o la realización de un procedimiento o modalidad en un sujeto con el fin de obtener un beneficio terapéutico de una enfermedad o afección relacionada con la salud. Por ejemplo, un tratamiento puede incluir la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una quinureninasa.
- "Sujeto" y "paciente" se refieren a un ser humano o un animal no humano, tal como primates, mamíferos y vertebrados. En realizaciones particulares, el sujeto es un ser humano.

II. Polipéptidos de quinureninasa

- Algunas quinureninas se refieren a proteínas y polipéptidos modificados. Realizaciones particulares se refieren a una proteína o polipéptido modificado que muestra al menos una actividad funcional que es comparable a la versión no modificada, preferentemente, la actividad degradante quinurenina o la actividad degradante de 3'-hidroxi-quinurenina. En aspectos adicionales, la proteína o polipéptido puede modificarse adicionalmente para aumentar la estabilidad en suero. Por tanto, cuando la presente solicitud se refiere a la función o actividad de "proteína modificada" o un "polipéptido modificado", un experto en la materia entendería que esto incluye, por ejemplo, una proteína o polipéptido que posee una ventaja adicional sobre la proteína o polipéptido no modificado, tal como actividad degradante de quinurenina o actividad degradante de 3'-hidroxi-quinurenina. En determinadas realizaciones, la proteína o polipéptido no modificado es una quinureninasa nativa, preferiblemente una quinureninasa humana o la quinureninasa de *Pseudomonas fluorescens*. Se contempla específicamente que pueden implementarse realizaciones que se refieren a una "proteína modificada" con respecto a un "polipéptido modificado" y viceversa.
- La determinación de la actividad puede conseguirse usando ensayos conocidos para los expertos en la materia, particularmente con respecto a la actividad de la proteína, y pueden incluir, para fines de comparación, el uso de versiones nativas y/o recombinantes de la proteína o polipéptido modificado o sin modificar.
- En determinadas realizaciones, un polipéptido modificado, tal como una quinureninasa modificada, puede identificarse basándose en su aumento en la actividad degradante de quinurenina y/o 3'-hidroxi-quinurenina. Por ejemplo, pueden reconocerse sitios de reconocimiento de sustrato del polipéptido no modificado. Esta identificación puede basarse en el análisis estructural o análisis de homología. Puede generarse una población de mutantes que implican modificaciones de dichos sitios de reconocimiento de sustrato. En una realización adicional, pueden seleccionarse mutantes con actividad degradante de quinurenina aumentada de la población mutante. La selección de mutantes deseados puede incluir métodos, tales como detección de subproductos o productos de la degradación de quinurenina.
- Las proteínas modificadas pueden poseer eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos; por tanto, una proteína con una eliminación, una proteína con una sustitución, y una proteína con una eliminación y una sustitución son proteína modificadas. En algunas realizaciones, estas proteínas modificadas pueden incluir además inserciones o aminoácidos añadidos, tales como con proteínas de fusión o proteínas con conectores, por ejemplo. Una "proteína con eliminación modificada" carece de uno o más restos de la proteína nativa, pero puede poseer la especificidad y/o actividad de la proteína nativa. Una "proteína con eliminación modificada" también puede tener inmunogenicidad o antigenicidad reducida. Un ejemplo de una proteína con eliminación modificada es una que tiene un resto de aminoácido eliminado de al menos una región antigénica, es decir, una región de la proteína que se ha determinado que es antigénica en un organismo particular, tal como el tipo de organismo al que puede administrarse la proteína modificada.
- Las variantes de sustitución o remplazo típicamente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, particularmente sus funciones efectoras y/o biodisponibilidad. Las sustituciones pueden ser conservativas o no, es decir, un aminoácido se remplaza con uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservativas son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina; leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina.
- Además de una delección o sustitución, una proteína modificada puede poseer una inserción de restos, que típicamente implica la adición de al menos un resto en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de un péptido o polipéptido de dirección o simplemente un único resto. Las adiciones terminales, llamadas proteínas de fusión, se analizan a continuación.
- La expresión "equivalente biológicamente funcional" está bien comprendida en la técnica y se define adicionalmente en detalle en este documento. Por consiguiente, secuencias que tienen entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 80 %, o entre aproximadamente un 81 % y aproximadamente un 90 %, o incluso entre aproximadamente un 91 % y aproximadamente un 99 % de aminoácidos que son idénticos o funcionalmente equivalentes a los aminoácidos de un polipéptido de control se incluyen, con la condición de que se mantenga la actividad biológica de la proteína. Una proteína modificada puede ser biológicamente equivalente funcionalmente a su equivalente nativo en determinados aspectos.
- También se entenderá que secuencias de aminoácidos y ácido nucleico pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos adicionales de extremo N o C o secuencias 5' o 3', y aún ser esencialmente como se expone en una de las secuencias divulgadas en este documento, siempre que la secuencia cumpla los criterios expuestos anteriormente, incluyendo el mantenimiento de la actividad proteínica biológica, donde se ve afectada la expresión de la proteína. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácido nucleico que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes que flanquean las partes 5' o 3' de la región codificante o pueden incluir diversas secuencias internas, es decir, intrones, que se sabe que se producen dentro de los genes.

III. Degradación enzimática de quinurenina para tratamiento

- 5 Los polipéptidos se usan para el tratamiento de cánceres que son sensibles a la reducción de quinurenina, con enzimas que reducen la quinurenina, para evitar los efectos tolerogénicos mediados por el tumor y en su lugar median respuestas proinflamatorias de ablación tumoral. En determinados aspectos, se contemplan quinureninas para su uso en el tratamiento de tumores que expresan IDO1, IDO2 y/o TDO.
- 10 Determinados aspectos de la presente invención proporcionan una quinureninasa modificada para el tratamiento de enfermedades, tales como tumores. Particularmente, el polipéptido modificado puede tener secuencias polipeptídicas humanas y, por tanto, puede prevenir reacciones alérgicas en pacientes humanos, permitir la dosificación repetida y aumentar la eficacia terapéutica.
- 15 Los tumores para los que son útiles los presente métodos de tratamiento incluyen cualquier tipo celular maligno, tal como los encontrados en un tumor sólido o un tumor hemático. Los tumores sólidos ejemplares pueden incluir, aunque sin limitación, un tumor de un órgano seleccionado del grupo que consiste en páncreas, colon, ciego, estómago, cerebro, cabeza, cuello, ovario, riñón, laringe, sarcoma, pulmón, vejiga, melanoma, próstata y mano. Los tumores hemáticos ejemplares incluyen tumores de la médula ósea, neoplasias de linfocitos T o B, leucemias, linfomas, blastomas, mielomas y similares. Ejemplos adicionales de cánceres que pueden tratarse usando los métodos 20 proporcionados en este documento incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, cáncer escamocelular, cáncer broncopulmonar (incluyendo cáncer broncopulmonar microcítico, cáncer broncopulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer del estroma gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de propagación superficial, melanoma maligno lentigo, melanoma lentiginoso acral, melanomas nodulares, así como linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no hodgkiniano (NHL) 25 de grado bajo/folicular; NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de grado alto; NHL linfoblástico de grado alto; NHL de células no escindidas pequeño de grado alto; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia 30 de células capilares, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda (AML) y leucemia mieloblástica crónica.
- 35 El cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a estos: neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma, indiferenciado; carcinoma de gigantocitos y células fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma escamocelular; carcinoma linfoepitelial; carcinoma basocelular; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular combinado y colangiocarcinoma; 40 adenocarcinoma trabecular; carcinoma quístico adenoide; adenocarcinoma en pólipos adenomatosos; adenocarcinoma, poliposis familiar coli; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma bronquiolo-alveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromófobo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxífilo; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma de la corteza suprarrenal; carcinoma 45 endometrioides; carcinoma de apéndices cutáneos; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma canalicular infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, de mama; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con 50 metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor del estroma de ovario, maligno; tecoma, maligno; tumor de células de la granulosa, maligno; androblastoma, maligno; carcinoma de células de sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de propagación superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epiteliales; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; 55 histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomirosarcoma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario; rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto muleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoides, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; bocio ovárico, maligno; coriocarcinoma; mesonefroma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de gigantocitos de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblastico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblastico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendrogioma; oligodendroblastoma; 60 neuroectodermo primitivo; sarcoma cerebelar; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, 65

- 5 maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoides; otros linfomas no hodgkinianos especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y leucemia de células capilares.
- 10 La quinureninasa puede usarse en este documento como un agente antitumoral en una diversidad de modalidades para reducir la quinurenina y/o 3'-hidroxi-quinurenina del tejido tumoral, o la circulación de un mamífero con cáncer, o para la reducción de quinurenina donde se considera deseable su reducción.
- 15 La reducción puede realizarse *in vivo* en la circulación de un mamífero, *in vitro* en casos donde se desea la reducción de quinurenina y 3'-hidroxi-quinurenina en cultivo tisular u otros medios biológicos, y en procedimientos *ex vivo* donde se manipulan líquidos biológicos, células o tejidos fuera del organismo y posteriormente se devuelven al organismo del mamífero paciente. La reducción de quinurenina de la circulación, medio de cultivo, líquidos biológicos o células se realiza para reducir la cantidad de quinurenina accesible al material que se está tratando y, por lo tanto, comprende poner en contacto el material a reducir con una cantidad reductora de quinurenina de la quinureninasa en condiciones reductoras de quinurenina para degradar la quinurenina ambiental en el material que se pone en contacto.
- 20 La reducción puede estar dirigida a la fuente de nutrientes de las células, y no necesariamente a las propias células. Por lo tanto, en una aplicación *in vivo*, el tratamiento de una célula tumoral incluye poner en contacto el medio nutriente para una población de células tumorales con la quinureninasa. En esta realización, el medio puede ser sangre, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y líquidos corporales similares donde se desea la reducción de quinurenina.
- 25 La eficacia de reducción de quinurenina y 3'-hidroxi-quinurenina puede variar ampliamente dependiendo de la aplicación, y típicamente depende de la cantidad de quinurenina presente en el material, la tasa deseada de reducción y la tolerancia del material para exposición a quinureninasa. Los niveles de quinurenina y metabolito de quinurenina en un material y, por lo tanto, las tasas de reducción de quinurenina y metabolito de quinurenina del material, pueden controlarse fácilmente por una diversidad de métodos químicos y bioquímicos bien conocidos en la técnica. Las 30 cantidades de reducción de quinurenina ejemplares se describen adicionalmente en este documento y pueden variar de 0,001 a 100 unidades (U) de quinureninasa, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 10 U, y más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 5 U de quinureninasa por mililitro (ml) de material a tratar. Las dosificaciones típicas pueden administrarse basándose en el peso corporal, y están en el intervalo de 5-1000 U/kilogramo (kg)/día, preferiblemente aproximadamente 5-100 U/kg/día, más preferiblemente aproximadamente 35 10-50 U/kg/día y más preferiblemente aproximadamente 20-40 U/kg/día..
- 35 Las condiciones de reducción de quinurenina son condiciones de tampón y temperatura compatibles con la actividad biológica de una quinureninasa, e incluyen condiciones de temperatura, salinidad y pH moderadas compatibles con la enzima, por ejemplo, condiciones fisiológicas. Las condiciones ejemplares incluyen aproximadamente 4-40 °C, fuerza iónica equivalente a aproximadamente 0,05 a 0,2 M de NaCl y un pH de aproximadamente 5 a 9, aunque se incluyen las condiciones fisiológicas.
- 40 La invención contempla el uso de una quinureninasa como un agente antitumoral y, por lo tanto, comprende poner en contacto una población de células tumorales con una cantidad terapéuticamente eficaz de quinureninasa durante un periodo de tiempo suficiente para inhibir el crecimiento de células tumorales.
- 45 En una realización, el contacto *in vivo* se consigue administrando, por inyección intraperitoneal intravenosa o intratumoral, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición fisiológicamente tolerable que comprende una quinureninasa de esta invención a un paciente, reduciendo de ese modo la fuente de quinurenina de las células tumorales presentes en el paciente.
- 50 Una cantidad terapéuticamente eficaz de una quinureninasa es una cantidad predeterminada calculada para conseguir el efecto deseado, es decir, para reducir la quinurenina en el tejido tumoral o en la circulación de un paciente y, de ese modo, mediar una respuesta proinflamatoria de ablación tumoral. Por tanto, los intervalos de dosificación para la 55 administración de quinureninasa de la invención son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado en que se reducen los síntomas de la división celular y el ciclo célula del tumor. La dosificación no debe ser tan grande que cause efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva, efectos neurológicos y similares. En general, la dosificación variará con la edad, estado, género y grado de la enfermedad del paciente y puede determinarse por un experto en la materia. La dosificación puede 60 ajustarse por el médico individual en caso de cualquier complicación.
- 65 La quinureninasa puede administrarse por vía parenteral por inyección o por infusión gradual a lo largo del tiempo. La quinureninasa puede administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal, oral, intramuscular, subcutánea, intracavidad, transdérmica, dérmica, puede conseguirse por medios peristáticos, puede inyectarse directamente en el tejido que contiene las células tumorales o puede administrarse mediante una bomba conectada a un catéter que puede contener un biodetector potencial para quinurenina.

Las composiciones terapéuticas que contienen quinureninasa se administran convencionalmente por vía intravenosa, como por inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. La expresión "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición terapéutica se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificación unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido, es decir, excipiente o vehículo.

5 Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrarse depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema del sujeto de utilizar el ingrediente activo y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para administrarse dependen del criterio del facultativo y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para aplicación sistémica se divulan en este documento y dependen de la vía de administración. Las pautas adecuadas para administración inicial y las dosis de refuerzo también se contemplan y se tipifican por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas mediante una inyección posterior u otra administración. Se describen en este documento administraciones múltiples ejemplares y se prefieren particularmente para mantener niveles en suero y tejido continuamente altos de quinureninasa y, a la inversa, niveles en suero y tejido bajos de quinurenina. Como alternativa, se contempla infusión intravenosa continua suficiente para mantener las concentraciones en la sangre en los intervalos especificados para tratamientos *in vivo*.

10 15

20 **IV. Conjugados**

Las composiciones de la presente invención implican quinureninasas modificadas, tales como mediante la formación de conjugados con segmentos peptídicos heterólogos o polímeros, tales como polietilenglicol. En aspectos adicionales, las quinureninasas pueden unirse a PEG para aumentar el radio hidrodinámico de la enzima y, por tanto, aumentar la persistencia en suero. En determinados aspectos, el polipéptido divulgado puede conjugarse con un agente de dirección, tal como un ligando que tiene la capacidad de unirse específicamente y de forma estable a un receptor externo o sitio de unión en una célula tumoral (publicación de patente de Estados Unidos 2009/0304666).

30 **A. Proteínas de fusión**

Determinadas realizaciones de la presente invención se refieren a proteínas de fusión. Estas moléculas pueden tener una quinureninasa nativa o modificada unida en el extremo N o C a un dominio heterólogo. Por ejemplo, las fusiones también pueden emplear secuencias líder de otro especie para permitir la expresión recombinante de una proteína en un hospedador heterólogo. Otra fusión útil incluye la adición de una marca de afinidad proteínica, tal como una marca de afinidad de seroalbúmina o seis restos de histidina, o un dominio inmunológicamente activo, tal como un epítopo de anticuerpo, preferiblemente escindible, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. Las marcas de afinidad no limitantes incluyen polihistidina, proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP) y glutatión S transferasa (GST).

35 40

En una realización particular, la quinureninasa puede unirse a un péptido que aumenta la semivida *in vivo*, tal como un polipéptido XTEN (Schellenberger *et al.*, 2009), dominio Fc de IgG, albúmina o péptido de unión a albúmina.

Los métodos de generación de proteínas de fusión son bien conocidos para los expertos en la materia. dichas proteínas pueden producirse, por ejemplo, por síntesis de *novo* de la proteína de fusión completa, o por adhesión de la secuencia de ADN que codifica el dominio heterólogo, seguida de la expresión de la proteína de fusión intacta.

La producción de proteínas de fusión que recuperan las actividades funcionales de las proteínas precursoras puede facilitarse conectando genes con un segmento de ADN de puente que codifica un conector peptídico que sufre corte y empalme entre los polipéptidos conectados en tandem. El conector sería de longitud suficiente para permitir el plegamiento apropiado de la proteína de fusión resultante.

50

B. Conectores

En determinadas realizaciones, la quinureninasa puede conjugarse químicamente usando reactivos de reticulación bifuncionales o fusionarse a nivel de proteína con conectores peptídicos.

Los reactivos de reticulación bifuncionales se han usado ampliamente para una diversidad de fines, incluyendo la preparación de matrices de afinidad, la modificación y estabilización de diversas estructuras, la identificación de sitios de unión a ligando y receptor y estudios estructurales. Los conectores peptídicos adecuados también pueden usarse para unir la quinureninasa, tal como conectores de Gly-Ser.

Los reactivos homobifuncionales que portan dos grupos funcionales idénticos demostraron ser altamente eficaces en la inducción de reticulación entre macromoléculas idénticas y diferentes o subunidades de una macromolécula, y la unión de ligandos polipeptídicos a sus sitios de unión específicos. Los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes. Aprovechando las reactividades diferenciales de los dos grupos funcionales diferentes, la reticulación puede controlarse tanto de forma selectiva como de forma secuencial. Los reactivos de reticulación

55 60 65

bifuncionales pueden dividirse de acuerdo con la especificidad de sus grupos funcionales, por ejemplo, grupos específicos de amino, sulfidrilo, guanidino, indol, carboxilo. De estos, los reactivos dirigidos a grupos amino libres han llegado a ser especialmente populares a causa de su disponibilidad comercial, facilidad de síntesis y las condiciones de reacción leves en que pueden aplicarse.

5 Una mayoría de reactivos de reticulación heterobifuncionales contienen un grupo reactivo de amina primaria y un grupo reactivo de tiol. En otro ejemplo, se describen reactivos de reticulación heterobifuncionales y métodos de uso de los reactivos de reticulación (patente de Estados Unidos n.º 5.889.155). Los reactivos de reticulación combinan un resto de hidracida nucleófilo con un resto de maleimida electrófilo, que permite el acoplamiento, en un ejemplo, de aldehídos a tioles libres. El reactivo de reticulación puede modificarse para reticular diversos grupos funcionales.

10 Adicionalmente, puede usarse cualquier otro agente de unión/acoplamiento y/o mecanismos conocidos para los expertos en la materia para combinar quinureninasa, tales como, por ejemplo, interacción de anticuerpo-antígeno, uniones de avidina biotina, uniones amida, uniones éster, uniones tioéster, uniones éter, uniones tioéster, uniones fosfoéster, uniones fosforamida, uniones aldehído, uniones disulfuro, interacciones iónicas e hidrófobas, anticuerpos biespecíficos y fragmentos de anticuerpo, o combinaciones de los mismos.

15 Se prefiere emplear un reticulante que tenga estabilidad razonable en la sangre. Se conocen numerosos tipos de conectores que contienen enlace disulfuro que pueden emplearse satisfactoriamente para conjugar agentes de dirección y terapéuticos/preventivos. Los conectores que contienen un enlace disulfuro que está estéricamente impedido pueden demostrar dar mayor estabilidad *in vivo*. Estos conectores, por tanto, son un grupo de agentes de unión.

20 Además de los reticulante impedidos, también pueden emplearse conectores no impedidos de acuerdo con ello. Otros reticulante útiles, que no se considera que contengan o generen un disulfuro protegido, incluyen SATA, SPDP y 2-iminotiolano (Wawrzynczak y Thorpe, 1987). El uso de dichos reticulantes está bien comprendido en la técnica. Otra realización implica el uso de conectores flexibles.

25 Una vez conjugado químicamente, el péptido generalmente se purificará para separar el conjugado de los agentes no conjugados y de otros contaminantes. Está disponible una gran cantidad de técnicas de purificación para su uso en proporcionar conjugados de un grado suficiente de pureza para hacer que sean clínicamente útiles.

30 Los métodos de purificación basados en la separación por tamaño, tal como filtración en gel, impregnación en gel o cromatografía de líquidos de alto rendimiento, generalmente serán los de mayor uso. También pueden usarse otras técnicas cromatográficas, tales como separación en Blue-Sepharose. Los métodos convencionales para purificar las proteínas de fusión de los cuerpos de inclusión pueden ser útiles, tales usando detergentes débiles, tales como N-lauroil-sarcosina de sodio (SLS).

C. PEGilación

35 En este documento, se divultan métodos y composiciones que se refieren a la PEGilación de quinureninasa. Por ejemplo, la quinureninasa puede PEGilarse de acuerdo con los métodos divulgados en este documento.

40 La PEGilación es el proceso de adhesión covalente de cadenas poliméricas de polietilenglicol con otra molécula, normalmente un fármaco o proteína terapéutica. La PEGilación se consigue de forma rutinaria mediante la incubación de un derivado reactivo de PEG con la macromolécula diana. La adhesión covalente de PEG a un fármaco o proteína terapéutica puede "enmascarar" el agente del sistema inmunitario del hospedador (inmunogenicidad y antigenicidad reducidas) o aumentar el tamaño hidrodinámico (tamaño en solución) del agente, que prolonga su tiempo en circulación reduciendo la eliminación renal. La PEGilación también puede proporcionar solubilidad en agua a fármacos y proteína hidrófobas.

45 La primera etapa de la PEGilación es la funcionalización adecuada del polímero de PEG en uno o ambos extremos. Los PEG que se activan en cada extremo con el mismo resto reactivo se conocen como "homobifuncional", mientras que si los grupos funcionales presentes son diferentes, entonces el derivado de PEG se denomina "heterobifuncional" o "heterofuncional". Los derivados químicamente activos o activados del polímero de PEG se preparan para adherir el PEG a la molécula deseada.

50 La elección del grupo funcional adecuado para el derivado de PEG se basa en el tipo de grupo reactivo disponible en la molécula que se acoplará al PEG. Para proteínas, los aminoácidos reactivos típicos incluyen lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina y tirosina. También puede usarse el grupo amino del extremo N y el ácido carboxílico del extremo C.

55 Las técnicas usadas para formar derivados de PEG de primera generación en general son hacer reaccionar el polímero de PEG con un grupo que es reactivo con grupos hidroxilo, típicamente anhídridos, cloruros ácidos, cloroformiato y carbonatos. En la química de PEGilación de segunda generación se hacen disponibles para la conjugación grupos funcionales más eficaces, tales como aldehído, ésteres, amidas, etc.

Como las aplicaciones de la PEGilación han llegado a ser cada vez más avanzadas y sofisticadas, ha habido un aumento en la necesidad de PEG heterobifuncionales para la conjugación. Estos PEG heterobifuncionales son muy útiles en la unión de dos entidades, donde se necesita un espaciador hidrófilo, flexible y biocompatible. Los grupos finales preferidos para PEG heterobifuncionales son maleimida, vinilsulfonas, disulfuro de piridilo, amina, ácidos carboxílicos y ésteres de NHS.

5 Los agentes de modificación más comunes, o conectores, se basan en molécula de metoxi PEG (mPEG). Su actividad depende de la adición de un grupo modificador de proteína al extremo alcohol. En algunos casos, se usa polietilenglicol (PEG diol) como molécula precursora. El diol se modifica posteriormente en ambos extremos para generar una molécula unida a PEG hetero u homodimérica.

10 Las proteínas en general se PEGilan en sitios nucleófilos, tales como tioles no protonados (restos de cisteinilo) o grupos amino. Los ejemplos de reactivos de modificación especifican de cisteinilo incluyen PEG maleimida, PEG yodoacetato, PEG tioles y PEG vinilsulfona. Los cuatro son fuertemente específicos de cisteinilo en condiciones suaves y neutros a pH ligeramente alcalino, pero cada uno tiene algunos inconvenientes. El tioéter formado con las maleimidas puede ser algo inestable en condiciones alcalinas de modo que puede haber alguna limitación a las opciones de formulación con este conector. La unión de carbamotioato formada con PEG de yodo es más estable, pero el yodo libre puede modificar los restos de tirosina en algunas condiciones. Los PEG tioles forman enlaces disulfuro con tioles de proteína, pero esta unión también puede ser inestable en condiciones alcalinas. La reactividad de PEG vinilsulfona es relativamente baja en comparación con maleimida y yodo PEG; sin embargo, la unión tioéter formada es bastante estable. Su tasa de reacción más lenta puede hacer que la reacción de PEG-vinilsulfona sea más fácil de controlar.

15 20 25 La PEGilación específica de sitio en restos de cisteinilo nativos raramente se realiza, ya que estos restos habitualmente están en forma de enlaces disulfuro o se requieren para la actividad biológica. Por otro lado, la mutagénesis dirigida al sitio puede usarse para incorporar sitios de PEGilación de cisteinilo para conectores específicos de tiol. La mutación de cisteína debe diseñarse de modo que sea accesible para el reactivo de PEGilación y aún sea biológicamente activo después de la PEGilación.

30 35 40 Los agentes de modificación específicos de amina incluyen éster de NHS de PEG, tresilato de PEG, aldehído de PEG, isotiocianato de PEG y otros varios. Todos reaccionan en condiciones suaves y son muy específicos para grupos amino. El éster de NHS PEG es probablemente uno de los agentes más reactivos; sin embargo, su alta reactividad puede hacer que la reacción de PEGilación sea difícil de controlar a gran escala. El PEG aldehído forma una imina con el grupo amino, que después se reduce en una amina secundaria con cianoborohidruro de sodio. A diferencia de borohidruro de sodio, el cianoborohidruro de sodio no reducirá los enlaces disulfuro. Sin embargo, este agente químico es muy tóxico y debe manipularse cuidadosamente, particularmente a pH inferior donde llega a ver volátil.

45 Debido a los múltiples restos de lisina en la mayoría de las proteínas, la PEGilación específica de sitio puede ser un reto. Afortunadamente, como estos reactivos reaccionan con grupos amino no protonados, es posible dirigir la PEGilación a grupos amino de pK inferior realizando la reacción a un pH inferior. En general, el pK del grupo alfa amino es 1-2 unidades de pH inferior que el grupo épsilon amino de los restos de lisina. PEGilando la molécula a pH 7 o más bajo, frecuentemente puede obtenerse una alta selectividad para el extremo N. Sin embargo, esto es únicamente factible si la parte del extremo N de la proteína no es necesaria para la actividad biológica. Además, los beneficios farmacocinéticos de la PEGilación frecuentemente compensan una pérdida significativa de bioactividad *in vitro*, produciendo un producto con bioactividad *in vivo* mucho mayor respecto a la química de PEGilación.

50 55 Hay varios parámetros que considerar cuando se desarrolla un procedimiento de PEGilación. Afortunadamente, habitualmente no hay más de cuatro o cinco parámetros clave. La estrategia de "diseño de experimentos" para la optimización de las condiciones de PEGilación puede ser muy útil. Para reacciones de PEGilación específica de tiol, los parámetros a considerar incluyen: concentración de proteína, relación de PEG a proteína (en una base molar), temperatura, pH, tiempo de reacción y en algunos casos, la exclusión de oxígeno. (El oxígeno puede contribuir a la formación de disulfuro intermolecular por la proteína, que reducirá el rendimiento del producto PEGilado.) Los mismos factores deben considerarse (con la excepción del oxígeno) para la modificación específica de amina excepto que el pH puede ser incluso más crítico, particularmente cuando se aborda el grupo amino del extremo N.

60 Para ambas modificaciones específicas de amina y tiol, las condiciones de reacción pueden afectar a la estabilidad de la proteína. Esto puede limitar la temperatura, la concentración de proteína y el pH. Además, la reactividad del conector PEG debe conocerse antes de empezar la reacción de PEGilación. Por ejemplo, si el agente de PEGilación es únicamente un 70 % activo, la cantidad de PEG usada debe asegurar que se cuentan únicamente las moléculas de PEG activas en la estequiometría de la reacción de proteína a PEG.

V. Proteínas y péptidos

65 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones novedosas que comprenden al menos una proteína o péptido, que es una quinureninasa. Estos péptidos pueden estar comprendidos en una proteína

de fusión o conjugados a un agente como se describe *supra*.

- Como se usa en este documento, una proteína o péptido en general se refiere, aunque sin limitación, a una proteína de más de aproximadamente 200 aminoácidos, hasta una secuencia de longitud completa traducida desde un gen; un polipéptido de más de aproximadamente 100 aminoácidos; y/o un péptido de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos. Por motivos de conveniencia, los términos "proteína", "polipéptido", y "péptido" se usan indistintamente en este documento.
- Como se usa en este documento, un "resto de aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido de origen natural, cualquier derivado de aminoácido o cualquier mimético de aminoácido conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, los restos de la proteína o péptido son secuenciales, sin ninguna entidad no aminoacídica interrumpiendo la secuencia de restos de aminoácido. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender una o más moléculas no aminoacídicas. En realizaciones particulares, la secuencia de restos de la proteína o péptido puede estar interrumpida por uno o más restos no aminoacídicos.
- Por consiguiente, la expresión "proteína o péptido" abarca secuencias de aminoácidos que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes encontrados en las proteínas de origen natural, o al menos un aminoácido modificado o inusual.
- Las proteínas o péptidos pueden generarse por cualquier técnica conocida para los expertos en la materia, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos mediante técnicas convencionales de biología molecular, el aislamiento de proteínas o péptidos de fuentes naturales o la síntesis química de proteínas o péptidos. Las secuencias de nucleótidos y proteínicas, polipeptídicas y peptídicas correspondientes a diversos genes se han divulgado previamente, y pueden encontrarse en bases de datos informatizadas conocidas para los expertos en la materia. Una de dichas bases de datos es el National Center for Biotechnology Information's Genbank y la base de datos GenPept (disponible en internet en ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones codificantes de genes conocidos pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas divulgadas en este documento o como sabrán los expertos en la materia. Como alternativa, se conocen diversas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos por los expertos en la materia.

VI. Ácidos nucleicos y vectores

- En determinados aspectos de la invención, secuencias de ácido nucleico que codifican una quinureninasa o una proteína de fusión que contiene una quinureninasa pueden estar comprendidas por la composición de la presente invención. Dependiendo del sistema de expresión que se use, pueden seleccionarse secuencias de ácido nucleico basadas en métodos convencionales. Por ejemplo, si la quinureninasa se obtiene de quinureninasa humana y contiene múltiples codones que se utilizan infrecuentemente en *E. coli*, entonces eso puede interferir con la expresión. Por lo tanto, los genes respectivos o variantes de los mismos pueden optimizarse para los codones para su expresión en *E. coli*. También pueden usarse diversos vectores para expresar la proteína de interés. Los vectores ejemplares incluyen, aunque sin limitación, vectores plasmídicos, vectores víricos, transposones o vectores basados en liposomas.

VII. Células hospedadoras

- Las células hospedadoras pueden ser cualquiera que puede transformarse para permitir la expresión y secreción de quinureninasa y conjugados de la misma. Las células hospedadoras pueden ser bacterias, células de mamífero, levaduras u hongos filamentosos. Diversas bacterias incluyen *Escherichia* y *Bacillus*. Las levaduras que pertenecen a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, o *Pichia* encontrarían uso como célula hospedadora apropiada. Pueden usarse diversas especies de hongos filamentosos como hospedadores de expresión, incluyendo los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Achlya*, *Podospora*, *Endothia*, *Mucor*, *Cochliobolus*, y *Pyricularia*.

- Los ejemplos de organismos hospedadores adecuados incluyen bacterias, por ejemplo, *Escherichia coli* MC1061, derivados de *Bacillus subtilis* BRB1 (Sibakov *et al.*, 1984), *Staphylococcus aureus* SAI123 (Lordanescu, 1975) o *Streptococcus lividans* (Hopwood *et al.*, 1985); levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* AH 22 (Mellor *et al.*, 1983) o *Schizosaccharomyces pombe*; y hongos filamentosos, por ejemplo, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus awamori* (Ward, 1989), o *Trichoderma reesei* (Penttila *et al.*, 1987; Harkki *et al.*, 1989).

- Los ejemplos de células hospedadoras de mamífero incluyen células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61), células de pituitaria de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de riñón de mono trasformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650), y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658). Lo anterior es ilustrativo, aunque no limitante, de los muchos organismos hospedadores posibles conocidos en la técnica. En principio, pueden usarse todos los hospedadores con capacidad de secreción ya sean procariotas o eucariotas.

- Las células hospedadoras de mamífero que expresan la quinureninasa y/o sus proteínas de fusión se cultivan en condiciones típicamente empleadas para cultivar la línea celular precursora. En general, las células se cultivan en un

medio convencional que contiene sales y nutrientes fisiológicos, tales como RPMI, MEM, IMEM o DMEM convencionales, típicamente complementados con suero al 5 %-10 %, tal como suero bovino fetal. Las condiciones de cultivo también son convencionales, por ejemplo, los cultivos se incuban a 37 °C en cultivos estacionarios o de balanceo hasta que se consiguen los niveles deseados de las proteínas.

5

VIII. Purificación de proteínas

Las técnicas de purificación de proteínas son bien conocidas para los expertos en la materia. Estas técnicas implican, a un nivel, la homogeneización y fraccionamiento en bruto de las células, tejido u órgano en fracciones polipeptídicas y no polipeptídicas. La proteína o polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para conseguir la purificación parcial o completa (o purificación hasta homogeneidad) salvo que se especifique lo contrario. Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunofijación y enfoque isoelectrónico. Un método particularmente eficaz de purificación de péptidos es cromatografía de líquidos de rápido rendimiento (FPLC) o incluso cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC).

Se pretende que una proteína o péptido purificado se refiera a una composición, aislable de otros componentes, en la que la proteína o péptido se purifica a cualquier grado respecto a su estado obtenible de forma natural. Una proteína o péptido aislado o purificado, por lo tanto, también se refiere a una proteína o péptido libre del entorno en que puede producirse de forma natural. En general, "purificado" se referirá a una composición proteínica o peptídica que se ha sometido a fraccionamiento para retirar otros diversos componentes, y cuya composición retiene sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa la expresión "sustancialmente purificada", esta denominación se referirá a una composición en que la proteína o péptido forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 95 % o más de las proteínas en la composición.

Son bien conocidas para los expertos en la materia diversas técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas. Estas incluyen, por ejemplo, la precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares, o mediante desnaturización térmica, seguida por centrifugación; etapas de cromatografía, tales como cromatografía de intercambio iónico, de filtración en gel, de fase inversa, con hidroxiapatita y de afinidad; enfoque isoelectrónico; electroforesis en gel; y combinaciones de estas y otras técnicas. Como se sabe en general en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede cambiarse, y que pueden omitirse determinadas etapas y aún dar como resultado un método adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.

Los expertos en la materia conocen diversos métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o péptido a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa o evaluar la cantidad de polipéptidos dentro de una fracción por análisis de SDS/PAGE. Un método preferido para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, compararla con la actividad específica del extracto inicial y calcular, por tanto, el grado de pureza en el mismo, evaluada por un "número de purificación factorial". Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular elegida para seguir la purificación, y si la proteína o péptido expresado muestra o no una actividad detectable.

No hay necesidades generales de que la proteína o péptido siempre se proporcione en su estado más purificado. De hecho, se contempla que productos sustancialmente menos purificados puedan tener utilidad en determinadas realizaciones. La purificación parcial puede conseguirse usando menos etapas de purificación en combinación, o utilizando diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC generalmente producirá una purificación "factorial" mayor que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que muestran un menor grado de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto proteínico o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.

En determinadas realizaciones, puede aislarse o purificarse una proteína o péptido, por ejemplo, una quinureninasa, una proteína de fusión que contiene una quinureninasa o una quinureninasa modificada después de PEGilación. Por ejemplo, una marca de His o un epítopo de afinidad puede estar comprendido en dichas quinureninas para facilitar la purificación. La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que depende de la afinidad específica entre una sustancia a aislar y una molécula a la que puede unirse específicamente. Este es un tipo de interacción de receptor-ligando. El material de la columna sintetiza acoplado covalentemente uno de los compañeros de unión a una matriz insoluble. El material de la columna entonces puede adsorber específicamente la sustancia de la solución. La elución se produce cambiando las condiciones a aquellas en que no se producirá la unión (por ejemplo, alteración del pH, fuerza iónica, temperatura, etc.). La matriz debe ser una sustancia que no adsorba moléculas a ningún grado significativo y que tenga una amplia gama de estabilidad química, física y térmica. El ligando debe acoplarse de tal manera que no afecte a sus propiedades de unión. El ligando también debe proporcionar unión relativamente estrecha. Debe ser posible eluir la sustancia sin destruir la muestra o el ligando.

- La cromatografía de exclusión molecular (SEC) es un método cromatográfico en que moléculas en solución se separan basándose en su tamaño, o en términos más técnicos, su volumen hidrodinámico. Habitualmente se aplica a moléculas grandes o complejos macromoleculares, tales como proteínas y polímeros industriales. Típicamente, cuando se usa una solución acuosa para transportar la muestra a través de la columna, la técnica se conoce como cromatografía de filtración en gel, frente al nombre de cromatografía por impregnación en gel, que se usa cuando se usa un disolvente orgánico como fase móvil.
- El principio subyacente de SEC es que partículas de diferentes tamaños eluirán (filtrarán) a través de una fase estacionaria a diferentes tasas. Esto provoca la separación de una solución de partículas basada en el tamaño. Con la condición de que todas las partículas se carguen simultáneamente o casi simultáneamente, las partículas del mismo tamaño deben eluir conjuntamente. Cada columna de exclusión molecular tiene un intervalo de masas moleculares que puede separar. El límite de exclusión define la masa molecular en el extremo superior de este intervalo y es donde las moléculas son demasiado grandes para quedarse atrapadas en la fase estacionaria. El límite de impregnación define la masa molecular en el extremo inferior del intervalo de separación y es donde las moléculas de un tamaño suficientemente pequeño pueden penetrar en los poros de la fase estacionaria completamente y todas las moléculas por debajo de esta masa molecular son demasiado pequeñas para eluir como una única banda.
- La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (o cromatografía de líquidos de alta presión, HPLC) es una forma de cromatografía en columna usada frecuentemente en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos. La HPLC utiliza una columna que aloja un material de compactación cromatográfico (fase estacionaria), una bomba que mueve la fase o fases móviles a través de la columna y un detector que muestra los tiempos de retención de las moléculas. El tiempo de retención varía dependiendo de las interacciones entre la fase estacionaria, las moléculas que se están analizando y el disolvente o disolventes usados.
- ## IX. Composiciones farmacéuticas
- Se contempla que la quinureninasa novedosa puede administrarse de forma sistémica o local para inhibir el crecimiento de células tumorales y, muy preferiblemente, para eliminar células cancerosas en pacientes con cáncer con cánceres avanzados localmente o metastásicos. Pueden administrarse por vía intravenosa, intratecal y/o intraperitoneal. Pueden administrarse en solitario o en combinación con fármacos antiproliferativos. En una realización, se administran para reducir la carga cancerosa en el paciente antes de la cirugía u otros procedimientos. Como alternativa, pueden administrarse después de cirugía para asegurar que no sobrevivirá ningún cáncer restante (por ejemplo, cáncer que la cirugía no ha logrado eliminar).
- No se pretende que la presente invención esté limitada por la naturaleza particular de la preparación terapéutica. Por ejemplo, dichas composiciones pueden proporcionarse en formulaciones junto con vehículos, diluyentes y excipientes líquidos, en gel o sólidos fisiológicamente tolerables. Estas preparaciones terapéuticas pueden administrarse a mamíferos para uso veterinario, tal como con animales domésticos, y uso clínico en seres humanos de una manera similar a otros agentes terapéuticos. En general, la dosificación requerida para la eficacia terapéutica variará dependiendo del tipo de uso y modo de administración, así como de las necesidades particulares de los sujetos individuales.
- Dichas composiciones típicamente se preparan como soluciones o suspensiones líquidas, como inyectables. Son diluyentes y excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, las composiciones pueden contener cantidades mínimas de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes estabilizantes o agentes tamponantes de pH.
- Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, puede ser necesario preparar composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas, anticuerpos y fármacos en una forma apropiada para la aplicación pretendida. En general, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad eficaz de una o más quinureninas o agentes adicionales disueltos o dispersados en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra indeseada cuando se administra a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según lo apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una quinureninasa aislada por el método divulgado en este documento, o ingrediente activo adicional será conocida para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, tal como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed., 1990. Además, para administración a animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridas por la FDA Office of Biological Standards.
- Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, tintes, así como materiales y combinaciones de los mismos, serían conocidos

para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed., 1990). Excepto en la medida de que cualquier vehículo convencional sea compatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

- 5 Determinadas realizaciones de la presente invención pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se tienen que administrar en forma sólida, líquida o de aerosol, y si tiene que ser estéril para la vía de administración, tal como inyección. Las composiciones pueden administrarse por vía intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrarectal, intramuscular, subcutánea, a la mucosa, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), por inyección, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada que baña las células diana directamente, mediante un catéter, mediante un lavado, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas) o por otros métodos o cualquier combinación de los anteriores como sabrían los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed., 1990).
- 10 15 Los polipéptidos modificados pueden formularse en una composición en una forma de base libre, neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteínica, o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de galénicas, tales como formuladas para administración parenteral, tales como soluciones inyectables o aerosoles para suministro a los pulmones, o formuladas para administraciones alimenticias, tales como cápsulas de liberación de fármaco y similares.
- 20 25

Además, de acuerdo con determinados aspectos de la presente invención, la composición adecuada para administración puede proporcionarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El vehículo debe ser asimilable e incluye vehículos líquidos, semisólidos, es decir, pastas, o sólidos. Excepto en la medida en que cualquier medio, agente, diluyente o vehículo convencional sea perjudicial para el destinatario o la eficacia terapéutica de una composición contenida en el mismo, su uso en composición administrable para su uso en la práctica de los métodos es apropiado. Los ejemplos de vehículos o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, rellenos y similares, o combinaciones de los mismos. La composición también puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes.

30 35 Adicionalmente, la prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante conservantes, tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, aunque sin limitación, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sóblico, timerosal o combinaciones de los mismos.

40 De acuerdo con determinados aspectos de la presente invención, la composición se combina con el vehículo de cualquier manera conveniente y práctica, es decir, por solución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulación, absorción y similares. Dichos procedimientos son rutinarios para los expertos en la materia.

En una realización específica de la presente invención, la composición se combina o mezcla minuciosamente con un vehículo semisólido o sólido. La mezcla puede realizarse de cualquier manera conveniente, tal como molienda. 45 También pueden añadirse agentes estabilizantes en el proceso de mezcla para proteger la composición de la pérdida de actividad terapéutica, es decir, la desnaturalización en el estómago. Los ejemplos de estabilizantes para su uso en una composición incluyen tamponen, aminoácidos, tales como glicina y lisina, carbohidratos, tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc.

50 En realizaciones adicionales, la presente invención puede referirse al uso de una composición de vehículo lipídico farmacéutico que incluye quinureninas, uno o más lípidos y un disolvente acuoso. Como se usa en este documento, el término "lípido" se definirá incluyendo cualquiera de una amplia gama de sustancias que es característicamente insoluble en agua y extraíble con un disolvente orgánico. Esta amplia clase de compuestos es bien conocida para los expertos en la materia y según se usa el término "lípido" en este documento, no se limita a ninguna estructura particular. Los ejemplos incluyen compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados. Un lípido puede ser de origen natural o sintético (es decir, diseñado o producido por el hombre). Sin embargo, un lípido es habitualmente una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroideos, terpenos, lisolípidos, glucoesfingolípidos, glucolípidos, sulfátidos, lípidos con ácidos grasos unidos por éter y éster, lípidos polimerizables y combinaciones de los mismos. Por supuesto, también se incluyen compuestos diferentes de los descritos específicamente en este documento que se entienden por un experto en la materia como lípidos, por las composiciones y métodos.

55 60

65 Un experto en la materia conocería la gama de técnicas que pueden emplearse para dispersar una composición en un vehículo líquido. Por ejemplo, la quinureninasa o una proteína de fusión de la misma puede dispersarse en una solución que contiene un lípido, disuelta con un lípido, emulsionada con un lípido, mezclada con un lípido, combinada con un lípido, unida covalentemente a un lípido, contenida como una suspensión en un lípido, contenida o en complejo

con una micela o liposoma, o asociada de otro modo con un lípido o estructura lipídica mediante cualquier medio conocido para los expertos en la materia. La dispersión puede provocar o no la formación de liposomas.

5 La cantidad de dosificación real de una composición administrada a un paciente animal puede determinarse por factores físicos y fisiológicos, tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, las intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes, la idiopatía del paciente y según la vía de administración. Dependiendo de la dosificación y la vía de administración, la cantidad de administraciones de una dosificación preferida y/o una cantidad eficaz puede variar de acuerdo con las respuestas del sujeto. El facultativo responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de ingrediente o ingredientes activos en una composición y la o las dosis apropiadas para el sujeto individual.

10 En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente un 0,1 % de un compuesto activo. En otras realizaciones, un compuesto activo puede comprender entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente un 25 % y aproximadamente un 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable en los mismos. De forma natural, la cantidad de compuesto o compuestos activos en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal manera que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Se contemplarán factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas, por un experto en la materia de preparación de dichas formulaciones farmacéuticas, y por tanto, puede ser deseable una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

15 En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, a aproximadamente 1000 miligramo/kg/peso corporal, o más por administración, y cualquier intervalo derivable en los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en este documento, puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 miligramo/kg/peso corporal a aproximadamente 100 miligramo/kg/peso corporal, de aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, etc., basándose en los números descritos anteriormente.

35 X. Tratamientos de combinación

En determinadas realizaciones, las composiciones de las presentes realizaciones para su uso en un método para el tratamiento de un tumor en un sujeto implican la administración de una quinureninasa en combinación con un segundo tratamiento o tratamiento adicional. Dicho tratamiento puede aplicarse en el tratamiento de cualquier enfermedad que esté asociada con dependencia de quinurenina. Como se comprende en la presente invención, la enfermedad puede ser cáncer.

40 Los métodos y composiciones, incluyendo los tratamientos de combinación, potencian el efecto terapéutico o protector, y/o aumentan el efecto terapéutico de otro tratamiento antineoplásico o antihiperproliferativo. Los métodos terapéuticos y profilácticos y composiciones pueden proporcionarse en una cantidad combinada eficaz para conseguir el efecto deseado, tal como la eliminación de una célula cancerosa y/o la inhibición de la hiperproliferación celular. Este proceso puede implicar la administración de una quinureninasa y un segundo tratamiento. El segundo tratamiento puede tener o no un efecto citotóxico directo. Por ejemplo, el segundo tratamiento puede ser un agente que regule por aumento el sistema inmunitario sin tener un efecto citotóxico directo. Un tejido, tumor o célula puede exponerse a una o más composiciones o una o más formulaciones farmacológicas que comprenden uno o más de los agentes (por ejemplo, una quinureninasa o un agente antineoplásico), o exponiendo el tejido, tumor y/o célula a dos o más composiciones o formulaciones distintas, en la que una composición comprende 1) una quinureninasa, 2) un agente antineoplásico o 3) tanto una quinureninasa como un agente neoplásico. Además, se contempla que dicho tratamiento de combinación puede usarse junto con quimioterapia, radioterapia, tratamiento quirúrgico o inmunoterapia.

45 Los términos "en contacto" y "expuesto", cuando se aplican a una célula, se usan en este documento para describir el proceso por el que una construcción terapéutica y un agente quimioterápico o radioterápico se suministran a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para conseguir la eliminación celular, por ejemplo, ambos agentes se suministran a una célula en una cantidad combinada eficaz para eliminar la célula o evitar que se divida.

50 Una quinureninasa puede administrarse antes, durante, después o en diversas combinaciones respecto a un tratamiento antineoplásico. Las administraciones pueden ser en intervalos que varían de simultáneamente a minutos a días a semanas. En realizaciones donde la quinureninasa se proporciona a un paciente por separado de un agente antineoplásico, en general, se aseguraría que no transcurre un período de tiempo significativo entre el tiempo de cada

suministro, de modo que los dos compuestos aún podrían ejercer un efecto ventajosamente combinados sobre el paciente. En dichos casos, se contempla que puede proporcionarse a un paciente la quinureninasa y el tratamiento antineoplásico en aproximadamente 12 a 24 o 72 h entre sí y, más particularmente, en aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones puede ser deseable prolongar el periodo de tiempo para el tratamiento significativamente donde transcurren de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

En determinadas realizaciones, un ciclo de tratamiento durará 1-90 días o más (este intervalo incluye días intermedios). Se contempla que un agente pueda administrarse en cualquier día desde el día 1 hasta el día 90 (este intervalo incluye días intermedios) o cualquier combinación de los mismos, y otro agente se administra en cualquier día desde el día 1 hasta el día 90 (este intervalo incluye días intermedios) o cualquier combinación de los mismos. Dentro de un único día (periodo de 24 horas), al paciente se le administra una o múltiples administraciones del agente o agentes. Además, después de un ciclo de tratamiento, se contempla que hay un periodo de tiempo en que no se administra tratamiento antineoplásico. Este periodo de tiempo puede durar 1-7 días y/o 1-5 semanas y/o 1-12 meses o más (este intervalo incluye días intermedios), dependiendo del estado del paciente, tal como su pronóstico, resistencia, salud, etc. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según lo necesario.

Pueden emplearse diversas combinaciones. Por ejemplo, a continuación una quinureninasa es "A" y un tratamiento antineoplásico es "B":

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

La administración de cualquier compuesto o tratamiento de las presente realizaciones a un paciente seguirá protocolos generales para la administración de dichos compuestos, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hay, de los agentes. Por lo tanto, en algunas realizaciones hay una etapa de control de la toxicidad que se puede atribuir al tratamiento de combinación.

A. Quimioterapia

Puede usarse una amplia diversidad de agentes quimioterápicos de acuerdo con las presentes realizaciones. El término "quimioterapia" se refiere al uso de fármacos para tratar el cáncer. Un "agente quimioterápico" se usa para connotar un compuesto o composición que se administra en el tratamiento del cáncer. Estos agentes o fármacos se clasifican por su modo de actividad dentro de una célula, por ejemplo, si afecta a alguna fase del ciclo celular y a qué fase. Como alternativa, un agente puede caracterizarse basándose en una capacidad de reticular directamente del ADN, de intercalarse en el ADN o de inducir aberraciones cromosómicas y mitóticas afectando a la síntesis de ácido nucleico.

Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos, tales como busulflán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptofincinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobia; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno,, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza de uracilo; nitrosureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediino (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II; dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo neocarcinostanina y cromóforos

antibióticos de enediino de cromoproteína relacionados, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitimicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, y zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácidos fólico, tales como denopterina, pteropterina y trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, y tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, y floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, y testolactona; antisuprarrenales, tales como mitotano y trilostano; reforzador de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitinina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como

maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de PSK polisacárido; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; 5 mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; taxoides, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; 10 tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (por ejemplo, CPT-11); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; carboplatino, procarbazina, plicomicina, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil proteína transferasa, transplatino y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

B. Radioterapia

15 Otros factores que causan daños en el ADN y se han usado ampliamente incluyen lo que se conoce habitualmente como rayos γ, rayos X y/o el suministro dirigido de radioisótopos a células tumorales. Otras formas de factores que dañan el ADN también se contemplan, tales como microondas, radiación con rayos de protones (patentes de Estados Unidos 5.760.395 y 4.870.287) y radiación UV. Es muy probable que todos estos factores logren una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores de ADN, en la replicación y reparación del ADN y en el ensamblaje y 20 mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para rayos X varían de dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante periodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), hasta dosis individuales de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, la potencia y tipo de radiación emitida y la captación por las células neoplásicas.

C. Inmunoterapia

25 Los expertos en la materia entenderán que las inmunoterapias pueden usarse en combinación o junto con métodos de las realizaciones. En el contexto del tratamiento del cáncer, los agentes inmunoterápicos, en general, dependen del uso de células efectoras inmunitarias y moléculas para abordar y destruir las células cancerosas. Rituximab (RITUXAN®) es uno de dichos ejemplos. Los inhibidores de los puntos de control, tales como, por ejemplo, ipilimumab, son otro de dichos ejemplos. El efecto inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador de la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo en solitario puede servir como efecto de tratamiento o puede reclutar otras células para lograr realmente la eliminación celular. El anticuerpo también puede conjugarse a un fármaco o toxina (agente quimioterápico, radionúclido, cadena de ricina A, toxina colérica, toxina pertúsica, etc.) y 30 servir simplemente como agente de dirección. Como alternativa, el efecto puede ser un linfocito que porta una molécula superficial que interactúa, directa o indirectamente, con una diana celular tumoral. Diversas células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y linfocitos NK.

40 En un aspecto de inmunoterapia, la célula tumoral debe albergar algún marcador que sea susceptible a dirección, es decir, no esté presente en la mayoría de las demás células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para la dirección en el contexto de las presentes realizaciones. Los marcadores tumorales comunes incluyen CD20, antígeno carcinoembrionario, tirosinasa (p97, gp68, TAG-72, HMFG, antígeno sialil-Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de laminina, erb B y p155). Un aspecto alternativo de inmunoterapia es combinar efectos antineoplásicos con efectos inmunoestimuladores. También existen moléculas inmunoestimuladoras, que incluyen: 45 citocinas, tales como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, gamma-IFN, quimiocinas, tales como MIP-1, MCP-1, IL-8 y factores de crecimiento, tales como ligando FLT3.

50 Los ejemplos de inmunoterapias actualmente en investigación o en uso son adyuvantes inmunitarios, por ejemplo, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos (patentes de Estados Unidos n.º 5.801.005 y 5.739.169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998); tratamiento con citocinas, por ejemplo, interferones α, β, y γ, IL-1, GM-CSF y TNF (Bukowski *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1998; Hellstrand *et al.*, 1998); genoterapia, por ejemplo, TNF, IL-1, IL-2, y p53 (Qin *et al.*, 1998; Austin-Ward y Villaseca, 1998; patentes de Estados Unidos 5.830.880 y 5.846.945); y anticuerpos monoclonales, por ejemplo anti-CD20, anti-gangliósido GM2, y *anti-p185 (Hollander, 2012; Hanibuchi *et al.*, 1998; Patente de Estados Unidos 5.824.311). Se contempla que puede emplearse uno o más tratamientos antineoplásicos con los tratamientos de anticuerpo descritos en este documento.

D. Cirugía

60 Aproximadamente un 60 % de las personas con cáncer experimentará cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, de diagnóstico o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa incluye la resección en que todo a parte del tejido canceroso se retira físicamente, se escinde y/o se destruye y puede usarse junto con otros tratamientos, tales como el tratamiento de las presentes realizaciones, quimioterapia, radioterapia, tratamiento hormonal, genoterapia, inmunoterapia y/o tratamientos alternativos. La resección tumoral se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento por cirugía incluye cirugía láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs).

Tras la escisión de parte o todas las células cancerosas, tejido o tumor, puede formarse una cavidad en el organismo. El tratamiento puede conseguirse por perfusión, inyección directa o aplicación local en la zona con un tratamiento antineoplásico adicional. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser de dosificaciones variables también.

5

E. Otros agentes

Se contempla que pueden usarse otros agentes en combinación con determinados aspectos de las presentes 10 realizaciones para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes que afectan a la regulación por aumento de los receptores de superficie celular y las uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a inductores apoptóticos u otros agentes biológicos. Los aumentos en la señalización intracelular elevando el número de uniones GAP aumentaría los efectos antihiperproliferativos en la población de células 15 hiperproliferativas adyacentes. En otras realizaciones, pueden usarse agentes citostáticos o de diferenciación en combinación con determinados aspectos de las presentes realizaciones para mejorar la eficacia antihiperproliferativa de los tratamientos. Se contemplan inhibidores de adhesión celular para mejorar la eficacia de las presentes 20 realizaciones. Son ejemplos de inhibidores de adhesión celular inhibidores de la cinasa de adhesión focal (FAK) y lovastatina. Se contempla además que otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tal como el anticuerpo c225, podrían usarse en combinación con determinados aspectos de las presentes realizaciones para mejorar la eficacia de tratamiento.

XI. Kits

25 Determinados aspectos de la presente invención pueden proporcionar kits, tales como kits terapéuticos. Por ejemplo, un kit puede comprender una o más composiciones farmacéuticas como se describen en este documento y opcionalmente instrucciones para su uso. Los kits también pueden comprender uno o más dispositivos para conseguir la administración de dichas composiciones. Por ejemplo, un presente kit puede comprender una composición farmacéutica y catéter para conseguir la inyección intravenosa directa de la composición en un tumor canceroso. En 30 otras realizaciones, un presente kit puede comprender ampollas prellenadas de una quinureninasa, opcionalmente formulada como un agente farmacéutico o liofilizada, para su uso con un dispositivo de suministro.

Los kits pueden comprender un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse de una diversidad de materiales, tal como vidrio o plástico. 35 El recipiente puede alojar una composición que incluye una quinureninasa que es eficaz para aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas, tal como se describe anteriormente. La etiqueta del recipiente puede indicar que la composición se usa para un tratamiento específico o aplicación no terapéutica, y también puede indicar directrices por su uso *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas anteriormente. El kit de la invención típicamente comprenderá el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes diferentes que comprenden materiales deseables desde un punto de vista 40 comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

XII. Ejemplos

45 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas divulgadas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el autor de la invención que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deben apreciar, a la luz de la presente divulgación, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se divultan y aún 50 obtener un resultado parecido o similar sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

Ejemplo 1 - Construcción génica, expresión y purificación de quinureninasa de *Pseudomonas fluorescens*

55 Se construyó un gen para la expresión de la enzima quinureninasa de *Pseudomonas fluorescens* (*Pf-KYNU*) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de extensión solapante de cuatro bloques génicos de codones optimizados diseñados usando el programa informático DNA-Works (Hoover y Lubkowski, 2002). El gen de longitud completa incluye un sitio para la enzima de restricción *Xba*I en el extremo N (nucleótidos 1-6), un sitio de unión al ribosoma optimizado (RBS; nucleótidos 29-55), un codón de parada (nucleótidos 56-58), una marca de His 6 en el extremo N (nucleótidos 59-91), un gen *Pf-KYNU* de codones optimizados de *E. coli* (nucleótidos 92-1336), un codón de parada (nucleótidos 1337-1342) y un sitio para la enzima de restricción *Bam*H I en el extremo C (nucleótidos 1342-1347) (véase la SEQ ID NO: 1). Los sitios para enzimas de restricción mencionados anteriormente se usaron para clonar el gen ensamblado en un vector pET-28a+ (Novagen). Esta construcción entonces se usó para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión. Las células se cultivaron a 37 °C con agitación a 210 r.p.m. en medio Terrific Broth (TB) con 50 mg/l de canamicina. La expresión se indujo cuando se alcanzó una OD₆₀₀ ~1,0 añadiendo IPTG (concentración final 60 0,5 mM) con agitación continuada durante la noche a 37 °C. Las células entonces se recogieron por centrifugación y 65 se resuspendieron en tampón de lisis que consistía en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, fosfato de

piridoxilo (PLP) 0,5 mM, fluoruro de fenilmetsulfonilo 1 mM y 1 µg/ml de DNasa. La lisis se consiguió mediante prensa francesa y el lisado se aclaró de los particulados por centrifugación a 20 000 x g durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante entonces se filtró a través de un filtro de jeringa de 5 µm y se aplicó a una columna de Ni-NTA/agarosa (Qiagen) preequilibrada en un tampón compuesto de fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM y PLP 0,1 mM a pH 7,4. Después de cargar el lisado en la columna, la resina se lavó con 5 volúmenes de columna (CV) de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, y PLP 0,1 mM con imidazol 30 mM. A continuación, se ajustó el caudal para lavar lentamente la columna durante la noche con 100 CV de tampón PBS sin endotoxina (Corning) con PLP 0,1 mM y TRITON® X114 al 1 % v/v. Este lavado durante la noche elimina el lipopolisacárido (LPS o endotoxina) que es un contaminante típico de sistemas de expresión bacterianos. La enzima lavada entonces se eluyó en 5 CV de PBS sin endotoxina con PLP 0,1 mM con imidazol 250 mM, y la resina se aclaró con una segunda parte de 5 CV de PBS sin endotoxina con PLP 0,1 mM. En este punto, se intercambió el tampón de la enzima a PBS fresco para eliminar el imidazol, se añadió glicerol al 10 % y se congelaron inmediatamente alícuotas en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C. Como alternativa, se intercambió inmediatamente el tampón de la enzima para que fuera fresco, con fosfato de sodio 100 mM estéril, pH 8,4, tanto para eliminar el imidazol como para prepararla para PEGilación (véase el ejemplo 4). Las purezas enzimáticas fueron típicamente de >95 % basadas en el análisis de SDS-PAGE y los rendimientos típicos promediaron aproximadamente 75 mg/l de cultivo. Se evaluaron las cantidades de proteínas midiendo la Abs_{280 nm} y usando el coeficiente de extinción enzimática calculado de 63 745 M⁻¹cm⁻¹.

Ejemplo 2 - Construcción génica, expresión y purificación de quinureninasa de *Homo sapiens*

Se obtuvo un gen para la expresión de la enzima quinureninasa de *Homo sapiens* (*h-KYNU*) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de extensión solapante de cuatro bloques génicos de codones optimizados diseñados usando el programa DNA-Works (Hoover and Lubkowski, 2002). El gen de longitud completa incluye un sitio para la enzima de restricción *Xba*I en el extremo N (nucleótidos 1-6), un RBS optimizado (nucleótidos 28-60), un codón de inicio (nucleótidos 61-63), una marca de His₆ en el extremo N (nucleótidos 64-96), un gen *h-KYNU* de codones optimizados de *E. coli* (nucleótidos 97-1488), un codón de parada (nucleótidos 1489-1491) y un sitio para la enzima de restricción *Bam*HI en el extremo C (nucleótidos 1492-1497) (véase la SEQ ID NO: 2). Los sitios para enzimas de restricción mencionados anteriormente se usaron para clonar el gen ensamblado en un vector pET-28a+ (Novagen). Esta construcción entonces se usó para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión. Las células se cultivaron a 37 °C con agitación a 210 r.p.m. en medio Terrific Broth (TB) con 50 mg/l de canamicina. La expresión se indujo cuando se alcanzó una DO₆₀₀ ~1,0 añadiendo IPTG (concentración final 0,5 mM) con agitación continuada durante la noche a 37 °C. Las células entonces se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis que consistía en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, y PLP 0,1 mM. Despues de cargar el lisado en la columna, la resina se lavó con 5 volúmenes de columna (CV) de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, y PLP 0,1 mM con imidazol 30 mM. A continuación, se ajustó el caudal para lavar lentamente la columna durante la noche con 100 CV de tampón PBS sin endotoxina (Corning) con PLP 0,1 mM y TRITON® X114 al 1 % v/v. Este lavado durante la noche elimina el lipopolisacárido (LPS o endotoxina) que es un contaminante típico en la expresión bacteriana de enzimas. La enzima lavada entonces se eluyó en 5 CV de PBS sin endotoxina con PLP 0,1 mM con imidazol 250 mM y la resina se aclaró con una segunda parte de 5 CV de PBS sin endotoxina con PLP 0,1 mM. En este punto, se intercambió el tampón de la enzima a PBS fresco para eliminar el imidazol, se añadió glicerol al 10 % y se congelaron inmediatamente alícuotas en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C. Como alternativa, podía intercambiarse el tampón de la enzima para que fuera fresco, con fosfato de sodio 100 mM estéril, pH 8,4, tanto para eliminar el imidazol como para prepararla para PEGilación (véase el ejemplo 4). Las purezas enzimáticas fueron típicamente de >95 % evaluadas por análisis de SDS-PAGE y los rendimientos típicos promediaron aproximadamente 20 mg/l de cultivo líquido. Se evaluaron las cantidades de proteínas midiendo la Abs_{280 nm} y usando el coeficiente de extinción enzimática calculado de 76 040 M⁻¹cm⁻¹.

Ejemplo 3 - Construcción génica, expresión y purificación de quinureninasa de *Mus musculus*

Se obtuvo un gen para la expresión de la enzima quinureninasa de *Mus musculus* (*m-KYNU*) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de extensión solapante de tres bloques génicos de codones optimizados diseñados usando el programa DNA-Works (Hoover et al., 2002). El gen de longitud completa incluía un sitio para la enzima de restricción *Xba*I en el extremo N (nucleótidos 1-6), un RBS optimizado (nucleótidos 29-58), un codón de inicio (nucleótidos 59-61), una marca de His₆ en el extremo N (nucleótidos 62-94), un gen *m-KYNU* de codones optimizados de *E. coli* (nucleótidos 95-1483), un codón de parada (nucleótidos 1484-1486) y un sitio para la enzima de restricción *Bam*HI en el extremo C (nucleótidos 1487-1492) (véase la SEQ ID NO: 3). Los sitios para enzimas de restricción mencionados anteriormente se usaron para clonar el gen ensamblado en un vector pET-28a+ (Novagen). Esta construcción entonces se usó para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión. Las células se cultivaron a 37 °C agitando a 210 r.p.m. en medio Terrific Broth (TB) con 50 mg/l de canamicina. La expresión se indujo cuando se alcanzó una DO₆₀₀ ~1,0 añadiendo IPTG 0,5 mM y se continuó durante la noche a 37 °C. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis que consistía en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, y PLP 0,5 mM, fluoruro de fenilmetsulfonilo 1 mM y 1 µg/ml de DNasa. La lisis se consiguió

mediante prensa francesa y el lisado se aclaró de los particulados por centrifugación a 20 000 x g durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de 5 µm y se aplicó a una columna de Ni-NTA/agarosa (Qiagen) preequilibrada en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, y tampón PLP 0,1 mM. Después de cargar el lisado en la columna, la resina se lavó con 5 volúmenes de columna (CV) de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, y PLP 0,1 mM con imidazol 30 mM. A continuación se ajustó el caudal para lavar lentamente durante la noche con 100 CV de tampón PBS sin endotoxina (Corning) con PLP 0,1 mM y TRITON® X114 al 1 % v/v. Este lavado durante la noche eliminó el lipopolisacárido (LPS o endotoxina) que es un contaminante típico en la expresión bacteriana de enzimas. La enzima lavada se eluyó en 5 CV de PBS sin endotoxina con PLP 0,1 mM con imidazol 250 mM y la resina se aclaró con una segunda parte de 5 CV de PBS sin endotoxina con PLP 0,1 mM. En este punto, se intercambió el 10
tampón de la enzima a PBS fresco para eliminar el imidazol, se añadió glicerol al 10 % y se congelaron inmediatamente
alícuotas en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C.

Ejemplo 4 - Preparación farmacológica de quinureninasa de *Pseudomonas fluorescens*

15 Para mejorar el tiempo en circulación de la enzima *in vivo*, se aumentó el radio hidrodinámico de las enzimas KYNU
funcionalizando los grupos reactivos superficiales en la proteína por conjugación con PEG. En una realización, se
funcionalizó *Pf-KYNU* por reacción de los restos de lisina superficiales con carbonato de metoxi PEG succinimidilo de
5000 PM (NANOCS). La enzima purificada sin endotoxinas se intercambió de tampón minuciosamente a fosfato de
sodio 100 mM preparado recientemente, pH 8,4 y se concentró a 10 mg/ml. La solución resultante se añadió
20 directamente a un exceso molar de 100:1 de reactivo de PEG sólido y se permitió que reaccionara a temperatura
ambiente durante 1 h (FIG. 1). El PEG sin reaccionar se retiró de la solución por intercambio de todo el tampón a PBS
sin endotoxina reciente en un dispositivo de filtración centrífuga de punto de corte de 100 kDa (AMICON®). La masa
molecular aparente de la enzima entonces se comprobó en una columna de HPLC de exclusión molecular
25 (Phenomenex) en PBS. Se usó una solución de patrón de PM de BioRad para generar una curva patrón y los tiempos
de retención de la enzima se compararon con los de los patrones de proteína. Basándose en la curva patrón, la enzima
no PEGilada tiene una masa aparente de 40 kDa, que está cerca de la masa de un monómero de *Pf-KYNU*. Se observó
que la versión PEGilada de la enzima tenía una masa aparente de 1300 kDa, es decir, sustancialmente más grande
30 que la enzima no modificada. Los niveles de endotoxina se cuantificaron usando el kit de ensayo de endotoxina
cromógeno cinético Chromo-LAL (Associates of Cape Cod, Inc.). La enzima lavada de la manera descrita
anteriormente típicamente producía niveles de endotoxina de 0.19 ± 0.07 UE/mg de *Pf-KYNU* purificada.

Ejemplo 5 - Preparación farmacológica de quinureninasa de *Homo sapiens*

35 Para mejorar el tiempo de residencia en la circulación de la enzima humana *in vivo*, se aumentó el radio hidrodinámico
de *h-KYNU* functionalizando los grupos reactivos superficiales en la proteína por conjugación con PEG. En una
realización, se functionalizó *h-KYNU* por reacción de los restos de lisina superficiales con carbonato de metoxi PEG
succinimidilo de 5000 PM (NANOCS). La enzima purificada sin endotoxinas se intercambió de tampón
minuciosamente a fosfato de sodio 100 mM preparado recientemente, pH 8,4 y se concentró a 10 mg/ml. La solución
resultante se añadió directamente a un exceso molar de 100:1 de reactivo de PEG sólido y se permitió que reaccionara
40 a temperatura ambiente durante 1 h. El PEG sin reaccionar se retiró de la solución por intercambio de todo el tampón
a PBS sin endotoxina reciente en un dispositivo de filtración centrífuga de punto de corte de 100 kDa (AMICON®). La
masa molecular aparente de la enzima se determinó usando una columna de HPLC de exclusión molecular
(Phenomenex) equilibrada con PBS y los tiempos de retención se compararon con una solución de patrón de PM
(BioRad). Los niveles de endotoxina se cuantificaron usando el kit de ensayo de endotoxina cromógeno cinético
45 Chromo-LAL (Associates of Cape Cod, Inc.).

Ejemplo 6 - Ensayo para medir los parámetros cinéticos de quinureninasa

50 Los parámetros cinéticos de *Pf-KYNU* y *h-KYNU*, así como de sus versiones PEGiladas como se describen en los
ejemplos 4 y 5, se cuantificaron por un ensayo espectrofotométrico, en que se controló el descenso en la absorbancia
máxima del sustrato enzimático, L-quinurenina, como una función del tiempo. Se prepararon soluciones de L-
quinurenina en un tampón de PBS, pH 7,4, para producir concentraciones finales que varían de 8 µM a 250 µM. La L-
quinurenina tiene un coeficiente de extinción de $4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ con una $\lambda_{\text{máx}}$ a 365 nm mientras que los productos de la
reacción de quinureninasa, ácido L-antranílico y L-alanina, no absorben apreciablemente a 365 nm. Las reacciones
55 se iniciaron añadiendo y mezclando rápidamente soluciones enzimáticas (~20 nM final) con las soluciones de sustrato
y controlando la pérdida de sustrato KYN a 25 °C midiendo $\text{Abs}_{365 \text{ nm}}$ a lo largo del tiempo. Los datos resultantes se
procesaron y ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten para determinar las constantes cinéticas. La cinética de la
enzima *Pf-KYNU* PEGilada se midió de una manera idéntica. Para la enzima no PEGilada, $K_{\text{cat}}/K_M = 1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ y
para la forma PEGilada, $K_{\text{cat}}/K_M = 1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Los parámetros cinéticos para la hidrólisis de ácido 3-hidroxi-L-
60 quinurénico también se determinaron como se describe en esta ocasión.

Ejemplo 7- Estabilidad *in vitro* de quinureninasa

65 Para medir la estabilidad *in vitro* de *Pf-KYNU*, la enzima se añadió a tampón PBS o suero humano combinado hasta
una concentración final de 10 µM y se incubó a 37 °C. Se recogieron porciones de 10 µl cada una en los puntos
temporales y se añadieron a 990 µl de una solución 250 µM de L-quinurenina/PBS. La velocidad inicial de la reacción

se controló midiendo el descenso de la absorbancia a 365 nm a lo largo del tiempo como se describe en el ejemplo 3. La estabilidad enzimática se determinó comparando la velocidad inicial de catálisis de L-quinurenina en cada punto temporal y comparándola con la velocidad a tiempo = 0. Los datos resultantes se representaron como el % de actividad frente al tiempo y se ajustaron a una ecuación exponencial para determinar la semivida ($T_{1/2}$). Se descubrió que la enzima Pf-KYNU tenía un $T_{1/2} = 34,3$ horas en PBS y un $T_{1/2} = 2,4$ horas en suero humano combinado (FIG. 2).

Ejemplo 8 - Ensayo para cuantificar los niveles de quinurenina y triptófano *in vivo*

Los niveles *in vivo* de L-quinurenina, triptófano, ácido quinurénico, 3-hidroxi-L-quinurenina y ácido L-antranílico (uno de los productos de catálisis de quinureninasa) se cuantificaron y controlaron por HPLC. Tras la necropsia de los ratones, se retiraron muestras de sangre, el tumor, el bazo y el hígado. Las muestras de sangre se centrifugaron para separar la sangre completa del suero. Las muestras tisulares se homogeneizaron en primer lugar y después se centrifugaron para retirar la parte sólida. A cada parte líquida se añadió una parte de 1:10 v/v de ácido tricloroacético al 100 % para precipitar las macromoléculas. Los sólidos se retiraron de nuevo por centrifugación y los sobrenadantes se pasaron a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm. Los sobrenadantes tratados se aplicaron directamente a una HPLC (Shimadzu) y se separaron en una columna de C-18 analítica convencional usando un gradiente que parte de solución B al 0 % hasta solución B al 100 % donde la solución A es H₂O + ácido trifluoroacético al 0,1 % y la solución B es acetonitrilo + ácido trifluoroacético al 0,1 %. El intervalo de absorbancia completo de 190 nm a 900 nm se recogió de forma continua para controlar todas las moléculas posibles y la espectroscopía de fluorescencia (Ex = 365 nm, Em = 480 nm) se recogió simultáneamente para controlar específicamente los niveles de quinurenina. Las concentraciones y los tiempos de retención se determinaron usando soluciones de patrón hechas de las moléculas puras (Sigma).

Ejemplo 9 - Eficacia de PEG-Pf-KYNU en el modelo de melanoma de ratón B16 autólogo

Ratones B6-WT (n = 20) se inocularon cada uno con $2,5 \times 10^5$ células de melanoma murino B16 por inyección subcutánea en el flanco. Después de permitir que los tumores se establecieran durante 10 días (media del tumor = 20 mm²) los ratones se dividieron en dos grupos de n = 10 cada uno. El grupo de control entonces se trató con 20 mg/kg de PEG-Pf-KYNU inactivada por calor por inyección intratumoral cada tres días hasta que los tumores alcanzaron 350 mm² de tamaño. El grupo experimental se trató de una manera idéntica excepto con 20 mg/kg de PEG-Pf-KYNU activa por inyección intratumoral cada tres días hasta que los tumores alcanzaron un punto final de 350 mm² de tamaño. Las tasas de crecimiento de los tumores de melanoma B16 se retardaron significativamente en el grupo de tratamiento al que se administró PEG-Pf-KYNU activa en comparación con el grupo tratado de forma idéntica con PEG-Pf-KYNU inactivada por calor (FIG. 3) produciendo una ampliación significativa de la vida (FIG. 4). Los linfocitos aislados de los grupos de control y de tratamiento experimental se evaluaron con paneles de anticuerpos (es decir, anti-CD45, CD4, Nk1.1, CD25, FoxP3, CD8, grancima B, IFNγ, CTLA4, CD11c, CD11b, F4/80, GR-1 y Ly6-C) que revelaron que la población de linfocitos T reguladores CD4+ CD25+ FoxP3+ en circulación era significativamente inferior en el grupo tratado con PEG-Pf-KYNU activa ($4,8 \pm 0,8$ % frente a $8,6 \pm 0,8$ %). Además, la población de linfocitos T CD8+ de infiltración tumoral que expresan grancima B e interferón y era significativamente mayor en ratones tratados con enzima activa (26 ± 19 % frente a 4 ± 2 %) (FIG. 5A-B).

Ejemplo 10 - Proteínas de fusión de quinureninasa-scFv para dirección tumoral

En algunos aspectos, la presente invención también contempla polipéptidos que comprenden la quinureninasa bacteriana o de mamífero modificada unida a una secuencia de aminoácidos heteróloga. Por ejemplo, la quinureninasa nativa o modificada puede unirse a un anticuerpo de fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a antígenos tumorales de superficie celular específicos. En esta realización, una proteína de fusión scFv-quinureninasa con la parte scFv de la proteína que tiene afinidad específica por un antígeno tumoral conocido, preferiblemente un antígeno específico de tumor que se internaliza a una tasa más lenta, por ejemplo, MUC-1, permitiría que la parte de quinureninasa de la proteína de fusión se suministrara a la célula tumoral y degradara KYN. Un ejemplo sería una proteína de fusión de scFv-quinureninasa donde la parte scFv se dirige y se une al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) que está regulado por aumento en determinados tipos de cáncer de mama.

En esta realización, una proteína de fusión quinureninasa nativa o modificada-scFv anti-HER2 actuaría dirigiendo y concentrando la quinureninasa directamente en la superficie del tumor y actuando al degradar la KYN producida por el tumor.

Ejemplo 11 - Proteínas de fusión de quinureninasa-scFv anti-CTLA4

En algunos aspectos, la presente invención también contempla polipéptidos que comprenden la quinureninasa bacteriana o de mamífero modificada unida a una secuencia de aminoácidos heteróloga. Por ejemplo, la quinureninasa nativa o modificada puede unirse a un anticuerpo de fragmento variable monocatenario (scFv) que se une al receptor de antígeno de linfocitos T citotóxico 4 (CTLA-4), muerte celular programada 1 (PD-1) o ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1). Un bloqueo de CTLA-4, PD-1 o PD-L1 mediante un anticuerpo antagonizante o fragmento de anticuerpo permite que la señal inhibidora de linfocitos T se invierta, lo que permite que CD28 estimule la activación de linfocitos T. En esta realización, una proteína de fusión de quinureninasa nativa o modificada-scFv anti-CTLA4,

anti-PD-1 o anti-PD-L1 actuaría eliminando tanto la señalización de interacción de proteína inhibidora:proteína como la señalización inhibidora de quinurenina. Esta realización de una proteína de fusión de quinureninasa nativa o modificada-scFv se esperaría que regulara por aumento potentemente la activación de linfocitos T y promoviera robustas respuestas antitumorales.

5 **Ejemplo 12 - Construcciones de receptor de antígeno químérico para el suministro de quinureninasa a linfocitos T**

10 En algunos aspectos, La presente invención también contempla un vector lentivírico adecuado para la transfección de linfocitos T con construcciones de receptor de antígeno químérico (CAR) de modo que se coexpresaría una quinureninasa bacteriana o de mamífero modificada además de la construcción de CAR. Las construcciones de CAR son proteínas que contienen un dominio de unión a antígeno extracelular fusionado a un dominio de señalización transmembranario y citoplasmático de una cadena CD3- ζ y a menudo una molécula CD28 (Ahmed *et al.*, 2010). El dominio de unión a antígeno puede ser un scFv diseñado para unirse a un antígeno expresado por una célula tumoral, siendo ejemplos HER2 expresado por glioblastoma u osteosarcoma, CD19 o CD20 expresado por diversas neoplasias de linfocitos B, o GD2 expresado por neuroblastoma (Lipowska-Bhalla *et al.*, 2012) o cualquier otra diana relevante. En esta realización, el vector lentivírico, que suministra una construcción de CAR apropiada a un linfocito T, además coexpresaría una quinureninasa bacteriana o de mamífero nativa o modificada en el citosol. El linfocito T que contiene esta construcción de CAR/quinureninasa tendría la doble capacidad de 1) unirse a células tumorales específicas y 2) degradar KYN, evitando la inducción por KYN de un fenotipo regulador y/o apoptosis. En otra realización, un linfocito T expresaría una construcción de CAR que se une a un linfoma de linfocitos B grande difuso CD19+ o CD20+ mientras coexpresa una quinureninasa para degradar las altas concentraciones de KYN a menudo producidas por este tipo de tumor (Yoshikawa *et al.*, 2010; de Jong *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2011).

25 **Ejemplo 13 - Selección genética para la actividad quinureninasa**

30 El aminoácido L-triptófano (L-Trp) se sintetiza a partir del precursor derivador de pentosa, corismato, por expresión de los genes biosintéticos de *trp*. En bacterias, tales *E. coli* los genes biosintéticos de *trp* están originados en un operón compuesto de cinco genes; *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB*, y *trpA*. Las proteínas TrpE y TrpD son componentes del complejo de antranilato sintasa que cataliza la primera etapa en la conversión de corismato y L-glutamina en ácido antranílico y L-glutamato. El ácido antranílico entonces se convierte posteriormente en L-Trp mediante la acción de TrpC, TrpA y TrpB. Las células que carecen de un gen de antranilato sintasa funcional son auxotróficas para L-Trp y no pueden crecer en medio mínimo sin triptófano. Los autores de la invención postularon que como la quinurenina puede transportarse al citosol de muchos organismos, las células que expresan enzimas L-quinureninasa recombinantes que presentan una actividad catalítica suficientemente alta deben poder convertir la L-quinurenina citosólica en ácido antranílico y el último después posibilita la síntesis de L-Trp. Por el contrario, las células que no expresan la enzima o expresan variantes con baja actividad catalítica deben presentar nada de crecimiento o crecimiento muy lento, respectivamente, en medio mínimo con L-quinurenina.

40 45 Se obtuvieron mutantes de eliminación de *trpE* y *trpD* de *E. coli* de Genetic Resources en Yale CGSC. Los genotipos de las cepas fueron (*F*-, Δ (*araD*-*araB*)567, Δ *lacZ*4787(:rrnB-3), λ -, Δ *trpE*772::kan, *rph-1*, Δ (*rhaD*-*rhaB*)568, *hsdR514*) y (*F*-, Δ (*araD*-*araB*)567, Δ *lacZ*4787(:rrmB-3), λ -, Δ *trpD*771::kan, *rph-1*, Δ (*rhaD*-*rhaB*)568, *hsdR514*), respectivamente. Las células se sembraron en placas con medio mínimo M9. Después se colocaron disco de papel de filtro impregnados en L-Trp, L-Kyn, ácido antranílico o tampón en las placas, seguido de incubación a 37 °C. Las células *E. coli*- Δ *trpD* crecían solamente en presencia de L-Trp, sin embargo, *E. coli*- Δ *trpE* también podía crecer en presencia de ácido antranílico, pero no tampón o L-Kyn, lo que demuestra que *trpC*, *trpA* y *trpB* se expresaban, permitiendo el rescate la auxotrofia de L-Trp con ácido antranílico como metabolito intermedio (FIG. 6). Además, las células *E. coli*- Δ *trpE* transformadas con un plásmido que alberga el gen *Pf-KYNU* crecían robustamente en placas de medio mínimo M9 en presencia de L-Kyn.

50 **Ejemplo 14 - Construcción génica, expresión y purificación de quinureninasa bacteriana que presenta alta actividad catalítica hacia quinurenina e identidad con la quinureninasa humana**

55 Similar a otras quinureninasas eucariotas, la enzima de *Homo sapiens* es muy selectiva hacia la hidrólisis de 3'-OH quinurenina y tiene una actividad catalítica aproximadamente 1000 veces inferior hacia quinurenina. A causa de su mala actividad catalítica hacia quinurenina, la enzima humana no es adecuada para fines terapéuticos. La administración de *Pf-KYNU* PEGilada (ejemplo 9), *Mu-KYNU* (ejemplo 22 y ejemplo 23) o *Cp-KYNU* (ejemplo 17) (todos los cuales presentan alta actividad catalítica hacia quinurenina en lugar de 3'-OH quinurenina) provocó un retardo del crecimiento tumoral como se muestra en el ejemplo 9 (FIG. 3). Sin embargo, la administración de quinureninasa humana PEGilada a dosificación similar o mayor no tuvo efecto sobre el crecimiento de tumores de melanoma B16 (n = 4). Sin embargo, como se muestra en el ejemplo 20, la genomanipulación de *h-KYNU* puede mejorar la actividad degradante de L-quinurenina de la enzima humana. Dichas variantes de *h-KYNU* genomanipuladas pueden provocar un retardo del crecimiento del tumor como se observa con *Pf-KYNU* PEGilada (ejemplo 9), *Mu-KYNU* (ejemplo 22 y ejemplo 23), y *Cp-KYNU* (ejemplo 17).

65 66 La *Pf-KYNU* presenta baja identidad de secuencia con su equivalente humano (24 % de identidad de aminoácidos).

Debido su baja identidad de secuencia con la proteína humana, *Pf-KYNU* puede provocar respuestas inmunitarias adversas en pacientes, así como la producción de anticuerpos neutralizantes. Por lo tanto, es importante descubrir enzimas quinureninasa que presenten alta actividad catalítica y selectividad hacia quinurenina y tengan un mayor grado de identidad de aminoácidos con la quinureninasa de *Homo sapiens*. Los autores de la invención identificaron varias enzimas bacterianas que presentan >38 % de identidad de aminoácidos con la quinureninasa de *Homo sapiens* y también alta actividad de hidrólisis de quinurenina. Las secuencias de estas enzimas se proporcionan como la SEQ ID NO: 13-52. Los porcentajes de identidad de estas enzimas en comparación con la quinureninasa de *Homo sapiens* se proporcionan en la tabla 1. Como ejemplo representativo, se construyó un gen para la expresión de la enzima quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis* (*Mu-KYNU*) (SEQ ID NO: 33) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de extensión solapante de dos bloques génicos de codones optimizados diseñados usando el programa informático DNA-Works (Hoover y Lubkowski, 2002). El gen de longitud completa incluye un sitio para la enzima de restricción *Ncol* en el extremo N, un RBS optimizado, una marca de His₆ en el extremo N, un gen *Mu-KYNU* de codones optimizados de *E. coli*, un codón de parada y un sitio para la enzima de restricción *EcoRI* en el extremo C. Los sitios para enzimas de restricción mencionados anteriormente se usaron para clonar el gen ensamblado en un vector pET-28a+ (Novagen). Esta construcción entonces se usó para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión. Las células se cultivaron a 37 °C con agitación a 210 r.p.m. en medio Terrific Broth (TB) con 50 mg/l de canamicina. La expresión se indujo cuando se alcanzó una DO₆₀₀ ~1,0 añadiendo IPTG (concentración final 0,5 mM) con agitación continuada durante la noche a 37 °C. Las células entonces se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis que consistía en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, fosfato de piridoxilo (PLP) 0,5 mM, fluoruro de fenilmetsulfonilo 1 mM y 1 µg/ml de DNasa. La lisis se consiguió mediante prensa francesa y el lisado se aclaró de los particulados por centrifugación a 20 000 x g durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante entonces se filtró a través de un filtro de jeringa de 5 µm y se aplicó a una columna de Ni-NTA/agarosa (Qiagen) preequilibrada en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, y tampón PLP 0,1 mM. Después de cargar el lisado en la columna, la resina se lavó con 5 volúmenes de columna (CV) de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, y PLP 0,1 mM con imidazol 30 mM. La enzima lavada entonces se eluyó en 5 CV de PBS con PLP 0,1 mM con imidazol 250 mM. En este punto, se intercambió el tampón de la enzima a PBS fresco para eliminar el imidazol, se añadió glicerol al 10 % y se congelaron inmediatamente alícuotas en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C. Las purezas enzimáticas fueron típicamente de >95 % basadas en el análisis de SDS-PAGE y los rendimientos típicos promediaron aproximadamente 75 mg/l de cultivo. Se evaluaron las cantidades de proteínas midiendo la Abs_{280 nm} y usando el coeficiente de extinción enzimática calculado de 78 185 M⁻¹cm⁻¹.

Tabla 1. Porcentajes de identidad de enzimas quinureninasa eubacterianas en comparación con quinureninasa de *Homo sapiens*.

Especie	SEQ ID NO	% de identidad
<i>Arenitalea lutea</i>	13	44,1
<i>Belliella baltica DSM 15883</i>	14	43,3
<i>Bizionia argentinensis</i>	15	42,9
<i>Candidatus Entotheonella sp. TSY2</i>	16	44,9
<i>Candidatus Koribacter versatilis Ellin345</i>	17	43,3
<i>Cecembia lonarensis</i>	18	45,1
<i>Chlamydia pecorum PV3056/3</i>	19	38,2
<i>Chlamydophila caviae GPIC</i>	20	40,8
<i>Corallococcus coralloides DSM 2259</i>	21	43
<i>Cyclobacterium marinum DSM 74</i>	22	44,5
<i>Cystobacterfuscus</i>	23	43,5
<i>Echinicola vietnamensis DSM 17526</i>	24	44,5
<i>Flavobacteria bacterium BBFL7</i>	25	43,4
<i>Flexibacter litoralis DSM 6794</i>	26	47,5
<i>Formosa sp. AK20</i>	27	45,7
<i>Fulvivirga imtechensis</i>	28	47,1
<i>Kangiella aquimarina</i>	29	44,1
<i>Kangiella koreensis DSM 16069</i>	30	44,3
<i>Lacinutrix sp. 5H-3-7-4</i>	31	44,2
<i>Mariniradius saccharolyticus</i>	32	44,5
<i>Mucilaginibacter paludis</i>	33	43,9
<i>Myroides odoratimimus</i>	34	42,2
<i>Myxococcus fulvus HW-1</i>	35	44,5
<i>Myxococcus stipitatus DSM 14675</i>	36	44,4
<i>Myxococcus xanthus DK 1622</i>	37	45,1
<i>Nafulsella turpanensis</i>	38	48,2
<i>Niastella koreensis GR20-10</i>	39	44,8
<i>Nonlabens dokdonensis DSW-6</i>	40	44
<i>Pedobacter agri</i>	41	44,1
<i>Pedobacter sp. BAL39</i>	42	42,1

<i>Pedobacter sp. V48</i>	43	44,1
<i>Rhodonellum psychrophilum</i>	44	45,4
<i>Salinispora arenicola</i>	45	39,1
<i>Saprospira grandis str. Lewin</i>	46	43,2
<i>Stigmatella aurantiaca DW4/3-1</i>	47	42,5
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	48	42
<i>Psychroflexus gondwanensis</i>	49	44
<i>Lewinella cohaerens</i>	50	45,6
<i>Lewinella persica</i>	51	44,9
<i>Pontibacter roseus</i>	52	44,8

Ejemplo 15 - Parámetros cinéticos de quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis* (Mu-KYNU)

Los parámetros cinéticos de *Mu*-KYNU se cuantificaron mediante un ensayo espectrofotométrico, en que se controló el descenso en la absorbancia máxima del sustrato enzimático, L-quinurenina, como una función del tiempo. Se prepararon soluciones de L-quinurenina en un tampón de PBS, pH 7,4, para producir concentraciones finales que varían de 16 µM a 500 µM. La L-quinurenina tiene un coeficiente de extinción de 4500 M⁻¹cm⁻¹ con una $\lambda_{\text{máx}}$ a 365 nm mientras que los productos de la reacción de quinureninasa, ácido L-antranílico y L-alanina, no absorben apreciablemente a 365 nm. Las reacciones se iniciaron añadiendo y mezclando rápidamente soluciones enzimáticas (~20 nM concentración final) con las soluciones de sustrato y controlando la pérdida de sustrato a 25 °C midiendo Abs_{365 nm} a lo largo del tiempo. Los datos resultantes se procesaron y ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten para determinar las constantes cinéticas. Se determinó que *Mu*-KYNU tiene una $k_{\text{cat}}/K_M = 1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Ejemplo 16 - Estabilidad *in vitro* de quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis* (Mu-KYNU)

Para medir la estabilidad *in vitro* de *Mu*-KYNU, la enzima se añadió a tampón PBS o suero humano combinado hasta una concentración final de 10 µM y se incubó a 37 °C. Se recogieron porciones de 10 µl cada una en los puntos temporales y se añadieron a 990 µl de una solución 250 µM de L-quinurenina/PBS. La velocidad inicial de la reacción se controló midiendo el descenso de la absorbancia a 365 nm a lo largo del tiempo como se describe en el ejemplo 3. La estabilidad enzimática se determinó comparando la velocidad inicial de catálisis de L-quinurenina en cada punto temporal y comparándola con la velocidad a tiempo = 0. Los datos resultantes se representaron como porcentaje de actividad frente al tiempo y se ajustaron a un modelo de descenso bifásico (Stone *et al.*, 2010) para determinar las semividas ($T_{1/2}$). Se descubrió que la actividad de la enzima *Mu*-KYNU en PBS tenía una ${}^1T_{1/2} = 6 \text{ h}$ con una amplitud de un 74 % de actividad restante y una posterior ${}^2T_{1/2} = 150 \text{ h}$ (FIG. 7). Se determinó que la estabilidad de la enzima *Mu*-KYNU en suero humano combinado tenía un ${}^1T_{1/2} = 5 \text{ h}$ con una amplitud de un 30 % de actividad restante y un posterior ${}^2T_{1/2} = 73 \text{ h}$ (FIG. 7).

Ejemplo 17 - Construcción génica, expresión y purificación de quinureninasa de *Chlamydophila pecorum*

Se sintetizó un gen para la expresión de la enzima quinureninasa de *Chlamydophila pecorum* (*Cp*-KYNU) usando bloques génicos de codones optimizados de *E. coli*. El gen de longitud completa incluye un sitio para la enzima de restricción *Ncol* en el extremo N (nucleótidos 1-6), un codón de inicio (nucleótidos 3-5), una marca de His₆ en el extremo N (nucleótidos 6-35), un gen *Cp*-KYNU de codones optimizados de *E. coli* (nucleótidos 36-1295), un codón de parada (nucleótidos 1296-1298) y un sitio para la enzima de restricción EcoRI en el extremo C (nucleótidos 1299-1304) (SEQ ID NO: 53). Los sitios para enzimas de restricción mencionados anteriormente se usaron para clonar el gen ensamblado en un vector pET-28a+ (Novagen). Esta construcción entonces se usó para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión. Las células se cultivaron a 37 °C con agitación a 210 r.p.m. en medio Terrific Broth (TB) con 50 mg/l de canamicina. La expresión se indujo cuando se alcanzó una DO₆₀₀ ~1,0 añadiendo IPTG (concentración final 0,5 mM) con agitación continuada durante la noche a 16 °C. Las células entonces se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis que consistía en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, fosfato de piridoxilo (PLP) 0,5 mM, fluoruro de fenilmetsulfonilo 1 mM y 1 µg/ml de DNasa. La lisis se consiguió mediante prensa francesa y el lisado se aclaró de los particulados por centrifugación a 20 000 x g durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante entonces se filtró a través de un filtro de jeringa de 5 µm y se aplicó a una columna de Ni-NTA/agarosa (Qiagen) preequilibrada en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, y tampón PLP 0,1 mM. Después de cargar el lisado en la columna, la resina se lavó con 10 volúmenes de columna (CV) de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, y PLP 0,1 mM con imidazol 30 mM. La enzima lavada entonces se eluyó con 5 CV de PBS que contenía PLP 0,1 mM e imidazol 250 mM. Se intercambió el tampón de la enzima eluida a PBS fresco para eliminar el imidazol, se añadió glicerol al 10 % y se congelaron inmediatamente alícuotas en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C.

Ejemplo 18 - Parámetros cinéticos de quinureninasa de *Chlamydophila pecorum* (*Cp*-KYNU)

Los parámetros cinéticos de *Cp*-KYNU (SEQ ID NO: 57) se cuantificaron mediante un ensayo espectrofotométrico, en que se controló el descenso en la absorbancia máxima del sustrato enzimático, L-quinurenina, como una función del tiempo. Se prepararon soluciones de L-quinurenina en tampón de PBS, pH 7,4, para producir concentraciones finales que varían de 16 µM a 500 µM. La L-quinurenina tiene un coeficiente de extinción de 4500 M⁻¹cm⁻¹ con una $\lambda_{\text{máx}}$ a

365 nm mientras que los productos de la reacción de quinureninasa, antranilato y L-alanina, no absorben apreciablemente a 365 nm. Las reacciones se iniciaron añadiendo y mezclando rápidamente soluciones enzimáticas (200 nM concentraciones finales) con las soluciones de sustrato y controlando la pérdida de sustrato a 25 °C midiendo Abs_{365 nm} a lo largo del tiempo. Los datos resultantes se procesaron y ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten para determinar las constantes cinéticas. Se determinó que Cp-KYNU tiene una $k_{cat}/K_M = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

5

Ejemplo 19 - Preparación farmacológica de quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis*

Para mejorar el tiempo en circulación de la enzima *in vivo*, se aumentó el radio hidrodinámico *Mu*-KYNU 10 funcionalizando los grupos reactivos superficiales en la proteína por conjugación con PEG. En una realización, se PEGiló *Mu*-KYNU por reacción de los restos de lisina superficiales con carbonato de metoxi PEG succinimidilo de 5000 PM (NANOCS). Se determinó que la *Mu*-KYNU purificada contenía niveles de endotoxina muy bajos (<20 UE/mg) como se describe a continuación. Se intercambió completamente el tampón a tampón de fosfato de sodio 15 100 mM recién preparado, pH 8,4 y se concentró a más de un 1 mg/ml. La solución resultante se añadió directamente a un exceso molar de 100:1 de reactivo de PEG sólido y se permitió que reaccionara a temperatura ambiente durante 1 h con agitación. El PEG sin reaccionar se retiró de la solución por intercambio de todo el tampón a PBS sin 20 endotoxina reciente en un dispositivo de filtración centrífuga de punto de corte de 100 kDa (Amicon). La masa molecular aparente de la enzima entonces se comprobó en una columna de HPLC de exclusión molecular (Phenomenex) en PBS usando una solución de patrón de MP de BioRad para generar una curva patrón, y se compararon los tiempos de retención enzimática con los de los patrones de proteína. Los niveles de endotoxina se cuantificaron usando el kit de ensayo de endotoxina cromógeno cinético Chromo-LAL (Associates of Cape Cod, Inc.).

15

Ejemplo 20 - Degradación de L-quinurenina potenciada en una variante de quinureninasa humana genomanipulada

25

La enzima *h*-KYNU es muy selectiva hacia la hidrólisis de 3'-OH quinurenina y tiene una actividad catalítica aproximadamente 1000 veces inferior hacia L-quinurenina. A causa de su mala actividad catalítica hacia L-quinurenina, la enzima humana de tipo silvestre humana no es adecuada para fines terapéuticos. Para diseñar una actividad degradante de L-quinurenina mejorada en *h*-KYNU, se construyó una colección por mutagénesis de saturación 30 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de extensión solapante usando el gen de *h*-KYNU y un par de oligonucleótidos diseñados para introducir mutaciones en el codón correspondiente al aminoácido F306. F306 está ubicado dentro el sitio activo de *h*-KYNU donde parece desempeñar una función en la unión al sustrato. La colección de saturación de F306 se cribó para la actividad usando el ensayo de quinureninasa en placa de microvaloración del ejemplo 6. Más de una docena de clones presentaban actividad significativa mayor que *h*-KYNU de tipo silvestre y se 35 seleccionaron para análisis adicional. La secuenciación de estos clones reveló que dos sustituciones de aminoácido en la posición F306 provocaban actividad degradante de L-quinurenina aumentada, concretamente *h*-KYNU-F306M (SEQ ID NO: 55) y *h*-KYNU-F306L (SEQ ID NO: 56). Estas variantes entonces se purificaron hasta homogeneidad y un análisis cinético detallado reveló un aumento de 2 veces a 5 veces en k_{cat}/K_M para L-quinurenina para *h*-KYNU-F306M y *h*-KYNU-F306L, respectivamente, en comparación con *h*-KYNU de tipo silvestre.

40

Ejemplo 21 - Comparación de tratamientos con *Pf*-KYNU, anti-PD1 y anti-CTLA-4 en el modelo de melanoma de ratón B16 autólogo

45

Se evaluó la quinureninasa de *Pseudomonas fluorescence* PEGilada (PEG-*Pf*-KYNU) en el modelo de ratón de melanoma B16 en una comparación paralela con los anticuerpos inhibidores del punto de control inmunitario anti-PDI (clon RMP1-14, BioXCell n.º BE0146) o anti-CTLA-4 (clon UC10-4F10-11, BioXCell n.º BE0032). Se implantaron cincuenta mil células B16 en el flanco de ratones C57BL/B16 (día 0, n = 8 ratones cada grupo). Una vez se desarrollaron tumores palpables (día 10), los animales se trataron con 250 µg de anti-PD1, 100 µg de anti-CTLA-4 (200 µg la 1.^a dosis según Holmggaard *et al.* (2013)) o 500 µg de PEG-*Pf*-KYNU en los tiempos mostrados (FIG. 8). Se 50 usó PEG-*Pf*-KYNU inactivada con calor como control. La administración de PEG-*Pf*-KYNU provocó un retardo del crecimiento tumoral significativo y supervivencia prolongada de una manera indistinguible de la observada con los anticuerpos inhibidores del punto de control anti-PDI o anti-CTLA-4 (FIG. 8) para PEG-*Pf*-KYNU frente a la enzima inactivada o PBS únicamente.

55

Ejemplo 22 - Eficacia de tratamiento de combinación de *Mu*-KYNU o *Pf*-KYNU y anti-PD1 en el modelo de melanoma de ratón B16 autólogo

60

Las enzimas PEGiladas (PEG-*Pf*-KYNU y PEG-*Mu*-KYNU) se evaluaron en aloinjertos de melanoma B16 en combinación con el anticuerpo inhibidor del punto de control inmunitario anti-PDI (Curran *et al.*, 2010). A cuatro grupos de ratones C57BL/6J (10 por grupo) se les implantó 50 000 células B16 (día 0) y se permitió que se desarrollaran los tumores. Una vez se desarrollaron tumores palpables (día 10), los animales se trataron con 250 µg de anti-PD1 por inyección IP (clon RMP1-14, BioXCell n.º BE0146) en los días 10, 13 y 16 con o sin 500 µg de PEG-*Pf*-KYNU o 500 µg PEG-*Mu*-KYNU s.c. cerca del sitio del tumor. Los ratones recibieron un total de seis dosis de KYNU entre los días 10 y 25. A un grupo se le administró inyecciones de PBS i.p. como control para PD-1. El crecimiento del tumor se alteró drásticamente o incluso se invirtió en todos los brazos de tratamiento en comparación con el control de PBS (FIG. 9A). De forma importante, se observaron efectos aditivos con anti-PDI en combinación con KYNU, que provoca remisión

completa de un 60 % de los tumores con tratamiento de PEG-Pf-KYNU/anti-PD1 y un 20 % de los tumores con tratamiento de PEG-Mu-KYNU/anti-PD1 (FIG. 9B). Los diagramas de Kaplan-Meier correspondientes se proporcionan en la FIG. 9C.

5 Ejemplo 23 - Eficacia de tratamientos de PEG-Mu-KYNU en el modelo de melanoma de ratón B16 autólogo

- Se evaluó la quinureninasa de *Mucilaginibacter paludis* PEGilada (PEG-Mu-KYNU) en el modelo de ratón de melanoma B16. Se iniciaron aloinjertos implantando 50 000 células B16 en los flancos de ratones C57BL/6J (día 0, n = 9 ratones por grupo). Una vez se desarrollaron tumores palpables (día 10), los animales se trataron con 500 µg de PEG-Mu-KYNU por inyección subcutánea cerca el sitio del tumor cada tres días para un total de 6 dosis. Se usó un régimen de tratamiento idéntico con PEG-Mu-KYNU inactivada con calor como control. La administración de PEG-Mu-KYNU provocó retardo del crecimiento tumoral (FIG. 10A) con una mediana del tiempo de supervivencia prolongada de 25 días en comparación con 22 días para el control con PEG-Mu-KYNU inactivada por calor (FIG. 10B).
- 15 Todos los métodos divulgados en este documento pueden generarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente divulgación.

Referencias

- 20 Las siguientes referencias, en la medida en que proporcionan procedimientos ejemplares u otros detalles complementarios a los expuestos en este documento, se mencionan en este documento.

- Patente de Estados Unidos n.º 4.870.287
 Patente de Estados Unidos n.º 5.739.169
 25 Patente de Estados Unidos n.º 5.760.395
 Patente de Estados Unidos n.º 5.801.005
 Patente de Estados Unidos n.º 5.824.311
 Patente de Estados Unidos n.º 5.830.880
 Patente de Estados Unidos n.º 5.846.945
 30 Patente de Estados Unidos n.º 5.889.155
 Patente de Estados Unidos n.º 7.109.304
 Patente de Estados Unidos n.º 8.465.743
 Publicación de patente de Estados Unidos 2009/0304666
 Documento WO 2012/031744
 35 Documento WO 2012/079000
 Documento WO 2013/059593
- 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.
 40 Austin-Ward y Villaseca, *Revista Médica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.
 Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y., 1994.
 Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.
 Chen y Guillemin, Kynurene pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *Int J Tryptophan Res*, 45 2:1-19, 2009.
 Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
 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.
 50 Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.
 de Jong *et al.*, Serum tryptophan and kynurene 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.
 Della Chiesa *et al.*, The tryptophan catabolite L-kynurene inhibits the surface expression of NKp46-and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood*, 108(13):4118-4125, 2006.
 55 Godin-Ethier *et al.*, Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Expression in Human Cancers: Clinical and Immunologic Perspectives. *Clinical Cancer Research*, 17(22):6985-6991, 2011.
 Hanibuchi *et al.*, *Int J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
 Harkki *et al.*, *BioTechnology*, 7:596-603, 1989.
 Hellstrand *et al.*, *Acta Oncológica*, 37(4):347-353, 1998.
 60 Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
 Holmgård *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.
 Hoover y Lubkowski, DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Research*, 30(10):e43-e43, 2002.
 65 Hopwood *et al.*, en: *Genetic Manipulation of Streptomyces*, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, Conn., 1985.

- Hui y Hashimoto, Infection Immun., 66(11):5329-5336, 1998.
 Ito *et al.*, J. Biochem., 79:1263, 1976.
 Kaper *et al.*, Nanosensor detection of an immunoregulatory tryptophan influx/kynurenine efflux cycle. PLoS Biology, 5(10):e257, 2007.
- 5 Lipowska-Bhalla *et al.*, Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges. Cancer Immunology Immunotherapy, 61(7):953-962, 2012.
 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.
 Lordanescu, J. Bacteriol, 12:597 601, 1975.
- 10 Mandi y Vecsei, The kynurenine system and immunoregulation. J Neural Transm, 119(2):197-209, 2012.
 Maniatis, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
 Mellor *et al.*, Gene, 24:1-14, 1983.
 15 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.
 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.
 Opitz *et al.*, An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. Nature, 478(7368):197-203, 2011.
- 20 Penttila *et al.*, Gene, 61:155-164, 1987.
 Pilote *et al.*, Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. Proc Natl Acad Sci USA, 109(7):2497-2502, 2012.
 Prendergast, Cancer: Why tumours eat tryptophan. Nature, 478(7368):192-194, 2011.
 25 Qin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(24):14411-14416, 1998.
 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
 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.
 Schellenberger *et al.*, Nature Biotech., 27:1186-1190, 2009.
- 30 Shin *et al.*, Modulation of natural killer cell antitumor activity by the aryl hydrocarbon receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 110(30):12391-12396, 2013.
 Sibakov *et al.*, Eur. J. Biochem., 145:567 572, 1984.
 Song *et al.*, L-Kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. International Immunopharmacology, 11(8):932-938, 2011.
 35 Stone *et al.*, Replacing Mn²⁺ with Co²⁺ in human arginase I enhances cytotoxicity toward L-arginine auxotrophic cancer cell lines. ACS Chemical Biology, 5:333-342, 2010.
 Ward, Proc, Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Helsinki, 119-128, 1989.
 Wawrzynczak y horpe, en: Immunoconjugates, Antibody Conjugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.
- 40 Yao *et al.*, Serum metabolic profiling and features of papillary thyroid carcinoma and nodular goiter. Mol Biosyst, 7(9):2608-2614, 2011.
 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.

Listado de secuencias

- 45 <110> Board of Regents, The University of Texas System
 <120> Administración de enzimas reductoras de quinurenina para tratamiento tumoral
 50 <130> UTFB.P1018WO
 <150> US 61/872.132
 <151> 30/08/2013
 55 <150> US 61/986.366
 <151> 30/04/2014
 <160> 57
 60 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 1347
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 1

5 tctagaaata atttgttta actttaagga aaacattaaa ataaggaggt agcaaatggg 60
 cggtcatcat caccaccatc atgggagcgg caccacccgc aacgattgcc tggcgctgga 120
 tgccgcaggat agcctggcac cgctgcgtca gcagttgcgc ctgcccgaag gtgttattta 180
 tctggatggc aacagcctgg gtgcgcgtcc gttgcggcg ctggcgctg cgcaggcggt 240
 gattgcgaa gaatggggca acggcctgat tcgcagctgg aacagcgcgg gctggcgca 300
 tctgagcgaa cgccctggca accgcctggc gaccctgatt ggccgcgcg atggcgaagt 360
 ggtggtgacc gataccacca gcattaacct gttaaagtgc tgagcgcgg cgctgcgcgt 420
 gcaggcgacc cgcaagcccg aacgcgcgt gattgtgacc gaaaccagca acttccgac 480
 cgatctgtat attgcggaaag gcctggcgta tatgctgcag caggctata ccctgcgcct 540
 ggtggatagc ccgaaagaac tgccgcaggc gattgatcag gataccgcgg tggtgatgct 600
 gacccatgtg aactataaaa cggctatat gcatgatatg caggcgctga cgcgcgtgag 660
 ccatgaatgc ggccgcgtgg cgatttggta tctggcgcat agccgcggcg cggtgccggt 720
 gatatctgcatt caggcgccgc cggattatgc gattggctgc acctataat atctgaacgg 780
 cggcccgccgc agccaggcgt ttgtgtgggt gagccgcag ctgtgcgatc tggtgccgca 840
 gccgctgtct gttgggttg gccatagccg ccagttgcgc atgaaaccgc gctatgaacc 900
 gagcaacggc attgcgcgt atctgtgcgg cacccagccg attaccagcc tggcgatggt 960
 ggaatgcggc ctggatgtgt ttgcgcagac cgatatggcg agccgcgcgca gaaaaagcct 1020
 ggcgcgtgacc gatctgttta ttgaactggt ggaacagcgc tgccgcggcg atgaactgac 1080
 cctggtgacc ccgcgcgaac atgcgaaacg cggcagccat gtgagctttg aacatccgga 1140
 aggctatgcg gtgattcagg cgctgattga tcgcggcggtt attggcgatt atcgcgaaacc 1200
 ggcgcattatg cgcttggct ttacccgcgt gtataccacc ttaccgaag tggatgc 1260
 ggtgcagatt ctggcgaaa ttctggatcg caaaacctgg ggcaggcgc agtttcaggt 1320
 ggcgcatacg gtgacctagt aggtatcc 1347

<210> 2

<211> 1497

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 2

10

15

tctagaaata	attttgtta	actttaagga	caaatcagga	cacagttaag	gaggtaaaat	60
atgggcggtc	atcatcacca	ccatcatggg	agcggcgaac	cgagctccct	tgaacttccg	120
gccgataaccg	tgcaacggat	agcggcggaa	ttgaaatgtc	acccgaccga	cgaacgcgtc	180
gcgttacatc	tggatgagga	agacaagctg	cgtcaattcc	gcgagtgtctt	ttacattccg	240
aaaattcagg	atctgcccgc	agtggacttg	agcctggtca	acaaagacga	gaacgccatc	300
tacttcctgg	gcaatagcct	gggcctgcaa	ccaaagatgg	tgaaaaccta	tcttgaggag	360
gagcttgaca	aatgggcgaa	gatcgccggcc	tacggccatg	aagtccggcaa	gcgtccctgg	420
attaccggcg	atgagtcaat	cgtggcttg	atgaaggata	tcgtcggcgc	gaacgagaaaa	480
gaaattgcgc	tgtatgaacgc	gctgaccgtg	aatctgcattc	tgctgtatgct	gtcattcttt	540
aagcccaccc	cgaagcgcta	caaaatcctg	ctggaaagcga	aagcgtttcc	cagcgatcat	600
tatgcgatag	aaagccagct	gcaactgcac	ggcctgaata	tcgaggagag	catgcgtatg	660
ataaaaaccgc	gcgaagggtga	ggagaccctg	cggattgagg	acatcctgga	ggtgatcgag	720
aaggagggcg	acagtatcgc	ggtgataactt	ttcagcggcg	tgcatttcta	cacgggccaa	780
cacttcaata	tcccgccat	taccaaagcc	ggccaggcga	aagggtgcta	tgtaggcttt	840
gatctggcgc	atgcagtggg	caacgtcgaa	ctgtatcttc	atgattgggg	cgttgatttt	900
gcgtgcttgt	gcagctataa	gtatctgaat	gccggggccg	gtgggattgc	gggagccttt	960
attcatgaga	aacacgcgca	taccattaaa	ccggcgctgg	ttggctggtt	ttggcacgaa	1020
ctgagcaccc	gcttcaagat	ggataacaaa	ctgcaattga	ttccgggcgt	gtgcggcttt	1080
cgtattagca	accffffcgat	tctgctggtc	tgcagcctgc	acgcgtatct	ggagattttc	1140
aagcaggcga	ccatgaaagc	gctgcgttaag	aaaagtgtgc	ttctgacggg	ctacctggag	1200
tacctgataa	agcacaacta	cgccaaggat	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> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 3

tctagaaata	attttgttta	actttaagaa	cacggtcggg	aatataagga	ggtaaaat	60
gggcggtcat	catcaccacc	atcatggag	cggcgagccg	agcccgtgg	aactgccgg	120
tgacgcggt	cgtcgattg	cggcagaact	gaactgtgac	ccgaccgatg	aacgtgtggc	180
gctgcgtctc	gacgaagagg	acaagcttc	tcacttccgt	aactgcttct	atatccctaa	240
aatgcgtgac	ctgccgagca	tcgatctgac	tctggttct	gaagacgacg	acgcgattta	300
cttcctgggt	aactctctgg	gtctgcagcc	aaaaatggtt	cgtacctacc	tggaggaaga	360
gctggacaaa	tggcgaaaa	tgggtgccta	cggccatgat	gtgggcaaac	gcccggtggat	420
cgtcggcgcac	gaaagcattg	tgtctctcat	gaaggacatt	gttggtgac	acgagaaaga	480
aattgcgtg	atgaatgctc	tgaccatcaa	cctgcacctg	ctgctcctgt	ctttcttcaa	540
gccgaccccc	aagcgtcata	aaatcctgct	cgaggctaaa	gcgttccgt	ctgatacta	600
cgcgatcgaa	tctcaaatcc	aactgcacgg	tctggacggt	gagaagtcta	tgcgtatgg	660
taagccgcgt	gaaggcgagg	agaccctccg	tatggaagac	atcctcgaag	ttatcgaaga	720
agaaggtgac	tctatcgac	ttattctgtt	ctctggcctg	cactttaca	ccggtaact	780
gttcaatatc	ccggcaatca	ccaaagcggg	ccacgcgaaa	ggttgcttcg	ttggttcga	840
cctggccat	gcgggtggta	acgtggagct	gcccctccac	gactggggtg	ttgactttgc	900
gtgctggtgc	tcttacaaat	acctgaactc	tggtgccgg	ggtctcgccg	gtgcgttcgt	960
ccacgaaaaa	cacgcgcaca	ccgttaaacc	ggcgctgggt	ggctggttcg	gccacgacct	1020
ctctacgcgt	ttcaacatgg	acaacaaact	ccagctgatc	ccaggcgcca	acggtttccg	1080
tatctctaac	ccgcccgtcc	tcctggtttg	ctctctgcac	gcgtctctcg	aggttttcca	1140
gcaggcgacc	atgaccgccc	tgcgcgtaa	atctattctc	ctgacgggtt	atctggaata	1200
catgctgaag	cactaccact	ctaaagacaa	cacggaaaac	aaaggccga	tcgttaacat	1260
catcaccccc	tctcggtcg	aagaacgtgg	ctgccaactg	accctgacct	tctctattcc	1320
aaaaaaatct	gtttcaaag	aactggagaa	acgtgggtgtt	gtttgcgaca	aacgtgaacc	1380
ggacggtatc	cgcgttgctc	cggtcccgct	gtacaactct	ttccatgacg	tttataagtt	1440
cattcgctcg	ctcacctcca	tcctggactc	tagcgaacgc	tcctaaggat	cc	1492

<210> 4

<211> 1251

<212> ADN

<213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 4

ES 2 707 711 T3

	atgaccaccc gcaacgattg cctggcgctg gatgcgcagg atagcctggc accgctgcgt	60
	cagcagtttgcg cgtgcggaa aggtgttatt tatctggatg gcaacagcct gggtgcgagt	120
	ccgggtgcgg cgctggcgcg tgcgcaggcg gtgattgcgg aagaatgggg caacggcctg	180
	atccgcagct ggaacagcgc gggctggcgc gatctgagcg aacgcctggg caaccgcctg	240
	gcgaccctga ttggcgcgcg cgatggcgaa gtgggttgtga ccgataaccac cagcattaac	300
	ctgtttaaag tgctgagcgc ggctgcgcgt gtgcaggcga cccgcagccc ggaacgcgcgc	360
	gtgatttgta ccgaaaccag caacttccg accgatctgt atattgcgga aggctggcg	420
	gatatgctgc agcagggcta taccctgcgc ctgggtggata gcccggaaaga actgcccgcag	480
	gcgattgatc aggataccgc ggtgggtatg ctgaccatg tgaactataa aaccggctat	540
	atgcatacatgata tgcaggcgct gaccgcgcgt agccatgaat gcggcgcgct ggcgatttgg	600
	gatctggcgca atagcgcggg cgccgtgcgg gtggatctgc atcaggcggg cgccgattat	660
	gcgattggct gcacctataa atatctgaac ggccggcccg gcagccaggc gtttgtgtgg	720
	gtgagccgc agctgtgcga tctgggtccg cagccgctgt ctgggtggtt tggccatagc	780
	cgccagtttgcg cgtggaaacc gcgcatacgaa ccgagcaacg gcattgcgcg ctatctgtgc	840
	ggcacccagc cgattaccag cctggcgatg gtggaatgcg gcctggatgt gtttgcgcag	900
	accgatatgg cgagcctgcg ccgcggaaacc ctggcgctga ccgatctgtt tattgaactg	960
	gtggaacagc gctgcgcggc gcatgaactg accctggatg ccccgccgca acatgcgaaa	1020
	cgccggcagcc atgtgagctt tgaacatccg gaaggctatg cggtgattca ggctgcgtatt	1080
	gatcgcggcg tgattggcgaa ttatcgccaa ccgcgcattta tgcgctttgg ctttaccccg	1140
	ctgtataccca cctttaccga agtgtggat gcgggtgcaga ttctggcgaa aattctggat	1200
	cgccggaaaccct gggcgcaggc gcagtttcag gtgcgcctata gcgtgaccta g	1251
	<210> 5	
	<211> 1398	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	
	atgaaaccga gctcccttga acttccggcc gataccgtgc aacggatagc ggcggaaattg	60
10	aaatgtcacc cgaccgacga acgcgtcgcg ttacatctgg atgaggaaga caagctgcgt	120

cacttccgcg	agtgcTTta	cattccgaaa	attcaggatc	tgccGCCAGT	ggacttgagc	180
ctggtcaaca	aagacgagaa	cgccatctac	ttcCTGGCA	atagCCTGGG	cctgcaacca	240
aagatggtga	aaaccttatct	tgaggaggag	cttgacAAAT	gggcgaAGAT	cgcggcctac	300
ggccatgaag	tcggcaAGCG	tccCTGGATT	accggcgatg	agtcaatcgt	tggCTTgatg	360
aaggatatcg	tcggcgcgaa	cgagAAAGAA	attgcgCTGA	tgaACGCGCT	gaccgtGAAT	420
ctgcATCTGC	tGATGCTGTC	attCTTAAG	cccACCCGGA	agcgctACAA	aatCCTGCTG	480
gaagcgAAAG	cgttcccAG	cgatcattat	gcgatAGAAA	gccagCTGCA	actgcacggc	540
ctgaatatcg	aggAGAGCAT	gcgtatgata	aaACCgcGCG	aaggTgAGGA	gaccCTGCGG	600
attgaggaca	tcctggaggt	gatcgAGAAG	gaggGCgACA	gtatogCGGT	gataACTTTC	660
agcggcgtgc	atttctacac	gggccaACAC	ttcaatATCC	cggcCATTAC	caaAGCCGGC	720
caggcgAAAG	ggtgctATGT	aggCTTgat	ctggcgcATG	cagtGGGCAA	cgtcgAACTG	780
tatCTTcatg	attggggcgt	tgattttgcg	tgctggTGCA	gctataAGTA	tctGAATGCC	840
ggggccggTG	ggattgcGGG	agcCTTAtt	catgAGAAAC	acgcgcatac	cattAAACCG	900
gcgcTggTTG	gctggTTTgg	gcacgAACTG	agcacCCGCT	tcaAGATGGA	taACAAACTG	960
caattgattc	cggcgtGTG	cggCTTCGT	attAGCAACC	ccccgattCT	gctggTCTGC	1020
agcCTgcACG	cgtCTCTGGA	gattttcaAG	caggcGACCA	tgAAAGCGCT	gcgtAAAGAAA	1080
agtgtgcTTc	tgacgggcta	cctggAGTAC	ctgataAAAGC	acaACTACGG	caaggATAAG	1140
gcggccacga	agaAGCCGGT	tgtGAACATT	atCACCCGT	ctcatgtGGA	agaACGTGGC	1200
tgccaACTGA	cgataACGTT	cagcgtGCCA	aacaAGGACG	tgttccaAGA	gctggAGAAAG	1260
cgtggcgtgg	tgtgtgataa	acgtaatCCG	aatggcATTc	gtgtggCGCC	tgtGCCGCTG	1320
tacaacAGCT	tccacgacGT	gtataAGTTC	accaACCTGC	tgacgAGCAT	tctggACAGT	1380
gcggAAACCA	aaaACTAG					1398

<210> 6

<211> 1395

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 6

atggagccga	gcccgcgtt	actgcccgtt	gacgcggta	gtcgattgc	ggcagaactg	60
aactgtgacc	cgaccgatga	acgtgtggcg	ctgcgtctcg	acgaagagga	aaagctctt	120
cacttccgta	actgcttcta	tatccctaaa	atgcgtgacc	tgccgagcat	cgatctgtct	180
ctggtttctg	aagacgacga	cgcgatttac	ttccctggta	actctctggg	tctgcagcca	240
aaaatggttc	gtacctacct	ggaggaagag	ctggacaaat	gggcgaaaat	gggtgcctac	300
ggccatgatg	tggcaaaacg	cccgtggatc	gtcggcgacg	aaagcattgt	gtctctcatg	360
aaggacattg	ttgggtgcaca	cgagaaagaa	attgcgtga	tgaatgctct	gaccatcaac	420
ctgcacctgc	tgctcctgtc	tttcttcaag	ccgaccccga	agcgtcataa	aatcctgctc	480
gaggctaaag	cgttcccgta	tgatcaactac	gcgatcgaat	ctcaaatacca	actgcacggt	540
ctggacgttg	agaagtctat	gcgtatggtt	aagccgcgtg	aaggcgagga	gaccctccgt	600
atggaagaca	tcctcgaagt	tatcgaagaa	gaaggtgact	ctatcgagt	tattctgttc	660
tctggcctgc	acttttacac	cggtaactg	ttcaatatcc	cgcaatcac	caaagcgggc	720
cacgcgaaag	gttgcttcgt	tggttcgac	ctggcccatg	cggttggtaa	cgtggagctg	780
cgcctccacg	actggggtgt	tgactttcg	tgctggtgct	cttacaaata	cctgaactct	840
ggtgcggttg	gtctcgcccc	tgcgttcgtc	cacgaaaaac	acgcgcacac	cgttaaacccg	900
gchgctggttg	gctgggttcgg	ccacgaccc	tctacgcgtt	tcaacatgga	caacaaactc	960
cagctgatcc	caggcgccaa	cggttccgt	atctctaacc	cgccgatcct	cctggtttgc	1020
tctctgcacg	cgtctctcga	ggtttccag	caggcgacca	tgaccgcct	gcccgtaaa	1080
tctattctcc	tgacgggtta	tctggaatac	atgctgaagc	actaccactc	taaagacaac	1140
acggaaaaaca	aagggtccgat	cgttaacatc	atcaccgggt	ctcgtgcgga	agaacgtggc	1200
tgccaaactga	ccctgacctt	ctctattccg	aaaaaatctg	tttcaaaga	actggagaaa	1260
cgtgggtttg	tttgcgacaa	acgtgaaccg	gacggtatcc	gcgttgctcc	ggtcccgtg	1320
tacaactctt	tccatgacgt	ttataagttc	attcgtctgc	tcacccat	cctggactct	1380
agcgaacgct	cctaa					1395

<210> 7

<211> 416

<212> PRT

<213> *Pseudomonas fluorescens*

<400> 7

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

Ala Thr Leu Ile Gly Ala Arg Asp Gly Glu Val 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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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 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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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 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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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 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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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 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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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 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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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 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

ES 2 707 711 T3

<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 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

ES 2 707 711 T3

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

5

10

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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 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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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 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

ES 2 707 711 T3

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

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

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

Glu Ala Gly Cys Cys Val Gly Tyr Asp Leu Ala His Ala Ala Gly Asn
210 215 220

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

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

Val His Ala Ser His His Gln Gln Phe Val Arg Phe Ser Gly Trp
260 265 270

Trp Gly Asn Asp Pro Asn Thr Arg Phe Tyr Phe Pro Lys Glu Phe Val
275 280 285

Pro Tyr Gly Gly Ala Ser Ser Trp Gln Val Ser Thr Pro Ser Ile Leu
290 295 300

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

ES 2 707 711 T3

Val Leu Lys Thr Ile
420

<210> 20

<211> 425

5 <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 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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5

<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

10

ES 2 707 711 T3

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 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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2707 711 T3

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 Arg Tyr Ala Arg Gly
420 425

<210> 24

<211> 426

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

<210> 26
<211> 442
<212> PRT
5 <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
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 707 711 T3

210	215	220
Ala Ala His Lys Val Gly Ala Thr Ala Gly Phe Asp Leu Ala His Ala		
225	230	235
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
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
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

ES 2 707 711 T3

<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

Ile 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 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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <212> PRT

<213> *Kangiella aquimarina*

<400> 29

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

ES 2 707 711 T3

Tyr His Glu Phe Ile 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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <212> PRT

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

<400> 31

Met Ser Asn Tyr Thr Leu Gly Arg Asp Phe Ala Gln Gln Leu Asp Lys
 1 5 10 15

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

Lys Asn Gly Asp Asp Leu Ile Tyr Leu Cys Gly Asn Ser Leu Gly Leu
 35 40 45

Gln Pro Lys Val Thr Lys Asp Tyr Ile Asn Gln Glu Leu Glu Asp Trp
 50 55 60

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

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

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

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

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

Gln Leu Arg His His Gly Phe Asp Asp Lys Glu Gly Leu Val Leu Trp
 145 150 155 160

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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

Leu Lys Ala Cys Leu
420

5
<210> 32
<211> 428
<212> PRT
<213> *Cecembia lonarensis*

<400> 32

Met	Thr	Thr	Asp	Phe	Glu	Tyr	Thr	Glu	Asp	Phe	Ala	Lys	Arg	Met
1				5				10				15		

Asp	Asp	Leu	Asp	Pro	Phe	Arg	His	Phe	Arg	Ser	Met	Phe	His	Phe	Pro
20							25					30			

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

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

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

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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2707 711 T3

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> *Myrodes odoratimimus*

5

<400> 34

Met	Ser	Phe	Glu	Asn	Thr	Leu	Ala	Tyr	Ala	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Lys
1									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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

<211> 428
<212> PRT
<213> *Nafulsella turpanensis*

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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
 385 390 400

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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			

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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 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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <212> PRT

<213> *Saprospira grandis* cepa 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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

<210> 50
<211> 422
<212> PRT
5 <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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

10

<400> 53

ccatggcg	acaccatcat	caccaccacg	gcggcattga	aaaactgaaa	cagtatcacg	60
atgaagcgat	caggctggat	agccttgate	cottacagaa	attcaaagaa	tgctttacat	120
taccgaagga	acctggagca	ctgtatttct	gcagcaatag	tctgggctt	cccgcgaaag	180
cggcttcca	gaaactggaa	gaacagttac	agcggtgag	cgaatttaggc	gctcgtggat	240
ggttgaagg	cgaggtaat	tggtataaca	gcttggaga	gcctattgt	cgtccattga	300
gcaaaatctt	aggagcgaa	agcaatgaag	tgaccctgat	gaatagctt	accgtgaatc	360
tgcacatgtt	gttgattagt	ttctatcg	cgaccaaaat	gcgttataag	atactgattt	420
atggcccagc	cttccgtcc	gatctgtat	ccattaagtc	gcacatcg	tttcataaga	480
aagaagaagg	tcttattctg	atagaaccgc	gtccggcg	acatctgg	caggaagaag	540
actttctgcg	cgtgataaaag	aagcaaggag	aggaaattgc	gttgggttt	ctgaactgcg	600
tgaattttct	gagcggccag	gtgctgaaag	tggatgaaat	caccgc	ttat gccaaggagg	660
ctggctgctg	cgtcggttat	gatctggcgc	atgcagcagg	caatattccc	ttaagcttgc	720
atgatcttgg	cggcgactt	cggtggct	gatcctacaa	atatctgtgc	ggaggcccag	780
gaggtccagg	catagcctac	gttcacgcgt	cacatcacca	ccaacagttc	gtgcgttca	840
gcgggtgg	ggcaatgat	ccgaataaccc	ggtttactt	ccccaaagag	tttgcgcgt	900
atggcgtgc	gagtcctgg	caggtgagca	ccccgtcgat	tctggcgaaa	ctgccgtt	960
ttgcggcact	ggaggtgtt	gaggaagcgg	gatggagaa	tatacgtgaa	aagagcaaga	1020
aacaaacagc	gttcctgtat	accctgttag	aaaatgctcg	cggcacccat	tttgatatga	1080
taacccgaa	agaaccggag	ctgcgtggct	gtcagcttag	cctgcgtatc	aaatgcagcc	1140
gtagcgaaga	gatcttacgg	aagctgaaac	gtttaggc	tacatgcgat	ttccgttgc	1200
cgaacattct	gcgtgtggcg	ccgagccgt	tgtacaccag	ctttacgaa	atctatcg	1260
ttgcgtacac	cttctggaa	gtcctgaaaa	ccatttgaga	attc		1304

<210> 54

<211> 431

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 54

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

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

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

Phe Cys Ser Asn Ser Leu Gly Leu Pro Ala Lys Ala Ala Ser Gln Lys
50 55 60

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

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

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

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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<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 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

ES 2 707 711 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 707 711 T3

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

ES 2 707 711 T3

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

5 <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

ES 2 707 711 T3

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 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

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una quinureninasa o un ácido nucleico que codifica una quinureninasa, para su uso en un método para el tratamiento de un tumor en un sujeto.
5
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un método de la reivindicación 1, en la que la quinureninasa comprende una quinureninasa de mamífero o bacteriana.
3. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en un método de la reivindicación 10 1, en la que la quinureninasa comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 7-52 y 57.
4. La composición de la reivindicación 3, para su uso en un método de la reivindicación 3, en la que la quinureninasa comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 8 con una sustitución 15 Phe306Met o Phe306Leu en la posición 306.
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método de la reivindicación 1, en la que la quinureninasa está acoplada a polietilenglicol.
- 20 6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un método de la reivindicación 1, en la que la quinureninasa comprende además un segmento peptídico heterólogo, preferiblemente en la que el segmento peptídico heterólogo es un péptido XTEN, un Fc de IgG, una albúmina o un péptido de unión a albúmina.
- 25 7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en un método de la reivindicación 1, en la que la quinureninasa tiene mayor actividad catalítica hacia quinurenina que hacia 3'-OH quinurenina.
8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en un método de la reivindicación 1, en la que la quinureninasa tiene una k_{cat}/K_M para quinurenina de al menos 0,5 M⁻¹/s¹.
- 30 9. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un método de la reivindicación 1, en la que el tumor es un tumor sólido.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un método de la reivindicación 1, en la que el tumor es un tumor hemático.
35
11. La composición de la reivindicación 1, para su uso en un método de la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico que codifica la quinureninasa es un vector de expresión.
- 40 12. La composición de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso en un método de la reivindicación 1, en la que el vector de expresión que codifica la quinureninasa está comprendido en un linfocito T, en la que el linfocito T comprende además un receptor de linfocito T de antígenos químérico expresado.

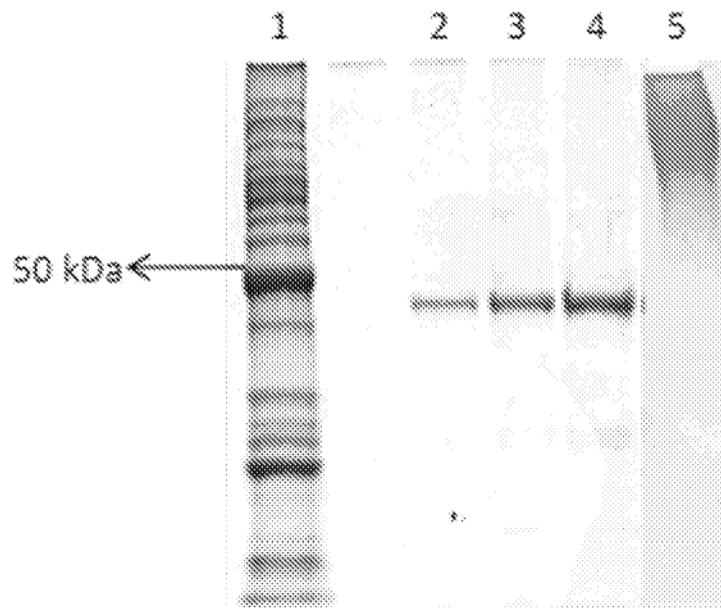


FIG. 1

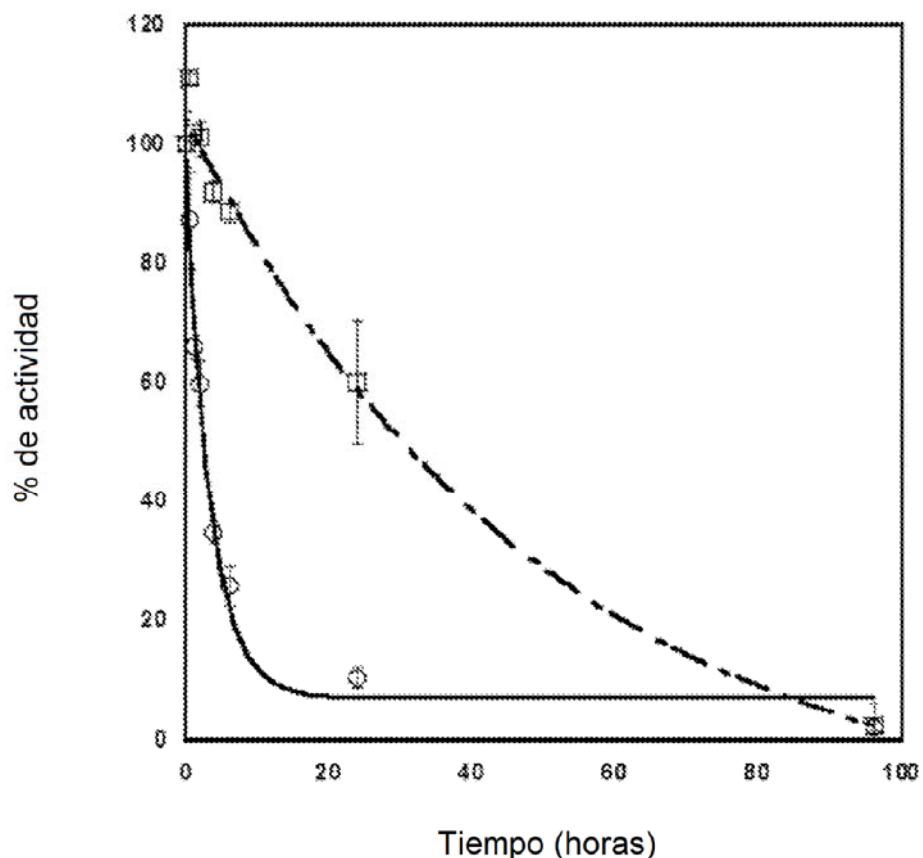
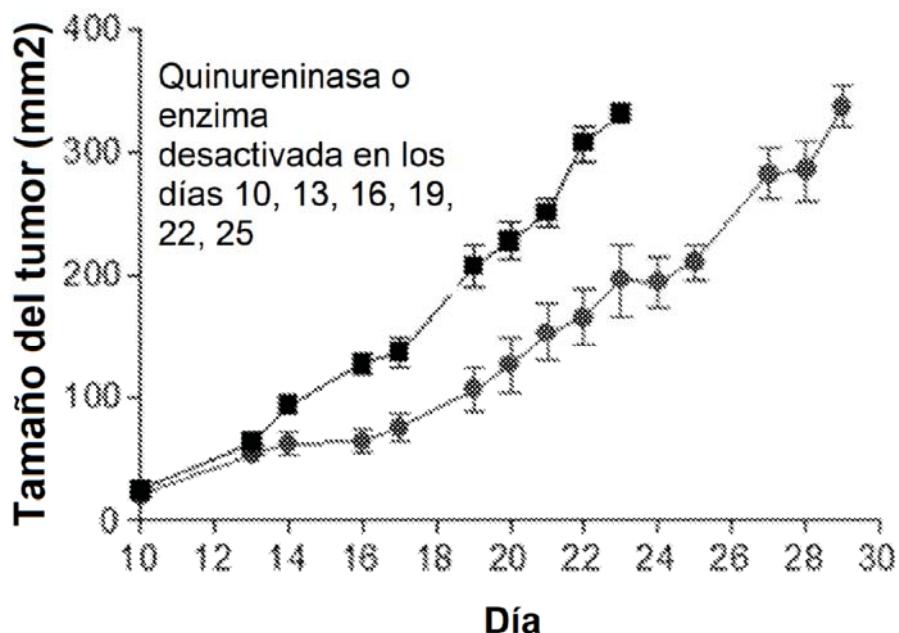


FIG. 2

Datos combinados de crecimiento del tumor**FIG. 3**

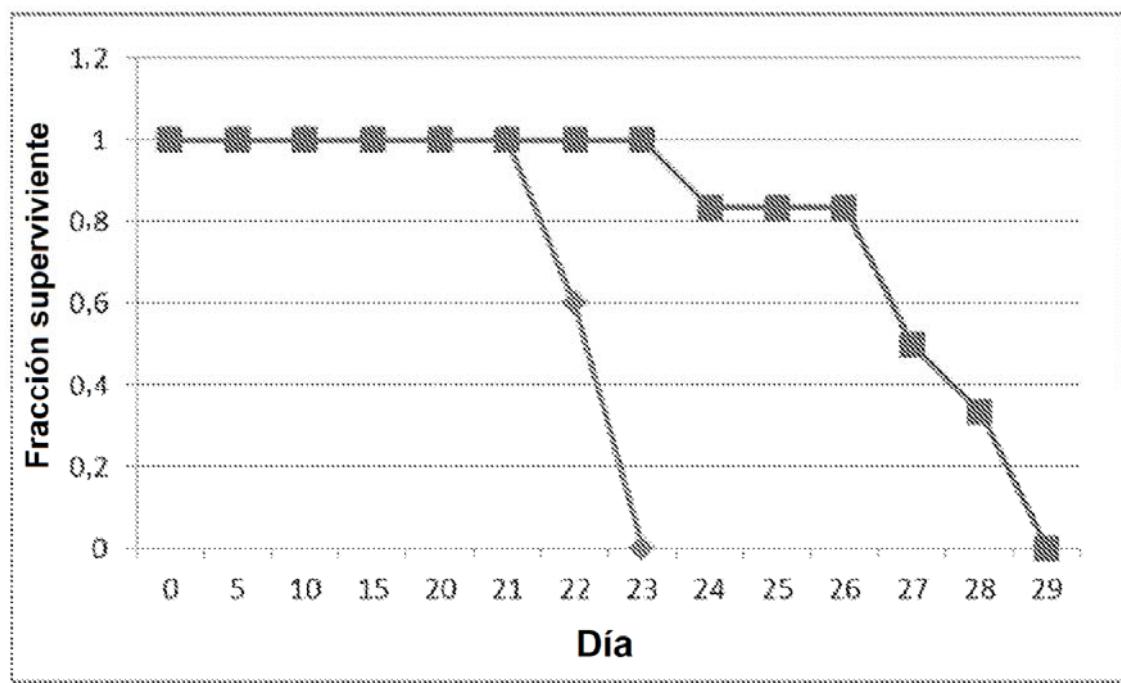
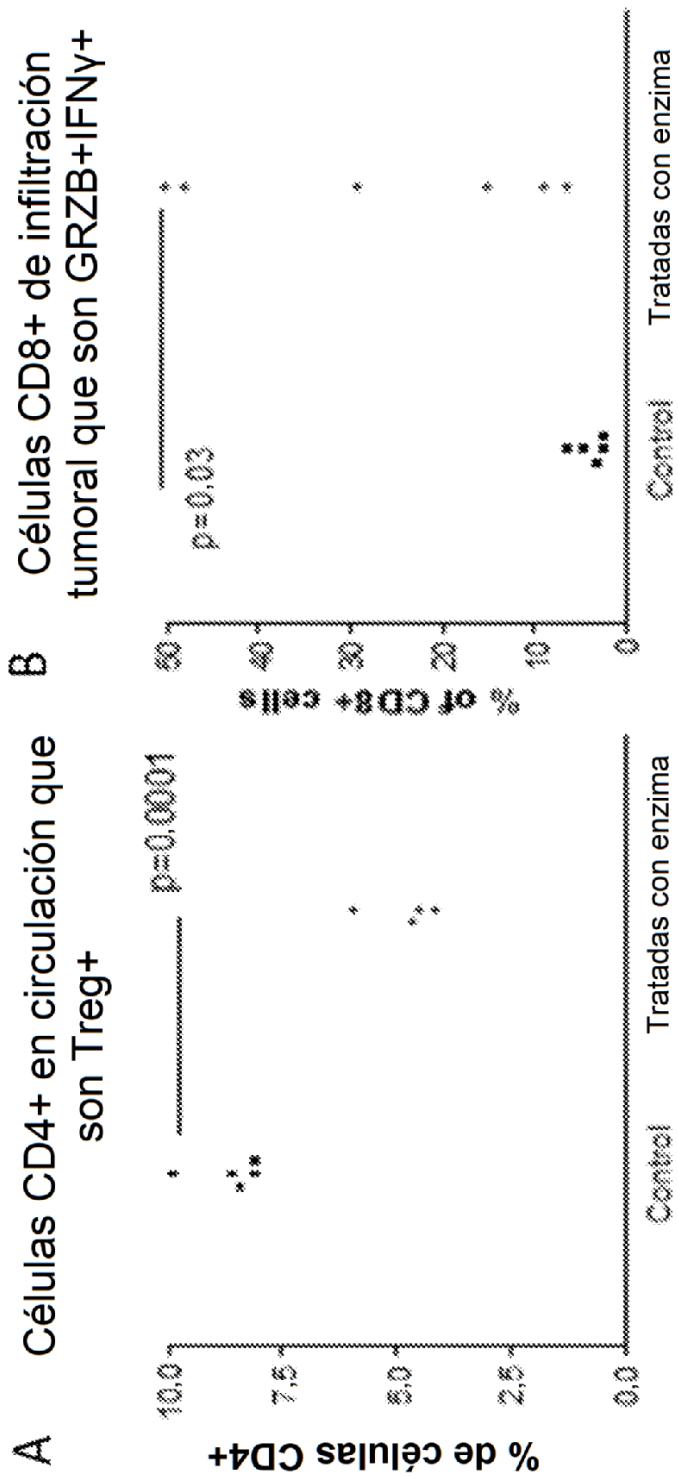


FIG. 4



FIGs. 5A-B

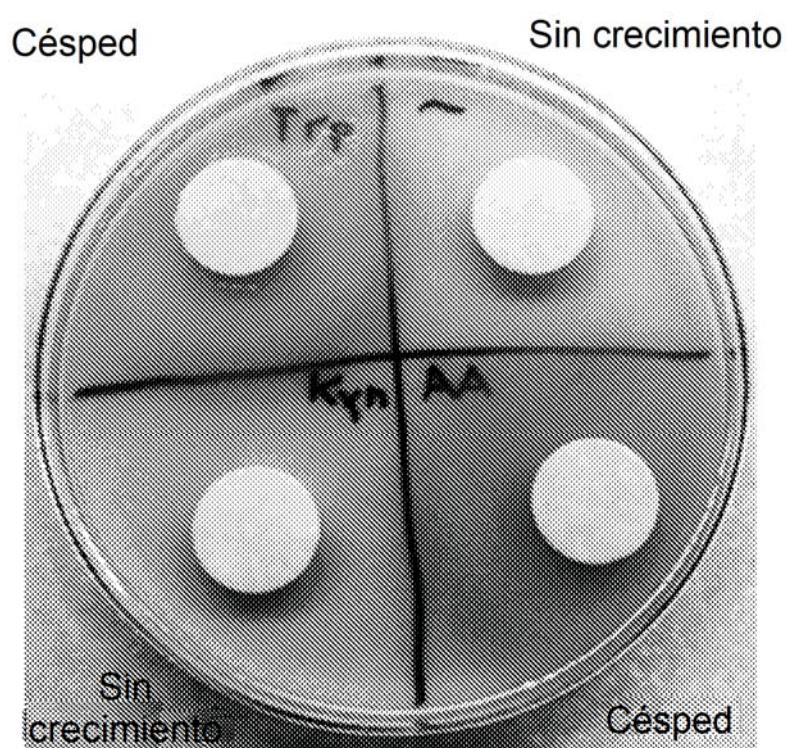


FIG. 6

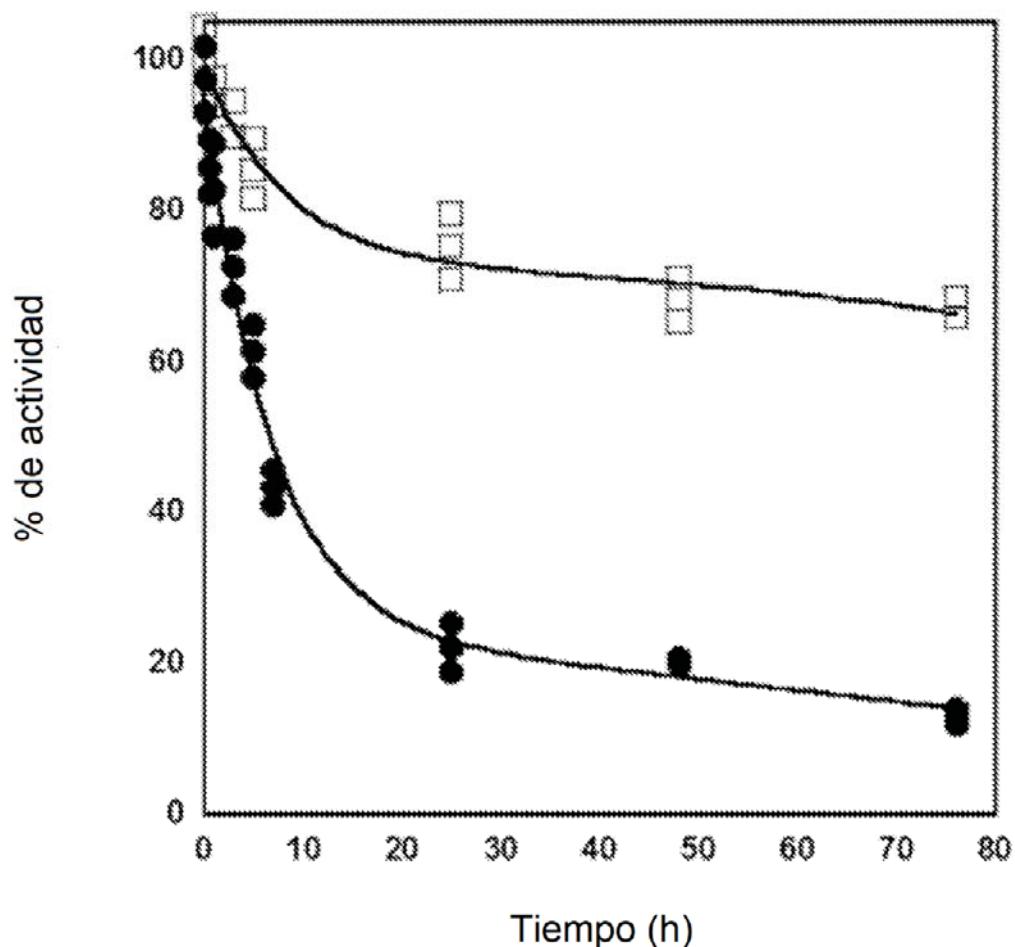


FIG. 7

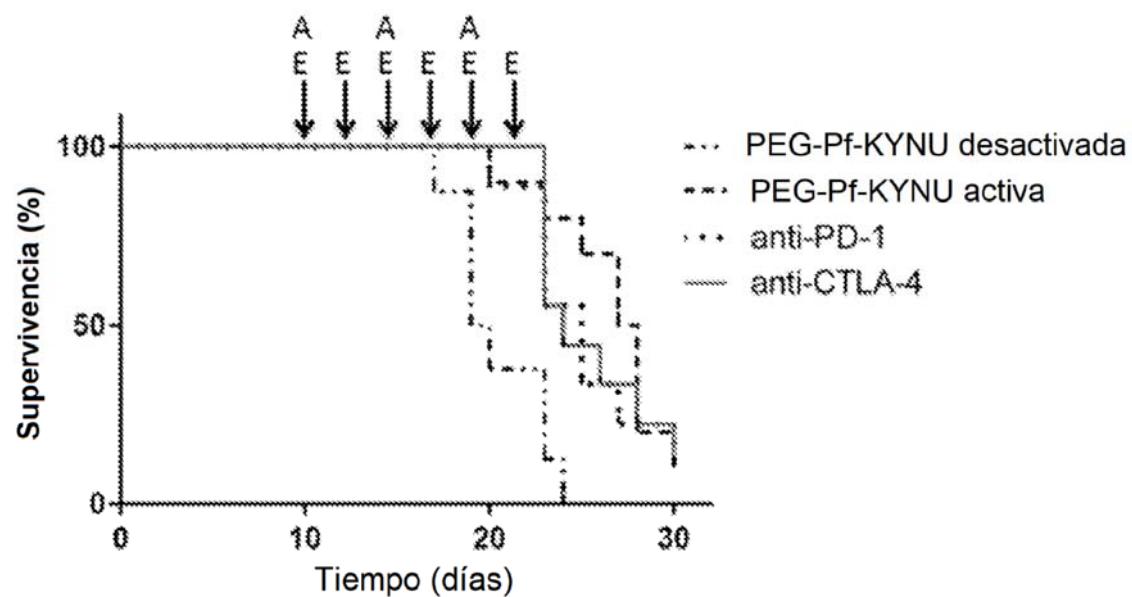
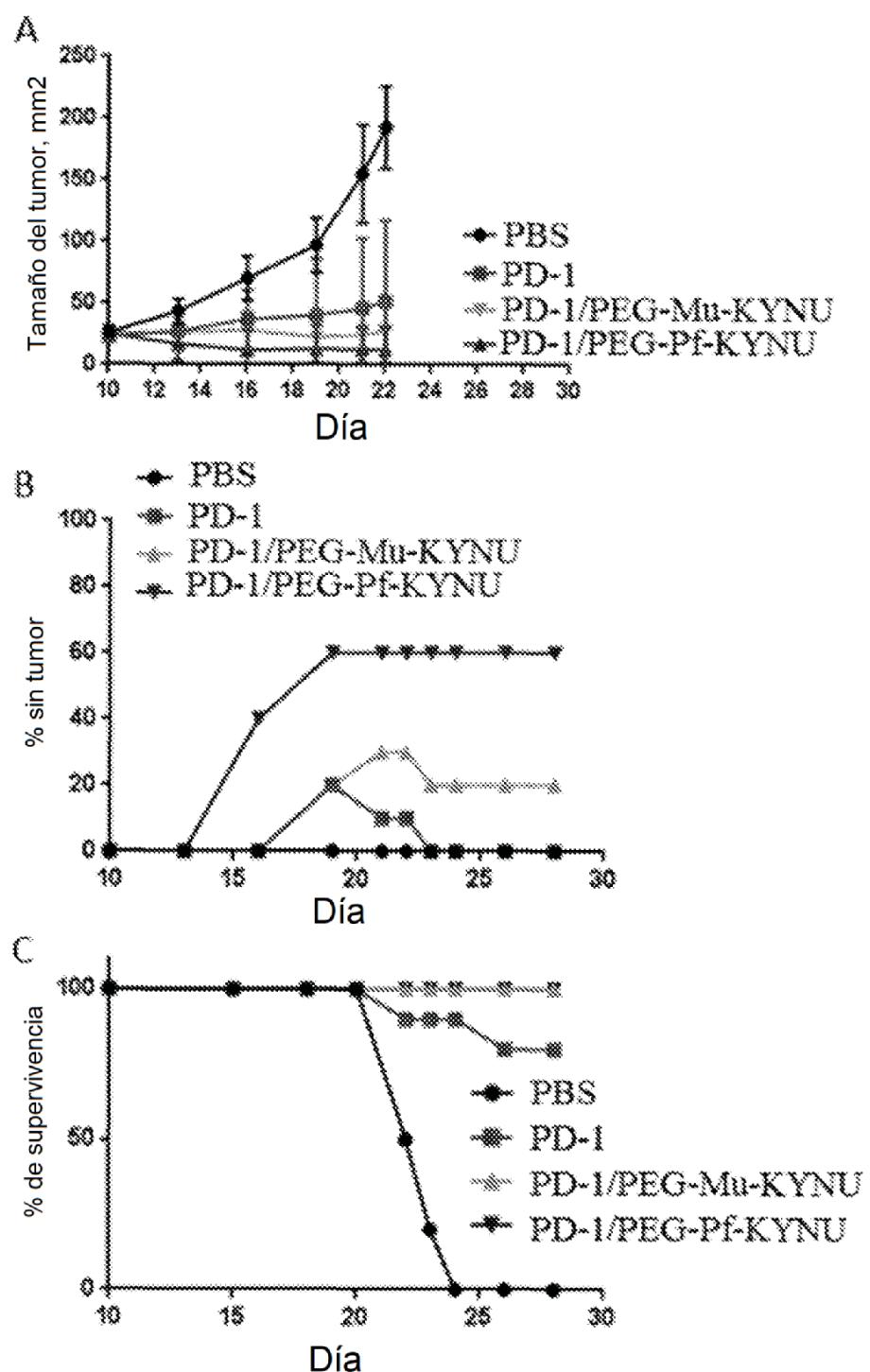
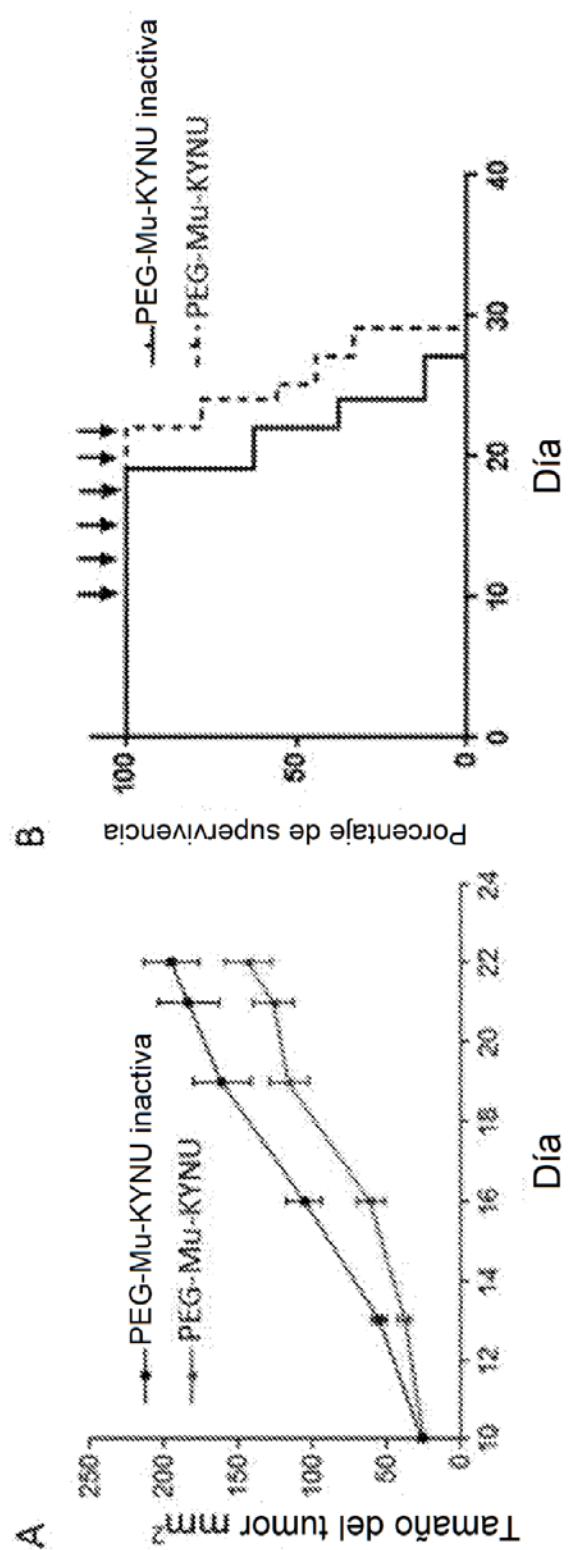


FIG. 8



FIGs. 9A-C



FIGS. 10A-B