

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201500826** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2015.12.30

(51) Int. Cl. **A61K 38/50** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.03.06

**(54) СОДЕРЖАЩАЯ АЛЬБУМИНСВЯЗЫВАЮЩУЮ АРГИНИНДЕЗИМИНАЗУ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ РАКА**

(31) **61/773,214; 14/197,236**

(32) **2013.03.06; 2014.03.05**

(33) **US**

(86) **PCT/US2014/020943**

(87) **WO 2014/138319 2014.09.12**

(88) **2014.12.24**

(71) Заявитель:
**ВИЖН ГЛОБАЛ ХОЛДИНГС ЛТД.
(CN)**

(72) Изобретатель:
**Вон Бин Ло (US), Вай Норман Фунг
Мань (CA), Гок Суй Цзи, Люн Юнь
Чжун (CN)**

(74) Представитель:
Песиков Э.П. (RU)

(57) В заявке описана фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок альбуминсвязывающей аргининдезимиказы (AAD), для лечения рака или других аргининзависимых болезней. Гибридный белок AAD, который может быть получен путем очистки растворимых и нерастворимых фракций общих белков, связывает сывороточный альбумин человека, обладает высокой активностью с более длительным периодом полувыведения и эффективно истощает аргинин в раковых клетках. Специфическая активность ADI дикого типа и AAD согласно настоящему изобретению составляет 8,4 и 9,2 единиц/мг (при физиологическом pH 7,4) соответственно. AAD, используемая в настоящем изобретении, может применяться для лечения рака различных типов (например, рака поджелудочной железы, лейкоза, рака головы и шеи, колоректального рака, рака легкого, молочной железы, печени, носоглотки, пищевода, предстательной железы, желудка и мозга) и аргининзависимых болезней. Композиция может применяться отдельно или в сочетании по меньшей мере с одним химиотерапевтическим средством с целью обеспечения синергетического эффекта лечения рака и/или ингибирования метастазов.

A1

201500826

201500826

A1

СОДЕРЖАЩАЯ АЛЬБУМИН-СВЯЗЫВАЮЩУЮ АРГИНИНДЕЗИМИНАЗУ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ РАКА

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Приоритет настоящей заявки испрашивается на основании предварительной патентной заявки US 61/773214, поданной 6 марта 2013 г., и обыкновенной патентной заявки US 14/197236, поданной 5 марта 2014 г., содержание которых во всей полноте в порядке ссылки включено в настоящую заявку.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к гибриднему белку альбумин-связывающей аргининдезиминазы (AAD), подвергнутому генетической модификации с целью создания вещества, обладающего высокой активностью и длительным периодом полувыведения *in vivo*. Настоящее изобретение дополнительно относится к конструкциям ДНК и белковой инженерии с целью создания различных гибридных белков AAD. Гибридные белки AAD могут быть выделены в очищенном виде из растворимой фракции и нерастворимой фракции (вирусных включений) общих белков. Настоящее изобретение дополнительно относится к содержащим альбумин-связывающую аргининдезиминазу фармацевтическим композициям для таргетной терапии рака и лечения аргинин-зависимых болезней у людей и других животных.

Предпосылки создания изобретения

В мире происходит рост заболеваемости раком поджелудочной железы, толстой кишки, печени, меланомой и цервикальным раком. Срочно необходимо эффективное лечение этих болезней. В случае рака многих типов, включая лейкоз, меланому, рак поджелудочной железы, толстой кишки, почки, легкого, предстательной железы, молочной железы, мозга, цервикальный рак и рак печени, раковые клетки являются ауксотрофными к аргинину, поскольку они не синтезируют аргининосукцинатсинтетазу (ASS), что делает рак этих типов отличными мишенями для терапии методом истощения аргинина.

Аргинин является частично заменимой аминокислотой в организме человека и других млекопитающих. Он может быть синтезирован из цитруллина посредством двухстадийного процесса, катализатором которого являются ферменты орнитинового цикла

аргининосукцинатсинтаза (ASS) и аргининосукцинатлиаза (ASL). В процессе обмена веществ аргиназа может превращать аргинин в орнитин, а в митохондриях орнитинкарбамоилтрансфераза (ОТС) может превращать орнитин в цитруллин. Цитруллин может использоваться снова для синтеза аргинина. Нормальным клеткам для роста обычно не требуется экзогенный источник аргинина в силу избыточной каталитической активности ASS и ASL. В отличие от этого, раковые клетки многих типов не синтезируют ASS и, соответственно, являются ауксотрофными к аргинину. Их рост зависит исключительно от аргинина, получаемого из системы кровообращения. Соответственно, использование циркулирующего аргинина в качестве мишени для разрушающих его ферментов является одной из возможных стратегий ингибирования роста ASS-негативных опухолей [Feun и др., *Curr. Pharm. Des.* 14:1049-1057 (2008); Kuo и др., *Oncotarget.* 1:246-251 (2010)].

Аргинин может разрушать аргиназу, аргининдекарбоксилазу и аргининдезиминазу (ADI). Из их числа, наивысшим сродством к аргинину (низким показателем K_m), вероятно, обладает аргининдезиминаза (ADI). ADI преобразует аргинин в цитруллин и аммиак, которые являются метаболитами орнитинового цикла. К сожалению, ADI содержится только в прокариотах, например, *Mycoplasma sp.* Существует ряд сложностей, связанных с выделением ADI в очищенном виде из прокариот. ADI, выделенная из *Pseudomonas putida*, не обладает эффективностью *in vivo* в силу своей низкой ферментативной активности при нейтральном pH. ADI, выделенная из *Escherichia coli*, не обладает ферментативной активностью и впоследствии должна подвергаться многократной денатурации и ренатурации, что повышает последующую стоимость производства.

Поскольку нативная ADI содержится в микроорганизмах, она является антигенной и быстро выводится из кровообращения пациента. ADI в нативной форме является иммуногенной после введения в кровообращение человека, имеет малый период полувыведения (~4 часа) и активирует нейтрализующие антитела [Ensor и др., *Cancer Res.* 62:5443-5450 (2002); Izzo и др., *J. Clin. Oncol.* 22:1815-1822 (2004)]. Эти недостатки могут быть преодолены путем пэгилирования. Было обнаружено, что из различных форм пэгилированной ADI эффективной является ADI, связанная с ПЭГ (с молекулярной массой 20000) посредством сукцинимидилсукцината (ADI-ПЭГ 20). Тем не менее, активность ADI после пэгилирования значительно снижается приблизительно на 50% [Ensor и др., *Cancer*

Res. 62:5443-5450 (2002)]. В результате предыдущих попыток создания пэгилированной ADI получали материалы, которые не являются гомогенными (из-за случайного присоединения ПЭГ к лизиновым остаткам на поверхности белка), и которые сложно характеризовать и контролировать их качество в ходе производственного процесса. Кроме того, ПЭГ является очень дорогостоящим, что значительно повышает стоимость изготовления. После внутривенного введения пэгилированной ADI *in vivo* наблюдается просачивание или отделение свободного ПЭГ, а ADI (без ПЭГ) может вызывать проблемы иммуногенности. Соответственно, существует потребность в усовершенствованных композициях для лечения рака, в частности, усовершенствованных композициях для лечения рака, которые обладают повышенной активностью и увеличенным периодом полувыведения *in vivo*.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложен гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины (AAD) с повышенной активностью и увеличенным периодом полувыведения из плазмы, который эффективно истощает аргинин в раковых клетках. Нативная ADI содержится в микроорганизмах, является антигенной и быстро выводится из кровообращения пациента. В настоящем изобретении предложены конструкции различных гибридных белков AAD из одного или двух альбумин-связывающих белков с целью обеспечения высокой активности и более длительного периода полувыведения *in vivo* (истощение аргинина в течение по меньшей мере 5 суток после одной инъекции). Альбумин-связывающий белок в гибридном белке AAD согласно настоящему изобретению не оказывает влияния на его специфическую ферментативную активность и продлевает период его полувыведения из кровообращения. Специфическая активность гибридного белка ADI и AAD дикого типа согласно настоящему изобретению составляет 8,4 и 9,2 единиц/мг (при физиологическом pH 7,4), соответственно.

В настоящем изобретении в целом предложен гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины, имеющий первый участок, который содержит один или два компонента, выбранных из альбумин-связывающей области, альбумин-связывающего пептида или альбумин-связывающего белка(-ов), и гибридизирован со вторым участком, содержащим аргининдезимиразу, в результате чего образуется гибридный белок альбумин-

связывающей аргининдезимиказы, который сохраняет активность аргининдезимиказы, а также способен связывать сывороточный альбумин.

В настоящем изобретении дополнительно предложена содержащая гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы (AAD) фармацевтическая композиция для таргетной терапии рака у людей и других животных. Согласно первой особенности настоящего изобретения предложена конструкция модифицированного гибридного белка AAD с высокой активностью в отношении раковых клеток. Согласно второй особенности настоящего изобретения предложено получение очищенного гибридного белка AAD с высокой степенью чистоты как из растворимой, так и нерастворимой фракций общих белков. Согласно третьей особенности настоящего изобретения продлен период полувыведения гибридного белка AAD, поскольку он способен эффективно связывать альбумин в системе кровообращения. Согласно четвертой особенности настоящего изобретения предложен способ применения содержащей AAD фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для лечения рака путем ее введения нуждающемуся в этом объекту, страдающему различными опухолями, раком различных типов или болезнями, сопутствующими опухолям или раку, или другими аргинин-зависимыми болезнями.

Гибридный белок AAD согласно настоящему изобретению также модифицирован во избежание диссоциации на альбумин-связывающий белок и ADI, в результате чего он становится более устойчивым и имеет более длительный период полувыведения из кровообращения. ADI гибридизирована с альбумин-связывающей областью/пептидом/белком в гибридном продукте на основе AAD с целью продления периода полувыведения из плазмы и снижения иммуногенности гибридного продукта. Альбумин-связывающей областью (ABD) является пептид, который связывает альбумин в крови. Существуют различные варианты ABD с различным или улучшенным сродством к сывороточному альбумину человека (HSA). Могут быть сконструированы различные варианты ABD, которые могут быть гибридизированы с ADI. В отличие от встречающейся в природе ADI, этот более длительный период полувыведения эффективно способствует истощению аргинина в раковых клетках, раковых стволовых клетках и/или клетках-предшественниках рака.

Фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок AAD, может применяться для внутривенной (в.м.) инъекции (быстродействующей дозы лекарства) и внутримышечной (в.м.) инъекции (достаточно быстро и длительно действующей дозы лекарства). Гибридный белок AAD согласно настоящему изобретению может применяться для лечения рака различных типов, такого как рак поджелудочной железы, лейкоз, рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легкого, молочной железы, предстательной железы, цервикальный рак, рак печени, носоглотки, пищевода и мозга. В настоящем изобретении предложены гибридные белки AAD, способы лечения рака, способы лечения и/или ингибирования метастазов раковой ткани и способы лечения аргинин-зависимых болезней.

Способ согласно настоящему изобретению также включает применение различных химиотерапевтических средств и/или радиотерапии в сочетании с гибридным белком AAD согласно настоящему изобретению с целью обеспечения синергетического эффекта лечения рака.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано проектирование различных гибридных белков AAD с одной или двумя альбумин-связывающими областями/пептидами/белками в виде трехмерной конструкции. Одна и/или две альбумин-связывающих области/пептида/белка могут быть гибридизированы с ADI с целью формирования гибридного белка AAD. Альбумин-связывающая область/пептид/белок находится в положении вдали от активного участка ADI. Альбумин-связывающая область/пептид/белок может быть гибридизирована с N-концом и/или C-концом ADI. Показанная структура основана на структуре ADI *Mycoplasma arginini* (банк данных белков: 1LXY), в которой (A) означает нативную ADI; (B) означает гибридный белок AAD с двумя ABD или ABD1; (C) означает гибридный белок AAD с одним ABD или ABD1 на N-конце; (D) означает гибридный белок AAD с одним ABD или ABD1 на C-конце.

На фиг. 2 показана расстановка последовательностей ADI в некоторых видах бактерий, включая *Mycoplasma arginini* (SEQ ID No. 23), *Lactococcus lactis* (SEQ ID No. 24), *Bacillus cereus* (SEQ ID No. 25) и *Bacillus licheniformis* (SEQ ID No. 26).

На фиг. 3 показаны конструкции и аминокислотные последовательности различных гибридных белков AAD, полученных из *Mycoplasma arginini* (A-E) и гибридного белка AAD, полученного из *Bacillus cereus* (F).

На фиг. 4 показано создание гибридного белка AAD согласно двум вариантам осуществления (A) и (B) путем использования интеиновых гибридных белков и лигирования синтезированных белков (CBD, связывающей хитин области) согласно следующим схемам; (C) С-концевой гибрид; (D) N-концевой гибрид; (E) опосредованное интеином лигирование белков.

На фиг. 5 показана карта плазмид вектора экспрессии, сконструированного с целью получения гибридного белка AAD.

На фиг. 6 показана (A) генетическая карта, (B) нуклеотидная последовательность (SEQ ID No. 44) и (C) аминокислотная последовательность (SEQ ID No. 40) His-ABD-PolyN-ADI. (ADI: *Mycoplasma arginini* ADI)

На фиг. 7 показана (A) генетическая карта, (B) нуклеотидная последовательность (SEQ ID No. 45) и (C) аминокислотная последовательность (SEQ ID No. 41) His-ABD-PolyN-bcADI. (bcADI, *Bacillus cereus* ADI)

На фиг. 8 показан синтез и очистка гибридного белка AAD: (A) AAD растворима на ~90% в случае синтеза при 20°C (дорожки 2 и 3) и нерастворима на ~90% (вирусные включения) в случае синтеза при 37°C (дорожки 4 и 5); (B) очищенный гибридный белок AAD в полиакриламидном геле для электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE): дорожка 1, очищенный гибридный белок AAD (52,8 кДа); дорожка 2, маркер молекулярной массы.

На фиг. 9 показано, что гибридный белок AAD эффективно истощает аргинин и ингибирует рост линий клеток рака различных типов у человека при исследовании *in vitro* культуры тканей, включая меланому человека (A375), карциному толстой кишки человека (HCT116) и рак поджелудочной железы человека (Panc1).

На фиг. 10 показаны результаты связывания альбумина гибридным белком AAD: (A) – не денатурирующий нативный полиакриламидный гель (12%), иллюстрирующий увеличение количества комплекса HSA+AAD при увеличении количества добавленного гибридного белка AAD (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 36; фиг. 3A).

Молярные соотношения сывороточного альбумина (HSA) и AAD на дорожках 3-6 составляют 1:1, 1:2, 1:5 и 1:15, соответственно. Дорожки 1 и 2 означают HSA и AAD в концентрации 6 и 30 пикомоль, соответственно; (B) – в другом эксперименте с использованием гибридного белка AAD (SEQ ID NO: 40; фиг. 3E) соотношения альбумина и AAD, составляющего 1:8, достаточно для связывания всего присутствующего альбумина (дорожка 5).

На фиг. 11 показан график, иллюстрирующий содержание аргинина в плазме у мышей в зависимости от дозы гибридного белка AAD. 100 мкг AAD достаточно для истощения аргинина в плазме в течение по меньшей мере 5 суток.

Определения

Термином "раковая стволовая клетка" обозначается биологически различимая клетка в опухолевом клоне, которая способна инициировать и поддерживать рост опухоли *in vivo* (т.е. инициирующая рак клетка).

Подробное описание изобретения

Аргинин является частично заменимой аминокислотой в организме человека и других млекопитающих. Он может быть синтезирован из цитруллина посредством двухстадийного процесса, катализатором которого являются ферменты орнитинового цикла аргининосукцинатсинтаза (ASS) и аргининосукцинатлиаза (ASL). В процессе обмена веществ аргиназа может превращать аргинин в орнитин, а в митохондриях орнитинкарбамоилтрансфераза (OTC) может превращать орнитин в цитруллин (OTC). Цитруллин может использоваться снова для синтеза аргинина. Нормальным клеткам для роста обычно не требуется экзогенный источник аргинина в силу избыточной каталитической активности ASS и ASL. В отличие от этого, раковые клетки многих типов не синтезируют ASS и, соответственно, являются ауксотрофными к аргинину. Их рост зависит исключительно от аргинина, получаемого из системы кровообращения. Соответственно, использование циркулирующего аргинина в качестве мишени для разрушающих его ферментов является одной из возможных стратегий ингибирования роста ASS-негативных опухолей.

Аргинин может разрушаться аргининдегидрогеназой (ADI). ADI преобразует аргинин в цитруллин и аммиак, которые являются метаболитами орнитинового цикла. К сожалению,

ADI содержится только в прокариотах, например, *Mycoplasma sp.* Существует ряд сложностей, связанных с выделением ADI в очищенном виде из прокариот. ADI, выделенная из *Pseudomonas putida*, не обладает эффективностью *in vivo* в силу своей низкой ферментативной активности при нейтральном pH. ADI, выделенная из *Escherichia coli*, не обладает ферментативной активностью и впоследствии должна подвергаться многократной денатурации и ренатурации, что повышает последующую стоимость производства. ADI в нативной форме имеет малый период полувыведения из плазмы (~4 часа) после введения в кровообращение человека [Ensor и др., *Cancer Res.* 62:5443-5450 (2002); Izzo и др., *J. Clin. Oncol.* 22:1815-1822 (2004)]. Эти недостатки могут быть частично преодолены путем пэгирования. Было обнаружено, что из различных форм пэгированной ADI эффективной является ADI, связанная с ПЭГ (с молекулярной массой 20000) посредством сукцинимидилсукцината (ADI-ПЭГ 20). Тем не менее, активность ADI после пэгирования значительно снижается (на ~50% [Ensor и др., *Cancer Res.* 62:5443-5450 (2002)]; Wang и др., *Bioconjug. Chem.* 17:1447-1459 (2006)]. Кроме того, линкер сукцинимидилсукцината и ПЭГ является легко гидролизуемым и может отсоединяться от белка, создавая проблемы иммуногенности через короткое время нахождения в организме. Соответственно, существует потребность в усовершенствованных композициях для лечения рака, в частности, усовершенствованных композициях для лечения рака, которые обладают повышенной активностью.

ADI, выделенная из *Pseudomonas putida*, не обладает эффективностью *in vivo* в силу своей низкой ферментативной активности при нейтральном pH и быстрого выведения из кровообращения подопытных животных. ADI, выделенная из *Mycoplasma arginini*, описана, например, у Takaku и др., *Int. J. Cancer*, 51:244-249 (1992) и в патенте US 5474928. Тем не менее, одной из проблем, связанных с применением такого чужеродного белка в целях терапии, является его антигенность. У Takaku и др., *Jpn. J. Cancer Res.*, 84:1195-1200 (1993) описана химическая модификация выделенной из *Mycoplasma arginini* ADI полиэтиленгликолем (ПЭГ) посредством цианурхлоридной линкерной группы. Тем не менее, в результате высвобождения цианида из цианурхлоридной линкерной группы модифицированный белок становился токсичным в процессе метаболизма. В отличие от этого, даже в случае ADI-PEG20, ПЭГ линкер является легко гидролизуемым и может

отсоединяться от белка, создавая проблемы иммуногенности через короткое время нахождения в организме. Соответственно, существует потребность в композициях, которые разрушают заменимые аминокислоты и в которых преодолены недостатки известного уровня техники.

Клетки рака многих типов, включая меланому, рак поджелудочной железы, толстой кишки, лейкоз, рак молочной железы, предстательной железы, почки и печени, являются ауксотрофными к аргинину, поскольку они не синтезируют аргининосукцинатсинтетазу (ASS), что делает их отличными мишенями для терапии методом истощения аргинина. В настоящем изобретении предложены гибридные белки альбумин-связывающей аргининдезимиказы (AAD) с высокой активностью и длительным периодом полувыведения для эффективного истощения аргинина в раковых клетках.

Масса мономерной ADI составляет порядка 45 кДа, при этом она существует в форме димера (массой порядка 90 кДа) [Das и др., Structure. 12:657-667 (2004)]. На фиг. 1 показано проектирование гибридного белка AAD. Одна или две альбумин-связывающих области/пептида/белка с линкером(-ами) или без линкера(-ов) (SEQ ID NO: 46-49) гибридизированы с ADI и образуют гибридный белок AAD. Следует отметить, что выбор одной или двух конкретных альбумин-связывающих областей/пептидов/белков может зависеть от типа раковой ткани-мишени, желаемого размера и периода полувыведения получаемого гибридного белка и от того, выбрана ли определенная область или весь белок. Кроме того, выбранное альбумин-связывающее вещество может являться одинаковым или различаться. Иными словами, могут быть гибридизированы белок и пептид, два белка, две области, область и белок и т.д. при условии, что получаемая молекула сохраняет активность ADI и также способна связывать сывороточный альбумин, при этом ни одной из функций одной части гибридного белка не препятствует другая часть гибридного белка. Альбумин-связывающая область/пептид/белок находится в положении вдали от активного участка. Альбумин-связывающая область/пептид/белок может быть гибридизирована с N-концом и/или C-концом ADI. Существуют различные варианты ABD с различным или улучшенным сродством к сывороточному альбумину человека (HSA). Могут быть сконструированы различные варианты ABD, которые могут быть гибридизированы с ADI. Некоторые микроорганизмы, содержащие ADI (например, *Pseudomonas* sp), не могут использоваться

из-за их потенциальной патогенности и пирогенности. Источником ADI могут являться без ограничения различные микроорганизмы, например, *Mycoplasma* (например, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma hominis*), *Lactococcus* (например, *Lactococcus lactis*), *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*), *Streptococcus* (например, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pneumoniae*), *Escherichia*, *Mycobacterium* (например, *Mycobacterium tuberculosis*) и *Bacillus* (например, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*). ADI предпочтительно клонируют из *Mycoplasma arginini*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* или любого их сочетания. Их аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 23-35) и расстановка некоторых из аминокислотных последовательностей, показанная на фиг. 2, описана в настоящем изобретении, а также известна из литературы [Das и др., Structure. 12:657-667 (2004); Wang и др., Bioconjug. Chem. 17:1447-1459 (2006); Ni и др., Appl. Microbiol. Biotechnol. 90:193-201 (2011)].

На фиг. 3 показано конструирование и аминокислотная последовательность (A) нативного белка ADI *Mycoplasma arginini* (SEQ ID NO: 23), (B) различных гибридных белков AAD, выделенных из ADI *Mycoplasma arginini* (SEQ ID NO: 36-40) и (C) гибридного белка AAD, выделенного из ADI *Bacillus cereus* (SEQ ID NO: 41). Успешно сконструированы различные гибридные белки AAD. В этих вариантах осуществления между альбумин-связывающим белком и ADI в гибридном белке AAD помещен линкер.

С другой стороны, также создан новый гибридный белок AAD путем использования интеиновых гибридных белков и лигирования синтезированных белков (фиг. 4). Новый гибридный белок AAD может быть сформирован (1) путем введения в реакцию ADI, имеющей N-концевой цистеиновый остаток, с химически активным сложным тиоэфиром на C-конце ABD или (2) путем введения в реакцию ABD, имеющей N-концевой цистеиновый остаток, с химически активным сложным тиоэфиром на C-конце ADI, в результате чего ADI и ABD связываются ковалентной связью. На фиг. 4Д показано, что ADI, имеющая N-концевой цистеиновый остаток, вступает в реакцию с химически активным сложным тиоэфиром на C-конце ABD. Сложный тиоэфир на C-конце ABD и α -цистеин на N-конце ADI необходимы для облегчения лигирования белков. Эти фрагменты получают с использованием вектора pTWIN1 (New England Biolabs) согласно инструкции изготовителя.

В частности, синтезируют ген, кодирующий гибридный белок ABD-интеин-CBD, и клонируют в вектор под контролем промотора T7 с целью экспрессии в *E. coli* (фиг. 4В). Полученный гибридный белок ABD-интеин-CBD связывает хитин в колонке. На фиг. 4А показана аминокислотная последовательность ABD-интеин-CBD (SEQ ID NO: 42). После индуцируемого тиолом расщепления и элюирования из колонки получают ABD с химически активным сложным тиоэфиром на ее С-конце (фиг. 4В). С другой стороны, синтезируют ген, кодирующий гибридный белок CBD-интеин-ADI и клонируют в вектор под контролем промотора T7 с целью экспрессии в *E. coli* (фиг. 4Г). Полученный гибридный белок CBD-интеин-ADI связывает хитин в колонке. На фиг. 4В показана аминокислотная последовательность CBD-интеин-ADI (SEQ ID NO: 43). После расщепления при pH 7 и 25°C и элюирования из колонки получают ADI с α -цистеином на ее N-конце (фиг. 4Г). Наконец, путем реакции лигирования белков получают гибридный белок AAD, как показано на фиг. 4Д.

Важно, что гибридные белки AAD могут быть получены и очищены традиционным способом. Например, как показано на фиг. 8, гибридный белок AAD успешно синтезируют из *E. coli* и выделяют в очищенном виде в форме как растворимой фракции, так нерастворимой фракции. Кроме того, на фиг. 8 показан очищенный гибридный белок AAD, подвергнутый анализу путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Масса очищенного гибридного белка AAD составляет 52,8 кДа.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит гибридный белок AAD с высокой активностью для истощения аргинина в опухолевых клетках с целью лечения рака. Было обнаружено, что специфическая активность очищенного гибридного белка AAD аналогична специфической активности ADI дикого типа. IC_{50} является полумаксимальной ингибирующей концентрацией, то есть отображает концентрацию гибридного белка AAD, которая требуется для 50% ингибирования линии раковых клеток. IC_{50} является показателем эффективности лекарства. В Таблице 1 приведена IC_{50} гибридного белка AAD (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 40, фиг. 3Д) для различных линий раковых клеток (меланомы человека, A375 & SK-mel-28; карциномы толстой кишки человека, HCT116; рака поджелудочной железы человека, PancI;

рака печени человека, Sk-hep1; цервикального рака человека, C-33A). На фиг. 9 представлена эффективность *in vitro* гибридного белка AAD в отношении различных линий раковых клеток. Показано, что гибридный белок AAD способен уничтожать линии клеток рака множества типов, включая меланому человека, карциному толстой кишки человека и рак поджелудочной железы.

Таблица 1

Линия раковых клеток	IC ₅₀ AAD (мкг/мл)
A375 (меланома человека)	0,104
SK-mel-28 (меланома человека)	1,92
Panc1 (рак поджелудочной железы человека)	1
Sk-hep1 (рак печени человека)	10
C-33A (цервикальный рак человека)	0,063
HCT116 (карцинома толстой кишки человека)	1,30

Что касается связывания альбумина, авторами успешно продемонстрировано, что сконструированный гибридный белок AAD способен связывать сывороточный альбумин человека (HSA). На фиг. 10 показано, что гибридный белок AAD (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 40, фиг. 3Д) легко связывает HSA. При молярном соотношении 1:5 или 1:15 образуется комплекс HSA-AAD согласно конструкции, показанной на фиг. 1, с использованием линкерной молекулы. Предполагается, что период полувыведения циркулирующего гибридного белка AAD из кровообращения увеличивается за счет образования нековалентного комплекса HSA-AAD. Соответственно, успешно создана длительно действующая версия гибридного белка AAD.

Ни один из предлагаемых на рынке продуктов не обладает такой же высокой эффективностью, как содержащая гибридный белок AAD фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению. В случае применения при лечении рака содержащая гибридный белок AAD фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению служит противораковым средством для истощения аргинина в опухолевых тканях.

Гибридный белок AAD является соответствующим кандидатом для применения в сочетании с другими молекулярными или цитотоксическими средствами нацеленного действия.

Примеры

Следующие далее примеры приведены в качестве описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не имеют целью ограничить каким-либо образом его объем.

Несколько из приведенных далее примеров относятся к способу получения гибридных белков альбумин-связывающей аргининдезимиказы. Могут применяться различные методы, включая клонирование и опосредованное интеином лигирование белков. Термин "клонирование" используется в широком смысле и обозначает конструирование гибридного гена, кодирующего гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы, вставку гибридного гена в вектор, вставку вектора в организм-хозяин и синтез белка, который содержит гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы. Могут применяться многочисленные варианты этого метода, при этом подпадающие под определение клонирования, предусмотренное в настоящем изобретении.

Пример 1

Конструирование гена, кодирующего альбумин-связывающую область/пептид/белок (ABD)

Конструирование гена, кодирующего ABD, происходит посредством двух раундов ПЦР. В первом раунде реакционная смесь ПЦР (общий объем 25 мкл) содержала следующие вещества:

1 x буфер ПЦР iProof (Bio-Rad)

50 мкМ смеси dNTP

0,5 единицы ДНК-полимеразы iProof (Bio-Rad)

10 нМ каждого из следующих олигонуклеотидов:

прямой праймер ABD-F1 (SEQ ID NO: 01):

5'-CATGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACT-3'

обратный праймер ABD-R2 (SEQ ID NO: 02):

5'-TAGTCACTTACTCCATATTTGTCAAGTTCTCTGTTAGCTAAGACTTTAGC-3'

прямой праймер ABD-F3 (SEQ ID NO: 03):

5'-GAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAACCTAATCAACAA-3'

обратный праймер ABD-R4 (SEQ ID NO: 04):

5'-TACACSTTCAACAGTTTTTGGCATTGTTGATTAGGTTCTTGTAATAGTCAC-3'

прямой праймер ABD-F5 (SEQ ID NO: 05):

5'-GCCAAAACCTGTTGAAGGTGTAAAAGCACTGATAGATGAAATTTTAGCTGC-3'

обратный праймер ABD-R6 (SEQ ID NO: 06):

5'-AGCTACGATAAGCTTAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATCTATCAGTG-3'

Использовали следующую программу ПЦР:

98°C 30 с; 20 циклов {98°C 10 с, 50°C 20 с, 72°C 20 с}

Во втором раунде ПЦР смесь (общий объем 50 мкл) содержала следующие вещества:

1 х буфер ПЦР iProof (Bio-Rad);

50 мкМ смеси dNTP;

1 мкл реагента ПЦР в качестве матричной ДНК из первого раунда;

1 единица ДНК-полимеразы iProof (Bio-Rad);

200 нМ каждого из следующих олигонуклеотидов:

прямой праймер ABD-F7 (SEQ ID NO: 07):

5'-CATGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACT-3'

обратный праймер ABD-R8 (SEQ ID NO: 08):

5'-AGCTACGATAAGCTTAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATCTATCAGTG-3'

Использовали следующую программу ПЦР:

98°C 30 с; 35 циклов {98°C 10 с, 60°C 20 с, 72°C 20 с}; 72°C 5 мин

Получили продукт ПЦР, содержащий последовательность ДНК ABD (из 169 пар оснований), и очистили его с помощью набора реагентов Qiagen для выделения ДНК из гелей в целях клонирования.

Пример 2А

Конструирование гибридного гена, кодирующего гибридный белок AAD

В первой ПЦР смесь (общий объем 50 мкл) содержала следующие вещества:

1 x буфер ПЦР iProof (Bio-Rad);

50 мкМ смеси dNTP;

25 нг геномной ДНК *Mycoplasma arginini*;

1 единица ДНК-полимеразы iProof (Bio-Rad);

200 нМ каждого из следующих олигонуклеотидов:

ADINde-F прямой праймер (SEQ ID NO: 09):

5'-ATCGATCGATGTCTGTATTTGACAGTAAATTTAAAGG-3'

ADIhis-R обратный праймер (SEQ ID NO: 10):

5'-AGCTAAGGAATTCGCATCATGATGGTGATGGTGGCTACCCCACTTAAC-3'

Использовали следующую программу ПЦР:

98°C 1 мин; 35 циклов {98°C 10 с, 50°C 20 с, 72°C 40 с}; 72°C 5 мин

Получили продукт ПЦР размером 1280 пар оснований, и очистили его с помощью набора реагентов Qiagen для выделения ДНК из гелей. После этого осуществили вторую ПЦР. Смесь для ПЦР (общий объем 50 мкл) содержала следующие вещества:

1 x буфер ПЦР iProof (Bio-Rad);

50 мкМ смеси dNTP;

10 нг продукта ПЦР размером 1280 пар оснований;

10 нг продукта ПЦР размером 169 пар оснований;

1 единица ДНК-полимеразы iProof (Bio-Rad);

200 нМ каждого из следующих олигонуклеотидов:

прямой праймер ADINde-F (SEQ ID NO: 11):

5'-ATCGATCGATGTCTGTATTTGACAGTAAATTTAAAGG-3'

обратный праймер ABD-R10 (SEQ ID NO: 12):

5'-AGCTACGATAAGCTTAAGGTAATGCAGCTAAATTTTCATCTATCAGTG-3'

Использовали следующую программу ПЦР:

98°C 1 мин; 35 циклов {98°C 10 с, 50°C 20 с, 72°C 45 с}; 72°C 5 мин

Получили продукт ПЦР размером 1428 пар оснований, и очистили его с помощью набора реагентов Qiagen для выделения ДНК из гелей. Затем ферментировали его с помощью рестриктаз NdeI и HindIII и лигировали с плазмидой pREST A (Invitrogen), предварительно ферментированной с помощью тех же ферментов. Затем преобразовали продукт лигирования в клетки BL21 (DE3) *E. coli*. Подтвердили последовательность сконструированного гибридного гена путем секвенирования ДНК.

Пример 2Б

Клонирование His-ABD-PolyN-ADI

Сконструировали **His-ABD-PolyN-ADI** (SEQ ID NO: 40, фиг. 3Д) на двух перекрывающихся друг друга стадиях ПЦР, и вставили фрагмент, полученный на последней стадии ПЦР, в вектор pET3a между сайтами NdeI и BamHI. На фиг. 6 показана генетическая карта, нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность **His-ABD-PolyN-ADI**.

Праймеры, использованные при конструировании **His-ABD-PolyN-ADI**:

прямой праймер hisABDNde-F (SEQ ID NO: 13):

5'-GGAGATATACATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATG-3'

обратный праймер ABDnn-R1 (SEQ ID NO: 14):

5'-TTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATC-3'

обратный праймер ABDn-R2 (SEQ ID NO: 15):

5'-AGAACCGCCGCTACCATTTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGA-3'

прямой праймер ADIn-F (SEQ ID NO: 16):

5'-AATAATAACAATGGTAGCGGCGTTCTGTATTTGACAGTAAATTTAAAGG-3'

обратный праймер ADIBam-R (SEQ ID NO: 17):

5'-TAGATCAATGGATCCTTACCACTTAACATCTTTACGTGATAAAG-3'

В первом раунде ПЦР использовали две реакционные пробирки с 50 мкл реакционной смеси, содержащей компоненты в известной концентрации. В каждой из пробирок содержалась смесь dNTP, буфера iProof (BIO-RAD), ДНК-полимеразы iProof (BIO-RAD), праймеров и матричной ДНК с добавлением ddH₂O до объема 50 мкл. В качестве

матричной ДНК использовали в реакции вектор рЕТ3а, содержащий ген выделенной из *Mycoplasma arginini* ADI с удаленной сайтовой мутацией внутренней NdeI без изменения белковой последовательности гена ADI.

В двух реакционных пробирках содержалась смесь праймеров (А) из 10 пикомоль *hisABDNde-F* (SEQ ID NO: 13), 0,5 пикомоля *ABDnn-R1* (SEQ ID NO: 14) и 10 пикомоль *ABDn-R2* (SEQ ID NO: 15); и (В) из 10 пикомоль *ADIn-F* (SEQ ID NO: 16) и 10 пикомоль *ADIBam-R* (SEQ ID NO: 17), соответственно.

Задали программу ПЦР согласно стадиям, рекомендованным в руководстве, с температурой (временем) гибридизации и усиления 50°C (20 с) и 72°C (40 с), соответственно. Получили два продукта ПЦР размером 237 и 1278 пар оснований. Экстрагировали продукты и использовали в качестве матрицы в следующем раунде ПЦР.

На второй перекрывающей стадии использовали такую же реакционную смесь, как в первом раунде за исключением того, что в качестве матрицы использовали смесь из 1 пикомоля продукта ПЦР размером 237 пар оснований и 1 пикомоля продукта ПЦР размером 1278 пар оснований, полученных в результате первого раунда ПЦР. В качестве праймеров использовали 10 пикомоль *hisABDNde-F* (SEQ ID NO: 13) и 10 пикомоль *ADIBam-R* (SEQ ID NO: 17).

Температура (время) гибридизации и усиления составляли 50°C (20 с) и 72°C (60 с), соответственно. В результате реакции получили продукт ПЦР размером 1484 пары оснований. Очистили продукт ПЦР, ферментировали его с помощью NdeI и BamHI, а затем лигировали с предварительно ферментированной плазмидой рЕТ3а. Затем преобразовали лигированный продукт в *E. coli* BL21 (DE3) с целью получения рекомбинантного белка.

Пример 2В

Клонирование His-ABD-PolyN-bcADI

Сконструировали **His-ABD-PolyN-bcADI** (SEQ ID NO: 41, фиг. 3Е) на двух перекрывающих друг друга стадиях ПЦР, и вставили фрагмент, полученный на последней стадии ПЦР, в вектор рЕТ3а между сайтами NdeI и BamHI. На фиг. 7 показана генетическая карта, нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность **His-ABD-PolyN-bcADI**.

Праймеры, использованные при конструировании **His-ABD-PolyN-bcADI**:

прямой праймер hisABDNde-F2 (SEQ ID NO: 18):

5'-GGAGATATACATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATG-3'

обратный праймер bcABDnn-R1 (SEQ ID NO: 19):

5'-TTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATC-3'

обратный праймер bcABDn-R2 (SEQ ID NO: 20):

5'-TTTACCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGA-3'

прямой праймер bcADIn-F (SEQ ID NO: 21):

5'-AATAATAACAATGGTAGCGGCGGTAAACATCCGATACATGTTACTTCAGA-3'

обратный праймер bcADIBam-R (SEQ ID NO: 22):

5'-TAGATCAATGGATCCCTAAATATCTTTACGAACAATTGGCATAC-3'

В первом раунде ПЦР использовали две реакционные пробирки с 50 мкл реакционной смеси, содержащей компоненты в известной концентрации. В каждой из пробирок содержалась смесь dNTP, буфера iProof (BIO-RAD), ДНК-полимеразы iProof (BIO-RAD), праймеров и матричной ДНК с добавлением ddH₂O до объема 50 мкл. В качестве матричной ДНК использовали в реакции вектор pET3a, содержащий ген выделенной из *Bacillus cereus* ADI с удаленной сайтовой мутацией внутренней NdeI без изменения белковой последовательности гена ADI.

В двух реакционных пробирках содержалась смесь праймеров (А) из 10 пикомоль *hisABDNde-F2* (SEQ ID NO: 18), 0,5 пикомоль *bcABDnn-R1* (SEQ ID NO: 19) и 10 пикомоль *bcABDn-R2* (SEQ ID NO: 20); и (В) из 10 пикомоль *bcADIn-F* (SEQ ID NO: 21) и 10 пикомоль *bcADIBam-R* (SEQ ID NO: 22), соответственно.

Задали программу ПЦР согласно стадиям, рекомендованным в руководстве, с температурой (временем) гибридизации и усиления 50°C (20 с) и 72°C (40 с), соответственно. Получили два продукта ПЦР размером 237 и 1250 пар оснований. Экстрагировали продукты и использовали в качестве матрицы в следующем раунде ПЦР.

На второй перекрывающей стадии использовали такую же реакционную смесь, как в первом раунде за исключением того, что в качестве матрицы использовали смесь из 1 пикомоль продукта ПЦР размером 237 пар оснований и 1 пикомоль продукта ПЦР размером 1250 пар оснований, полученных в результате первого раунда ПЦР.

В качестве праймеров использовали 10 пикомоль *hisABDNde-F2* (SEQ ID NO: 18) и 10 пикомоль *bcADIBam-R* (SEQ ID NO: 22).

Температура (время) гибридизации и усиления составляли 50°C (20 с) и 72°C (60 с), соответственно. В результате реакции получили продукт ПЦР размером 1512 пар оснований. Очистили продукт ПЦР, ферментировали его с помощью NdeI и BamHI, а затем лигировали с предварительно ферментированной плазмидой pET3a. Затем преобразовали лигированный продукт в *E. coli* BL21 (DE3) с целью получения рекомбинантного белка.

Пример 3

Синтез и очистка гибридного белка AAD

С целью получения посевной культуры в течение ночи культивировали штамм BL21(DE3) *E. Coli*, содержащий плазмиду, кодирующую гибридный белок AAD (фиг. 5), в 5 мл среды 2xTY при 30°C, 250 об/мин. Добавили культивированную в течение ночи посевную культуру (2,5 мл) в 250 мл среды 2xTY при 37°C, 250 об/мин в течение 2,5 ч (до OD₆₀₀ ≈ 0,6-0,7). После достижения OD₆₀₀ добавили в культуру IPTG (до конечной концентрации 0,2 мМ). Продолжили выращивание еще в течение 22 часов при 20°C, а затем собрали клетки путем центрифугирования. Повторно суспендировали сгусток клеток в 25 мл 10 мМ буфера на основе фосфата натрия с pH 7,4. Подвергли клетки лизису путем разрушения ультразвуком. Собрали растворимую часть после центрифугирования. Затем очистили гибридный белок (содержащий гистидиновую метку) методом никель-аффинной хроматографии. В Таблице 2 показано, что температура культивации является важным фактором, влияющим на растворимость гибридного белка AAD (с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 40, фиг. 3Д), полученного из экспрессирующего хозяина.

С целью выделения растворимой фракции гибридного белка AAD повторно суспендировали сгусток клеток в 25 мл 10 мМ буфера на основе фосфата натрия с pH 7,4. Подвергли клетки лизису путем разрушения ультразвуком. Собрали растворимую часть после центрифугирования. Затем очистили гибридный белок AAD (содержащий гистидиновую метку) методом никель-аффинной хроматографии.

С целью выделения нерастворимой фракции гибридного белка AAD повторно суспендировали сгусток клеток в 25 мл 20 мМ буфера Triton X-100 на основе фосфата

натрия с pH 7,4. Подвергли клетки лизису путем разрушения ультразвуком. Собирали нерастворимую часть (вирусные включения) путем центрифугирования. Развернули молекулы белка путем повторного суспендирования в 10 мл 20 мМ Tris-HCl с pH 7,4, 6 М гуанидингидрохлорида со встряхиванием до достижения растворимости. Повторно свернули молекулы белка путем добавления по каплям раствора развернутого белка в быстро перемешиваемый раствор 100 мл 20 мМ буфера на основе фосфата натрия с pH 7,4. Удалили нерастворимые вещества путем центрифугирования. Осуществили высаливание белка путем добавления твердого порошкового сульфата аммония в надосадочную жидкость до достижения 70% насыщения. Собирали нерастворимую часть путем центрифугирования и повторно суспендировали в 10 мл 20 мМ буфера на основе фосфата натрия. Затем очистили гибридный белок AAD (содержащий гистидиновую метку) методом никель-аффинной хроматографии.

Таблица 2

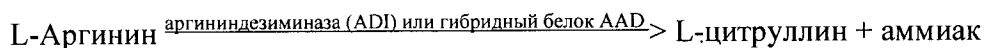
AAD	1	2	3
Температура культивации (°C)	30	20	37
Выход (мг)/ 250 мл культуры	~0,66	~12,0	~7,0
Растворимость	50%	90%	90% вирусных включений
IC ₅₀ (мкг/мл) для клеток A375	0,10	0,68	0,23

Пример 4

Анализ ферментативной активности и ферментативной кинетики гибридного белка AAD

С целью определения ферментативной активности ADI дикого типа и гибридного белка AAD согласно настоящему изобретению использовали реакцию диацетилмонооксима-

тиосемикарбазида (DAM)-(TSC) для обнаружения цитруллина. Эта реакция представлена далее.



С этой целью добавили образец в окрашивающийся реагент, который получили путем смешивания кислого раствора хлорида железа с раствором DAM-TSC. Вкратце, в течение 5 минут инкубировали фермент с 20 мМ аргинина, 10 мМ фосфата натрия с pH 7,4 при 37°C. Нагрели реакционную смесь до 100°C в течение 5 минут, чтобы проявить цвет и осуществить считывание на волне 540 нм (световой путь = 1 см). Построили стандартную кривую с использованием различных концентраций цитруллина. Одна единица нативного фермента ADI соответствует ферментативной активности, при которой 1 мкмоль аргинина преобразуется в 1 мкмоль цитруллина в минуту при 37°C в условиях анализа. Специфическая активность ADI дикого типа и гибридного белка AAD согласно настоящему изобретению составляла 8,4 и 9,2 единиц/мг (при физиологическом pH 7,4), соответственно. Также определили специфическую активность ADI дикого типа и гибридного белка AAD при различных pH (от 5,5 до 9,5), из которых оптимальным является pH 6,5. Соответственно, полученные результаты показывают, что гибридный белок AAD эффективно истощает аргинин, поскольку гибридизация с альбумин-связывающим белком не сказывается на ферментативной активности ADI.

Константа Михаэлиса K_m равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной, и является обратным показателем сродства субстрата к ферменту. Малая величина K_m говорит о высоком сродстве к субстрату, и это означает, что скорость реакции быстрее приближается к максимальной скорости. С целью определения ферментативной кинетики или величины K_m измерили активность ADI дикого типа и гибридного белка AAD при различных концентрациях являющегося субстратом аргинина (2000 мкМ, 1000 мкМ, 500 мкМ, 250 мкМ, 125 мкМ, 62,5 мкМ) и при pH 7,4. Измеренная величина K_m для гибридного белка AAD (SEQ ID NO: 40, белка ADI, полученного из *Mycoplasma arginini*), показанная на фиг. 3Д, и для гибридного белка AAD (SEQ ID NO: 41, белка ADI, полученного из *Bacillus cereus*), показанная на фиг. 3Е, составляют 0,0041 мМ и 0,132 мМ, соответственно. Эти результаты говорят о том, что

гибридизация с ABD не сказывается на способности различных гибридных белков AAD связывать аргинин.

Пример 5

Анализ пролиферации клеток и эффективности *in vitro* гибридного белка AAD в отношении линий раковых клеток

Использовали культуральную среду DMEM для выращивания линий клеток A375 и SK-mel-28 меланомы человека, PancI рака поджелудочной железы человека и C-33A цервикального рака человека. Использовали среду EMEM для культивирования линий клеток SK-hep 1 рака печени и C-33A цервикального рака. Высеяли раковые клетки (2×10^3) в 100 мкл культуральной среды на лунки 96-луночных планшетов и инкубировали в течение 24 часов. Заменяли культуральную среду средой, содержащей различные концентрации гибридного белка AAD. Инкубировали планшеты еще в течение 3 суток при 37°C в среде из 95% воздуха/5% CO₂. Осуществили анализ, чтобы оценить число жизнеспособных клеток в культуре согласно инструкциям изготовителя. Приняли количество фермента, которое потребовалось для ингибирования роста клеток на 50%, за IC₅₀.

Как показано в Таблице 1 на фиг. 9, эти результаты говорят о том, что гибридный белок AAD эффективно истощает аргинин и ингибирует рост раковых клеток человека различных линий при исследовании культур тканей *in vitro*. Например, IC₅₀ для меланомы человека, карциномы толстой кишки человека, рака поджелудочной железы человека, рака печени человека и цервикального рака человека имела малую величину (смотри Таблицу 1), поскольку гибридный белок AAD легко ингибировал рост клеток рака всех этих типов. Как и предполагалось, гибридный белок AAD ингибирует рост клеток рака всех аргинин-зависимых типов (например, рака ASS-негативного типа).

Пример 6

Определение периода полувыведения *in vivo* гибридного белка AAD

В этом исследовании использовали мышей линии Balb/c (в возрасте 5-7 недель), которых акклиматизировали в течение недели до начала эксперимента. Разделили мышей

(n=3) на четыре группы, и внутривенно ввели, соответственно, 0, 100, 500 или 1000 мкг гибридного белка AAD (SEQ ID NO: 40, фиг. 3Д) в 100 мкл PBS. Взяли образцы крови каждой мыши в момент 0 часов и в дни с 1 по 7. Получили сыворотку после центрифугирования. Затем освободили сыворотку от белков и подвергли анализу на аргинин с помощью анализатора аминокислот.

Как показано на фиг. 11, даже в наименьшей дозировке 100 мкг гибридный белок AAD (SEQ ID NO: 40, фиг. 3Д) эффективно истощает аргинин в плазме в дни 1, 3 и 5, т.е. AAD способна эффективно истощать аргинин *in vivo* в течение по меньшей мере 5 дней. Содержание аргинина постепенно вернулось к нормальному уровню в день 6 и день 7 во всех лечебных группах.

Пример 7

Эффективность *in vivo* гибридного белка AAD в отношении ксенотрансплантатов раковых клеток

В этом исследовании использовали бестимусных мышей линии balb/c (в возрасте 5-7 недель), которых акклиматизировали в течение недели до начала эксперимента. Подкожно ввели мышам 2×10^6 раковых клеток в 100 мкл свежей культуральной среды. Через десять дней произвольно разделили мышей на контрольную и лечебную группы. Мышам из контрольной группы раз в неделю внутривенно вводили 100 мкл PBS, а мышам из лечебной группы – 100 мкл гибридного белка AAD. Измерили размер опухолей с помощью калибра, и вычислили объем опухолей согласно формуле: $(\text{длина} \times \text{ширина}^2)/2$. На пятый день после каждого курса брали образцы крови с целью измерения содержания аргинина в плазме.

SEQUENCE LISTING

<110> Vision Global Holdings Ltd.
WONG, Bing Lou

<120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING ALBUMIN-BINDING ARGININE
DEIMINASE FOR CANCER TARGETING TREATMENT

<130> P6890US01

<140> PCT/US14/020943
<141> 2014-03-06

<150> US 61/773,214
<151> 2013-03-06

<150> US 14/197,236
<151> 2014-03-05

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer,synthesized in lab

<400> 1
catgatgcga attccttagc tgaagctaaa gtcttagcta acagagaact 50

<210> 2
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer,synthesized in lab

<400> 2
tagtcactta ctccatattt gtcaagttct ctgtttagcta agactttagc 50

<210> 3
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer, synthesized in lab

<400> 3
gaacttgaca aatatggagt aagtgactat tacaagaacc taatcaacaa 50

<210> 4
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer, synthesized in lab

<400> 4
 tacaccttca acagtttttg cattgttgat taggttcttg taatagtcac 50

<210> 5
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer, synthesized in lab

<400> 5
 gccaaaactg ttgaaggtgt aaaagcactg atagatgaaa ttttagctgc 50

<210> 6
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer, synthesized in lab

<400> 6
 agctacgata agcttaaggt aatgcagcta aaatttcac tatcagtg 48

<210> 7
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer, synthesized in lab

<400> 7
 catgatgcga attccttagc tgaagctaaa gtcttagcta acagagaact 50

<210> 8
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer, synthesized in lab

<400> 8
 agctacgata agcttaaggt aatgcagcta aaatttcac tatcagtg 48

<210> 9
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer, synthesized in lab

<400> 9

atcgatcgat gtctgtatatt gacagtaaatt ttaaagg 37

<210> 10
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer, synthesized in lab

<400> 10
agctaaggaa ttcgcatcat gatggtgatg gtggtggcta cccacttaa c 51

<210> 11
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer, synthesized in lab

<400> 11
atcgatcgat gtctgtatatt gacagtaaatt ttaaagg 37

<210> 12
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer, synthesized in lab

<400> 12
agctacgata agcttaaggt aatgcagcta aaatttcac tatcagtg 48

<210> 13
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer, synthesized in lab

<400> 13
ggagatatac atatgcatca tcaccatcac catgatgaag ccgtggatg 49

<210> 14
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer, synthesized in lab

<400> 14
ttgttattat tggtgttact acccgaaggt aatgcagcta aaatttcac 50

<210> 15

<211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer, synthesized in lab

 <400> 15
 agaaccgccg ctaccattgt tattattggt gttactaccc ga 42

<210> 16
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer, synthesized in lab

 <400> 16
 aataataaca atggtagcgg cggttctgta tttgacagta aatttaaagg 50

<210> 17
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer, synthesized in lab

 <400> 17
 tagatcaatg gatccttacc acttaacatc tttacgtgat aaag 44

<210> 18
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer, synthesized in lab

 <400> 18
 ggagatatac atatgcatca tcaccatcac catgatgaag ccgtggatg 49

<210> 19
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer, synthesized in lab

 <400> 19
 ttgttattat tggtgttact acccgaaggt aatgcagcta aaatttcac 50

<210> 20
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer, synthesized in lab
 <400> 20
 tttaccgccg ctaccattgt tattattggt gttactaccc ga 42

<210> 21
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer, synthesized in lab
 <400> 21
 aataataaca atggtagcgg cggtaaacad ccgatacatg ttacttcaga 50

<210> 22
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer, synthesized in lab
 <400> 22
 tagatcaatg gatccctaaa tatctttacg aacaattggc atac 44

<210> 23
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma arginini

<400> 23
 Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
 20 25 30
 Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45
 Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu
 50 55 60
 Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala
 65 70 75 80
 Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu
 85 90 95
 Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val
 100 105 110

Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe
370 375 380

His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
405 410

<210> 24
<211> 410
<212> PRT
<213> Lactococcus lactis

<400> 24

Met Asn Asn Gly Ile Asn Val Asn Ser Glu Ile Gly Lys Leu Lys Ser
1 5 10 15

Val Leu Leu His Arg Pro Gly Ala Glu Val Glu Asn Ile Thr Pro Asp
20 25 30

Thr Met Lys Gln Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Tyr Leu Lys Ile Ala
35 40 45

Gln Lys Glu His Asp Phe Phe Ala Gln Thr Leu Arg Asp Asn Gly Ala
50 55 60

Glu Thr Val Tyr Ile Glu Asn Leu Ala Thr Glu Val Phe Glu Lys Ser
65 70 75 80

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

Tyr Arg Pro Gly Arg Thr Tyr Asp Gly Leu Thr Glu Tyr Leu Thr Ser
100 105 110

Met Pro Thr Lys Asp Met Val Glu Lys Val Tyr Ala Gly Val Arg Lys
115 120 125

Asn Glu Leu Asp Ile Lys Arg Thr Ala Leu Ser Asp Met Ala Gly Ser
130 135 140

Asp Ala Glu Asn Tyr Phe Tyr Leu Asn Pro Leu Pro Asn Ala Tyr Phe
145 150 155 160

Thr Arg Asp Pro Gln Ala Ser Met Gly Val Gly Met Thr Ile Asn Lys
165 170 175

Met Thr Phe Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser Leu Ile Thr Glu Tyr Val
180 185 190

Met Ala Asn His Pro Arg Phe Lys Asp Thr Pro Ile Trp Arg Asp Arg
195 200 205

Asn His Thr Thr Arg Ile Glu Gly Gly Asp Glu Leu Ile Leu Asn Lys
210 215 220

Thr Thr Val Ala Ile Gly Val Ser Glu Arg Thr Ser Ser Lys Thr Ile
225 230 235 240

Gln Asn Leu Ala Lys Glu Leu Phe Ala Asn Pro Leu Ser Thr Phe Asp
245 250 255

Thr Val Leu Ala Val Glu Ile Pro His Asn His Ala Met Met His Leu
260 265 270

Asp Thr Val Phe Thr Met Ile Asn His Asp Gln Phe Thr Val Phe Pro
275 280 285

Gly Ile Met Asp Gly Ala Gly Asn Ile Asn Val Phe Ile Leu Arg Pro
290 295 300

Gly Gln Asp Gly Glu Val Glu Ile Glu His Leu Thr Asp Leu Lys Ala
305 310 315 320

Ala Leu Lys Lys Val Leu Asn Leu Ser Glu Leu Asp Leu Ile Glu Cys
325 330 335

Gly Ala Gly Asp Pro Ile Ala Ala Pro Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly
340 345 350

Ser Asn Thr Leu Ala Ile Ala Pro Gly Glu Ile Val Thr Tyr Asp Arg
355 360 365

Asn Tyr Val Thr Val Glu Leu Leu Lys Glu His Gly Ile Lys Val His
370 375 380

Glu Ile Leu Ser Ser Glu Leu Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ala Arg Cys
385 390 395 400

Met Ser Gln Pro Leu Trp Arg Glu Asp Leu
405 410

<210> 25
<211> 410
<212> PRT

<213> Bacillus cereus

<400> 25

Met Lys His Pro Ile His Val Thr Ser Glu Ile Gly Glu Leu Gln Thr
1 5 10 15

Val Leu Leu Lys Arg Pro Gly Lys Glu Val Glu Asn Leu Thr Pro Asp
20 25 30

Tyr Leu Gln Gln Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Tyr Leu Pro Ile Ile
35 40 45

Gln Lys Glu His Asp Tyr Phe Ala Gln Thr Leu Arg Asn Arg Gly Val
50 55 60

Glu Val Leu Tyr Leu Glu Lys Leu Ala Ala Glu Ala Leu Val Asp Lys
65 70 75 80

Lys Leu Arg Glu Glu Phe Val Asp Arg Ile Leu Lys Glu Gly Gln Ala
85 90 95

Asp Val Asn Val Ala His Gln Thr Leu Lys Glu Tyr Leu Leu Ser Phe
100 105 110

Ser Asn Glu Glu Leu Ile Gln Lys Ile Met Gly Gly Val Arg Lys Asn
115 120 125

Glu Ile Glu Thr Ser Lys Lys Thr His Leu Tyr Glu Leu Met Glu Asp
130 135 140

His Tyr Pro Phe Tyr Leu Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
145 150 155 160

Asp Pro Ala Ala Ser Val Gly Asp Gly Leu Thr Ile Asn Lys Met Arg
165 170 175

Glu Pro Ala Arg Arg Arg Glu Ser Leu Phe Met Glu Tyr Ile Ile Lys
180 185 190

Tyr His Pro Arg Phe Ala Lys His Asn Val Pro Ile Trp Leu Asp Arg
195 200 205

Asp Tyr Lys Phe Pro Ile Glu Gly Gly Asp Glu Leu Ile Leu Asn Glu
210 215 220

Glu Thr Ile Ala Ile Gly Val Ser Ala Arg Thr Ser Ala Lys Ala Ile
225 230 235 240

Glu Arg Leu Ala Lys Asn Leu Phe Ser Arg Gln Asn Lys Ile Lys Lys
 245 250 255

Val Leu Ala Ile Glu Ile Pro Lys Cys Arg Ala Phe Met His Leu Asp
 260 265 270

Thr Val Phe Thr Met Val Asp Tyr Asp Lys Phe Thr Ile His Pro Ala
 275 280 285

Ile Gln Gly Pro Lys Gly Asn Met Asn Ile Tyr Ile Leu Glu Lys Gly
 290 295 300

Ala Asp Glu Glu Thr Leu Lys Ile Thr His Arg Thr Ser Leu Met Glu
 305 310 315 320

Ala Leu Lys Glu Val Leu Asp Leu Ser Glu Leu Val Leu Ile Pro Cys
 325 330 335

Gly Gly Gly Asp Val Ile Ala Ser Ala Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly
 340 345 350

Ser Asn Thr Leu Ala Ile Ala Pro Gly Val Val Val Thr Tyr Asp Arg
 355 360 365

Asn Tyr Val Ser Asn Thr Leu Leu Arg Glu His Gly Ile Glu Val Ile
 370 375 380

Glu Val Leu Ser Ser Glu Leu Ser Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys
 385 390 395 400

Met Ser Met Pro Ile Val Arg Lys Asp Ile
 405 410

<210> 26
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> Bacillus licheniformis

<400> 26

Met Ile Met Thr Thr Pro Ile His Val Tyr Ser Glu Ile Gly Pro Leu
 1 5 10 15

Lys Thr Val Met Leu Lys Arg Pro Gly Arg Glu Leu Glu Asn Leu Thr
 20 25 30

Pro Glu Tyr Leu Glu Arg Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Phe Leu Pro
 35 40 45

Ala Val Gln Lys Glu His Asp Gln Phe Ala Glu Thr Leu Lys Gln Gln

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

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

 <210> 27
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma arthritidis

 <400> 27
 Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Lys Glu Ile
 20 25 30
 Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45
 Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Glu Phe Val Ala Glu
 50 55 60
 Leu Lys Lys Arg Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Val Asp Leu Ile Val
 65 70 75 80
 Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Lys Glu Ala Lys Glu Lys Leu Leu Glu
 85 90 95
 Glu Phe Leu Asp Asp Ser Val Pro Val Leu Ser Asp Glu His Arg Ala
 100 105 110
 Ala Val Lys Lys Phe Leu Gln Ser Gln Lys Ser Thr Arg Ser Leu Val
 115 120 125

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

Arg Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys
405

<210> 28
<211> 409
<212> PRT
<213> Mycoplasma hominis

<400> 28

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Gln Ser Phe Val Lys Ile
50 55 60

Met Lys Asp Arg Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala
65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Lys Ala Ala Lys Glu Glu Phe Ile Glu
85 90 95

Thr Phe Leu Glu Glu Thr Val Pro Val Leu Thr Glu Ala Asn Lys Lys
100 105 110

Ala Val Arg Ala Phe Leu Leu Ser Lys Pro Thr His Glu Met Val Glu
115 120 125

Phe Met Met Ser Gly Ile Thr Lys Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ser Glu
130 135 140

Asn Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp
145 150 155 160

Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Phe Met Arg Tyr
165 170 175

Ile Val Arg Arg Arg Glu Thr Leu Phe Ala Arg Phe Val Phe Arg Asn
180 185 190

His Pro Lys Leu Val Lys Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Met Lys
195 200 205

Met Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Glu Thr Leu
210 215 220

Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Asp Thr Ile Thr Leu Leu
225 230 235 240

Ala Lys Asn Ile Lys Ala Asn Lys Glu Val Glu Phe Lys Arg Ile Val
245 250 255

Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp
260 265 270

Leu Thr Met Leu Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala Asn
275 280 285

Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala Glu
290 295 300

Pro Gln Pro Gln Leu Asn Gly Leu Pro Leu Asp Lys Leu Leu Ala Ser
305 310 315 320

Ile Ile Asn Lys Glu Pro Val Leu Ile Pro Ile Gly Gly Ala Gly Ala
325 330 335

Thr Glu Met Glu Ile Ala Arg Glu Thr Asn Phe Asp Gly Thr Asn Tyr
340 345 350

Leu Ala Ile Lys Pro Gly Leu Val Ile Gly Tyr Asp Arg Asn Glu Lys
355 360 365

Thr Asn Ala Ala Leu Lys Ala Ala Gly Ile Thr Val Leu Pro Phe His
370 375 380

Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met
385 390 395 400

Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
405

<210> 29
<211> 411
<212> PRT
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 29

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

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

Phe Met His Leu Asp Thr Val Phe Thr Met Val Asp Tyr Asp Lys Phe
 275 280 285

Thr Ile His Pro Glu Ile Glu Gly Asp Leu Arg Val Tyr Ser Val Thr
 290 295 300

Tyr Asp Asn Glu Glu Leu His Ile Val Glu Glu Lys Gly Asp Leu Ala
 305 310 315 320

Asp Leu Leu Ala Ala Asn Leu Gly Val Glu Lys Val Asp Leu Ile Arg
 325 330 335

Cys Gly Gly Asp Asn Leu Val Ala Ala Gly Arg Glu Gln Trp Asn Asp
 340 345 350

Gly Ser Asn Thr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Val Val Val Val Tyr Asn
 355 360 365

Arg Asn Thr Ile Thr Asn Ala Ile Leu Glu Ser Lys Gly Leu Lys Leu
 370 375 380

Ile Lys Ile His Gly Ser Glu Leu Val Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg
 385 390 395 400

Cys Met Ser Met Pro Phe Glu Arg Glu Asp Ile
 405 410

<210> 30
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumonia

<400> 30

Met Ser Ser His Pro Ile Gln Val Phe Ser Glu Ile Gly Lys Leu Lys
 1 5 10 15

Lys Val Met Leu His Arg Pro Gly Lys Glu Leu Glu Asn Leu Leu Pro
 20 25 30

Asp Tyr Leu Glu Arg Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Phe Leu Glu Asp
 35 40 45

Ala Gln Lys Glu His Asp Ala Phe Ala Gln Ala Leu Arg Asp Glu Gly
 50 55 60

Ile Glu Val Leu Tyr Leu Glu Gln Leu Ala Ala Glu Ser Leu Thr Ser

65	70	75	80
Pro Glu Ile Arg Asp 85	Gln Phe Ile Glu	Glu Tyr Leu Asp 90	Glu Ala Asn 95
Ile Arg Asp Arg 100	Gln Thr Lys Val	Ala Ile Arg Glu	Leu Leu His Gly 110
Ile Lys Asp Asn 115	Gln Glu Leu Val	Glu Lys Thr Met	Ala Gly Ile Gln 125
Lys Val Glu Leu Pro 130	Glu Ile Pro Asp	Glu Ala Lys Asp	Leu Thr Asp 140
Leu Val Glu Ser Asp 145	Tyr Pro Phe Ala	Ile Asp Pro Met	Pro Asn Leu 160
Tyr Phe Thr Arg 165	Asp Pro Phe Ala	Thr Ile Gly Asn	Ala Val Ser Leu 175
Asn His Met Phe 180	Ala Asp Thr Arg	Asn Arg Glu Thr	Leu Tyr Gly Lys 190
Tyr Ile Phe Lys 195	Tyr His Pro Ile	Tyr Gly Gly Lys	Val Asp Leu Val 205
Tyr Asn Arg Glu 210	Glu Asp Thr Arg	Ile Glu Gly Gly	Asp Glu Leu Val 220
Leu Ser Lys Asp 225	Val Leu Ala Val	Gly Ile Ser Gln	Arg Thr Asp Ala 240
Ala Ser Ile Glu 245	Lys Leu Leu Val	Asn Ile Phe Lys	Lys Asn Val Gly 255
Phe Lys Lys Val 260	Leu Ala Phe Glu	Phe Ala Asn Asn	Arg Lys Phe Met 270
His Leu Asp Thr 275	Val Phe Thr Met	Val Asp Tyr Asp	Lys Phe Thr Ile 285
His Pro Glu Ile 290	Glu Gly Asp Leu	His Val Tyr Ser	Val Thr Tyr Glu 300
Asn Glu Lys Leu 305	Lys Ile Val Glu	Glu Lys Gly Asp	Leu Ala Glu Leu 320
Leu Ala Gln Asn 310	Leu Gly Val Glu	Lys Val His Leu	Ile Arg Cys Gly

325

330

335

Gly Gly Asn Ile Val Ala Ala Ala Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly Ser
 340 345 350

Asn Thr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Val Val Val Val Tyr Asp Arg Asn
 355 360 365

Thr Val Thr Asn Lys Ile Leu Glu Glu Tyr Gly Leu Arg Leu Ile Lys
 370 375 380

Ile Arg Gly Ser Glu Leu Val Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys Met
 385 390 395 400

Ser Met Pro Phe Glu Arg Glu Glu Val
 405

<210> 31

<211> 402

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 31

Met Gly Val Glu Leu Gly Ser Asn Ser Glu Val Gly Ala Leu Arg Val
 1 5 10 15

Val Ile Leu His Arg Pro Gly Ala Glu Leu Arg Arg Leu Thr Pro Arg
 20 25 30

Asn Thr Asp Gln Leu Leu Phe Asp Gly Leu Pro Trp Val Ser Arg Ala
 35 40 45

Gln Asp Glu His Asp Glu Phe Ala Glu Leu Leu Ala Ser Arg Gly Ala
 50 55 60

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

Gly Ala Ala Arg Met Gln Gly Ile Ala Ala Ala Val Asp Ala Pro Arg
 85 90 95

Leu Gly Leu Pro Leu Ala Gln Glu Leu Ser Ala Tyr Leu Arg Ser Leu
 100 105 110

Asp Pro Gly Arg Leu Ala His Val Leu Thr Ala Gly Met Thr Phe Asn
 115 120 125

Glu Leu Pro Ser Asp Thr Arg Thr Asp Val Ser Leu Val Leu Arg Met
 130 135 140

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

Pro Leu

<210> 32
<211> 417
<212> PRT
<213> *Pseudomonas plecoglossicida*

<400> 32

Met Ser Thr Glu Lys Gln Lys Tyr Gly Val His Ser Glu Ala Gly Lys
1 5 10 15

Leu Arg Lys Val Met Val Cys Ser Pro Gly Leu Ala His Lys Arg Leu
20 25 30

Thr Pro Ser Asn Cys Asp Glu Leu Leu Phe Asp Asp Val Ile Trp Val
35 40 45

Asp Gln Ala Lys Arg Asp His Phe Asp Phe Val Thr Lys Met Arg Glu
50 55 60

Arg Gly Val Asp Val Leu Glu Met His Asn Leu Leu Thr Asp Ile Val
65 70 75 80

Gln Asp Lys Asn Ala Leu Lys Trp Ile Leu Asp Arg Lys Leu Thr Asp
85 90 95

Asp Thr Val Gly Val Gly Leu Lys Asn Glu Val Arg Ser Trp Leu Glu
100 105 110

Gly Gln Asp Pro Arg His Leu Ala Glu Phe Leu Ile Gly Gly Val Ala
115 120 125

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

Asn Asp Tyr Leu Gly His Ser Ser Phe Ile Leu Pro Pro Leu Pro Asn
145 150 155 160

Thr Gln Phe Thr Arg Asp Thr Thr Cys Trp Ile Tyr Gly Gly Val Thr
165 170 175

Leu Asn Pro Met Tyr Trp Pro Ala Arg Arg Gln Glu Thr Leu Leu Thr
180 185 190

Thr Ala Ile Tyr Lys Phe His Lys Glu Phe Thr Asn Ala Glu Phe Glu
195 200 205

Val Trp Tyr Gly Asp Pro Asp Lys Glu His Gly Ser Ser Thr Leu Glu
 210 215 220

Gly Gly Asp Val Met Pro Ile Gly Lys Gly Ile Val Leu Ile Gly Met
 225 230 235 240

Gly Glu Arg Thr Ser Arg Gln Ala Ile Gly Gln Leu Ala Arg Asn Leu
 245 250 255

Phe Glu Lys Gly Ala Ala Thr Glu Val Ile Val Ala Gly Leu Pro Lys
 260 265 270

Ser Arg Ala Ala Met His Leu Asp Thr Val Phe Ser Phe Cys Asp Arg
 275 280 285

Asp Leu Val Thr Val Phe Pro Glu Val Val Asn Glu Ile Val Pro Phe
 290 295 300

Ile Ile Arg Pro Asp Glu Lys Lys Pro Tyr Gly Met Asp Val Arg Arg
 305 310 315 320

Ile Asn Lys Ser Phe Ile Glu Val Val Gly Glu Gln Leu Gly Val Lys
 325 330 335

Leu Arg Val Val Glu Thr Gly Gly Asn Ser Phe Ala Ala Glu Arg Glu
 340 345 350

Gln Trp Asp Asp Gly Asn Asn Val Val Ala Ile Glu Pro Gly Val Val
 355 360 365

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

Gly Ile Glu Val Ile Thr Ile Ser Ala Gly Glu Leu Gly Arg Gly Arg
 385 390 395 400

Gly Gly Gly His Cys Met Thr Cys Pro Ile Val Arg Asp Pro Ile Asp
 405 410 415

Tyr

<210> 33
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida
 <400> 33

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

Phe Glu Lys Gly Ala Ala Glu Lys Ile Ile Val Ala Gly Leu Pro Lys
 260 265 270

Ser Arg Ala Ala Met His Leu Asp Thr Val Phe Ser Phe Cys Asp Arg
 275 280 285

Asp Leu Val Thr Val Phe Pro Glu Val Val Lys Glu Ile Lys Pro Phe
 290 295 300

Ile Ile Thr Pro Asp Ser Ser Lys Pro Tyr Gly Met Asn Ile Ala Pro
 305 310 315 320

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

Lys Asp Lys Leu Arg Val Val Glu Thr Gly Gly Asn Ser Phe Ala Ala
 340 345 350

Glu Arg Glu Gln Trp Asp Asp Gly Asn Asn Val Val Ala Leu Glu Pro
 355 360 365

Gly Val Val Ile Gly Tyr Asp Arg Asn Thr Tyr Thr Asn Thr Leu Leu
 370 375 380

Arg Lys Ala Gly Ile Glu Val Ile Thr Ile Ser Ala Gly Glu Leu Gly
 385 390 395 400

Arg Gly Arg Gly Gly Gly His Cys Met Thr Cys Pro Ile Val Arg Asp
 405 410 415

Pro Ile Asp Tyr
 420

<210> 34
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 34

Met Ser Thr Glu Lys Thr Lys Leu Gly Val His Ser Glu Ala Gly Lys
 1 5 10 15

Leu Arg Lys Val Met Val Cys Ser Pro Gly Leu Ala His Gln Arg Leu
 20 25 30

Thr Pro Ser Asn Cys Asp Glu Leu Leu Phe Asp Asp Val Ile Trp Val
 35 40 45

Asn Gln Ala Lys Arg Asp His Phe Asp Phe Val Thr Lys Met Arg Glu

50		55		60	
Arg 65	Gly	Ile	Asp	Val	Leu 70
	Glu	Met	His	Asn	Leu 75
	Leu	Thr	Glu	Thr	Ile 80
Gln	Asn	Pro	Glu	Ala 85	Leu
	Lys	Trp	Ile	Leu 90	Asp
	Arg	Lys	Ile	Thr	Ala 95
Asp	Ser	Val	Gly 100	Leu	Gly
	Leu	Thr	Ser 105	Glu	Leu
	Arg	Ser	Trp	Leu	Glu 110
Ser	Leu	Glu 115	Pro	Arg	Lys
	Leu	Ala 120	Glu	Tyr	Leu
	Ile	Gly 125	Gly	Val	Ala
Ala	Asp	Asp	Leu	Pro	Ala
130			Ser 135	Glu	Gly
	Ala	Asn	Ile 140	Leu	Lys
	Met	Tyr			
Arg 145	Glu	Tyr	Leu	Gly	His
	Ser	Ser	Phe	Leu	Leu 150
	Pro	Pro	Leu	Pro	Asn 160
Thr	Gln	Phe	Thr	Arg	Asp
	Thr	Cys	Trp 170	Ile	Tyr
	Gly	Gly	Val	Thr	175
Leu	Asn	Pro	Met	Tyr	Trp
	Pro	Ala	Arg	Arg	Gln
	Glu	Thr	Leu	Leu	Thr 190
Thr	Ala	Ile	Tyr	Lys	Phe
195			His	Pro	Glu
	Phe	Ala	Asn	Ala	Glu
	Phe	Glu	205		
Ile	Trp	Tyr	Gly	Asp	Pro
210			Asp	Lys	Asp
	His	Gly	Ser	Ser	Thr
	Leu	Glu	220		
Gly 225	Gly	Asp	Val	Met	Pro
	Ile	Gly	Asn	Gly	Val
	Val	Val	Leu	Ile	Gly
	Met	240			
Gly	Glu	Arg	Ser	Ser	Arg
	Gln	Ala	Ile	Gly	Gln
	Val	Ala	Gln	Ser	Leu
	245		250		255
Phe	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala
	Glu	Arg	Val	Ile	Val
	Ala	Gly	Leu	Pro	Lys
	260		265		270
Ser	Arg	Ala	Ala	Met	His
	Leu	Asp	Thr	Val	Phe
	Ser	Phe	Cys	Asp	Arg
	275		280		285
Asp	Leu	Val	Thr	Val	Phe
290			Pro	Glu	Val
	Val	Lys	Glu	Ile	Val
	Pro	Phe	300		
Ser	Leu	Arg	Pro	Asp	Pro
	Ser	Ser	Pro	Tyr	Gly
	Met	Asn	Ile	Arg	Arg

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

Asp Tyr

<210> 35
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Streptococcus pneumoniae

<400> 35

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

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

Lys Val Glu Leu Pro Glu Ile Pro Asp Glu Ala Lys Asp Leu Thr Asp
130 135 140

Leu Val Glu Ser Asp Tyr Pro Phe Ala Ile Asp Pro Met Pro Asn Leu
145 150 155 160

Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Thr Ile Gly Asn Ala Val Ser Leu
165 170 175

Asn His Met Phe Ala Asp Thr Arg Asn Arg Glu Thr Leu Tyr Gly Lys
180 185 190

Tyr Ile Phe Lys Tyr His Pro Ile Tyr Gly Gly Lys Val Asp Leu Val
195 200 205

Tyr Asn Arg Glu Glu Asp Thr Arg Ile Glu Gly Gly Asp Glu Leu Val
210 215 220

Leu Ser Lys Asp Val Leu Ala Val Gly Ile Ser Gln Arg Thr Asp Ala
225 230 235 240

Ala Ser Ile Glu Lys Leu Leu Val Asn Ile Phe Lys Lys Asn Val Gly
245 250 255

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

His Leu Asp Thr Val Phe Thr Met Val Asp Tyr Asp Lys Phe Thr Ile
275 280 285

His Pro Glu Ile Glu Gly Asp Leu His Val Tyr Ser Val Thr Tyr Glu
290 295 300

Asn Glu Lys Leu Lys Ile Val Glu Glu Lys Gly Asp Leu Ala Glu Leu
305 310 315 320

Leu Ala Gln Asn Leu Gly Val Glu Lys Val His Leu Ile Arg Cys Gly
325 330 335

Gly Gly Asn Ile Val Ala Ala Ala Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly Ser
340 345 350

Asn Thr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Val Val Val Val Tyr Asp Arg Asn
355 360 365

Thr Val Thr Asn Lys Ile Leu Glu Glu Tyr Gly Leu Arg Leu Ile Lys
370 375 380

Ile Arg Gly Ser Glu Leu Val Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys Met
385 390 395 400

Ser Met Pro Phe Glu Arg Glu Glu Val
405

<210> 36
<211> 467
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ABD1, synthesized in lab

<400> 36

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu
50 55 60

Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala
65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu
85 90 95

Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val
100 105 110

Val Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Thr Ser Arg Glu Leu Val
115 120 125

Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala
130 135 140

Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
145 150 155 160

Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg
 165 170 175

Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser
 180 185 190

Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu
 195 200 205

Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr
 210 215 220

Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr Leu
 225 230 235 240

Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile
 245 250 255

Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr
 260 265 270

Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala
 275 280 285

Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala
 290 295 300

Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Gln
 305 310 315 320

Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly
 325 330 335

Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn
 340 345 350

Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu
 355 360 365

Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe
 370 375 380

His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
 385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp Gly Ser His His His His
 405 410 415

His His Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu
 420 425 430

Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys
 435 440 445

Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala
 450 455 460

Ala Leu Pro
 465

<210> 37
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ABD, synthesized in lab

<400> 37

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
 20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu
 50 55 60

Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala
 65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu
 85 90 95

Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val
 100 105 110

Val Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Thr Ser Arg Glu Leu Val
 115 120 125

Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala
 130 135 140

Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
 145 150 155 160

Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg
165 170 175

Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser
180 185 190

Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu
195 200 205

Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr
210 215 220

Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr Leu
225 230 235 240

Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile
245 250 255

Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr
260 265 270

Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala
275 280 285

Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala
290 295 300

Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Gln
305 310 315 320

Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly
325 330 335

Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn
340 345 350

Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu
355 360 365

Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe
370 375 380

His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp Ala Gln His Asp Glu Ala
405 410 415

Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu
420 425 430

Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn
435 440 445

Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala
450 455 460

Ala Leu Pro
465

<210> 38
<211> 473
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ABD, synthesized in lab

<400> 38

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu
50 55 60

Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala
65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu
85 90 95

Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val
100 105 110

Val Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Thr Ser Arg Glu Leu Val
115 120 125

Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala
130 135 140

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

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp His His His His His His
 405 410 415
 Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys
 420 425 430
 Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
 435 440 445
 Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
 450 455 460
 Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 465 470
 <210> 39
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ABD, synthesized in lab
 <400> 39
 Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
 20 25 30
 Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45
 Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu
 50 55 60
 Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala
 65 70 75 80
 Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu
 85 90 95
 Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val
 100 105 110
 Val Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Thr Ser Arg Glu Leu Val
 115 120 125
 Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala
 130 135 140

Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
145 150 155 160

Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg
165 170 175

Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser
180 185 190

Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu
195 200 205

Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr
210 215 220

Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr Leu
225 230 235 240

Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile
245 250 255

Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr
260 265 270

Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala
275 280 285

Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala
290 295 300

Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Gln
305 310 315 320

Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly
325 330 335

Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn
340 345 350

Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu
355 360 365

Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe
370 375 380

His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp Ala Gln His Asp Glu Ala
405 410 415

Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu
420 425 430

Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn
435 440 445

Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala
450 455 460

Ala Leu Pro His His His His His His
465 470

<210> 40
<211> 483
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ABD, synthesized in lab

<400> 40

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

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
20 25 30

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly
35 40 45

Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly Ser Val Phe Asp Ser Lys
65 70 75 80

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

Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg
100 105 110

Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Ser His Asp Ala Arg
115 120 125

Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn
 130 135 140

Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser
 145 150 155 160

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

Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val Val Val Arg Asn Phe Leu Lys
 180 185 190

Ala Lys Lys Thr Ser Arg Glu Leu Val Glu Ile Met Met Ala Gly Ile
 195 200 205

Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala Asp His Glu Leu Ile Val Asp
 210 215 220

Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly
 225 230 235 240

Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu
 245 250 255

Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser Asn His Pro Lys Leu Ile Asn
 260 265 270

Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly
 275 280 285

Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr Leu Val Val Gly Val Ser Glu
 290 295 300

Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr Leu Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala
 305 310 315 320

Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile Val Ala Ile Asn Val Pro Lys
 325 330 335

Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys
 340 345 350

Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp
 355 360 365

Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn
 370 375 380

Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Gln Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro
385 390 395 400

Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu
405 410 415

Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly
420 425 430

Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu
435 440 445

Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe His Gly Asn Gln Leu Ser Leu
450 455 460

Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp
465 470 475 480

Val Lys Trp

<210> 41
<211> 506
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> His-ABD-PolyN-bcADI, synthesized in lab

<400> 41

Met Gly His His His His His His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser
1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
20 25 30

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
35 40 45

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Gly
50 55 60

Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly Lys His Pro Ile His
65 70 75 80

Val Thr Ser Glu Ile Gly Glu Leu Gln Thr Val Leu Leu Lys Arg Pro
85 90 95

Gly Lys Glu Val Glu Asn Leu Thr Pro Asp Tyr Leu Gln Gln Leu Leu
100 105 110

Phe Asp Asp Ile Pro Tyr Leu Pro Ile Ile Gln Lys Glu His Asp Tyr
115 120 125

Phe Ala Gln Thr Leu Arg Asn Arg Gly Val Glu Val Leu Tyr Leu Glu
130 135 140

Lys Leu Ala Ala Glu Ala Leu Val Asp Lys Lys Leu Arg Glu Glu Phe
145 150 155 160

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

Gln Thr Leu Lys Glu Tyr Leu Leu Ser Phe Ser Asn Glu Glu Leu Ile
180 185 190

Gln Lys Ile Met Glu Thr Gly Gly Val Arg Lys Asn Glu Ile Glu Thr
195 200 205

Ser Lys Lys Thr His Leu Tyr Glu Leu Met Glu Thr Glu Asp His Tyr
210 215 220

Pro Phe Tyr Leu Asp Pro Met Glu Thr Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
225 230 235 240

Asp Pro Ala Ala Ser Val Gly Asp Gly Leu Thr Ile Asn Lys Met Glu
245 250 255

Thr Arg Glu Pro Ala Arg Arg Arg Glu Ser Leu Phe Met Glu Thr Glu
260 265 270

Tyr Ile Ile Lys Tyr His Pro Arg Phe Glu Lys His Asn Val Pro Ile
275 280 285

Trp Leu Asp Arg Asp Tyr Lys Phe Pro Ile Glu Gly Gly Asp Glu Leu
290 295 300

Ile Leu Asn Glu Glu Thr Ile Ala Ile Gly Val Ser Ala Arg Thr Ser
305 310 315 320

Ala Lys Ala Ile Glu Arg Leu Ala Lys Asn Leu Phe Ser Arg Gln Asn
325 330 335

Lys Ile Lys Lys Val Leu Ala Ile Glu Ile Pro Lys Cys Arg Ala Phe
340 345 350

Met Glu Thr His Leu Asp Thr Val Phe Thr Met Glu Thr Val Asp Tyr
355 360 365

Asp Lys Phe Thr Ile His Pro Ala Ile Gln Gly Pro Lys Gly Asn Met
370 375 380

Glu Thr Asn Ile Tyr Ile Leu Glu Lys Gly Ser Asp Glu Glu Thr Leu
385 390 395 400

Lys Ile Thr His Arg Thr Ser Leu Met Glu Thr Glu Ala Leu Lys Glu
405 410 415

Val Leu Gly Leu Ser Glu Leu Val Leu Ile Pro Cys Gly Gly Gly Asp
420 425 430

Val Ile Ala Ser Ala Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly Ser Asn Thr Leu
435 440 445

Ala Ile Ala Pro Gly Val Val Val Thr Tyr Asp Arg Asn Tyr Val Ser
450 455 460

Asn Thr Leu Leu Arg Glu His Gly Ile Glu Val Ile Glu Val Leu Ser
465 470 475 480

Ser Glu Leu Ser Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys Met Glu Thr Ser
485 490 495

Met Glu Thr Pro Ile Val Arg Lys Asp Ile
500 505

<210> 42
<211> 335
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ABD-Intein-CBD, synthesized in lab

<400> 42

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

Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
35 40 45

Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Glu Phe Leu Glu Gly Ser
50 55 60

Ser Cys Ile Thr Gly Asp Ala Leu Val Ala Leu Pro Glu Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Val Arg Ile Ala Asp Ile Val Pro Gly Ala Arg Pro Asn Ser Asp Asn
 85 90 95

Ala Ile Asp Leu Lys Val Leu Asp Arg His Gly Asn Pro Val Leu Ala
 100 105 110

Asp Arg Leu Phe His Ser Gly Glu His Pro Val Tyr Thr Val Arg Thr
 115 120 125

Val Glu Gly Leu Arg Val Thr Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Leu Cys
 130 135 140

Leu Val Asp Val Ala Gly Val Pro Thr Leu Leu Trp Lys Leu Ile Asp
 145 150 155 160

Glu Ile Lys Pro Gly Asp Tyr Ala Val Ile Gln Arg Ser Ala Phe Ser
 165 170 175

Val Asp Cys Ala Gly Phe Ala Arg Gly Lys Pro Glu Phe Ala Pro Thr
 180 185 190

Thr Tyr Thr Val Gly Val Pro Gly Leu Val Arg Phe Leu Glu Ala His
 195 200 205

His Arg Asp Pro Asp Ala Gln Ala Ile Ala Asp Glu Leu Thr Asp Gly
 210 215 220

Arg Phe Tyr Tyr Ala Lys Val Ala Ser Val Thr Asp Ala Gly Val Gln
 225 230 235 240

Pro Val Tyr Ser Leu Arg Val Asp Thr Ala Asp His Ala Phe Ile Thr
 245 250 255

Asn Gly Phe Val Ser His Ala Thr Gly Leu Thr Gly Leu Asn Ser Gly
 260 265 270

Leu Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr
 275 280 285

Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu
 290 295 300

Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala
 305 310 315 320

Leu Trp Gln Leu Gln Gly Asp Pro Ile Thr Ile Thr Ile Thr Lys
325 330 335

<210> 43
<211> 636
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CBD-Intein-ADI, synthesized in lab

<400> 43

Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp
1 5 10 15

Gln Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly
20 25 30

Lys Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu
35 40 45

Pro Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln Asn Asn Gly Asn Asn
50 55 60

Gly Leu Glu Leu Arg Glu Ser Gly Ala Ile Ser Gly Asp Ser Leu Ile
65 70 75 80

Ser Leu Ala Ser Thr Gly Lys Arg Val Ser Ile Lys Asp Leu Leu Asp
85 90 95

Glu Lys Asp Phe Glu Ile Trp Ala Ile Asn Glu Gln Thr Met Lys Leu
100 105 110

Glu Ser Ala Lys Val Ser Arg Val Phe Cys Thr Gly Lys Lys Leu Val
115 120 125

Tyr Ile Leu Lys Thr Arg Leu Gly Arg Thr Ile Lys Ala Thr Ala Asn
130 135 140

His Arg Phe Leu Thr Ile Asp Gly Trp Lys Arg Leu Asp Glu Leu Ser
145 150 155 160

Leu Lys Glu His Ile Ala Leu Pro Arg Lys Leu Glu Ser Ser Ser Leu
165 170 175

Gln Leu Ser Pro Glu Ile Glu Lys Leu Ser Gln Ser Asp Ile Tyr Trp
180 185 190

Asp Ser Ile Val Ser Ile Thr Glu Thr Gly Val Glu Glu Val Phe Asp
195 200 205

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

His Asn Cys Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr
 225 230 235 240

Ser Glu Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg
 245 250 255

Glu Ile Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Cys Phe Ser
 260 265 270

Ala Ile Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val
 275 280 285

Ala Glu Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu
 290 295 300

Val Ala Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu
 305 310 315 320

Ile Glu Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His
 325 330 335

Lys Val Val Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Thr Ser Arg Glu
 340 345 350

Leu Val Glu Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile
 355 360 365

Glu Ala Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe
 370 375 380

Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr
 385 390 395 400

Met Arg Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val
 405 410 415

Phe Ser Asn His Pro Lys Leu Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro
 420 425 430

Ser Leu Lys Leu Ser Ile Ala Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn
 435 440 445

Asp Thr Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val
 450 455 460

Thr Leu Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Ser Glu Phe Lys
465 470 475 480

Arg Ile Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu
485 490 495

Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro
500 505 510

Ile Ala Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly
515 520 525

Gly Ala Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu
530 535 540

Leu Gln Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly
545 550 555 560

Glu Gly Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly
565 570 575

Thr Asn Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg
580 585 590

Asn Glu Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu
595 600 605

Pro Phe His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys
610 615 620

Met Ser Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
625 630 635

<210> 44
<211> 1452
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> His-ABD-PolyN-ADI-DNA, synthesized in lab

<400> 44
atgcatcatc accatcacca tgatgaagcc gtggatgcga attccttagc tgaagctaaa 60
gtcttagcta acagagaact tgacaaatat ggagtaagtg actattacaa gaacctaatc 120
aacaatgccaa aaactgttga aggtgtaaaa gcactgatag atgaaatttt agctgcatta 180
ccttcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gttctgtatt tgacagtaaa 240
tttaaaggaa ttcacgttta ttcagaaatt ggtgaattag aatcagttct agttcacgaa 300

ccaggacgcg aaattgacta tattacacca gctagactag atgaattatg cttctcagct	360
atcttagaaa gccacgatgc tagaaaagaa cacaaacaat tcgtagcaga attaaaagca	420
aacgacatca atgttggtga attaattgat ttagttgctg aaacatatga tttagcatca	480
caagaagcta aagacaaatt aatcgaagaa tttttagaag actcagaacc agttctatca	540
gaagaacaca aagtagttgt aagaaacttc ttaaaagcta aaaaaacatc aagagaatta	600
gtagaaatca tgatggcagg gatcacaaaa tacgatttag gtatcgaagc agatcacgaa	660
ttaatcgttg acccaatgcc aaacctatac ttcacacgtg acccatttgc atcagtaggt	720
aatggtgtaa caatccacta catgcgttac aaagttagac aacgtgaaac attattctca	780
agatttgtat tctcaaatca ccctaaacta attaacactc catggtacta cgacccttca	840
ctaaaattat caatcgcagg tggggacgta tttatctaca acaatgacac attagtagtt	900
ggtgtttctg aaagaactga cttacaaaca gttactttat tagctaaaaa cattgttgct	960
aataaagaat ctgaattcaa acgtattggt gcaattaacg ttccaaaatg gacaaactta	1020
atgcacttag acacatggct aacaatgtta gacaaggaca aattcctata ctcaccaatc	1080
gctaattgacg tattttaaatt ctgggattat gacttagtaa acggtggagc agaaccacaa	1140
ccagttgaaa acggattacc tctagaagga ttattacaat caatcattaa caaaaaacca	1200
gttttaattc ctatcgcagg tgaaggtgct tcacaaatgg aaatcgaaag agaaacacac	1260
ttcgatggta caaactactt agcaattaga ccaggtggtg taattgggta ctcacgtaac	1320
gaaaaaacia acgctgctct agaagctgca ggcattaaag ttcttccatt ccacggtaac	1380
caattatcat taggtatggg taacgctcgt tgtatgtcaa tgcctttatc acgtaaagat	1440
gttaagtggg aa	1452

<210> 45

<211> 1455

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> His-ABD-PolyN-bcADI-DNA, synthesized in lab

<400> 45

atgggtcatc atcaccatca ccatgatgaa gccgtggatg cgaacagctt agctgaagct	60
aaagtcttag ctaacagaga acttgacaaa tatggagtaa gtgactatta caagaacctt	120
atcaacaatg ccaaaactgt tgaaggtgta aaagcactga tagatgaaat tttagctgca	180
ttaccttcgg gtagtaacaa caataataac aatggtagcg gcggtaaaca tccgatacat	240
gttacttcag aaattgggga attacaaacg gttttattaa aacgaccggg taaagaagtg	300
gaaaacttga cgccagatta tttgcagcaa ttattatttg acgatattcc atacctacca	360
attattcaaa aagagcatga ttattttgca caaacgttac gcaatcgggg tgttgaagtt	420

ctttatttag aaaaactagc cgctgaggcg ttagtagata aaaaacttcg agaagaattt	480
gttgatcgta ttttaaaaga aggacaggcc gacgtaaattg ttgcacatca aactttaaaa	540
gaatatttac tttccttttc aaatgaagaa ttaattcaaa aaattatggg cgggtgtacgg	600
aaaaacgaaa ttgaaacaag taagaagaca catttatatg aattaatgga agatcattat	660
ccgttttact tagatccaat gcctaattta tattttactc gtgatccagc agctagcgtg	720
ggcgatggct taacgataaa taagatgaga gaaccagcgc gtagacgtga atcattattc	780
atggagtaca tcattaaata tcatccaaga tttgaaaaac ataatgtacc aatctggtta	840
gatcgtgatt ataaatttcc aattgaaggt ggcgacgagc taattttaaa tgaagaaaca	900
attgcgattg gagtatctgc tcgtacttca gctaaagcaa ttgaacgttt agcaaaaaat	960
ctcttttagcc gacaaaataa aattaagaaa gtgttagcaa tagaaattcc aaaatgccga	1020
gcatttatgc atttagatac agtatttaca atggttgatt atgataagtt tacaattcac	1080
ccagctattc aagggccaaa agggaatatg aatatttata ttttagaaaa aggatcagat	1140
gaggaaactc ttaaaattac acatcgact tctttaatgg aagcattaaa agaggatta	1200
ggcttaagtg aattagtctt tattccatgt ggaggaggag atgtaattgc ttctgctcgt	1260
gaacaatgga atgatggctc gaacacatta gcaatcgcg caggtgtagt tgttacatat	1320
gatcgcaact atgtatccaa tacgttatta cggaacacg gtatagaagt gattgaggtg	1380
ctaagttcag aattatctcg tggctgctggg ggtccacgtt gcatgagtat gccaatgtt	1440
cgtaaagata tttaa	1455

<210> 46
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ABD without Linker, synthesized in lab
 <400> 46

Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Gly
1				5				10						15	

Val	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Leu	Ile	Asn	Asn	Ala	Lys	Thr	Val	Glu
			20					25					30		

Gly	Val	Lys	Ala	Leu	Ile	Asp	Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro
		35					40					45	

<210> 47
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> ABD with Linker, synthesized in lab

<400> 47

Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys
1 5 10 15

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr
20 25 30

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu
35 40 45

Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
50 55

<210> 48

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ABD1 without Linker, synthesized in lab

<400> 48

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 49

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ABD1 with Linker, synthesized in lab

<400> 49

Gly Ser His His His His His Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys
1 5 10 15

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr
20 25 30

Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu
35 40 45

Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
50 55

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker 1, synthesized in lab

<400> 50

Gly Ser His His His His His His Ala Asn Ser
1 5 10

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker 2, synthesized in lab

<400> 51

Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser
1 5 10

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker 3, synthesized in lab

<400> 52

Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser
1 5

<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker 5, synthesized in lab

<400> 53

Gly Ser Gly Gly
1

Формула изобретения

1. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы, имеющий первый участок, содержащий один или два компонента, выбранных из альбумин-связывающей области, альбумин-связывающего пептида или альбумин-связывающего белка(-ов), гибридизированный со вторым участком, содержащим аргининдезимиказу, в результате чего образуется гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы, и одну или несколько линкерных молекул; первый участок отделен от активного участка второго участка линкерной молекулой, гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы сохраняет активность аргининдезимиказы и связывает сывороточный альбумин, и ни одной из функций одной части гибридного белка не препятствует другая часть гибридного белка, при этом гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 или 41.

2. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором два компонента являются одинаковыми.

3. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором два компонента являются различными.

4. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором альбумин-связывающей областью являются последовательности SEQ ID NO. 46, 47, 48, 49 или их активный участок.

5. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором альбумин-связывающим пептидом являются последовательности SEQ ID NO. 46, 47, 48, 49 или их активный участок.

6. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором альбумин-связывающим белком являются последовательности SEQ ID NO. 46, 47, 48, 49 или их активный участок.

7. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором линкерная молекула содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 50, 51, 52, 53, или аминокислотную последовательность серин-глицин-серин (SGS).

8. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, дополнительно содержащий по меньшей мере Poly-N или гистидиновую метку.

9. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, в котором гибридизация включает использование остающегося участка опосредованного интеином лигирования белков между первым участком и вторым участком.

10. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 9, в котором опосредованный интеином белок, содержит связывающую хитин область.

11. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, в котором аргининдезимины выбрана из аргининдезимины, полученной из микроорганизмов *Mycoplasma*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Mycobacterium* или *Bacillus*.

12. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 11, в котором аргининдезимины получена из *Mycoplasma arginini*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* или их сочетания.

13. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, который сформирован путем введения в реакцию аргининдезимины, имеющей N-концевой цистеиновый остаток, с химически активным сложным тиоэфиром на C-конце альбумин-связывающей области, в результате чего аргининдезимины и альбумин-связывающая область связаны ковалентной связью.

14. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, который сформирован путем введения в реакцию альбумин-связывающей области, имеющей N-концевой цистеиновый остаток, с химически активным сложным тиоэфиром на C-конце аргининдезимины, в результате чего аргининдезимины и альбумин-связывающая область связаны ковалентной связью.

15. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, который сформирован путем использования последовательностей SEQ ID NOS. 42 и 43 и введения в реакцию аргининдезимины, имеющей N-концевой цистеиновый остаток, с химически

активным сложным тиоэфиром на С-конце альбумин-связывающей области, в результате чего аргининдезиминая и альбумин-связывающая область связаны ковалентной связью.

16. Применение гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминая по любому из п.п. 1-15 с целью получения лекарственного средства для лечения рака у пациента, включающее введение пациенту клинически эффективного количества гибридного белка с целью снижения доступности циркулирующего аргинина.

17. Применение по п. 16, в котором раком является рак поджелудочной железы, лейкоз, рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легкого, молочной железы, печени, носоглотки, пищевода, предстательной железы, желудка или мозга.

18. Применение гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминая по любому из п.п. 1-15 с целью получения лекарственного средства для лечения аргинин-зависимых болезней у пациента, включающее введение пациенту клинически эффективного количества гибридного белка с целью снижения доступности циркулирующего аргинина.

19. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминая по п. 1 включающий конструирование гибридного гена, кодирующего гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезиминая, вставку гибридного гена в вектор, вставку вектора в организм-хозяин и синтез белка, содержащего гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезиминая по п. 1.

20. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминая по п. 19, дополнительно включающий очистку гибридного белка.

21. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминая по п. 20, в котором очистку осуществляют путем хроматографии.

22. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминая по п. 20, в котором осуществляют очистку растворимых фракций общих белков.

23. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминая по п. 20, в котором осуществляют очистку нерастворимых фракций общих белков.

24. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминая по п. 1 путем опосредованного ионного лигирования белков между альбумин-связывающей областью, альбумин-связывающим пептидом или альбумин-связывающим белком(-ами) и вторым участком, содержащим аргининдезиминаязу.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1 в фармацевтически приемлемом носителе.
26. Фармацевтическая композиция по п. 25, которая имеет рН от 5,5 до 9,5.
27. Фармацевтическая композиция по п. 25, которая имеет рН 7,4.
28. Фармацевтическая композиция по п. 25, которая имеет рН 6,5.

Формула изобретения (публикация WO 2014/138319 от 12.09.2014)

1. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы, имеющий первый участок, содержащий один или два компонента, выбранных из альбумин-связывающей области, альбумин-связывающего пептида или альбумин-связывающего белка(-ов), гибридизированный со вторым участком, содержащим аргининдезимиказу, в результате чего образуется гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы, который сохраняет активность аргининдезимиказы и способен связывать сывороточный альбумин.
2. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором два компонента являются одинаковыми.
3. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором два компонента являются различными.
4. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором альбумин-связывающей областью являются последовательности SEQ ID NO. 46, 47, 48, 49 или их активный участок.
5. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором альбумин-связывающим пептидом являются последовательности SEQ ID NO. 46, 47, 48, 49 или их активный участок.
6. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором альбумин-связывающим белком являются последовательности SEQ ID NO. 46, 47, 48, 49 или их активный участок.
7. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, в котором гибридизация включает использование одной или нескольких линкерных молекул.
8. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 7, в котором линкерная молекула содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 50, 51, 52, 53, или аминокислотную последовательность серин-глицин-серин (SGS).
9. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1, дополнительно содержащий по меньшей мере Poly-N или гистидиновую метку.

10. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, в котором гибридизация включает использование остающегося участка опосредованного интеина лигирования белков между первым участком и вторым участком.

11. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 10, в котором опосредованный интеином белок содержит связывающую хитин область.

12. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, в котором аргининдезимины выбрана из аргининдезимины, полученной из микроорганизмов *Mycoplasma*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Mycobacterium* или *Bacillus*.

13. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 12, в котором аргининдезимины получена из *Mycoplasma arginini*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas pleoglossicida*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* или их сочетания.

14. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, в котором аргининдезимины содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO. 36, 37, 38, 39, 40, 41 или 43.

15. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, который сформирован путем введения в реакцию аргининдезимины, имеющей N-концевой цистеиновый остаток, с химически активным сложным тиоэфиром на C-конце альбумин-связывающей области, в результате чего аргининдезимины и альбумин-связывающая область связаны ковалентной связью.

16. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, который сформирован путем введения в реакцию альбумин-связывающей области, имеющей N-концевой цистеиновый остаток, с химически активным сложным тиоэфиром на C-конце аргининдезимины, в результате чего аргининдезимины и альбумин-связывающая область связаны ковалентной связью.

17. Гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимины по п. 1, который сформирован путем использования последовательностей SEQ ID NOS. 42 и 43 и введения в реакцию аргининдезимины, имеющей N-концевой цистеиновый остаток, с химически

активным сложным тиозфиром на С-конце альбумин-связывающей области, в результате чего аргининдезиминая и альбумин-связывающая область связаны ковалентной связью.

18. Применение гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминой по любому из п.п. 1-17 с целью получения лекарственного средства для лечения рака у пациента, включающее введение пациенту клинически эффективного количества гибридного белка с целью снижения доступности циркулирующего аргинина.

19. Применение по п. 18, в котором раком является рак поджелудочной железы, лейкоз, рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легкого, молочной железы, печени, носоглотки, пищевода, предстательной железы, желудка или мозга.

20. Применение гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминой по любому из п.п. 1-17 с целью получения лекарственного средства для лечения аргинин-зависимых болезней у пациента, включающее введение пациенту клинически эффективного количества гибридного белка с целью снижения доступности циркулирующего аргинина.

21. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминой по п. 1, включающий конструирование гибридного гена, кодирующего гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезиминой, вставку гибридного гена в вектор, вставку вектора в организм-хозяин и синтез белка, содержащего гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезиминой по п. 1.

22. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминой по п. 21, дополнительно включающий очистку гибридного белка.

23. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминой по п. 22, в котором очистку осуществляют путем хроматографии.

24. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминой по п. 22, в котором осуществляют очистку растворимых фракций общих белков.

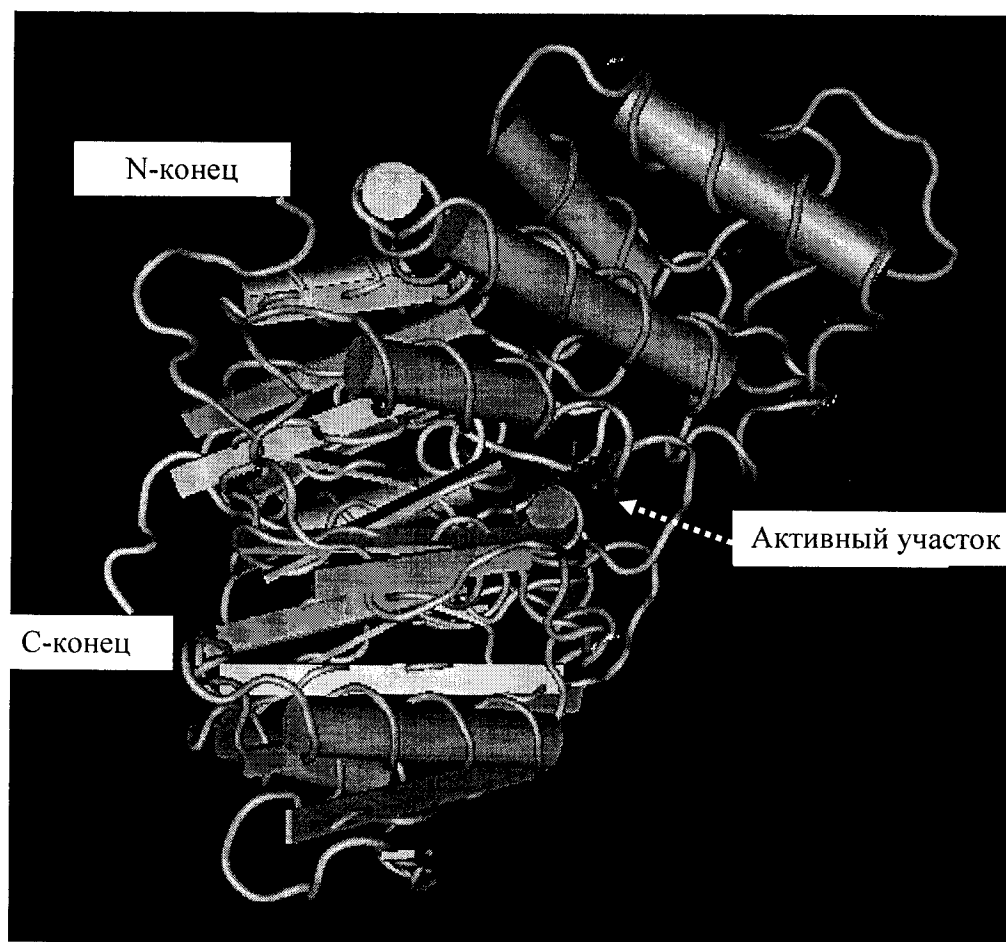
25. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминой по п. 22, в котором осуществляют очистку нерастворимых фракций общих белков.

26. Способ получения гибридного белка альбумин-связывающей аргининдезиминой по п. 1 путем опосредованного ионно-лигирования белков между альбумин-связывающей областью, альбумин-связывающим пептидом или альбумин-связывающим белком(-ами) и вторым участком, содержащим аргининдезиминозу.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок альбумин-связывающей аргининдезимиказы по п. 1 в фармацевтически приемлемом носителе.
28. Фармацевтическая композиция по п. 27, которая имеет рН от 5,5 до 9,5.
29. Фармацевтическая композиция по п. 27, которая имеет рН 7,4.
30. Фармацевтическая композиция по п. 27, которая имеет рН 6,5.

(A)

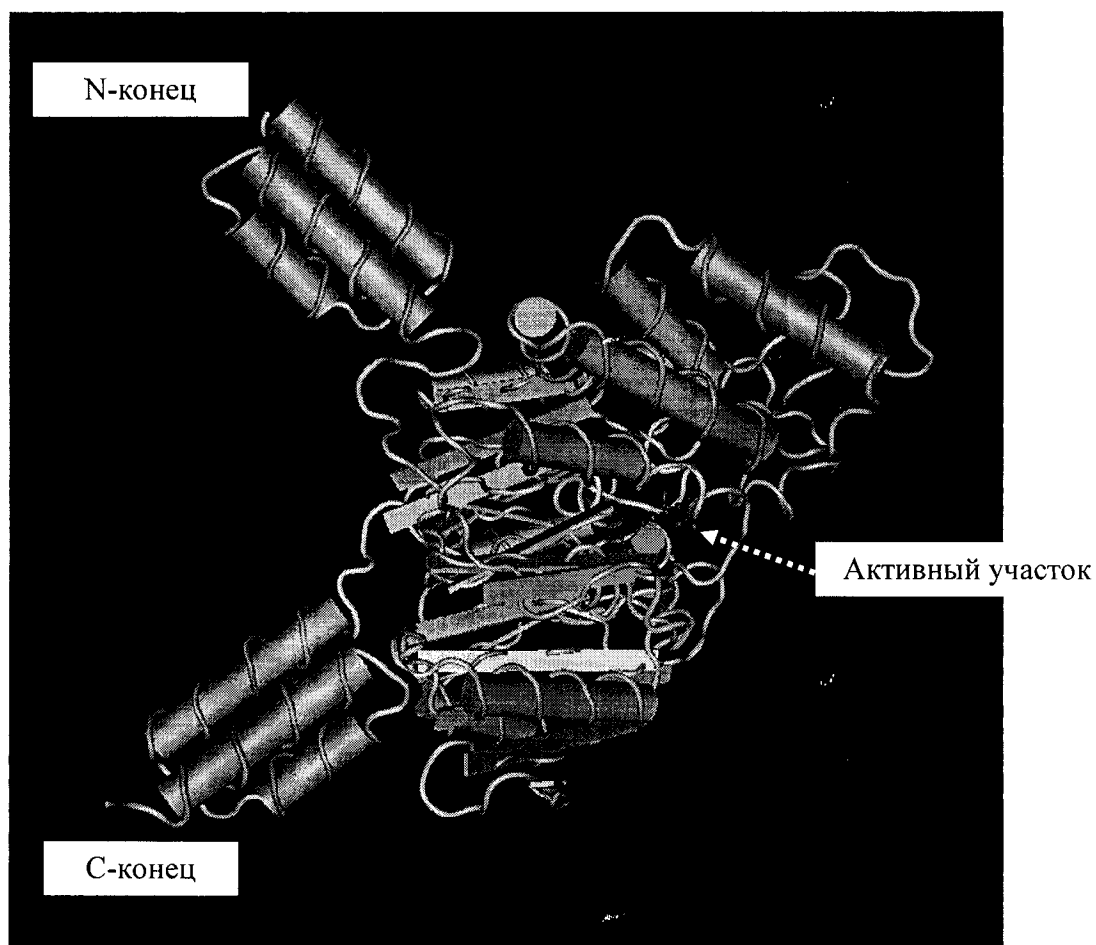
Нативная ADI



Фиг. 1А

(В)

Гибридный белок AAD с двумя ABD/ABD1



SEQ ID NO: 46

ABD без линкера:

LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 47

ABD с линкером:

AQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 48

ABD1 без линкера:

LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP

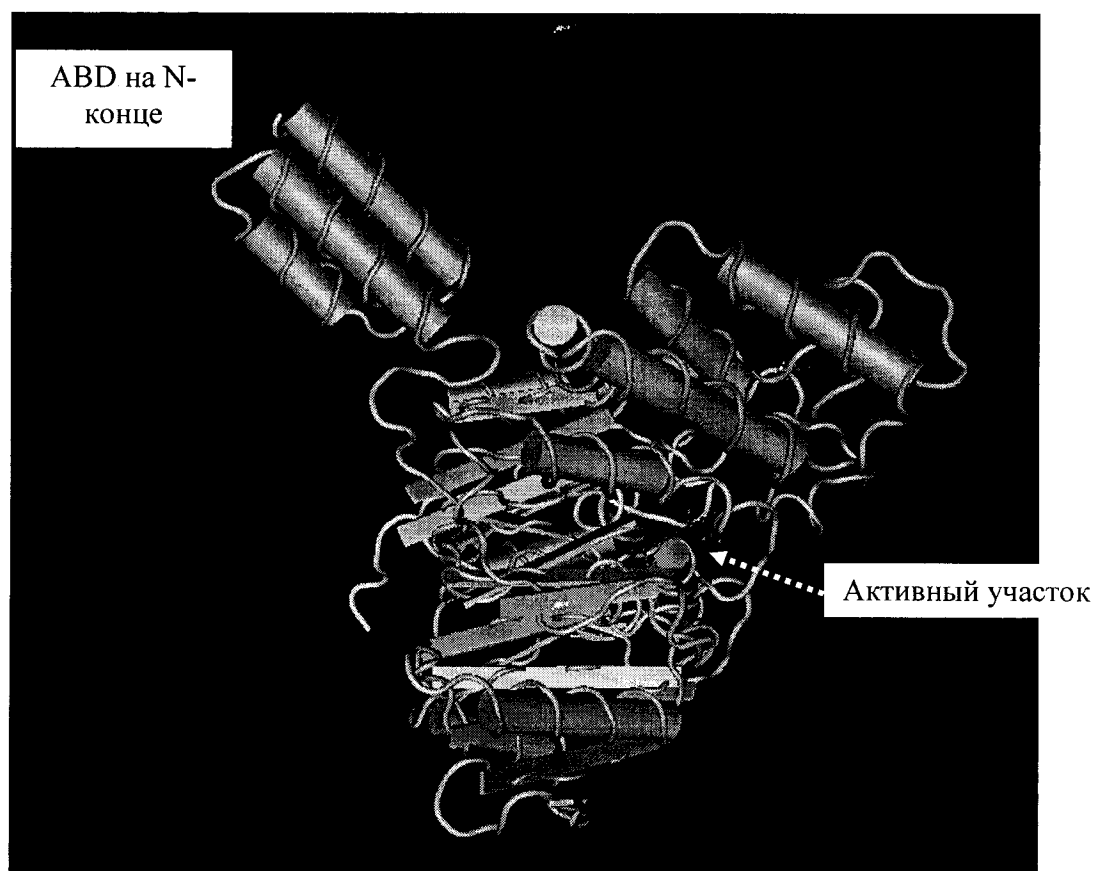
SEQ ID NO: 49

ABD1 с линкером:

GSHHHHHHANSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKLHILAALP

(C)

Гибридный белок AAD с одной ABD/ABD1 на N-конце



SEQ ID NO: 46

ABD без линкера:

LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 47

ABD с линкером :

AQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 48

ABD1 без линкера:

LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVKALHILAALP

SEQ ID NO: 49

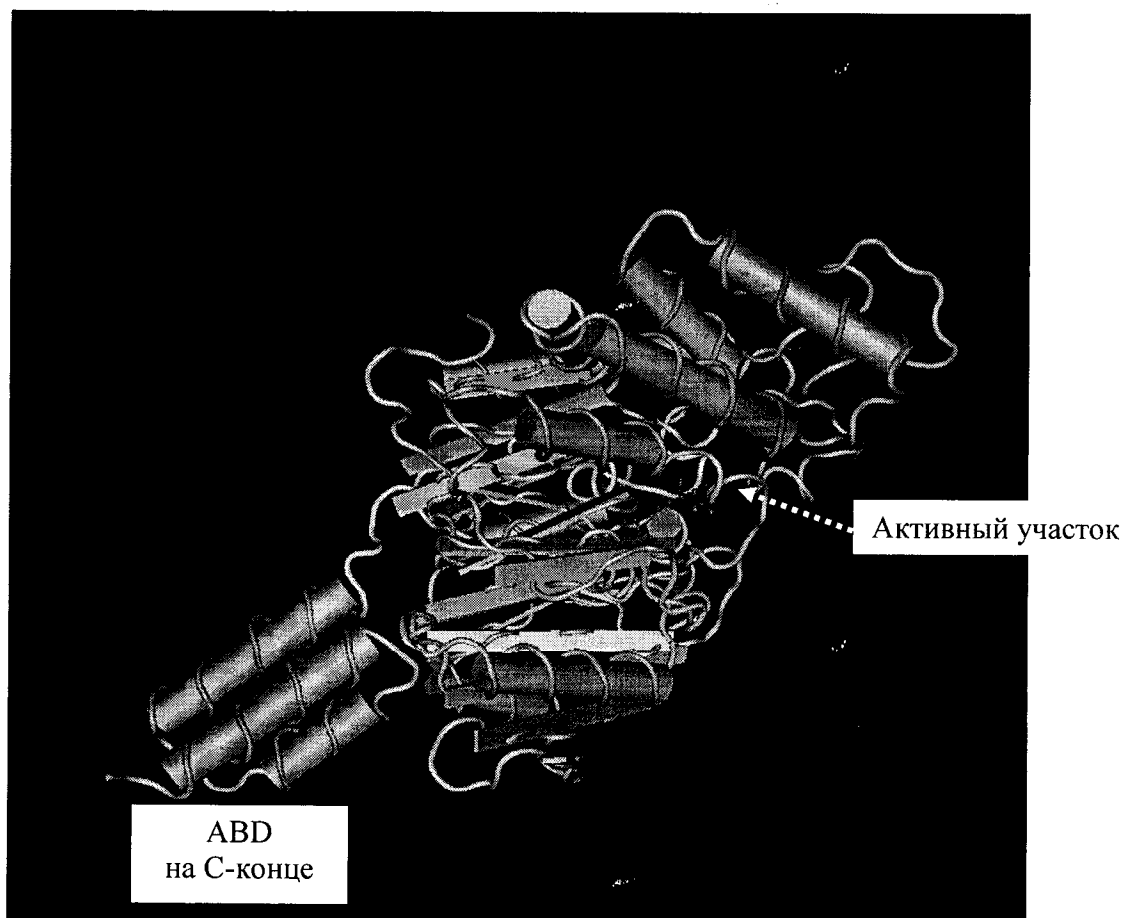
ABD1 с линкером:

GSHHHHHHANSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVKALHILAALP

Фиг. 1B (продолжение)

(D)

Гибридный белок AAD с одной ABD/ABD1
на C-конце



SEQ ID NO: 46

ABD без линкера:

AEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 47

ABD с линкером:

AQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

SEQ ID NO: 48

ABD1 без линкера:

LAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVKALHILAALP

SEQ ID NO: 49

ABD1 с линкером:

GSHHHHHHANSLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVKALHILAALP

<i>Mycoplasma arginini</i>	1	MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILES HDARKEHKQ	60
<i>Lactococcus lactis</i>	1	-----MNNGINVNSEIGKLKSVLLHRPGA EVENITPDTMKQLLFDDIPYLKIAQKEHDF	54
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	-----MKHP IHVTSEIGELQTVLLKRP GKEVENLTPDY LQQLFDDIPYLP I IQKEHDY	54
<i>Bacillus cereus</i>	1	----MIMTTP IHVYSEIGPLKTVMLKRP GRELENLTPEYLERLLFDDIPFLPAVQKEHDQ	56
		*. * * * * * : : : : * * : : * * : . . * * . * : * * .	
	61	FVAELKANDINVELIDLVAETYDLASQEA KDKLIEEFLEDSE PVLSEEHKV VVRNFLKA	120
	55	FAQTLRDN GAETVYIENLATEVFEKSSE -TKEEFLSHLLHEAGYRPGRTYDGL-TEYLT-	111
	55	FAQTLRNRGVEVLYLEKLA AEALVDK-K-LREEFVDRILKEGQADVNVAHQTL-KEYLL-	110
	57	FAETLKQQA EVLYLEKLTAEALDDA-L-VREQFIDELLTESKADINGAYDRL-KEFLL-	112
		*. * : . : : : * : * . : : : : * : . : : : * :	
	121	KKTSRELVEIMMAGITKYDL-----GIEADHELIVDMPNLYFTRDPFASVGNQ	169
	112	SMPTKDMVEKVYAGVRKNELDIKRTALSDMAGSDAENYFYL NPLNAYFTRDPQASMGVG	171
	111	SFSNEELIQKIMGGVRKNEIETSKTHLYE-LMEDHYFPYLDMPNLYFTRDPAASVGDG	169
	113	TFDADSMVEQVMGIRKNELEREK KSHLHE-LMEDHYFPYLDMPNLYFTRDPA AAI GSG	171
		. : : : : * : * : : : : : : : : * * * * * * : : * *	
	170	VTIHYMRYKVRQRETLSRFVFSNHPKLIN--TPWYYDPSLKSIEGGDVFIYNNDTLVV	227
	172	MTINKMTFFARQPE SLITEYVMANHPRFK--TPIWRDRNHTRIEGGDELILNKTIVAI	229
	170	LTINKMREPARRRESLFMEYIIKYHPRFAKHNVPIWLD RDKYKFPIEGGDELILNEETIAI	229
	172	LTINKMKEPARRRESLFMYIINHHPRFKGHEIPVWLD RDKYKFPIEGGDELVLNEETVAI	231
		: * . * : : * : * : : : : * : * : . . * * * * : : * : * : :	
	228	GVSERTDLQTVTLLAKNIVANKECEF KKRIVAINVPKWTNLMHLDTWL TMLDKDKFLYSPI	287
	230	GVSERTSSKTIQN LAKELFANPLSTFDTVLAVEI PHNHAMMHLDTVFTMINHDQFTVFG	289
	230	GVSARTSAKAIERLAKNLF SRQ-NKIKKVLAIEI PKCRAFMHLDTVFTMV DYDKFTIHPA	288
	232	GVSERTTAQAIERLVRNLFQRQ-SRIRRVLAVEI PKSRAFMHLDTVFTMVDRDQFTIHPA	290
		* * * * : : : * : : . : : : : : : : : * * * * : * : * * *	
	288	ANDVFKFWDYDLVNGGAEPQP--VENGLPLEGLLQSIINKKPVLIPIAGEGASQMEIERE	345
	290	IMDGAGNINVFILRPGQDG-EVEIEHLTDLKAALKKVLNLSEL DL-IECGAGDP I AAPRE	347
	289	IQSPKGNMNIYILEKGAD EETLKITHRTSLMEALKEVLDLSELVL-IPCGGGDV I ASARE	347
	291	IQGPEGDMRIFVLERGKTAD EIHTEEHNLP EVLKRTLG LSDVNL-IFCGGGDE I ASARE	349
		: : . * . * * : : : : * . . . : * :	
	346	THFDGTNYLAIRPGVVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSMPLSR	405
	348	QWNDGSNTLAIAPGEIVTYDRNYVTVELLKEHG I KVHEILSSELGRGRGGARCMSQPLWR	407
	348	QWNDGSNTLAIAPGVVVTYDRNYVSNTLLREHG I EVIEVLSSEL SRGRGGPRC MSMP I VR	407
	350	QWNDGSNTLAIAPGVVVTYDRNYISNECIREQGIKVIEIPSGELSRGRGGPRC MSMP I VR	409
		* * : * * * * : : * : * : : * . * * * . . : . * * * * * : * :	
	406	KDVKN	410
	408	EDL--	410
	408	KDI--	410
	410	EDVK-	413
		: * :	

Фиг. 2

(A) SEQ ID NO: 36

ADI-linker-ABD

MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLEFSAILESHDARKEHKQ
FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLSEEHKVVRNFLKA
KKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPLYFTRDPFASVGNGVTIHYMRYKVR
QRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLSIEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSPIANDVFKFWDYDLV
NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLPIPIAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGV
VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCSMPLSRKDVKGGSHHHHHHHAN
SLAEAKVLANRELDKYGVSDFYKRLINKAKTVEGVEALKHLAALP

(ABD 1: высокоаффинная альбумин-связывающая область; линкер подчеркнут)

Линкер 1 (SEQ ID NO: 50): GSHHHHHHANS

(B) SEQ ID NO: 37

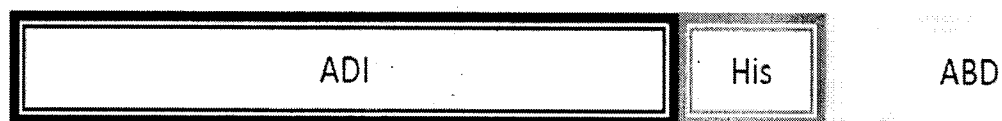
ADI-linker-ABD

MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLEFSAILESHDARKEHKQ
FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLSEEHKVVRNFLKA
KKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPLYFTRDPFASVGNGVTIHYMRYKVR
QRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLSIEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSPIANDVFKFWDYDLV
NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLPIPIAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGV
VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCSMPLSRKDVKWAQHDEAVDAN
SLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

(ABD: альбумин-связывающая область; линкер подчеркнут))

Линкер 2 (SEQ ID NO: 51): AQHDEAVDANS

(C) SEQ ID NO: 38



MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLEFSAILESHDARKEHKQ
FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLSEEHKVVVRNFLKA
KKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPLNYFTRDPFASVGNGVTIHYMRYKVR
QRETLSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLSIEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSPIANDVFKFWDYDLV
NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLIPIAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGV
VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSMPLSRKDVKWHHHHHHAQH
EAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP

(ABD: альбумин-связывающая область; линкер подчеркнут)

(D) SEQ ID NO: 39



MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLEFSAILESHDARKEHKQ
FVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLSEEHKVVVRNFLKA
KKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPLNYFTRDPFASVGNGVTIHYMRYKVR
QRETLSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLSIEGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTL
LAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSPIANDVFKFWDYDLV
NGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLIPIAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGV
VIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSMPLSRKDVKWAQHDEAVDAN
SLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALPHHHHHH

(ABD: альбумин-связывающая область; линкер подчеркнут)

Фиг. 3 (продолжение)

(E) SEQ ID NO: 40



MHHHHHHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAAL
PSGSNNNNNNGSGGSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELCSA
I L E S H D A R K E H K Q F V A E L K A N D I N V V E L I D L V A E T Y D L A S Q E A K D K L I E E F L E D S E P V L S
E E H K V V R N F L K A K K T S R E L V E I M M A G I T K Y D L G I E A D H E L I V D P M P N L Y F T R D P F A S V G
N G V T I H Y M R Y K V R Q R E T L F S R F V F S N H P K L I N T P W Y Y D P S L K L S I A G G D V F I Y N N D T L V V
G V S E R T D L Q T V T L L A K N I V A N K E S E F K R I V A I N V P K W T N L M H L D T W L T M L D K D K F L Y S P I
A N D V F K F W D Y D L V N G G A E P Q P V E N G L P L E G L L Q S I I N K K P V L I P I A G E G A S Q M E I E R E T H
F D G T N Y L A I R P G V V I G Y S R N E K T N A A L E A A G I K V L P F H G N Q L S L G M G N A R C M S M P L S R K D
V K W

(ABD: альбумин-связывающая область; линкер между His и ABD подчеркнут сплошной линией, а линкер между Poly-N и ADI подчеркнут пунктирной линией)

Линкер 3 (SEQ ID NO: 52): DEAVDANSЛинкер4: SGS; Линкер 5 (SEQ ID NO: 53): GSGG

Фиг. 3 (продолжение)

(F) SEQ ID NO: 41



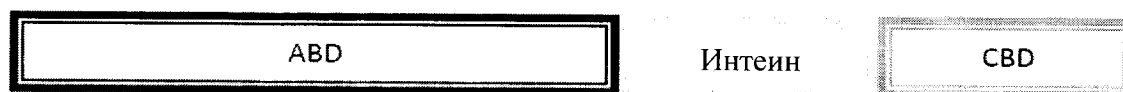
MG HHHHDEAVDANS LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP
SGSNNNNNNGSGGKHPIHVTSEIGELQTVLLKRPGEVENLTPDYLQQLLFDDIPYLPPIQK
EHDYFAQTLRNRGVEVLYLEKLAAEALVDKKLREEFVDRIKKEGQADVNVAHQTLKEYLLSF
SNEELIQKIMETGGVRKNEIETSKKTHLYELMETEDHYPFYLDPMETPNLYFTRDPAASVGD
GLTINKMETREPARRRESLFMETEYIIKYHPRFEKHNVPiWLD RDYKFPIEGGDELILNEET
IAIGVSARTSAKAIERLAKNLF SRQNIKKVLAIEIPKCR AFMETHLDTVFTMETVDYDKFT
IHPAIQGPKGNMETNIYILEKGSDEETLKITHRTSLMETEALKEVLGLSELVLI PCGGGDVI
ASAREQWNDGSNTLAIAPGVVVTYDRNYVSNTLLREHGIEVIEVLSS ELSRGRGGPRCMETS
METPIVRKDI

(ABD: альбумин-связывающая область; линкер между His и ABD подчеркнут сплошной линией, а линкер между Poly-N и bcADI подчеркнут пунктирной линией)

Линкер 3 (SEQ ID NO: 52): DEAVDANS; Линкер 4: SGS; Линкер 5 (SEQ ID NO: 53): GSGG

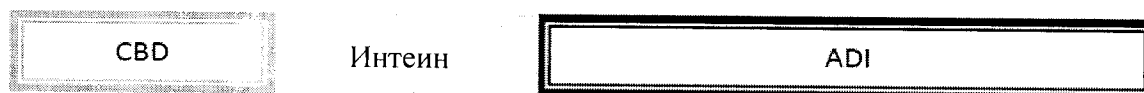
Фиг. 3 (продолжение)

(A) SEQ ID NO: 42



MAQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAAALPEF
LEGSSCITGDALVALPEGESVRIADIVPGARPNSDNAIDLKVLDRHGNPVLADRLFHSGE
HPVYTVRTVEGLRVTGTANHPLLCLVDVAGVPTLLWKLIDEIKPGDYAVIQRSAFSVDCA
GFARGKPEFAPTTYTVGVPGLVRFLEAHHRDPDAQAIADELTDGRFYAKVASVTDAGVQ
PVYSLRVDTADHAFITNGEVSHTATGLTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKT
YKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQGDPTITITK

(B) SEQ ID NO: 43

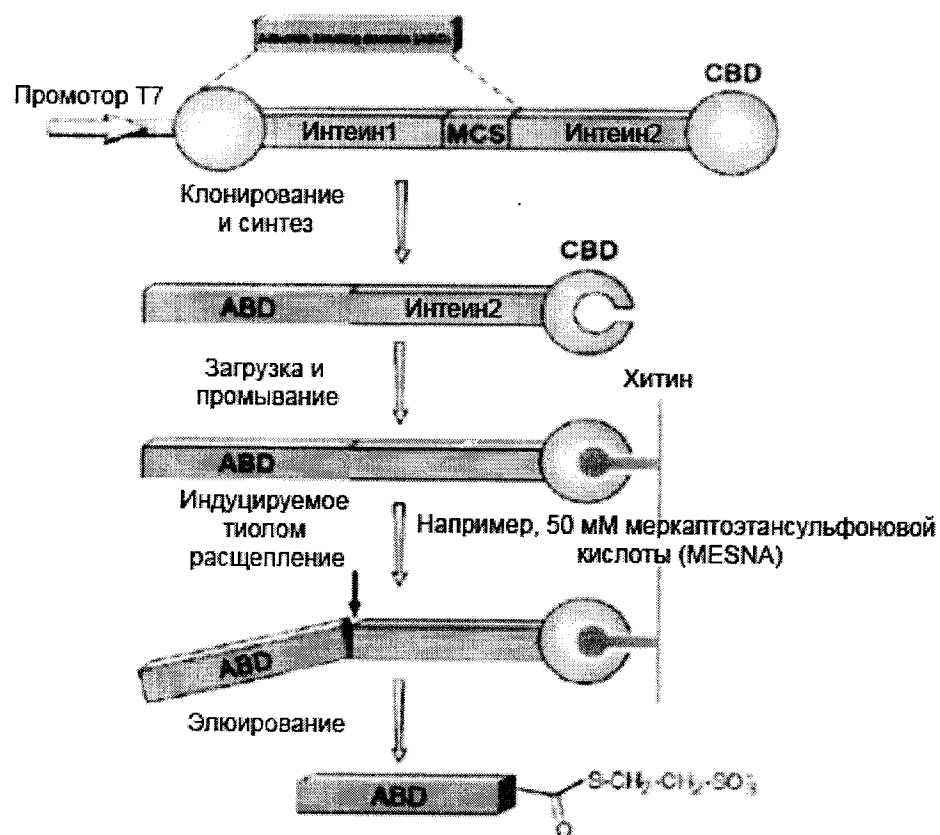


MKIEEGKLTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQN
NGNNGLELRESGAISGDSLISLASTGKRVS IKDLLDEKDFEIWAIN EQTMKLES AKVSRV
FCTGKKLVYILKTRLGRTIKATANHRFLTIDGWKRDELDELKEHIALPRKLESSSLQLSP
EIEKLSQSDIYWDSIVSITETGVEEVFDLTPGPHNFVANDIIVHNC SVFDSKFKGIHVY
SEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDEL CFS AILESHDARKEHKQFVAELKANDINVVE
LIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPV LSEEHKVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAG
ITKYDLGIEADHELIVDPM PNLYFTRDPFASVGNGVTIHYMRYKVRQRET LFSRFVFSNH
PKLINTPWYYDPSLKLSIAGGDVFIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKESEFK
RIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLP
LEGLLQSIINKKPVLIPIAGEGASQMEIERETHFDGTNYLAIRPGVVIGYSRNEKTNAAL
EAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCM SMPLSRKDVKW

Фиг. 4

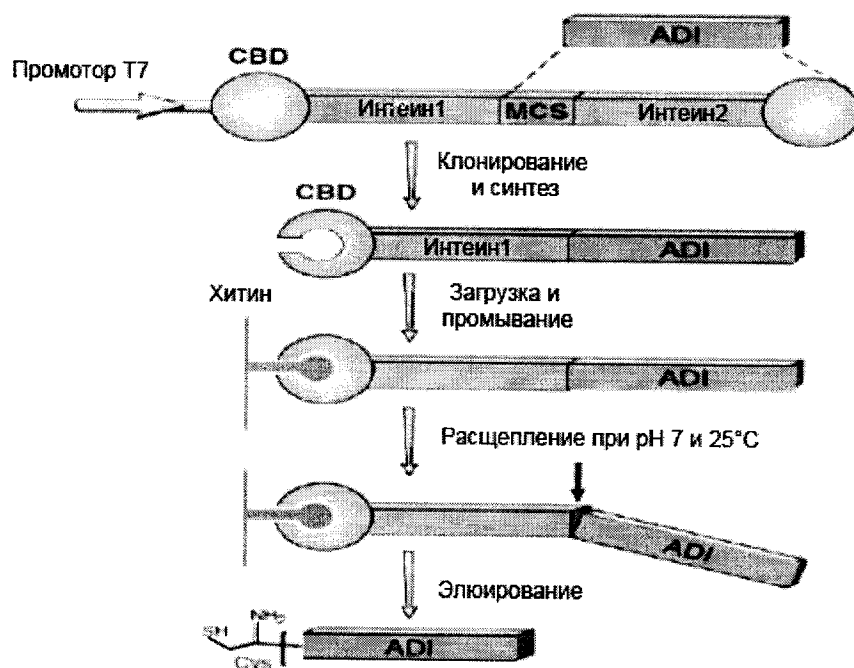
(C)

С-концевая
гибридизация



(D)

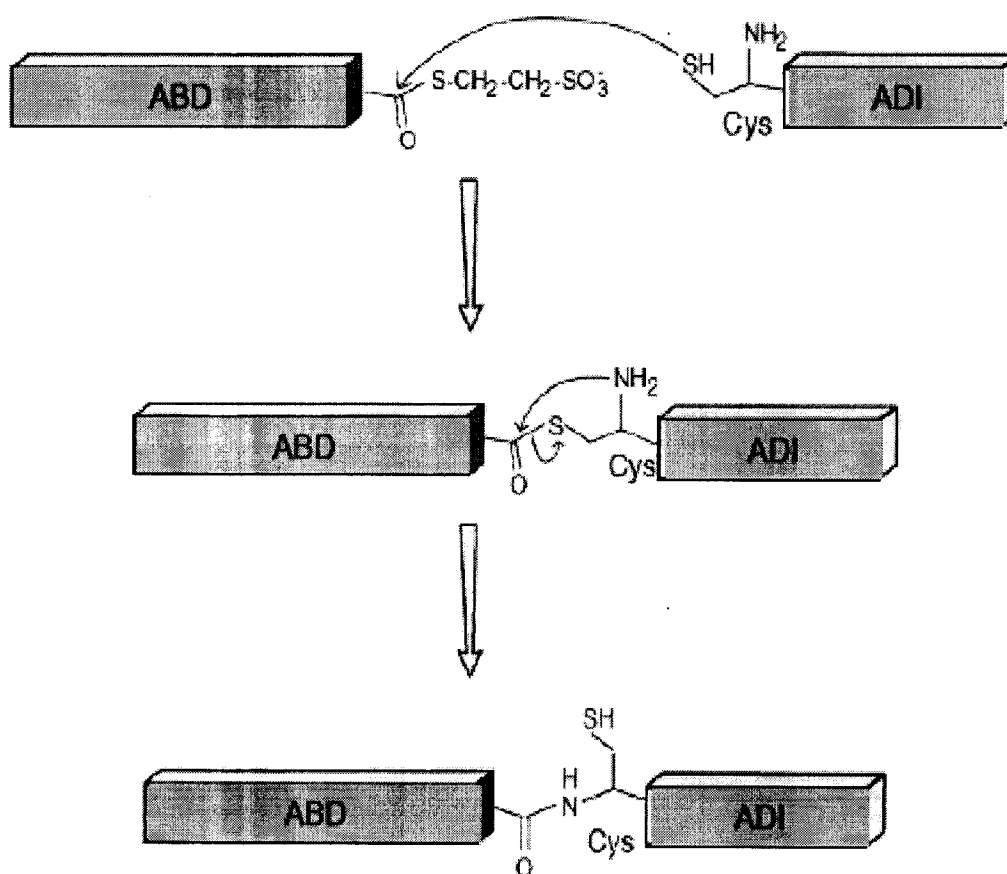
N-концевая
гибридизация



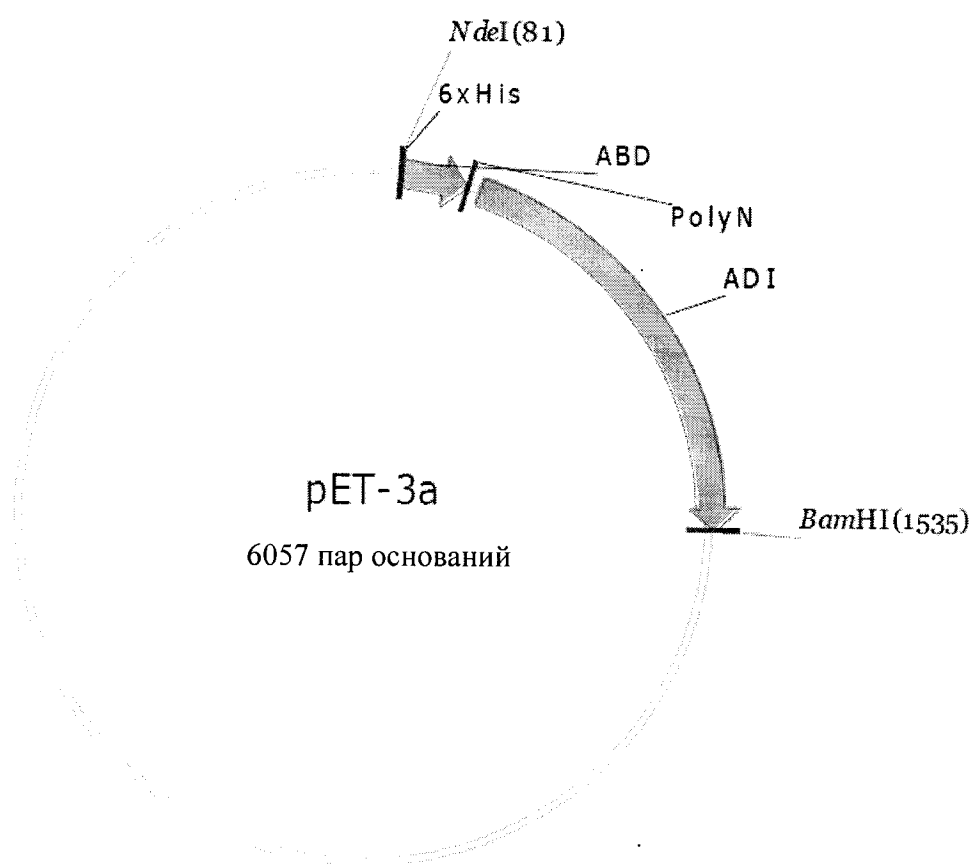
Фиг. 4 (продолжение)

(E)

Опосредованное интеином лигирование белков

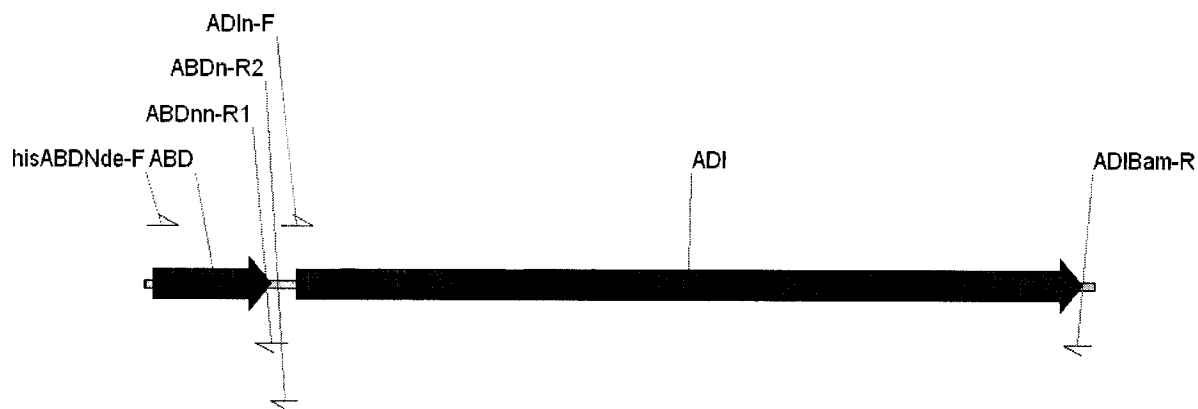


Фиг. 4 (продолжение)



Фиг. 5

(A) Генетическая карта



(B) Нуклеотидная последовательность His-ABD-PolyN-ADI (1484 пары оснований)

(SEQ ID NO: 44)

5' -

```

ATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCT
TAGCTAACAGAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGAATATTACAAGAACCTAATCAACAATGC
CAAACTGTTGAAGGTGTAAGCACTGATAGATGAAATTTTAGCTGCATTACCTTCGGGTAGT
AACACAATAATAACAATGGTAGCGGCGGTTCTGTATTTGACAGTAAATTTAAAGGAATTCACG
TTTATTCAGAAATTGGTGAATTAGAATCAGTTCTAGTTCACGAACCAGGACGCGAAATTGACTA
TATTACACCAGCTAGACTAGATGAATTATGCTTCTCAGCTATCTTAGAAAGCCACGATGCTAGA
AAAGAACACAAACAATTCGTAGCAGAATTAAAAGCAAACGACATCAATGTTGTTGAATTAATTG
ATTTAGTTGCTGAAACATATGATTTAGCATCACAAGAAGCTAAAGACAAATTAATCGAAGAATT
TTTAGAAGACTCAGAACCAGTTCTATCAGAAGAACACAAAGTAGTTGTAAGAACTTCTTAAAA
GCTAAAAAAACATCAAGAGAATTAGTAGAAATCATGATGGCAGGGATCACAATAACGATTTAG
GTATCGAAGCAGATCACGAATTAATCGTTGACCCAATGCCAAACCTATACTTCACACGTGACCC
ATTTGCATCAGTAGGTAATGGTGTAAACAATCCACTACATGCGTTACAAAGTTAGACAACGTGAA
ACATTATTCTCAAGATTTTGTATTCTCAAATCACCCCTAACTAATTAACACTCCATGGTACTACG
ACCCTTCACTAAAATTATCAATCGCAGGTGGGGACGTATTTATCTACAACAATGACACATTAGT
AGTTGGTGTCTTCTGAAAGAACTGACTTACAAACAGTTACTTTATTAGCTAAAAACATTGTTGCT
AATAAAGAATCTGAATTCAAACGTATTGTTGCAATTAACGTTCCAAAATGGACAACTTAATGC
ACTTAGACACATGGCTAACAATGTTAGACAAGGACAAATTCCTATACTCACCAATCGCTAATGA
CGTATTTAAATTCTGGGATTATGACTTAGTAAACGGTGGAGCAGAACCACAACCAGTTGAAAAC
GGATTACCTCTAGAAGGATTATTACAATCAATCATTAACAAAAAACAGTTTAAATTCSTATCG
CAGGTGAAGGTGCTTCACAAATGGAAATCGAAAGAGAAACACACTTCGATGGTACAACTACTT
AGCAATTAGACCAGGTGTTGTAATTGGTTACTCACGTAACGAAAAAACAAACGCTGCTCTAGAA
GCTGCAGGCATTAAAGTTCTTCCATTCCACGGTAACCAATTATCATTAGGTATGGGTAACGCTC
GTTGTATGTCAATGCSTTTATCACGTAAAGATGTTAAGTGTTAA-3'

```

Фиг. 6

(C) Аминокислотная последовательность His-ABD-PolyN-ADI:

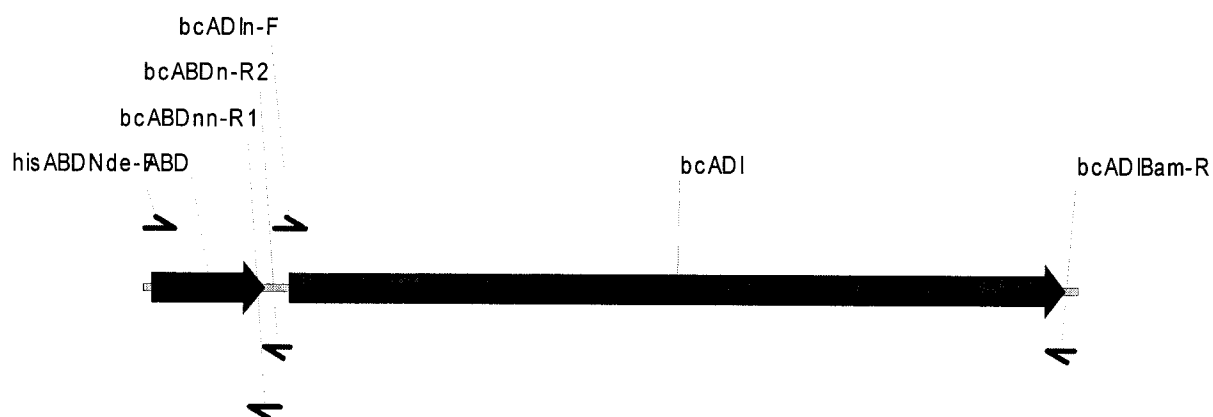
(SEQ ID NO: 40)

MHHHHHHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAA
LPSGSNNNNNNGSGGSVFDSKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELCF
SAILESHDARKEHKQFVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPV
SEEHKVVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASV
GNGVTIHYMRYKVRQRETLSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLSIAGGDVFIYNNDTL
VVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKESSEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLY
SPIANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKKPVLPIAGEGASQMEIER
ETHFDGTNYLAIRPGVVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLGMGNARCMSMP
LSRKDVKW

(PolyN с линкером: SGSNNNNNNGSGG)

Фиг. 6 (продолжение)

(A) Генетическая карта



(B) Нуклеотидная последовательность His-ABD-PolyN-bcADI (1512 пар оснований):

(SEQ ID NO: 45)

5' –

```

ATGGGTCATCATCACCATCACCATGATGAAGCCGTGGATGCGAACAGCTTAGCTGAAGCTAAAG
TCTTAGCTAACAGAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAACCTAATCAACAA
TGCCAAAACCTGTTGAAGGTGTAAAAGCACTGATAGATGAAATTTTAGCTGCATTACCTTCGGGT
AGTAACAACAATAATAACAATGGTAGCGGCGGTAAACATCCGATACATGTTACTTCAGAAATTG
GGGAATTACAAACGGTTTTATTAAACGACCGGGTAAAGAAGTGGAACCTTGACGCCAGATTA
TTTGCAGCAATTATTATTTGACGATATTCCATACCTACCAATTATTCAAAAAGAGCATGATTAT
TTTGCACAAACGTTACGCAATCGGGGTGTTGAAGTCTTTATTTAGAAAACTAGCCGCTGAGG
CGTTAGTAGATAAAAACTTCGAGAAGAATTTGTTGATCGTATTTTAAAGAAGGACAGGCCGA
CGTAAATGTTGCACATCAAACCTTAAAGAATATTTACTTTTCCTTTTCAAATGAAGAATTAATT
CAAAAAATTATGGGCGGTGTACGGAAAAACGAAATTGAAACAAGTAAGAAGACACATTTATATG
AATTAATGGAAGATCATTATCCGTTTTACTTAGATCCAATGCCTAATTTATATTTTACTCGTGA
TCCAGCAGCTAGCGTGGGCGATGGCTTAACGATAAATAAGATGAGAGAACCAGCGCGTAGACGT
GAATCATTATTTCATGGAGTACATCATTAATATCATCCAAGATTTGAAAAACATAATGTACCAA
TCTGGTTAGATCGTGATTATAAATTTCCAATTGAAGGTGGCGACGAGCTAATTTTAAATGAAGA
AACAAATTGCGATTGGAGTATCTGCTCGTACTTCAGCTAAAGCAATTGAACGTTTAGCAAAAAAT
CTCTTTAGCCGACAAAATAAAATTAAGAAAGTGTTAGCAATAGAAATTCAAAATGCCGAGCAT
TTATGCATTTAGATACAGTATTTACAATGGTTGATTATGATAAGTTTACAATTCACCCAGCTAT
TCAAGGGCCAAAAGGGAATATGAATATTTATATTTTAGAAAAAGGATCAGATGAGGAACTCTT
AAAATTACACATCGTACTTCTTTAATGGAAGCATTAAAGAGGTATTAGGCTTAAGTGAATTAG
TTCTTATTCCATGTGGAGGAGGAGATGTAATTGCTTCTGCTCGTGAACAATGGAATGATGGCTC
GAACACATTAGCAATCGCGCCAGGTGTAGTTGTTACATATGATCGCAACTATGTATCCAATACG
TTATTACGGGAACACGGTATAGAAGTGATTGAGGTGCTAAGTTCAGAAATTATCTCGTGGTCTG
GGGTCCACGTTGCATGAGTATGCCAATTGTTTCGTAAAGATATTTAA-3'

```

Фиг. 7

(C) Аминокислотная последовательность His-ABD-PolyN-bcADI:

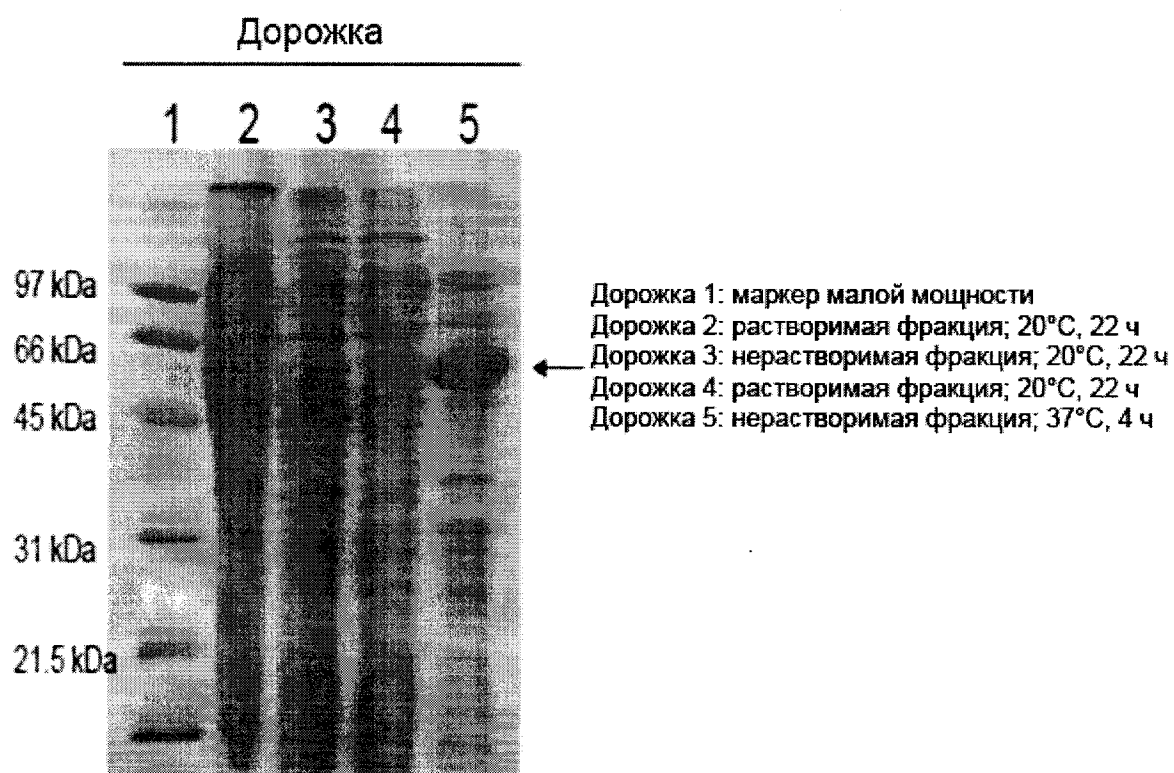
(SEQ ID NO: 41)

MGHHHHHHHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILA
ALPSGSNNNNNNGSGGKHPIHVTSEIGELQTVLLKRPGKEVENLTPDYLQQLLFDDIPY
LPPIQKEHDYFAQTLRNRGVEVLYLEKLAAEALVDKKLREEFVDRILKEGQADVNVAHQ
TLKEYLLSFSNEELIQKIMETGGVRKNEIETSKKTHLYELMETEDHYPFYLDPMETPNLY
FTRDPAASVGDGLTINKMETREPARRRESLFMETEYIIKYHPRFEKHNVPiWLDRDYKF
PIEGGDELILNEETIAIGVSARTSAKAIERLAKNLF SRQNKIKKVLAI EIPKCRAFMETHLD
TVFTMETVDYDKFTIHPAIQGPKGNMETNIYILEKGSDEETLKITHRTSLMETEALKEVL
GLSELVLIPCGGGDVIASAREQWNDGSNTLAIAPGVVVITYDRNYVSNTLLREHGIEVIE
VLSEL SRGRGGPRCMETSMETPIVRKDI

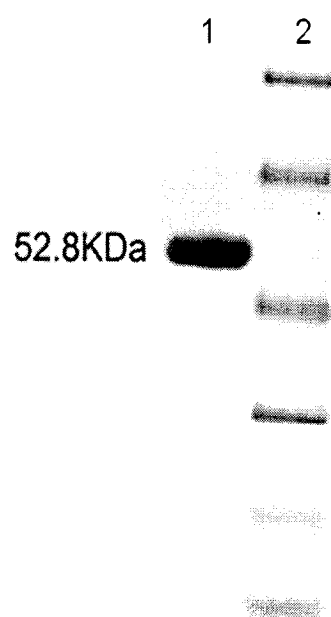
(PolyN с линкером: SGSNNNNNNGSGG)

Фиг. 7 (продолжение)

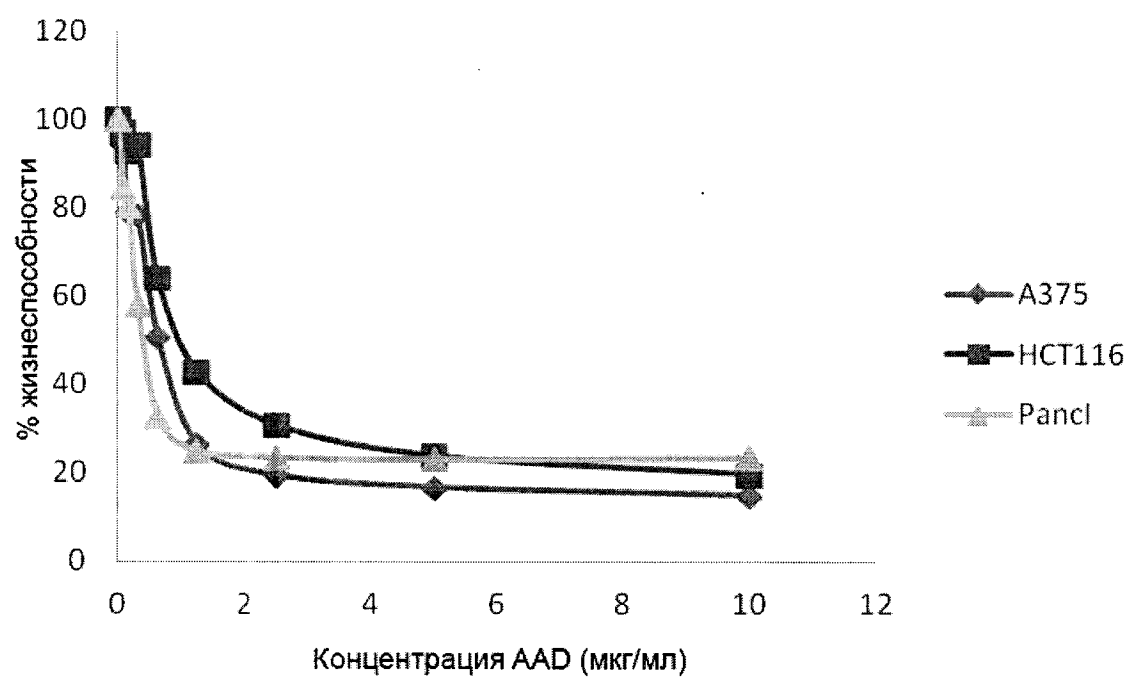
(A)



(B)

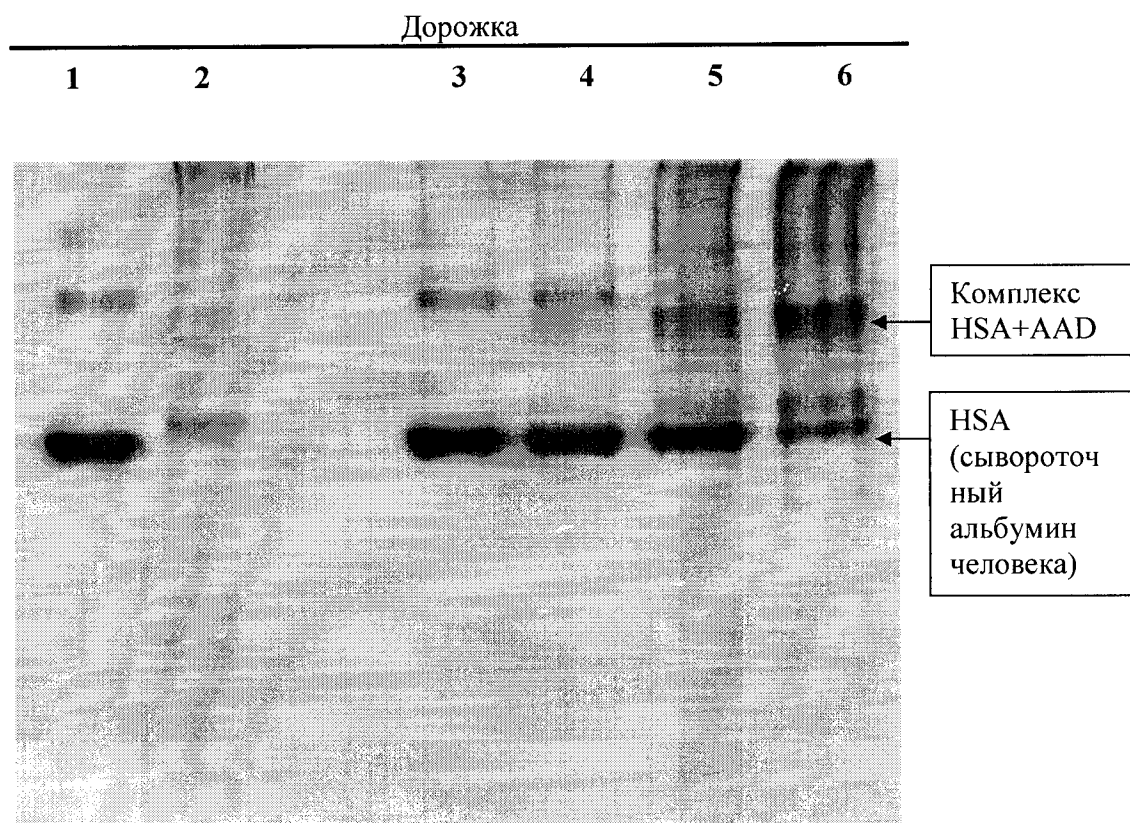


Фиг. 8



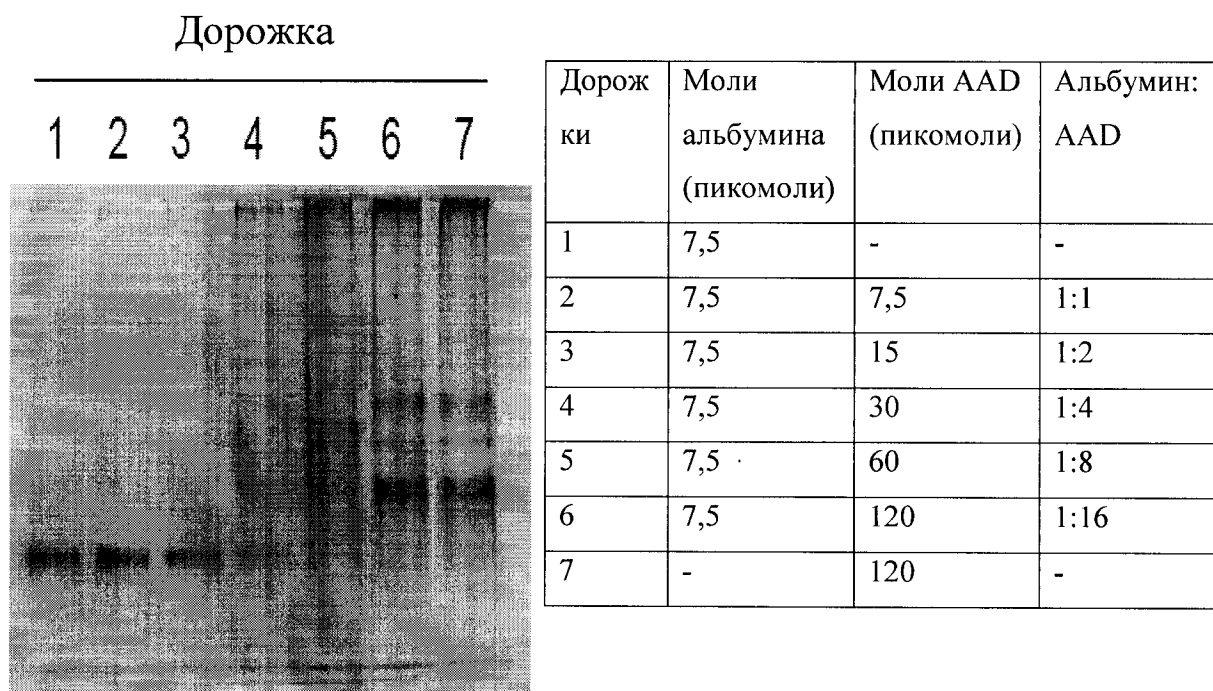
Фиг. 9

(A)



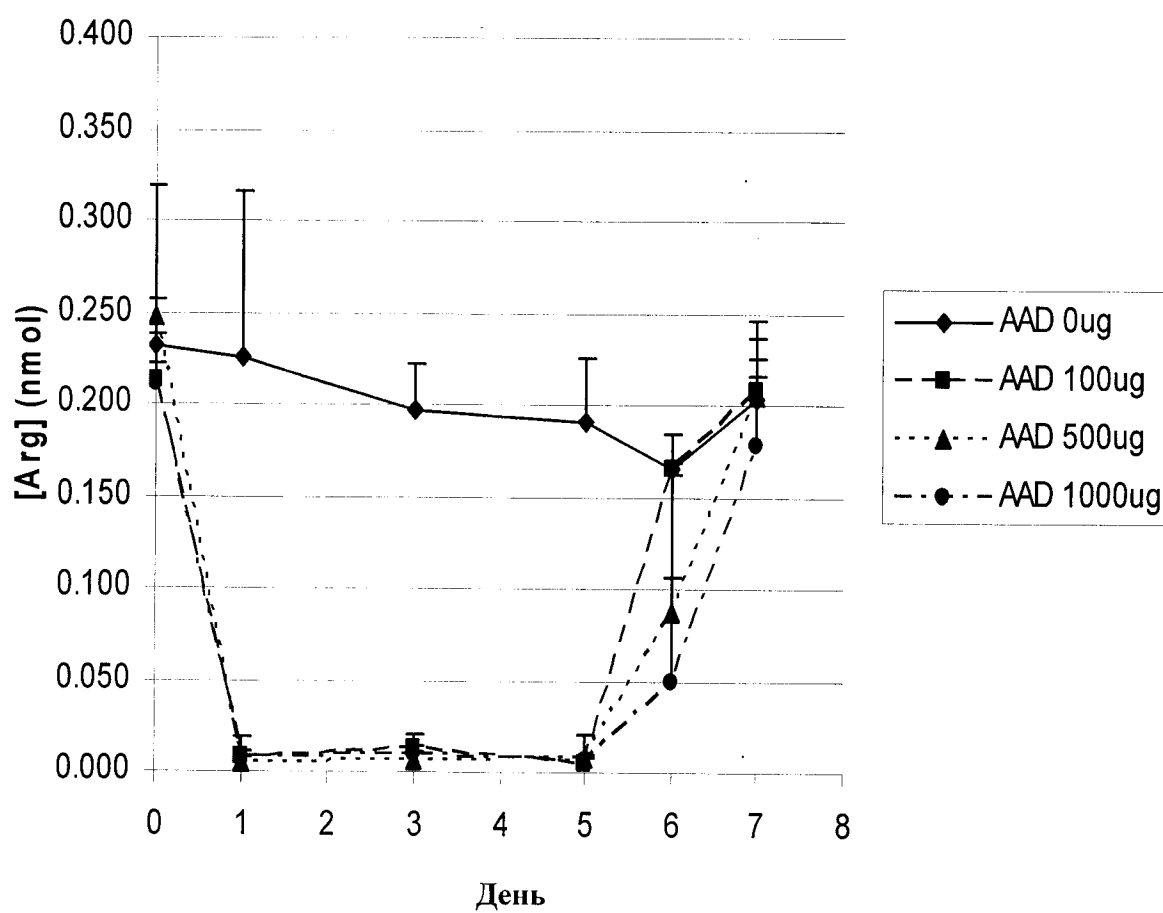
Фиг. 10

(В)



Фиг. 10 (продолжение)

Влияние AAD на содержание аргинина в плазме мышей (n=3)



Фиг. 11