

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037276**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.03.03**

**(51)** Int. Cl. **C12N 9/36** (2006.01)  
**C12N 9/52** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201270774**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2011.04.27**

---

**(54) СПОСОБЫ УСТРАНЕНИЯ ИЛИ УМЕНЬШЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОПЛЕНКИ**

---

**(31)** **10 161 170.5**

**(32)** **2010.04.27**

**(33)** **EP**

**(43)** **2013.04.30**

**(86)** **PCT/EP2011/056657**

**(87)** **WO 2011/134998 2011.11.03**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЛИСАНДО АГ (LI)**

**(72)** Изобретатель:  
**Миллер Стефан (DE)**

**(74)** Представитель:  
**Гончаров В.В. (BY)**

**(56)** **WO-A2-2010023207**

DONOVAN D. M. ET AL.: "Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 72, no. 4, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 2988-2996, XP002582772, ISSN: 0099-2240, DOI: DOI:10.1128/AEM.72.4.2988-2996.2006, abstract

ARIMA H. ET AL.: "Bactericidal action of lysozymes attached with various sizes of hydrophobic peptides to the C-terminal using genetic modification", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 415, no. 1, 22 September 1997 (1997-09-22), pages 114-118, XP004261147, ISSN: 0014-5793, DOI: DOI:10.1016/S0014-5793(97)01071-5, "Discussion"

LOPEZ R. ET AL.: "Enzymes for anti-infective therapy: phage lysins", DRUG DISCOVERY TODAY: THERAPEUTIC STRATEGIES, ELSEVIER, vol. 1, no. 4, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 469-474, XP004694307, ISSN: 1740-6773, DOI: DOI:10.1016/J.DDSTR.2004.09.002

KUMAR C. GANESH ET AL.: "Significance of microbial biofilms in food industry: A review", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, vol. 42, no. 1-2, 30 June 1998 (1998-06-30), pages 9-27, XP002647868, ISSN: 0168-1605, page 19, left-hand column, paragraph 1  
**WO-A2-2010112848**

---

**(57)** Заявленное изобретение относится к способам устранения или уменьшения бактериальной биопленки на поверхности объекта с использованием эндолизина или бактериоцина, которые слиты с пептидом, обладающим активностью, разрушающей мембрану или липополисахарид (ЛПС) бактерий. Изобретение также относится к соответствующему применению указанного антимикробного слитого белка, а также его применению для производства лекарственного препарата для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными и/или грамположительными бактериями, образующими бактериальные биопленки.

---

**B1**

**037276**

**037276 B1**

Заявленное изобретение относится к способам устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок с использованием слитого белка, содержащего эндолизин, аутолизин или бактериоцин, с которым слит пептид, обладающий активностью, разрушающей мембрану или липополисахарид (ЛПС). Помимо этого, заявленное изобретение относится к слитым белкам, применяемым в качестве лекарственного препарата, в частности, для лечения или профилактики инфекций, вызванных грамотрицательными и/или грамположительными бактериями, связанных с образованием бактериальных биопленок, в качестве диагностического средства, дезинфектанта или компонента косметического препарата. Заявленное изобретение также относится к устранению, уменьшению или предотвращению заражения грамотрицательными и/или грамположительными бактериями, связанного с образованием бактериальных биопленок, пищевых продуктов, оборудования и помещений на предприятиях пищевой промышленности, поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами, медицинского оборудования, поверхностей в медицинских стационарах и хирургических блоках. Более того, заявленное изобретение относится к применению вышеупомянутого слитого белка в качестве диагностического средства в медицинской, пищевой отраслях промышленности и охране окружающей среды, связанных с образованием бактериальных биопленок.

Эндолизины представляют собой пептидогликангидролазы, кодируемые бактериофагами (или бактериальными вирусами). Они синтезируются во время экспрессии "поздних" генов в литическом цикле мультпликации фагов и опосредуют высвобождение прогенных вирионов из инфицированных клеток путем разрушения бактериального пептидогликана. Они являются  $\beta(1,4)$ -гликолазами (лизосимами), трансгликолазами, амидазами или эндопептидазами. Антимикробное применение эндолизинов было предложено Гассоном еще в 1991 г. (патент GB 2243611). Несмотря на то, что антимикробная функция эндолизинов была предметом изучения в течение достаточно длительного периода, применению этих эндолизинов в качестве антибактериальных агентов не уделялось должного внимания вследствие доминировавшего господства антибиотиков. И только после открытия мультирезистентных к антибиотикам бактерий, великолепный в своей простоте принцип применения эндолизинов для борьбы с патогенными организмами, поражающими человека, получил заслуженное признание. Насущной проблемой стала задача разработки абсолютно новых классов антибактериальных агентов, и эндолизины, используемые в качестве "энзибиотиков" - термин- сочетание "энзимов" с "антибиотиками" - явились превосходным решением данной проблемы. В 2001 г. Фискетти и соавторы продемонстрировали в первый раз терапевтический потенциал эндолизина-бактериофага C1 в отношении стрептококков (*streptococci*) группы A (Nelson et al., 2001). С тех пор множество публикаций утвердили эндолизины в качестве эффективного и дополнительного замещающего средства для борьбы с бактериальными инфекциями, в частности, вызванными грамположительными бактериями. В последующем, различные эндолизины, эффективные в отношении других грамположительных патогенных организмов, таких как стрептококк пневмонии (*Streptococcus pneumoniae*) (Loeffler et al., 2001), возбудитель сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) (Schuch et al., 2002), *S. agalactiae* (Cheng et al., 2005) и золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) (Rashel et al., 2007), подтвердили свою полезность в качестве энзибиотиков. В настоящее время, самой насущной проблемой лечения с применением эндолизинов является нечувствительность грамотрицательных бактерий к экзогенному действию эндолизинов, поскольку внешняя мембрана препятствует проникновению эндолизинов из пептидогликана. Данное обстоятельство препятствует расширению сферы эффективного применения эндолизинов в отношении злостных грамотрицательных патогенов.

Грамотрицательные бактерии имеют внешнюю мембрану с характерным ассиметричным двойным слоем, выступающим как барьер. Двойной слой внешней мембраны состоит из внутреннего одностороннего слоя, содержащего фосфолипиды (преимущественно, фосфатидил этаноламин) и наружного одностороннего слоя, содержащего преимущественно единичный гликолипид, липополисахарид (ЛПС). Существует множество вариантов структур ЛПС в мире бактерий и строение ЛПС может изменяться в ответ на воздействие условий окружающей среды. Стабильность слоя ЛПС и взаимодействие между различными молекулами ЛПС по существу достигается за счет электростатического взаимодействия бивалентных ионов ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) с анионными элементами молекулы ЛПС (фосфатные группы липида А, внутреннее ядро и карбоксильные группы кетодезоксиоктоната (КДО)). В связи с этим катионсвязывающие участки играют очень важную роль в целостности внешней мембраны (Vaara 1992). Поликатионные агенты, такие, как поли-L-лизин полимеры (с как минимум 20 остатками) повышают проницаемость внешней мембраны путем замещения данных стабилизирующих бивалентных катионов. Кроме того, они запускают механизм так называемой "самореализуемого поглощения" (Hancock and Wong, 1984). Вследствие своей громоздкости, они нарушают нормальную барьерную функцию внешней мембраны и создают промежуточные трещины, тем самым способствуя собственному поглощению (Vaara and Vaara, 1983). Более того, плотная и упорядоченная упаковка гидрофобной составляющей липида А, возникновению которой способствует отсутствие ненасыщенных жирных кислот, формирует жесткую структуру с высокой вязкостью, что делает его менее проницаемым для липофильных молекул и придает дополнительную устойчивость внешней мембране (ВМ).

По сравнению с грамотрицательными бактериями, грамположительные бактерии не имеют внешней мембраны. Цитоплазматическая мембрана окружена слоем пептидогликана толщиной до 25 нм (ко-

торый составляет всего максимум 5 нм в грамотрицательных бактериях), который образует стенку бактерии. Основной функцией клеточной стенки грамположительных бактерий является стабилизация формы бактерии и уравнивание внутреннего давления бактерии. Пептидогликан, или муреин, представляет собой полимер, состоящий из сахаров и аминокислот. Сахарный компонент состоит из чередующихся остатков  $\beta$ -(1,4) связанных остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Пептидная цепь из трех-пяти аминокислот прикрепляется к N-ацетилмурамовой кислоте. Пептидная цепь может быть перекрестно связана с пептидной цепью другого штамма, образующего слой с трехмерной сетчаточной структурой. Пептидная цепь может содержать D- и L-аминокислотные остатки, а состав может меняться в зависимости от действия на различные бактерии.

Большинство грамотрицательных бактерий, а также многие виды грамположительных бактерий, образуют бактериальные биопленки. Бактериальная биопленка представляет собой совокупность или скопление микроорганизмов, которая прикрепляется к поверхности. Прилепленные бактерии зачастую окружены защитным внеклеточным полимерным веществом, производимым грамотрицательными и грамположительными бактериями. Вследствие наличия биопленки, бактерии намного более устойчивы к воздействию антимикробных веществ, как, например, антибиотики, дезинфектанты и разрушающие клеточную стенку энзимы. Помимо этого, в настоящее время обработка биопленок не представляется возможной вследствие самозащитной функции внеклеточного полимерного вещества от разрушения антимикробными веществами, дезинфектантами или разрушающими биопленки веществами.

Таким образом, существует явная потребность в способах устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок.

Данная цель достигается практической реализацией предмета изобретения, описанного в формуле изобретения.

Следующие чертежи иллюстрируют заявленное изобретение.

Фиг. 1 представляет схематическое описание, показывающее плазмидную структуру рекомбинантного воспроизведения (POLY)<sup>n</sup>-gp144 ((POLY)<sup>n</sup>-KZ144). Предварительно рEXP5CT/POLY-gp144 (рEXP5CT/POLY-KZ144) построили при помощи хвоста ПЦР (с сайтом рестрикции BamHI и первой поликатионной кассетой в 5' хвостовом праймере). Плазмид линейаризовали с использованием BamHI, дефосфорилировали и лигандировали с использованием кассеты, содержащей выступающие концы BamHI. Данная кассета получена при помощи гибридизации двух комплементарных олигонуклеотидов и кодирует 9 положительно заряженных остатков. Один положительно заряженный остаток аргинина присутствует в сайте соединения между первой и второй кассетами, вместе с серином. Аналогичным образом, путем повторения цикла, построили более длинные рEXP5CT/(POLY)<sup>n</sup>-gp144 (рEXP5CT/(POLY)<sup>n</sup>-KZ144) варианты.

Фиг. 2 представляет экспрессию и секрецию POLY-gp144 в *Pichia pastoris*. 30 мкл супернатанта экспрессионной культуры *P. pastoris* X33 [после 1 дня (квадрат), 3 дней (треугольник) и 4 дней (окружность)] добавили к 270 мкл хлороформ-пермеабиллизированных клеток *P. aeruginosa* PAO1p. В качестве буфера были приняты оптимальные энзиматические условия POLY-gp144 КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>/К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> I = 120 мМ рН 6.2). Далее, методом спектрофотометрии измерили оптическую плотность. Уменьшение показателей оптической плотности указывает на секрецию муралитического энзима *P. pastoris*. В качестве отрицательного контроля, включили *P. pastoris* X33 без экспрессионного плаزمиды (алмаз).

Фиг. 3 представляет графическое изображение антибактериальной активности немодифицированных эндолизин  $\phi$ KZgp144 и ELgp188, модифицированных вариантов эндолизин POLY-gp144 и POLY-gp188, состоящих из пептидной цепочки, содержащей 9 положительно заряженных аминокислотных остатков и модифицированных вариантов (POLY)<sup>2</sup>-gp144 и (POLY)<sup>2</sup>-gp188, состоящих из пептидной цепочки, содержащей 18 положительно заряженных аминокислотных остатков, в отношении клеток *Pseudomonas aeruginosa* PAO1p. Планки погрешностей показывают стандартные отклонения средних значений.

Фиг. 4 представляет изображение кумасси-помеченных SDS-PAGE (аббревиатура метода электрофореза в полиакриламидном геле) с результатами экспрессии и очистки немодифицированного эндолизина PSP3gp10 и его модифицированного варианта эндолизина PKPSP3gp10. Дорожка LMW относится к размерному маркеру (LMW лесенка). Следующие три дорожки относятся к протеиновым фракциям очищенного белка в элюирующем буфере (20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH рН7,4; 0,5 М NaCl; 500 мМ имидазола) после Ni<sup>2+</sup> аффинной хроматографии. Дорожка FT относится к поперечному потоку, а дорожка W - к побочным фракциям. На изображении очищенных протеиновых фракций видны единичные вторичные бэнды, что указывает на высокую чистоту рекомбинантных протеинов (>90%).

Фиг. 5 А-Г, представляет графическое изображение антибактериальной активности немодифицированного PSP3gp10 и модифицированного PKPSP3gp10 в различных сочетаниях в отношении некоторых экспоненциально растущих грамотрицательных бактерий после инкубации при комнатной температуре и без встряхивания. Каждый вид грамотрицательных бактерий подвергли инкубации в течение 30 мин с составом, содержащим 0,5 мМ EDTA ЭДТК, но без эндолизина, с составом, содержащим 1,315 мкМ немодифицированного PSP3gp10, но без ЭДТК, с составом, содержащим 1,315 мкМ модифицированного PKPSP3gp10,

но без ЭДТК, с составом, содержащим 1,315 мкМ немодифицированного PSP3gp10 и 0,5 мМ ЭДТК и с составом, содержащим 1,315 мкМ модифицированного PKPSP3gp10 и 0,5 мМ ЭДТК. На фиг. 5А представлена антибактериальная активность в отношении клеток *P. aeruginosa* PAO1p, на фиг. 5Б - антибактериальная активность в отношении клеток *P. aeruginosa* Br667, на фиг. 5В - антибактериальная активность в отношении клеток *E. coli* WK 6 и на фиг. 5, Г - антибактериальная активность в отношении клеток *Salmonella typhimurium*. "Δ" показывает разницу в активности между, соответственно, образцами PSP3gp10 и PKPSP3gp10. Планки погрешностей показывают стандартные отклонения средних значений.

Фиг. 6 представляет изображение кумасси-помеченных SDS-PAGE (аббревиатура метода электрофореза в полиакриламидном геле) с результатами экспрессии и очистки немодифицированного эндолизина P2gp09 и его модифицированного варианта эндолизина PKP2gp09. Дорожка LMW относится к размерному маркеру (LMW лесенка). Следующие три дорожки относятся к протеиновым фракциям очищенного белка в элюирующем буфере (20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH7.4; 0.5 М NaCl; 500 мМ имидазола) после Ni<sup>2+</sup> аффинной хроматографии. Дорожка FT относится к поперечному потоку, а дорожка W - к побочным фракциям. На изображении очищенных протеиновых фракций видны единичные вторичные бэнды, что указывает на высокую чистоту рекомбинантного протеина (>95%).

Фиг. 7А-Е представляют графическое изображение антибактериальной активности немодифицированного P2gp09 и модифицированного PKP2gp09 в различных сочетаниях в отношении некоторых экспоненциально растущих грамотрицательных бактерий после инкубации при комнатной температуре и без встряхивания. Каждый вид грамотрицательных бактерий подвергли инкубации в течение 30 мин с составом, содержащим 0,5 мМ ЭДТК, но без эндолизина, с составом, содержащим 1,315 мкМ немодифицированного P2gp09, но без ЭДТК, с составом, содержащим 1,315 мкМ модифицированного PKP2gp09, но без ЭДТК, с составом, содержащим 1,315 мкМ немодифицированного P2gp09 и 0,5 мМ ЭДТК и с составом, содержащим 1,315 мкМ модифицированного PKP2gp09 и 0,5 мМ ЭДТК. На фиг. 7А представлена антибактериальная активность в отношении клеток *P. aeruginosa* PAO1p, на фиг. 7Б - антибактериальная активность в отношении клеток *P. aeruginosa* Br667, на фиг. 7В - антибактериальная активность в отношении клеток *E. coli* WK 6, на фиг. 7Г - антибактериальная активность в отношении клеток *Burkholderia pseudomallei*, на фиг. 7Д - антибактериальная активность в отношении клеток *Pseudomonas putida* G1 и на фиг. 7Е - антибактериальная активность в отношении клеток *Salmonella typhimurium* LT2 (SGSC № 2317). "Δ" показывает разницу в активности между, соответственно, образцами P2gp09 и PKP2gp09. Планки погрешностей показывают стандартные отклонения средних значений.

Фиг. 8 представляет изображение кумасси-помеченных SDS-PAGE (аббревиатура метода электрофореза в полиакриламидном геле) с результатами экспрессии и очистки немодифицированного эндолизина OBPgpLYS и его модифицированного варианта эндолизина PKOBPgpLYS. Дорожка LMW относится к размерному маркеру (LMW лесенка). Следующие три дорожки относятся к протеиновым фракциям очищенного белка в элюирующем буфере (20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH7.4; 0.5 М NaCl; 500 мМ имидазола) после Ni<sup>2+</sup> аффинной хроматографии. Дорожка FT относится к поперечному потоку, а дорожка W - к побочным фракциям. На изображении очищенных протеиновых фракций видны единичные вторичные бэнды, что указывает на высокую чистоту рекомбинантных протеинов (>90%).

Фиг. 9А-Е, представляет графическое изображение антибактериальной активности немодифицированного OBPgpLYS и модифицированного PKOBPgpLYS в различных сочетаниях в отношении некоторых экспоненциально растущих грамотрицательных бактерий после инкубации при комнатной температуре и без встряхивания. Каждый вид грамотрицательных бактерий подвергли инкубации в течение 30 мин с составом, содержащим 0,5 мМ ЭДТК, но без эндолизина, с составом, содержащим 1,315 мкМ немодифицированного OBPgpLYS, но без ЭДТК, с составом, содержащим 1,315 мкМ модифицированного PKOBPgpLYS, но без ЭДТК, с составом, содержащим 1,315 мкМ немодифицированного OBPgpLYS и 0,5 мМ ЭДТК и с составом, содержащим 1,315 мкМ модифицированного PKOBPgpLYS и 0,5 мМ ЭДТК. На фиг. 9А представлена антибактериальная активность в отношении клеток *Escherichia coli* WK6, на 9Б - антибактериальная активность в отношении клеток *Salmonella typhimurium*

LT2 (SGSC № 2317), на фиг. 9В - антибактериальная активность в отношении клеток *Pseudomonas aeruginosa* PAO1p, на фиг. 9Г - антибактериальная активность в отношении клеток *Pseudomonas aeruginosa* Br667, на фиг. 9Д - антибактериальная активность в отношении клеток *Pseudomonas putida* G1 и на фиг. 9Е - антибактериальная активность в отношении клеток *Burkholderia pseudomallei*. "Δ" показывает разницу в активности между, соответственно, образцами OBPgpLYS и PKOBPgpLYS. Планки погрешностей показывают стандартные отклонения средних значений.

Фиг. 10А и 10Б представляют графическое изображение уменьшающей биопленку активности PolyKZ144 (Art-014) в отношении мукоидного растущего клинического штамма *Pseudomonas aeruginosa* 2573 (Source Uniklinikum Regensburg, nicht näher defmiert). *Pseudomonas aeruginosa* 2573 выращивали как минимум в течение 24 ч при 37°C в полистироловом титрационном микропланшете для образования биопленки. Для визуализации содержимого биопленки, провели окрашивание кристаллическим фиолетовым. На фиг. 10А, представлены результаты инкубирования биопленки или с альгинатлиазой (10 ед/мл), или PolyKZ144 (50 мкг/мл). Воздействие обоих энзимов сравнили либо с необработанной био-

пленкой, либо с биопленкой, промытой и повторно инкубированной в среде Лурия-Бертани в качестве контрольной. На фиг. 10Б представлено сравнение воздействия PolyKZ144 либо с необработанной биопленкой, либо с биопленкой, промытой и повторно инкубированной в среде Лурия-Бертани в качестве контрольной и с немукцидными растущими лабораторными штаммами *E.coli* до состояния опоманутого немспецифичного окрашивания.

Фиг. 11А-Ж представляют графическое изображение уменьшающей биопленку активности нескольких слитых белков в отношении различных грамположительных и грамотрицательных бактериальных штаммов.

*Staphylococcus aureus* KS13 (A and B), *Listeria monocytogenes* Scott A (C), *Acinetobacter baumannii* DSMZ30007 (D), *Pseudomonas aeruginosa* 2572 (E, F) and *Pseudomonas aeruginosa* 2573 (G) выращивали в течение как минимум 24 ч при 37°C в полистироловом титрационном микропланшете для образования биопленки. Для визуализации содержимого биопленки, провели окрашивание кристаллическим фиолетовым. На фиг. 11А, биопленку затем инкубировали либо с РК-пептидом (1,25 мкг/планшет), либо с эндолизином P1y2638 (25 мкг/планшет), либо со слитым белком P1y2638-РК (25 мкг/планшет). Воздействие пептида, эндолизина и слитого белка сравнили с необработанной биопленкой (одна часть белкового буфера на одну часть 2х LB (Лурия-Бертани) без NaCl), обозначенной LB. На фиг. 11Б представлены результаты инкубирования биопленки либо с бактериоцином Лизостафином (18 мкг/планшет), либо с вариантом бактериоцина РК-Лизостафина (18 мкг/планшет). Воздействие бактериоцина и варианта бактериоцина сравнили с необработанной биопленкой (одна часть белкового буфера на одну часть 2х LB без NaCl), обозначенной LB. На фиг. 11В представлены результаты инкубирования биопленки с модифицированным вариантом эндолизина Пентапептид-P1y511 (25 мкг/планшет). Воздействие модифицированного варианта эндолизина сравнили с необработанной биопленкой (одна часть белкового буфера на одну часть 2х LB без NaCl), обозначенной LB. На фиг. 11Г, Д представлены результаты инкубирования биопленки либо с РК-Пептидом (1,25 мкг/планшет), либо с эндолизином ОВР (25 мкг/планшет), либо с модифицированным вариантом эндолизина РК-ОВР (25 мкг/планшет). Воздействие пептида, эндолизина и модифицированного варианта эндолизина сравнили с необработанной биопленкой (одна часть белкового буфера на одну часть 2х LB без NaCl), обозначенной LB. На фиг. 11Е, Ж представлены результаты инкубирования биопленки либо с эндолизином KZ144 (50 мкг/планшет), либо с модифицированным вариантом эндолизина SMAP29-KZ144 (50 мкг/планшет). Воздействие пептида, эндолизина и модифицированного варианта эндолизина сравнили с необработанной биопленкой (одна часть белкового буфера на одну часть 2х LB без NaCl), обозначенной LB.

Термин "белок" в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, синонимично соотносится с термином "полипептид". Термин "белок" в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к линейному полимеру аминокислотных остатков, связанных пептидными связями в специфичной последовательности. Аминокислотные остатки белка могут быть модифицированы, например, ковалентными прикреплениями различных групп, как, например, углеводы и фосфат. Прочие вещества могут быть более свободно ассоциированы с полипептидными цепочками, как, например, гемы или липиды, приводя к образованию конъюгированных белков, которые также обозначают термином "белок", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения. Описаны различные варианты с включением полипептидных цепей, в частности, что касается присутствия альфа-спиральных и бета-складчатых структур. Термин "белок" в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к четырем классам белков, а именно альфа, бета, альфа/бета и альфа плюс бета. Помимо этого, термин "белок" относится к комплексному соединению, причем комплекс представляет собой гомомер.

Термин "слитый белок", используемый в описании заявленного изобретения, относится к продукту экспрессии, образующемуся в результате слияния двух нуклеиновых последовательностей. Такой протеин можно получить, например, в экспрессионной системе рекомбинантной ДНК или химическим сшиванием. Кроме того, термин "слитый белок", используемый в описании заявленного изобретения, относится к слиянию первой аминокислотной последовательности, в частности эндолизина, аутолизина, бактериоцина и/или другой пептидогликангидролазы, со второй или последующей аминокислотной последовательностью. Вторая или последующая аминокислотная последовательность предпочтительно представляет собой пептид, в частности катионный, поликатионный, гидрофобный, амфипатичный и/или антимикробный пептид. Более предпочтительно, данная вторая и/или последующая аминокислотная последовательность является чужеродной и не гомологична в какой-либо степени по отношению к любым доменам первой аминокислотной последовательности.

Термин "модифицированный вариант эндолизина" используется в описании заявленного изобретения синонимично с термином "вариант эндолизина". Оба термина относятся к слитым белкам, содержащим эндолизин и пептид, в частности катионный, поликатионный, гидрофобный, амфипатичный и/или антимикробный пептид.

Термин "модифицированный вариант бактериоцина" используется в описании заявленного изобретения синонимично с термином "вариант бактериоцина". Оба термина относятся к слитым белкам, со-

держащим бактериоцин и пептид, в частности катионный, поликатионный, гидрофобный, амфипатичный и/или антимикробный пептид.

Термин "модифицированный вариант аутолизина" используется в описании заявленного изобретения синонимично с термином "вариант аутолизина". Оба термина относятся к слитым белкам, содержащим аутолизин и пептид, в частности катионный, поликатионный, гидрофобный, амфипатичный и/или антимикробный пептид.

Термин "пептидная цепочка", используемый в описании заявленного изобретения, относится к любому виду пептида, соединенного с белком, таким как эндолизин, бактериоцин или аутолизин. В частности, термин "пептидная цепочка", используемый в описании заявленного изобретения, относится к катионному пептиду, поликатионному пептиду, гидрофобному пептиду, амфипатичному пептиду и/или антимикробному пептиду. Однако пептидная цепочка в том значении, в котором она трактуется в заявленном изобретении, не относится к His-меткам, в частности к His<sub>5</sub>-меткам, His<sub>6</sub>-меткам, His<sub>7</sub>-меткам, His<sub>8</sub>-меткам, His<sub>9</sub>-меткам, His<sub>10</sub>-меткам, His<sub>11</sub>-меткам, His<sub>12</sub>-меткам, His<sub>16</sub>-меткам и His<sub>20</sub>-меткам, Strep-меткам, Avi-меткам, Muc-меткам, Gst-меткам, JS-меткам, цистеин-меткам, FLAG-меткам или другим меткам, известным из уровня техники, тиоредоксин- или мальтоза-связывающим белкам (МСБ). Термин "метка" или "таг", в отличие от термина "пептидная цепочка", используемый в описании заявленного изобретения, относится к пептиду, который применяется для облегчения экспрессии и/или аффинной очистки полипептида, для иммобилизации полипептида на поверхности, или для применения в качестве маркера или меченой составляющей для обнаружения полипептида, например, при помощи связывания антител в различных форматах энзим связанного иммуносорбентного метода исследования (ELISA), если только функция построения метки, применяемая для любой из вышеперечисленных фасилитаций, не вызвана положительным зарядом упомянутого пептида. Тем не менее, His<sub>6</sub>-метка может, в зависимости от соответствующего показателя рН, быть положительно заряженной, но использоваться в качестве средства аффинной очистки вследствие своей способности связываться с иммобилизованными бивалентными катионами, а не как пептидная цепочка, в соответствии с заявленным изобретением.

Термин "пептид", используемый в описании заявленного изобретения, относится к коротким полипептидам, состоящим из приблизительно от 2 до 100 аминокислотных остатков, более предпочтительно примерно от 4 до 50 аминокислотных остатков, наиболее предпочтительно примерно от 5 до 30 аминокислотных остатков, причем аминокислотная группа одного аминокислотного остатка связана пептидной связью с карбоксильной группой другого аминокислотного остатка. Пептид (белок) может выполнять специфическую функцию, может являться естественно построенным белком, или смоделированным и синтезированным в искусственных условиях. Пептид, к примеру, можно получить или выделить из нативного белка путем энзимного или химического расщепления, или построить с помощью обычных методов белкового синтеза (напр., твердофазный синтез) или методами молекулярной биологии (Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Предпочтительно синтетически получаемые пептиды представляют собой, например, катионные, поликатионные, амфипатичные и/или гидрофобные пептиды.

Естественные пептиды предпочтительно представляют собой антимикробные пептиды.

В описании заявленного изобретения термин "катионный пептид" относится к пептиду с положительно заряженными аминокислотными остатками. Предпочтительно катионный пептид имеет значение рКа (отрицательный десятичный логарифм константы диссоциации) равное 9,0 или выше. Как правило, по крайней мере четыре аминокислотных остатка катионного пептида могут быть положительно заряженными, например лизин или аргинин. Термин "положительно заряженные" относится к боковым цепочкам аминокислотных остатков, которые имеют чистый положительный заряд при физических условиях. Термин "катионный пептид", используемый в заявленном изобретении, также относится к поликатионным пептидам.

Термин "поликатионный пептид", используемый в описании заявленного изобретения, относится к смоделированным и синтезированным пептидам, состоящих преимущественно из положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности, остатков лизина, аргинина и/или гистидина, наиболее предпочтительно остатков лизина и/или аргинина. Пептид состоит преимущественно из положительно заряженных аминокислотных остатков, причем как минимум примерно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 100% аминокислотных остатков представляют собой положительно заряженные аминокислотные остатки, в частности остатки лизина и/или аргинина. Те из аминокислотных остатков, которые не являются положительно заряженными, могут представлять собой нейтрально заряженные аминокислотные остатки и/или отрицательно заряженные аминокислотные остатки и/или гидрофобные аминокислотные остатки. Более предпочтительно, те из аминокислотных остатков, которые не являются положительно заряженными, могут представлять собой нейтрально заряженные аминокислотные остатки, в частности серин и/или глицин.

Термин "антимикробные пептиды" (АМП), в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к любому естественному пептиду с микробицидной и/или микробиостатической функциями в отношении, например, бактерий, вирусов, грибов, дрожжевых клеток, микоплазм, протозоа. Так, например, термин "антимикробный пептид", в том смысле, в котором он использу-

ется в описании заявленного изобретения, относится, в частности, к любому пептиду с антимикробной, антигрибковой, антимикотической, антипаразитарной, антипротозойной, антивирусной, антиинфекционной, антиконтагиозной и/или бактерицидной, альгицидной, амебоцидной, микробицидной, бактерицидной, фунгицидной, паразитицидной, протозоицидной функцией, в частности, суши-пептиды и дефензин. Антимикробный пептид может представлять собой член суперсемейства РНКазы А, дефензин, кателицидин, гранулизин, гистатин, псориазин, дермицидин или гепсидин. Антимикробный пептид может встречаться в природном виде в насекомых, рыбах, растениях, паукообразных, позвоночных или млекопитающих.

Более предпочтительно антимикробный пептид может встречаться в природном виде в насекомых, рыбах, растениях, паукообразных, позвоночных или млекопитающих. Более предпочтительно антимикробный пептид может встречаться в природном виде в редисе, тутовом шелкопряде, тарантуле, лягушке, предпочтительно в лягушках *Xenopus laevis*, *Rana*, более предпочтительно в *Rana catesbeiana*, жабе, предпочтительно в азиатской жабе *Bufo bufo gargarizans*, мухе, предпочтительно в *Drosophila*, более предпочтительно в *Drosophila melanogaster*, в *Aedes aegypti*, в домашних медоносных пчелах, шмелях, предпочтительно в *Bombus pascuorum*, мясной мухе, предпочтительно в *Sarcophaga peregrina*, скорпионе, мечехвосте, зубатке (соче), предпочтительно в *Parasilurus asotus*, корове, свинье, овце, свиноподобных, жвачных животных, обезьяне и человеке.

Термин "суши-пептид (Sushi пептид)" в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к белкам комплементарного контроля с короткими повторениями транскрипции. Sushi модуль Sushi пептидов функционирует как домен взаимодействия "белок-белок" в различных белках. Доказано, что пептиды, содержащие Sushi домен, показывают антимикробную активность. Предпочтительно суши пептиды представляют собой природные антимикробные пептиды.

Термин "амфипатичный пептид", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к синтетическим пептидам, имеющим как гидрофильные, так и гидрофобные функциональные группы. Предпочтительно в контексте описания заявленного изобретения термин "амфипатичный пептид" относится к пептиду, имеющему определенное расположение гидрофильных и гидрофобных групп, например амфипатичные пептиды могут являться альфа-спиральными, с превалирующими неполярными боковыми цепями вдоль одной стороны спирали и полярными остатками вдоль остальной части поверхности.

Термин "гидрофобная группа", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к химическим группам, как, например, аминокислотные боковые цепи, которые преимущественно водонерастворимы, но растворимы в масляной фазе, причем растворимость в масляной фазе выше, чем растворимость в воде или водной фазе. В воде аминокислотные остатки с гидрофобной боковой цепью взаимодействуют друг с другом для получения неводной среды. Примерами аминокислотных остатков с гидрофобными боковыми цепями являются остатки валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и глицина.

Термин "эндолизин", используемый в описании заявленного изобретения, относится к энзиму, который эффективен для гидролиза стенок бактериальных клеток. "Эндолизины" состоят как минимум из одного "энзим активного домена" (ЭАД) с как минимум одной из нижеследующих функций: эндопептидаза, N-ацетил-мурамоил-L-аланин-амидаза (амидаза), N-ацетил-мурамидаза, N-ацетил-глюкозаминидаза (ликозим) или трансгликолазы. В дополнение, эндолизины могут также содержать энзим неактивные участки, и прикрепляться к клеточной стенке бактерии-хозяина, т.н. ДСКС (домены связывания клеточных стенок). Эндолизин может содержать один, два или более ДСКС. Однако, термин "эндолизин" в том значении, в котором он используется в описании заявленного изобретения, также относится к энзимам, содержащим как минимум один ЭАД, но ни одного ДСКС. Как правило, домен связывания клеточных стенок обладает способностью связывать различные компоненты на поверхности бактерии. Предпочтительно, домен связывания клеточных стенок представляет собой пептидогликан-связывающий домен, который связан с пептидогликаном бактерии.

Термин "клеточная стенка", используемый в описании заявленного изобретения, относится ко всем компонентам, образующим внешнюю оболочку клетки грамположительной или грамотрицательной бактерии, обеспечивая, таким образом, их целостность. В частности, термин "клеточная стенка" в том значении, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к пептидогликану, внешней мембране грамотрицательной бактерии с липополисахаридом, клеточной мембране бактерии, а также к дополнительным слоям на пептидогликане, как, например, капсулы, внешние протеиновые слои или слаймы.

Термин "аутолизин", используемый в описании заявленного изобретения, относится к энзимам, а именно эндолизинам, но кодированным бактериями и включенным в, например, процессы деления клеток и метаболизма в клеточной стенке. Описание аутолизинов содержится в издании "Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. FEMS Microbiol Rev. 2008 Mar; 32(2):259-86".

Термин "бактериоцин", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобре-

ния, относится к белковоподобным, полипептид-подобным или пептид-подобным веществам, которые могут ингибировать рост других бактерий. Более предпочтительно, упомянутый процесс ингибирования происходит специфически путем абсорбции упомянутых прочих бактерий специфическими рецепторами бактериоцина. Обычно, бактериоцины продуцируются микроорганизмами. Тем не менее, термин "бактериоцин" в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится как изолированной форме микроорганизма, так и синтетически получаемой форме, и относится к вариантам, которые преимущественно сохраняют свойства своих родительских бактериоцинов, но чьи последовательности были изменены путем инсерции или делеции одного или более аминокислотных остатков.

Термин "ЭАД", в том смысле, в котором он используется в описании заявленного изобретения, относится к энзимактивному домену эндолизина. ЭАД ответственен за гидролиз бактериальных пептидогликанов. Этот домен обладает как минимум одной энзим-функцией эндолизина. ЭАД также может состоять из более чем одного энзим-активного модуля. Термин "ЭАД" используется в описании заявленного изобретения синонимично с термином "каталитический домен".

Термин "деления", используемый в описании заявленного изобретения, относится к делеции 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислотных остатков из соответствующей начальной последовательности.

Термин "инсерция" или "аддиция", используемые в описании заявленного изобретения, относятся к инсерции или аддиции 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислотных остатков из соответствующей начальной последовательности.

Термин "субституция", используемый в описании заявленного изобретения, относится к замене одного аминокислотного остатка, локализованного в определенном положении, на другой аминокислотный остаток.

Термин "био пленка", используемый в описании заявленного изобретения, относится к совокупности бактериальных микроорганизмов, в которой бактериальные клетки прикрепляются друг к другу и/или к поверхности. Прилепленные бактерии зачастую окружены защитным внеклеточным полимерным веществом (ВПВ), производимым клетками. Био пленка ВПВ состоит из внеклеточного ДНК, белков и полисахаридов. Такие био пленки могут образовываться на любой поверхности одушевленных или неодушевленных объектов, в частности, на поверхности твердых предметов в качестве колоний и на поверхности жидкостей в качестве пелликул (тонких пленок). Микробные клетки, растущие в пленке, физиологически отличны от планктонных клеток одного и того же конкретного организма.

Заявленное изобретение относится к способам устранения, уменьшения или предотвращения бактериальной био пленки, включающим этапы:

а) обеспечение наличия слитого белка, содержащего энзим с активностью, разрушающей клеточные стенки грамотрицательных и/или грамположительных бактерий, с которым слит пептид, обладающий активностью, разрушающей мембрану или липополисахарид (ЛПС); и

б) обеспечение контакта упомянутого слитого белка с материалом, жидкостью, поверхностью или биологическим материалом.

Предпочтительно относится к способам устранения, уменьшения или предотвращения бактериальной био пленки, включающим этапы:

в) обеспечение наличия слитого белка, содержащего эндолизин, аутолизин или бактериоцин, с которыми слит пептид, обладающий активностью, разрушающей мембрану или липополисахарид (ЛПС); и

г) обеспечение контакта упомянутого слитого белка с материалом, жидкостью, поверхностью или биологическим материалом.

Термин "обеспечение" наличия слитого белка в соответствии с заявленным изобретением относится либо к простому применению слитого белка в соответствии с заявленным изобретением или к получению и очистке такого слитого белка, предворяющему его применение в соответствии с заявленным изобретением.

Предпочтительно материал представляет собой камень, скалистые породы, почву, отстой, пищевые продукты, корм (фураж) или косметику. Предпочтительно жидкость представляет собой воду, например питьевую воду, грунтовую воду или сточную (техническую) воду, термальные источники, моря, озера, реки, любую водную систему, растворы для очистки и хранения контактных линз, зубных протезов, имплантатов, протезов или ортезов (шин).

Предпочтительно биологический материал представляет собой любое вещество, извлеченное или полученное из живого организма, в частности растений и млекопитающих, предпочтительно человека, например клетки, ткани, органы, кровь, компоненты крови и жидкие среды организма. Предпочтительно клетки являются ядродержащими или безъядерными. Клетки можно извлекать из любого органа, в частности, могут являться гепатоцитами, гладкомышечными клетками, эндотелиальными клетками, кератиноцитами, инсулярными клетками, стволовыми клетками (из взрослого и новорожденного организмов, различных тканей, различного видового происхождения), предшественники стволовых клеток, клетки пуповинной крови, гаметы (мужские и женские), клетки-предшественники гамет, эритробласты, лейкобласты и хондробласты. Ткани представляют собой, например, слизистые оболочки, нервы, мышцы, эпителий, соединительная и опорная ткани, мягкие ткани ротовой полости и зубы. Органы представляют собой, например, сердце, клапаны сердца, глаза, уши, мочеполовой тракт, легкие, печень, почки, билиар-

ный (желчевыводящий) тракт, простату, нос, пищеварительный тракт, дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, головной и костный мозг. Предпочтительными жидкостными средами организма являются моча, спинномозговая жидкость и лимфа.

Предпочтительно поверхности представляют собой твердые биологические или небиологические поверхности. Предпочтительными примерами поверхностей являются поверхности медицинских приборов, в частности, имплантаты, протезы, катетеры, например зубные имплантаты, протезы мочевыводящих путей, перитонеальная мембрана и катетер перитонеального диализа, постоянные катетеры для гемодиализа и постоянного введения химиотерапевтических препаратов (катетеры Хикмана), сердечные имплантаты, как, например, кардиостимуляторы, искусственные клапаны сердца, вспомогательные желудочковые системы, искусственные сосудистые трансплантаты и стенты, интрамедуллярные фиксаторы, чрескожные швы, трахеальные и вентиляторные трубки, а также поверхности труб систем промышленного и питьевого водоснабжения и природных водных систем.

Биопленки образуются в результате жизнедеятельности бактериальных микроорганизмов, в них бактериальные клетки прикрепляются друг к другу и/или к поверхности. Внеклеточные полимерные вещества (ВПВ), выделяемые бактериальными организмами биопленки, образуют с водными гидрогелями (слизистую) шлам подобную матрицу. Матрица может также содержать газовые пузырьки и неорганические частицы. Биопленка ВПВ содержит внеклеточную ДНК, белки и полисахариды. Помимо бактериальных микроорганизмов, в пленку могут быть включены другие одноклеточные организмы. Биопленки могут появляться в результате оседания бактериальных микроорганизмов на поверхностях. В большинстве случаев, биопленка образуется на водных поверхностях или на поверхности, граничащей с твердой фазой. Такие биопленки могут образовываться на поверхности любого одушевленного или неодушевленного предмета. Как правило, на всех поверхностях (границах) могут оседать биопленки; они присутствуют практически всюду, на почве (в грунте) и сточных водах, в грунтовых водах, на камнях, в пустынях, в горячих источниках, на и в растениях и животных, в частности на слизистых оболочках. Помимо этого, биопленки могут встречаться на медицинских приборах, например имплантатах, катетерах, эндоскопах, протезах, инструментах и аппаратах, а также в косметике, пище и фуражных кормах. Биопленки могут также образовываться вследствие инфекций, поскольку, в большинстве случаев, бактериальные микроорганизмы формируют биопленку для защиты от воздействия иммунной системы. Образование биопленки обеспечивает долговременную выживаемость бактериальных микроорганизмов. Примером острой инфекции дыхательных путей является легионеллез, вызываемый проглатыванием или вдыханием сгустков биопленок легионелл, оторвавшихся от поверхности воздухо-/водопроводящих труб систем нагревания или охлаждения. Также, множество пищевых бактерий, как, например, *E. coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. и *Camphylobacter jejuni* могут формировать биопленки на пищевых продуктах или поверхности приборов, которые впоследствии высокоустойчивы к биоцидам, засухе, жаре, антибиотикам и очищающим реагентам. Микроорганизмы, являющиеся возбудителями инфекций имплантатов, катетров и прочих медицинских приборов могут представлять собой коагулазонегативные стафилококки, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida* spp., которые также являются возбудителями широкого круга внутрибольничных инфекций. Типичными бактериальными инфекциями, вызываемыми биопленками у человека, являются: раневые инфекции, в частности, при сахарном диабете, ангине, остеомиелите, бактериальном эндокардите, синусите, инфекциях роговицы, мочевыделительного тракта, инфекциях билиарного тракта, инфекционные почечные камни, уретрит, простатит, инфекции, связанные с катетеризацией, инфекции среднего уха, образование зубного налета, гингивит, периодонтит, муковисцидоз и инфекции, вызванные использованием постоянных вживленных предметов, как, например, суставные протезы и сердечные клапаны.

Наличие биопленок могут определять при помощи различных тестов, как, например, чашечным методом выращивания живой культуры (TCP), описанным Christensen et al., *J Clin Microbiol* 22:996-1006 (1985), или пробирочным методом (TM), как описано выше Christensen et al., *Infect Immun* 37:318-26 (1982), или методом конгорот агара (CRA), описанным Freeman et al., *J Clin Pathol* 42: 872-4 (1989). Биопленку можно оценить количественными методами при помощи пробы кристаллическим фиолетовым (Peeters et al., *J Microbiol Methods* 72: 157-165 (2008)).

Слитый белок в соответствии с заявленным изобретением может оказывать воздействие на взаимодействие бактерий, образующих биопленку таким образом, что клетки переносятся в единичные планктонные клетки, где они затем подвергаются лизису упомянутым слитым белком, соответственно, биопленка затем разрушается частично или полностью. Воздействие слитого белка в соответствии с заявленным изобретением на бактерии может также непосредственно лизировать бактерии, находящиеся в биопленке, и, таким образом, биопленка распадается частично или полностью. Помимо этого, слитый белок в соответствии с заявленным изобретением может предотвратить образование бактериальных биопленок путем лизиса бактерий, которые могут образовывать биопленку с другими бактериями.

Слитые белки в соответствии с заявленным изобретением относятся предпочтительно к вариантам эндолизина, вариантам бактериоцина и вариантам аутолизина.

Предпочтительные слитые белки в соответствии с заявленным изобретением содержат эндолизин,

аутолизин или бактериоцин, слитый с пептидом при помощи липополисахарида (ЛПС) или с общей разрушающей мембрану активностью. ЛПС является основным компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Он повышает отрицательный заряд клеточной мембраны и защищает мембрану от определенных видов химических атак. В определенном смысле, упомянутый ЛПС защищает мембрану грамотрицательных бактерий также от эндолизинов, поступающих из окружающей бактерии среды. Несмотря на это целостность ЛПС можно нарушить пептидами, обладающими разрушающей ЛПС активностью, как, например, положительно заряженные пептиды. Помимо этого упомянутые пептиды могут быть вовлечены в механизм переноса белка внешней мембраной, процесс дестабилизации структурных белков внешней мембраны и/или липидзависимой дестабилизации. Авторы заявленного изобретения с удивлением обнаружили, что пептид с разрушающей ЛПС активностью или с общей разрушающей мембрану активностью, способствуют переносу эндолизина, аутолизина или бактериоцина, слитых с упомянутым пептидом, через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий. После градиентного переноса эндолизина, аутолизина или бактериоцина через внешнюю мембрану бактерий, клеточная стенка бактерии более легко поддается разрушению эндолизином вследствие деградации пептидогликанного слоя с последующим осмотическим лизисом, после того, как внутреннее клеточное давление бактерии становится избыточным. Грамположительные бактерии имеют гораздо более толстый пептидогликаный слой, чем грамотрицательные бактерии. В данном случае разрушающая мембрану активность слитого белка способствует лизису бактерий, благодаря воздействию на цитоплазматическую мембрану.

Таким образом, заявленное изобретение относится к способам устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок с использованием слитых белков, состоящих из энзима, предпочтительно, эндолизина, аутолизина или бактериоцина, с активностью, разрушающей клеточную стенку грамотрицательных и/или грамположительных бактерий и пептида с разрушающей мембрану активностью, причем упомянутый пептид слит с энзимом на N- и/или C-концах. Упомянутые слитые белки в соответствии с заявленным изобретением представляют собой так называемые модифицированные варианты эндолизина, или просто варианты эндолизина, или модифицированные эндолизины, модифицированные варианты аутолизина, или варианты аутолизина, модифицированные бактериоцины или варианты бактериоцина.

Эндолизиную составляющую слитого белка предпочтительно кодируют бактериофагами, характерными для грамотрицательных бактерий, таких как грамотрицательные бактерии бактериальных групп, семейств, родов или видов, включающих штаммы, патогенные для человека или животных, как, например, бактерии Enterobacteriaceae (*Escherichia*, в частности *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, в частности *K. pneumoniae*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Yersinia*), Pseudomonadaceae (*Pseudomonas*, в частности *P. aeruginosa*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella*, *Sphingomonas*, *Comamonas*), Neisseria, Moraxella, Vibrio, Aeromonas, Brucella, Francisella, Bordetella, Legionella, Bartonella, Coxiella, Haemophilus, Pasteurella, Mannheimia, Actinobacillus, Gardnerella, Spirochaetaceae (*Treponema* and *Borrelia*), Leptospiraceae, Campylobacter, Helicobacter, Spirillum, Streptobacillus, Bacteroidaceae (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*), Acinetobacter, в частности *A. baumannii*.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, эндолизин слитого белка предпочтительно кодируют бактериофагами, характерными для грамположительных бактерий, таких как грамположительные бактерии бактериальных групп, семейств, родов или видов, включающих штаммы, патогенные для человека или животных, как, например, бактерии phylum Actinobacteria, в частности Actinobacteridae, в частности Actinomycetales, в частности Actinomycineae: Actinomycetaceae (*Actinomyces*, *Mobiluncus*), Corynebacterineae: Mycobacteriaceae (*Mycobacterium*), Nocardiaceae, Corynebacteriaceae, Frankineae: Frankiaceae, Micrococcineae: Brevibacteriaceae and Propionibacteriaceae (*Propionibacterium*) и Bifidobacteriales, в частности Bifidobacteriaceae (*Bifidobacterium*, *Falcivibrio*, *Gardnerella*) и другие: Acidimicrobidae, Coriobacteridae, Rubrobacteridae, Sphaerobacteridae; а также phylum Firmicutes, в частности Bacilli, в частности Bacillales, в частности: Bacillaceae (*Bacillus*), Listeriaceae (*Listeria*), Staphylococcaceae (*Staphylococcus*, *Gemella*, *Jeotgalicoccus*) и Lactobacillales, в частности: Enterococcaceae (*Enterococcus*), Lactobacillaceae (*Lactobacillus*, *Pediococcus*), Leuconostocaceae (*Leuconostoc*), Streptococcaceae (*Lactococcus*, *Streptococcus*) и Clostridia, в частности: Clostridiales (*Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Selenomonas*), Halanaerobiales и Thermoanaerobacterales, и Tenericutes/Mollicutes, в частности: Mycoplasmatales (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*), Entomoplasmatales (*Spiroplasma*), Anaeroplasmatales (*Erysipelothrix*), Acholeplasmatales (*Acholeplasma*), Haloplasmatales (*Haloplasma*).

В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения аутолизин или бактериоцин слитого белка кодируют грамотрицательными или грамположительными бактериями бактериальных групп, семейств, родов или видов, включающих штаммы, патогенные для человека или животных, как, например, бактерии, упомянутые выше.

Предпочтительно эндолизиную составляющую получают из фага или природного эндолизина, как приведено в нижеследующей табл. 1:

Флаг	Упоминание в публикациях	Природный эндוליзин	Прогнозируемая функция эндוליзина
ФV10	Perry, L.L. and Applegate, B.M.	PhiV10p30	Хитиназа
FELS-1	McClelland, M. and Wilson, R.K.	STM0907.Fels0	Хитиназа
ε15	Kropinski, A.M. and McConnel, M.R.	epsilon15p25	Хитиназа
YUA	Ceysens, P. (Laboratory for Gene technology)	YuA20	литический домен трансгликолаза (C) / 1 трансмембрана-воздух (N)
B3	Braid, M.D. and Kitts, C.L.	ORF23	литические домены трансгликолаза (C) / 2 трансмембрана-воздух (N)
ВСЕРμ	Summer, E.J. and Young, R.	ВсерMu22	литический домен трансгликолаза (M) / 1 трансмембрана-воздух (N)
F116	Byrne, M. and Kropinski, A.M.	F116p62	мураминназа (T4-подобный)
FELS-2	McClelland, M. and Wilson, R.K.	STM2715.S.Fels2	мураминназа (T4-подобный)
ES18	Casjens, S.R. and Hendrix, R.W.	gp76	мураминназа (T4-подобный)
SETP3	De Lappe, N and Cormican, M.	SPSV3_gp23	мураминназа (T4-подобный)
ФЕСО32	Savalia, D and Severinov, K	phi32_17	мураминназа (T4-подобный)
HK022	Juhala, R and Hendrix, R.W.	HK022p54	мураминназа (лямбда-подобный)
HK97	Juhala, R and Hendrix, R.W.	HK97p58	мураминназа (лямбда-подобный)
HK620	Clark, A.J. and Dhillon, T.S.	HK620p36	мураминназа (лямбда-подобный)
E1	Pickard, D. and Dougan, G	VIP0007	мураминназа (лямбда-подобный)
SF6	Casjens, S and Clark, A.J.	Sf6p62	мураминназа (лямбда-подобный)
SFV	Allison, G.E. and Verma, N.K.	R (SfVp40)	мураминназа (лямбда-подобный)
ВСЕРС6B	Summer, EJ and Young, R.	gp22	мураминназа (лямбда-подобный)
ВСЕРNAZGUL	Summer, EJ and Young, R.	Nazgul38	мураминназа (лямбда-подобный)
P2	Christie, G.E. and Calender, R.	K (P2p09)	мураминназа (лямбда-подобный)
WФ	Christie, G.E. and Esposito, D.	K (Wphi09)	мураминназа (лямбда-подобный)
RV5	Kropinski, A.M. and Johnson	rv5_gp085	мураминназа (лямбда-подобный)
JS98	Zuber, S and Denou, E.	EpJS98_gp116	мураминназа (T4-подобный)
I3A	Savalia, D and Molineux, I.	gp3.5	мурамоил-L-аланин амидаза
BA14	Savalia, D and Molineux, I.	gp3.5	мурамоил-L-аланин амидаза
ECODS1	Savalia, D and Molineux, I.	gp3.5	мурамоил-L-аланин амидаза
K1F	Scholl, D and Merril, C	CKV1F_gp16	мурамоил-L-аланин амидаза
T3	Pajunen, M.I. and Mollieux, I.J.	T3p18	мурамоил-L-аланин амидаза
GH-1	Kropinski, A.M. and Kovalyova, I.V.	gh-1p12	мурамоил-L-аланин амидаза
K11	Mollieux, I. and Savalia, D.	gp3.5	мурамоил-L-аланин амидаза
BIP-1	Liu, M and Miller, J.F.	bip-1p02	лизоцим (N) / PG-связывающий домен (C)
BMP-1	Liu, M and Miller, J.F.	bmp-1p02	лизоцим (N) / PG-связывающий домен (C)
BPP-1	Liu, M and Miller, J.F.	bpp2	лизоцим (N) / PG-связывающий домен (C)
ФСТX	Nakayama, K and Hayashi, T.	ORF12	PG-связывающий домен (N) / мурамидаза (C)
ВСЕР43	Summer, EJ and Young, R.	Всер43-27	PG-связывающий домен (N) / мурамидаза (C)
ВСЕР781	Summer, EJ and Young, R.	Всер781-27	PG-связывающий домен (N) / мурамидаза (C)
ВСЕР1	Summer, EJ and Young, R.	Всер1-28	PG-связывающий домен (N) / мурамидаза (C)
ВСЕРNY3	Summer, EJ and Young, R.	ВсерNY3gene26	PG-связывающий домен (N) / мурамидаза (C)
ФЕ12-2	DeShazer, D and Nierman, W.C.	gp45	PG-связывающий домен (N) / мурамидаза (C)
Ф52237	DeShazer, D and Nierman, W.C.	gp28	PG-связывающий домен (N) / мурамидаза (C)
ФP27	Recktenwald, J and Schmidt, H.	P27p30	Эндопептидаза
RB49	Monod, C and Krisch, H.M.	RB49p102	Эндопептидаза
Ф1	Arbiol, C. and Comeau, A.M.	phi1-p102	Эндопептидаза
T5	Pankova, N.V. and Ksenzenko, V.N.	lys (T5.040)	Эндопептидаза
201phi2-1	Thomas <i>et al.</i> , 2008		PG-связывающий домен (N) / неизвестный каталитический домен (C)
Aeh1	Monod, C and Krisch, H.M.	Aeh1p339	мураминназа (T4-подобный)
YYZ-2008	Kropinski, A.M.	YYZgp45	мураминназа (лямбда-подобный)

Также предпочтительно эндוליзиновую составляющую получают из эндוליзинов *Pseudomonas ae-*

ruginosa фагов ФКЗ и EL, *Pseudomonas putida* фага OBP, фага LUZ24, или из T4 лизосомы, gp61 мурамидазы, PSP3 эндолизина, фага *Salmonella*, фага *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* фага P2, *E. coli* фага N4 и K1F *Salmonella typhimurium* фага.

Помимо вышеупомянутых, предпочтительными эндолизинами слитого белка являются эндолизины фага *Listeria* PlyA118, PlyA500, PlyPSA, PlyA511, PlyP35, PlyP40, эндолизин стафилококкового фага Phi 11, эндолизин Phi MR11, LysK, Ply 2638, *Clostridium perfringens* PlyS6, Ply3626, *Clostridium difficile*: эндолизин CD27L, *Streptococcus*: эндолизин B30, фаг Dp-1 Pal амидаза, эндолизин C1, эндолизин Cpl-1, PlyGBS, *Enterococcus*: PlyV12, *Bacillus anthracis*: фаг гамма эндолизин PlyG, *Propionibacterium* фаг эндолизин PA6-gp20.

Предпочтительные аутолизины слитого белка описаны в публикации: *Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases*. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. *FEMS Microbiol Rev.* 2008 Mar;32(2):259-86. Epub 2008 Feb 11. Review. Примером предпочтительного аутолизина является AtlA аутолизин.

Предпочтительными бактериоцинами являются лизостафин (разрушающий клеточные стенки *Staphylococcus*), мутанолизин (разрушающий клеточные стенки *Streptococcus*) и и энтеролизин (разрушающий клеточные стенки *Enterococcus*). Более предпочтительно, бактериоцин слитого белка в соответствии с заявленным изобретением содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 87.

Помимо вышеупомянутых примеров, эндолизиновую составляющую слитого белка выбирают из группы, состоящей из Cpl-1 в соответствии с SEQ ID NO: 84, Ply511 в соответствии с SEQ ID NO: 85, LysK в соответствии с SEQ ID NO: 86, PA6-gp20 в соответствии с SEQ ID NO: 88, phiKZgp144 в соответствии с SEQ ID NO: 1, ELgp188 в соответствии с SEQ ID NO: 2, *Salmonella* эндолизин в соответствии с SEQ ID NO: 3, *Enterobacteria* фаг T4 эндолизин в соответствии с SEQ ID NO: 4, *Acinetobacter baumannii* эндолизин в соответствии с SEQ ID NO: 5, *E.coli* фаг K1F эндолизин в соответствии с SEQ ID NO: 6, OBPgpLYS в соответствии с SEQ ID NO: 7, PSP3 *Salmonella* эндолизин (PSP3gp10) в соответствии с SEQ ID NO: 8, *E.coli* фаг P2 эндолизин (P2gp09) в соответствии с SEQ ID NO: 9, *Salmonella typhimurium* фаг мурамидаза STM0016 в соответствии с SEQ ID NO: 89, *E. coli* фаг N4 мурамидаза N4-gp61 в соответствии с SEQ ID NO: 90, N4-gp61 trunc. в соответствии с SEQ ID NO: 91 и Ply 2638 в соответствии с SEQ ID NO: 92.

В другом предпочтительном практическом воплощении заявленного изобретения способы устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок при помощи слитых белков в соответствии с заявленным изобретением включают применение модификаций и/или изменений в аминокислотных последовательностях. Такие изменения и/или модификации могут содержать как мутации, так и делеции, инсерции и аддиции, их субституции или комбинации и/или химические и изменения аминокислотных остатков, например, биотинилирование, ацетилирование, пегилирование, химические изменения amino-, SH- или карбоксильных групп. Упомянутые модифицированные и/или измененные эндолизины обладают литической активностью, характерной для эндолизина природного происхождения. Тем не менее, упомянутая активность может быть выше или ниже активности соответствующего природного эндолизина. Упомянутая активность может быть на уровне примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или примерно 200% и даже более от активности соответствующего природного эндолизина. Активность можно измерить посредством анализов, известным специалистам в данной области техники, а именно, анализ лизиса в чашке Петри или жидколизисный анализ, которые описаны, например, в публикации Briers et al., *J. Biochem. Biophys Methods* 70: 531-533, (2007).

Пептид слитого белка в соответствии с заявленным изобретением могут связать с энзимом, предпочтительно с эндолизином, аутолизином или бактериоцином при помощи дополнительных аминокислотных остатков, например, вследствие клонирования. Предпочтительно упомянутые аминокислотные остатки не обязательно будут распознаны и/или расщеплены протеазами. Предпочтительно, упомянутый пептид может быть связан с энзимом при помощи как минимум 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дополнительных аминокислотных остатков. Предпочтительно пептид, слитый на N-конце с энзимом, предпочтительно с эндолизином, аутолизином или бактериоцином, слитого белка в соответствии с заявленным изобретением, кроме того, содержит дополнительные аминокислотные остатки на своем N-конце. Предпочтительно, пептид содержит аминокислоту метионин (Met), или метионин, глицин и серин (Met-Gly-Ser) или аланин, метионин и глицин (Ala-Met-Gly). В другом предпочтительном практическом воплощении заявленного изобретения, пептид связан с N-концом энзима, предпочтительно с эндолизином, аутолизином или бактериоцином, при помощи дополнительных аминокислотных остатков, в частности, глицина и серина (Gly-Ser). В другом предпочтительном варианте, пептид связан с C-концом энзима при помощи дополнительных аминокислотных остатков, в частности глицина и серина (Gly-Ser).

В одном из аспектов заявленного изобретения, пептид с активностью, разрушающей мембрану и/или ЛПС, содержит положительно заряженный пептид, который включает одну или более положительно заряженных аминокислот лизина, аргинина и/или гистидина. Предпочтительно более чем 80%, более предпочтительно более чем 90%, наиболее предпочтительно 100% аминокислот в упомянутом пептиде представляют собой положительно заряженные аминокислоты. Как дополнительное преимущество, катионный пептид расположен на N-конце и/или C-конце слитого белка, тем самым увеличивая

катионность упомянутых белков. В другом практическом воплощении заявленного изобретения катионный пептид слит с энзимом, предпочтительно с эндолизином, аутолизином или бактериоцином длиной как минимум 5, более предпочтительно как минимум 9 аминокислот.

В практическом варианте воплощения заявленного изобретения упомянутый пептид содержит от примерно 3 до примерно 50, более предпочтительно от примерно 5 до примерно 20, например от примерно 5 до примерно 15 аминокислотных остатков и как минимум 20, 30, 40, 50, 60 или 70%, более предпочтительно как минимум 80%, например, как минимум 90% упомянутых аминокислотных остатков представляют собой остатки аргинина или лизина. В другом предпочтительном варианте, упомянутый пептид содержит от примерно 3 до примерно 50, более предпочтительно примерно 5 до примерно 20, например, от примерно 5 до примерно 15 аминокислотных остатков и упомянутые аминокислотные остатки представляют собой остатки аргинина или лизина.

Предпочтительно пептид слитого белка слит с N-концом и/или C-концом энзима, предпочтительно с эндолизином, аутолизином или бактериоцином. В частности, в предпочтительном варианте упомянутый пептид слит только с N-концом энзима, предпочтительно эндолизина, аутолизина или бактериоцина. Тем не менее, также предпочтительны слитые белки с пептидом на обоих N-конце и на C-конце. Упомянутые пептиды на N-конце и на C-конце могут являться одним и тем же пептидом или различными пептидами.

Пептид слитого белка предпочтительно связан ковалентной связью с энзимом. Предпочтительно, упомянутый пептид содержит как минимум 5, более предпочтительно как минимум 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или как минимум 100 аминокислотных остатков. В особенности предпочтителен пептид, содержащий от примерно 5 до примерно 100 аминокислотных остатков, от примерно 5 до примерно 50 или от примерно 5 до примерно 30 аминокислотных остатков. Более предпочтителен пептид, содержащий от примерно 6 до примерно 42 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 39 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 38 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 31 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 25 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 24 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 22 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 21 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 20 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 19 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 16 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 14 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 12 аминокислотных остатков, от примерно 6 до примерно 10 аминокислотных остатков или от примерно 6 до примерно 9 аминокислотных остатков.

В одном из аспектов заявленного изобретения пептид выбирают из группы, состоящей из катионных пептидов, поликатионных пептидов, гидрофобных пептидов, антимикробных пептидов и амфипатичных пептидов.

В одном из аспектов заявленного изобретения пептид представляет собой катионный и/или поликатионный пептид, который содержит один или более положительно заряженных аминокислотных остатков лизина, аргинина и/или гистидина, в частности, остатки лизина и/или аргинина. Предпочтительно, более чем примерно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% аминокислотных остатков в упомянутом пептиде представляют собой положительно заряженные аминокислотные остатки, в частности, остатки лизина и/или аргинина. Наиболее предпочтительны пептиды, состоящие из примерно 100% положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности, остатков аргинина и/или лизина, причем от примерно 60% до примерно 70% упомянутых положительно заряженных аминокислотных остатков представляют собой остатки лизина и от примерно 30% до примерно 40% упомянутых положительно заряженных аминокислотных остатков представляют собой остатки аргинина. Более предпочтителен пептид, состоящий из от примерно 100% положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности остатков аргинина и/или лизина, причем предпочтительно примерно от 64 до примерно 68% упомянутых положительно заряженных аминокислотных остатков представляют собой остатки лизина и от примерно 32 до примерно 36% упомянутых положительно заряженных аминокислотных остатков представляют собой остатки аргинина. Также предпочтительны пептиды, состоящие либо только из аргинина, либо только из лизина.

В особенности предпочтительны катионные и/или поликатионные пептиды, состоящие как минимум из одного мотива в соответствии с SEQ ID NO: 10 (KRKKRK). В частности, катионные пептиды, состоящие из как минимум 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 мотивов в соответствии с SEQ ID NO: 10 (KRKKRK) являются предпочтительными. Более предпочтительны -катионные пептиды, состоящие из как минимум одного KRK мотива (лизин-аргинин-лизин), предпочтительно из как минимум 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 или 33 KRK мотивов.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, пептид является катионным, и содержит, помимо положительно заряженных аминокислотных остатков, в част-

ности остатков лизина и/или аргинина, нейтрально заряженные аминокислотные остатки, в частности из остатков глицина и/или серина. Предпочтительны катионные пептиды, состоящие из примерно от 70 до примерно 100%, или примерно от 80 до примерно 95%, или примерно от 85 до примерно 90% положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности остатков лизина, аргинина и/или гистидина, более предпочтительно остатков лизина и/или аргинина и примерно от 0 до примерно 30%, или примерно от 5 до примерно 20%, или примерно от 10 до примерно 20% нейтрально заряженных аминокислотных остатков, в частности остатков глицина и/или серина. Предпочтительны пептиды, состоящие из примерно от 4 до примерно 8% остатков серина, или примерно от 33 до примерно 36% остатков аргинина и примерно от 56 до примерно 63% остатков лизина. В особенности предпочтительны пептиды, состоящие как минимум из одного мотива в соответствии с SEQ ID NO: 32 (KRXKR), причем X является любой аминокислотой, кроме лизина, аргинина и гистидина. Наиболее предпочтительны пептиды, состоящие как минимум из одного мотива в соответствии с SEQ ID NO: 33 (KRSKR). Наиболее предпочтительны пептиды, состоящие как минимум из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или примерно 20 мотивов в соответствии с SEQ ID NO: 32 (KRXKR) от SEQ ID NO: 33 (KRSKR).

Также предпочтительны пептиды слитого белка, состоящие из примерно от 9 до примерно 16% остатков глицина, из примерно от 4 до примерно 11% остатков серина, или примерно от 26 до примерно 32% остатков аргинина или примерно от 47 до примерно 55% остатков лизина. В особенности предпочтительны пептиды, состоящие как минимум из одного мотива в соответствии с SEQ ID NO: 34 (KRGSG). Наиболее предпочтительны катионные пептиды, состоящие как минимум из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или примерно от 20 мотивов в соответствии с SEQ ID NO: 34 (KRGSG).

В другом варианте предпочтительного воплощения заявленного изобретения, катионный пептид состоит, помимо положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности остатков лизина и/или аргинина, из гидрофобных аминокислотных остатков, в частности остатков валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и глицина, более предпочтительно из остатков аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, и/или триптофана. Предпочтительными являются катионные пептиды, состоящие из примерно от 70 до примерно 100%, или примерно от 80 до примерно 95%, или от примерно 85 до примерно 90% положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности остатков лизина и/или аргинина и от примерно 0 до примерно 30%, или от примерно 5 до примерно 20%, или от примерно 10 до примерно 20% гидрофобных аминокислотных остатков, остатков валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и глицина, более предпочтительно из остатков аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, и/или триптофана.

Наиболее предпочтительными являются пептидные цепочки, выбираемые из группы, состоящей из следующих последовательностей, представленных в табл. 2.

Таблица 2

Пептид	Длина	SEQ ID NO:
KRKKRK	6	SEQ ID NO: 10
KRKKRKKRK	9	SEQ ID NO: 11
RRRRRRRR	9	SEQ ID NO: 12
KKKKKKK	8	SEQ ID NO: 13
KRKKRKKRK	10	SEQ ID NO: 14
KRKKRKKRKKRK	12	SEQ ID NO: 15
KRKKRKKRKKRKKR	14	SEQ ID NO: 16
KKKKKKKKKKKKKKK	16	SEQ ID NO: 17
KRKKRKKRKKRKKRKKRK	19	SEQ ID NO: 18
RRRRRRRRRRRRRRRR	19	SEQ ID NO: 19
KKKKKKKKKKKKKKKKK	19	SEQ ID NO: 20
KRKKRKKRKRKRKKRKKRK	20	SEQ ID NO: 21
KRKKRKKRKRKRKKRKKRK	21	SEQ ID NO: 22
KRKKRKKRKKRKKRKKRK	21	SEQ ID NO: 23
KRKKRKKRKRKRGSGRKKRKKRK	22	SEQ ID NO: 24
KRKKRKKRKRKRGSGRKKRKKRK	24	SEQ ID NO: 25
KRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKK	25	SEQ ID NO: 26
KRKKRKKRKRKRKKRKKRKRKRKKRKKR	31	SEQ ID NO: 27
KRKKRKKRKRKRGSGRKKRKKRKRKRGSGRKKRKKRKKR	38	SEQ ID NO: 28
KRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKKRKKR	39	SEQ ID NO: 29
KRKKRKKRKRKRKRKKRKRKRKRKRKRKRKRKRKRKKR	42	SEQ ID NO: 30

Предпочтительно пептидная цепочка не является меткой, как, например, His-метка, Strep-метка, Avi-метка, Мус-метка, Gst-метка, JS-метка, цистеин-метка, FLAG-метка или прочие метки, известные из уровня техники, и не тиоредоксин- или мальтоза-связывающими протеинами (MCP-MBP). Однако пептидная цепочка и/или модифицированный вариант эндוליзина, в соответствии с заявленным изобретением, могут включать как дополнение такую метку (метки).

В предпочтительном варианте воплощения заявленного изобретения пептид слитого белка выполняет функцию переноса слитого белка согласно заявленному изобретению через внешнюю мембрану

бактерий, но обладает нулевой или минимальной активностью в случае отсутствия слития с эндолизинном, аутолизинном или бактериоцином. Функция переноса слитого белка через внешнюю мембрану грамотрицательных и/или грамположительных бактерий осуществляется благодаря потенциалу внешней мембраны или ЛПС-разрушающей/проникающей активности упомянутого пептида. Данную разрушающую внешнюю мембрану или ЛПС/проникающую активность пептида могут определить следующим методом: обрабатываемые бактериальные клетки культивируют в жидкой среде или чашках с агаровой средой. Затем определяют концентрацию бактериальных клеток в жидкой среде фотометрическим методом при оптической плотности OD600 нм или пересчитывают колонии на чашках с агаровой средой, соответственно. Затем, бактерии в жидкой среде или на чашках обрабатывают слитым белком в соответствии с заявленным изобретением. После инкубирования, определяют концентрацию бактериальных клеток в жидкой среде фотометрическим методом при оптической плотности OD600 нм или повторно пересчитывают колонии на чашках с агаровой средой. Если слитый белок показывает такую разрушающую внешнюю мембрану или ЛПС/проникающую-дестабилизирующую активность, бактериальные клетки подвергаются лизису вследствие обработки слитым белком, и, таким образом, снижается концентрация бактериальных клеток в жидкой среде/число бактериальных колоний на чашке с агаровой средой. Таким образом, снижение концентрации бактериальных клеток в жидкой среде/числа бактериальных колоний на чашке с агаровой средой после обработки слитым белком свидетельствует о наличии разрушающей внешнюю мембрану или ЛПС/проникающей-дестабилизирующей активности слитого белка.

В другом варианте практического воплощения заявленного изобретения, пептид представляет собой антимикробный пептид, обладающий положительным номинальным зарядом и содержащий примерно 50% гидрофобных аминокислот. Антимикробные пептиды являются амфипатичными, с длиной примерно от 12 до примерно 50 аминокислотных остатков. Антимикробные пептиды встречаются в природном виде в насекомых, рыбах, растениях, паукообразных, позвоночных или млекопитающих. Предпочтительно, антимикробный пептид может встречаться в природном виде в редисе, тутовом шелкопряде, тарантуле, лягушке, предпочтительно в лягушках *Xenopus laevis*, *Rana*, более предпочтительно в *Rana catesbeiana*, жабе, предпочтительно в азиатской жабе *Bufo bufo gargarizans*, мухе, предпочтительно в *Drosophila*, более предпочтительно в *Drosophila melanogaster*, в *Aedes aegypti*, в домашних медоносных пчелах, шмелях, предпочтительно в *Bombus pascuorum*, мясной мухе, предпочтительно в *Sarcophaga peregrina*, скорпионе, мечехвосте, зубатке (семе), предпочтительно в *Parasilurus asotus*, корове, свинье, овце, свиноподобных, жвачных животных, обезьяне и человеке.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, антимикробный пептид слитого белка содержит примерно от 0 до примерно 5%, или примерно от 0 до примерно 35%, или примерно от 10 до примерно 35% или примерно от 15 до примерно 45%, или примерно от 20% до примерно 45% положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности остатков лизина и/или аргинина и примерно от 50 до примерно 80%, или примерно от 60 до примерно 80%, или примерно от 55 до примерно 75%, или примерно от 70 до примерно 90% гидрофобных аминокислотных остатков, остатков валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и глицина, более предпочтительно из остатков аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, и/или триптофана.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, антимикробный пептид слитого белка содержит примерно от 4 до примерно 58% положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности остатков лизина и/или аргинина или примерно от 33 до примерно 89% гидрофобных аминокислотных остатков, остатков валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и глицина, более предпочтительно из остатков аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина и/или триптофана.

Примеры антимикробных пептидов слитого белка в соответствии с заявленным изобретением приведены в нижеследующей таблице.

Таблица 3

Пептид	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPVPRTE S	SEQ ID NO:93
SMAP-29	RGLRRLGRKIAHGKVKYGPVLRRIIRIAG	SEQ ID NO:94
Indolicidin	ILPWKWPWWPWRR	SEQ ID NO:95
Protegrin	RGGRLCYCRRRFCVCVGR	SEQ ID NO:96
Cecropin P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGLAIAIQGGPR	SEQ ID NO:97
Magainin	GIGKFLHSKAKFGKAFVGEIMNS	SEQ ID NO:98
Pleurocidin	GWGSFFKAAHVKGKVGKAALTHYL	SEQ ID NO:99
Cecropin A (A.aegypti)	GGLKKGKLEGAGKRVFNAAEKALPVVAGAKA LRK	SEQ ID NO:100
Cecropin A (D. melanogaster)	GWLKKIGKKIERVQHQTRDATIQGLGIPQQAANVA ATARG	SEQ ID NO:101
Buforin II	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	SEQ ID NO:102
Sarcotoxin IA	GWLKKIGKKIERVQHQTRDATIQGLGIAQQAANV AATAR	SEQ ID NO:103
Apidaecin	ANRPVYIPPPRPPHRL	SEQ ID NO:104
Ascaphine 5	GIKDWIKGA AKKLIKTVASHIANQ	SEQ ID NO:105
Nigrocine 2	GLLSKVLGVGKVKVLCGVSLVC	SEQ ID NO:106
Pseudin 1	GLNTLKKVFQGLHEAIKLINNHVQ	SEQ ID NO:107
Ranalexin	FLGGLIVPAMICAVTKKC	SEQ ID NO:108
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	SEQ ID NO:109
Lycotoxin 1	IWLTALKFLGKHA AKKLAQQLSKL	SEQ ID NO: 110
Parasin 1	KGRGKQGGKVR AKTRSS	SEQ ID NO: 111
Buforin I	AGRKQGGKVR AKTRSSRAGLQFPVGRVHRL RKGNY	SEQ ID NO: 112
Dermaseptin 1	ALWKTMLKKGTMALHAGKAALGAAADTISQGT Q	SEQ ID NO: 113
Bactenecin 1	RLCRIVVIRVCR	SEQ ID NO: 114
Thanatin	GSKKPVPIIYCNRRTGKQCRM	SEQ ID NO: 115
Brevinin 1T	VNPIILGVLPKVCLITKKC	SEQ ID NO: 116
Ranateurin 1	SMLSVLKNLGVGLGFVACKINIKQC	SEQ ID NO: 117
Esculentin 1	GIFSKLGRKKIKNLLISGLKNGVKEVGM DVVRTGI KIAGCKIKGEC	SEQ ID NO: 118
Tachyplesin	RWCFRVCYRGICYRKCR	SEQ ID NO: 119
Androctonin	RSVCRQIKCRRRGGCYKCTNRPY	SEQ ID NO: 120
alpha-defensin	DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRWAFCC	SEQ ID NO: 121
beta-defensin	NPVSCVRNKGICVPIRCPGSMKQIGTCVGRAVKCC RKK	SEQ ID NO: 122
theta-defensin	GFCRCLCRRGVCRCICTR	SEQ ID NO: 123
defensin (sapecin A)	ATCDLLSGTGINHSACA AHCLLRGNRGGYCNGKA VCVCRN	SEQ ID NO: 124
Thionin (crabmin)	TTCCPSIVARSNFVNCRIPGTPEAICATYTGCIIPGA TCPGDYAN	SEQ ID NO: 125
defensin from radish	QKLCQRPSGTWVGCGNNAACKNQIRLEKARHG SCNYVFP AHCIYFPC	SEQ ID NO: 126
Drosomycin	DCLSGRYKGPCAVWDNETCRRVCKEEGRSSGHCS PSLKCWCEGC	SEQ ID NO: 127
Hepcidin	DTHFPICIFCCGCHRSKCGMCCKT	SEQ ID NO: 128
Bac 5	RFRPPIRPPIRPPFYPPFRPPIRPPFPPFRPPLGR PFP	SEQ ID NO: 129
PR-39	RRRPRPPYLPRRPPPPFPRLPPRIPPGFPPRFPPRF	SEQ ID NO: 130
Pyrrhocoricin	VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN	SEQ ID NO: 131
Histatin 5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY	SEQ ID NO: 132

Еще в одном аспекте заявленного изобретения пептид представляет собой sushi пептид, описанный в публикации Ding JL, Li P, Ho B Cell Mol Life Sci. 2008 Apr;65(7-8):1202-19. The Sushi peptides: structural characterization and mode of action against Gram-negative bacteria. Особенно предпочтительным является sushi 1 пептид в соответствии с SEQ ID NO: 32.

Предпочтительные sushi пептиды - это sushi пептиды S1 и S3 и их производные; FASEB J. 2000 Sep; 14(12): 1801-13.

Еще в одном аспекте заявленного изобретения, пептид представляет собой гидрофобный пептид, который содержит как минимум 90% гидрофобных аминокислотных остатков валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и глицина. В наиболее предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, гидрофобный пептид слитого белка состоит из примерно от 90 до примерно 95%, или примерно

от 90 до примерно 100%, или примерно от 95 до примерно 100% гидрофобных аминокислотных остатков аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, и/или триптофана.

Предпочтительными гидрофобными пептидами слитого белка являются Walmaghl с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 134 и гидрофобный пептид слитого белка с аминокислотной последовательностью Phe-Phe-Val-Ala-Pro (SEQ ID NO: 135).

В одном из аспектов заявленного изобретения, пептид представляет собой амфипатичный пептид, который содержит один или более положительно заряженных аминокислотных остатков лизина, аргинина и/или гистидина, в сочетании с одним или более гидрофобными аминокислотными остатками валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и/или глицина. Боковые цепи аминокислотных остатков предпочтительно ориентированы с учетом того, что катионные и гидрофобные поверхности упорядочены в кластеры на противоположных сторонах пептида. Предпочтительно, более, чем примерно 30, 40, 50, 60 или 70% аминокислотных остатков в упомянутом пептиде являются положительно заряженными аминокислотами. Предпочтительно, более, чем примерно 30, 40, 50, 60 или 70%, аминокислотных остатков в упомянутом пептиде являются гидрофобными аминокислотными остатками. Предпочтительно амфипатичный пептид слист с N-концом и/или C-концом энзима, обладающего способностью разрушать клеточную стенку, повышая таким образом амфипатичность упомянутых белков.

В другом варианте практического воплощения заявленного изобретения, пептид является амфипатичным пептидом, содержащим как минимум 5, более предпочтительно как минимум 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте практического воплощения, как минимум примерно 30, 40, 50, 60 или 70% упомянутых аминокислотных остатков амфипатичного пептида являются остатками либо аргинина, либо лизина и/или как минимум 30, 40, 50, 60 или 70% упомянутых аминокислотных остатков амфипатичного пептида являются остатками гидрофобных аминокислот валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и/или глицина.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, пептид представляет собой амфипатичный пептид, который содержит помимо положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности, остатков лизина и/или аргинина, также гидрофобные аминокислотные остатки валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и/или глицина, более предпочтительно остатки аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, и/или триптофана. Предпочтительны амфипатичные пептиды, содержащие примерно от 10 до примерно 50%, или примерно от 20 до примерно 50%, или примерно от 30 до примерно 45% или примерно от 5 до примерно 30% положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности остатков лизина и/или аргинина и примерно от 50 до примерно 85%, или примерно от 50 до примерно 90%, или примерно от 55 до примерно 90%, или примерно от 60 до примерно 90%, или примерно от 65 до примерно 90% гидрофобных аминокислотных остатков, остатков валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и глицина, более предпочтительно остатков аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина и триптофана. В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, амфипатичные пептиды содержат от 12 до примерно 50% положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности, остатков лизина и/или аргинина и примерно от 50 до примерно 85% гидрофобных аминокислотных остатков, остатков валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, цистеина, аланина, тирозина, гистидина, треонина, серина, пролина и глицина, более предпочтительно остатков аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина и/или триптофана.

Предпочтительными амфипатичными пептидами слитого белка являются  $\alpha$ 4-спираль T4 лизосомы в соответствии с SEQ ID NO: 136 и WLBU2-Variant с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 137 и Walmagh 2 в соответствии с SEQ ID NO: 138.

В предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, слитый белок состоит из пептида в соответствии с SEQ ID NO: 10 до 30, 32 до 34 и 93 до 138 и эндолизин в соответствии с SEQ ID NO: 1 до 9, 84 до 86 и 88 до 92 или бактериоцина в соответствии с SEQ ID NO: 87. В предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, слитый белок содержит пептид, выбираемый из группы пептидов в соответствии с SEQ ID NO: 10 до 30, 32 до 34 и 93 до 138 и эндолизин, выбираемый из группы эндолизинов в соответствии с SEQ ID NO: 1 до 9, 84 до 86 и 88 до 92 или бактериоцин в соответствии с SEQ ID NO: 87.

Особенно предпочтительными являются слитые белки, выбираемые из группы, состоящей из следующих слитых белков, представленных в табл. 4.

Таблица 4

Слитый белок	SEQ ID NO: (слитый белок)	Эндолизинная/бактериоциновая составляющая	Пептид (N-концевой, если не указано иначе)
POLY-gp144	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11
(POLY) <sup>2</sup> -gp144	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 21
(POLY) <sup>3</sup> -gp144	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 27
(POLY) <sup>4</sup> -gp144	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 30
POLY-gp188	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 11
(POLY) <sup>2</sup> -gp188	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 21
(POLY) <sup>3</sup> -gp188	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 27
(POLY) <sup>4</sup> -gp188	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 30
pKKZ144pET32b	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 14
KRK_6_pET32b	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 10
KRK_12_pET32b	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 15
KRK_14_pET32b	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 16
R9_pET32b	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 12
K8_pET32b	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 13
pK2KZ144_pET32b_mod3	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 28
PKPSP3gp10	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 11
PKP2gp09	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 11
PKOBPgpLYS	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 11
pK2KZ144pET32b	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 22
pK3KZ144pET32b	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 27
pK4KZ144pET32b	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 30
KRK_19_pET32b	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 18
KRK_21_pET32b	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 23

KRK_25_pET32b	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 26
KRK_39_pET32b	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 29
K19_pET32b	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 20
K16_pET32b	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 17
pKKZ-144_K2_pET32b	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 1	N-конец: SEQ ID NO: 11 С-конец: SEQ ID NO: 21
pK2KZ144_pET32b_mod1	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 24
pK2KZ144_pET32b_mod2	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 25
smi01_KRK9	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 11
smi02_KRK9	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 11
smi03_KRK9	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 11
smi04_KRK9	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 11
SMAP-29-KZ144	SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 94
Ply2638-PK	SEQ ID NO: 140	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 11
Pentapeptid-Ply511	SEQ ID NO: 141	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 135
PK-Lysostaphin	SEQ ID NO: 142	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 11

Слитые белки в соответствии с заявленным изобретением, и, в частности, наиболее предпочтительные слитые белки в соответствии с SEQ ID NO: 35 до 49, 53, 57, 61 до 64, 66 до 78 и 139 до 142 могут дополнительно содержать метионин на N-конце.

Слитые белки в соответствии с заявленным изобретением, и, в частности, наиболее предпочтительные слитые белки в соответствии с SEQ ID NO: 35 до 49, 53, 57, 61 до 64, 66 до 78 и 139 до 142 могут дополнительно включать метку, например, для очищения. Предпочтительной является His<sub>6</sub>-метка, предпочтительно на С-конце слитого белка. Упомянутую метку можно связать со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков, например, вследствие клонирования. Предпочтительно упомянутую метку можно связать со слитым белком при помощи как минимум 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дополнительных аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте воплощения заявленного изобретения, слитый белок включает His<sub>6</sub>-метку, в своем С-конце, связанную со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков лизина и глицина (Lys-Gly) или лейцина и глутаминовой кислоты (Leu-Glu). Предпочтительно упомянутые дополнительные аминокислотные остатки не распознаются или расщепляются протеазами. В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, слитый белок включает His<sub>6</sub>-метку, на своем N-конце, связанную со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков лизина и глицина (Lys-Gly) или лейцина и глутаминовой кислоты (Leu-Glu). В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок включает His<sub>6</sub>-метку, на своем N- и С-концах, связанную с энзимом, предпочтительно с эндолизином, аутолизином или бактериоцином, при помощи дополнительных аминокислотных остатков лизина и глицина (Lys-Gly) или лейцина и глутаминовой кислоты (Leu-Glu).

В частности, предпочтительными являются слитые белки, применяемые согласно приведенным ниже примерам. Слитые белки в соответствии с SEQ ID NO: 35 до 42, 53, 57 и 61, применяемые согласно приведенным ниже примерам, содержат His<sub>6</sub>-метку на С-конце, связанную со слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков лизина и глицина (Lys-Gly). Слитый белок в соответствии с SEQ ID NO: 43 до 49, 75, 139, 141 и 142, применяемые согласно приведенным ниже примерам, содер-

жат His<sub>6</sub>-метку на С-конце, связанную с соответствующим слитым белком при помощи дополнительных аминокислотных остатков лейцина и глутаминовой кислоты (Leu-Glu).

Слитые белки получают построением путем связывания как минимум двух последовательностей нуклеиновой кислоты, с использованием стандартных методов клонирования в соответствии с Sambrook et al. 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Такой белок можно получить, например, в системах экспрессии рекомбинантных ДНК. Подобные слитые белки в соответствии с заявленным изобретением можно получать путем слияния нуклеиновых кислот для эндолизина, аутолизина или бактериоцина и соответствующего пептида.

Поскольку некоторые слитые белки могут либо проявлять токсичность после экспрессии в бактериальных клетках, либо терять гомогенность вследствие деградации белка, стратегическим выходом из сложившейся дилеммы была бы экспрессия данных слитых белков, в слиянии или соединении с другими белками. Примером такого прочего дополнительного белка является тиоредоксин, который показал способность опосредовать экспрессию токсичных антимикробных пептидов в клетках *E. coli* (TrxA mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from multiple joined genes in *Escherichia coli*. Zhou L, Zhao Z, Li B, Cai Y, Zhang S. *Protein Expr Purif.* 2009 Apr; 64(2): 225-230).

Для повышения антимикробной активности слитых белков может возникнуть необходимость удаления дополнительного слитого белка путем электролитического расщепления. С этой целью применяют имеющиеся в продаже наборы, например, системы экспрессии pET32 (Novagen), для модификации N-конца слитого белка, в зависимости от используемой протеазы, например, MGS до AMGS (SEQ ID NO: 31), при этом присутствие имеющихся остатков аланина связано с введением сайта расщепления энтерокиназы.

В еще одном предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, пептиды слитого белка в соответствии с заявленным изобретением, содержат модификации и/или изменения аминокислотных последовательностей. Такие изменения и/или модификации могут содержать мутации, как, например, делеции, инсерции и добавления, субституции или сочетания вышеупомянутых и/или химические изменения аминокислотных остатков, например биотинилирование, ацетилирование, пегилирование, химические изменения amino-, SH- или карбоксигрупп.

Помимо вышеописанного заявленное изобретение относится к способам устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок с использованием изолированной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением. Заявленное изобретение также относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с заявленным изобретением. Упомянутый вектор может быть применим в конститутивной или индуцируемой экспрессии упомянутого слитого белка в соответствии с заявленным изобретением.

Слитые белки могут получать из микроорганизма, как, например, генетически модифицированная приемлемая клетка-хозяин, которая экспрессирует упомянутые слитые белки. Упомянутая клетка-хозяин может представлять собой микроорганизм, как, например, бактерия или дрожжевая клетка, или клетка животного, например, млекопитающего, в частности, человека. В одном из вариантов практического воплощения заявленного изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку *Pichia pastoris*. Клетку-хозяина могут выбирать вследствие чисто биологических параметров, например, выход, растворимость, затраты, и пр., но также и по медицинских параметрам, например, непатогенные бактерии или дрожжи, клетки организма человека.

В еще одном аспекте заявленное изобретение относится к способам устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок с использованием композиции, предпочтительно фармацевтической композиции, содержащей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением и/или хозяин, трансформированный с использованием молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок в соответствии с заявленным изобретением.

В предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения, способы устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок с использованием композиции, дополнительно содержащей агенты, пермеабилизирующие внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий, как, например, хелаты металлов, как-то ЭДТК, ТРИС, молочная кислота, лактоферрин, полимиксин, лимонная кислота и/или другие вещества, как описано в публикации Vaara (*Agents that increase the permeability of the outer membrane.* Vaara M. *Microbiol. Rev.* 1992 Sep; 56 (3): 395-441). Предпочтительными также являются композиции, содержащие сочетания вышеупомянутых пермеабилизирующих агентов. Особенно предпочтительной является композиция, содержащая от примерно 10 мкМ до примерно 100 мМ ЭДТК, более предпочтительно от примерно 50 мкМ до примерно 10 мМ ЭДТК, более предпочтительно от примерно 0,5 мМ до примерно 10 мМ ЭДТК, более предпочтительно от примерно 0,5 мМ до примерно 2 мМ ЭДТК, более предпочтительно от примерно 0,5 мМ до 1 мМ ЭДТК. Тем не менее, предпочтительными также являются композиции, содержащие от примерно 10 мкМ до примерно 0,5 мМ ЭДТК. Также предпочтительной является композиция, содержащая от примерно 0,5 до примерно 2 мМ ЭДТК, более предпочтительно примерно 1 мМ ЭДТК и дополнительно от примерно 10 до примерно 100 мМ ТРИС.

Заявленное изобретение также относится к способам устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок с использованием слитого белка в соответствии с заявленным изобретением и/или хозяину, трансформированному с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок в соответствии с заявленным изобретением для применения в качестве лекарственного препарата.

В другом аспекте заявленное изобретение относится к применению слитого белка в соответствии с заявленным изобретением и/или хозяину, трансформированному с использованием вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок в соответствии с заявленным изобретением для устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок, применения в производстве лекарственного препарата для лечения и/или профилактики расстройств, заболеваний и прочих дисфункций, ассоциируемых с грамотрицательными бактериями. Предпочтительным является применение, при котором бактерии, образующие биопленку, вызывают расстройства, заболевания и пр. дисфункции, которые ухудшают здоровье растений, животных и/или человека. Предпочтительным является применение, при котором бактерии, образующие биопленку, могут являться грамотрицательными бактериями, бактериальными группами, семействами, родами или видами, содержащими штаммы, патогенные для человека или животных, а именно Enterobacteriaceae (*Escherichia*, в особенности *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, в особенности *K. pneumoniae*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Yersinia*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*, в особенности *P. aeruginosa*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella*, *Sphingomonas*, *Comamonas*), *Neisseria*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Brucella*, *Francisella*, *Bordetella*, *Legionella*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Gardnerella*, *Spirochaetaceae* (*Treponema* and *Borrelia*), *Leptospiraceae*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Spirillum*, *Streptobacillus*, *Bacteroidaceae* (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*), *Acinetobacter*, в особенности *A. baumannii*. Предпочтительно, упомянутые расстройство, заболевание или дисфункция могут быть вызваны *Pseudomonas*, в особенности *Pseudomonas aeruginosa* и/или *Pseudomonas putida*, *Burkholderia*, в особенности *Burkholderia pseudomallei* и/или *Burkholderia solanacearum*, *Salmonella*, в особенности *Salmonella typhimurium* и/или *Salmonella Enteritidis*, *Acinetobacter*, в особенности *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* и/или *Klebsiella*, в особенности *Klebsiella pneumoniae*. В частности, лечение и/или профилактика расстройства, заболевания или дисфункции, которые могут быть вызваны грамположительными бактериями, бактериальными группами, семействами, родами или видами, содержащими штаммы, патогенные для человека или животных, а именно *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus equi*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Propionibacterium acnes*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Actinomyces*. В расширенном аспекте заявленное изобретение относится к способу лечения дисфункций, заболеваний или симптоматики, связанных с бактериальной биопленкой, при наличии достаточных показаний, причем данный способ включает введение или прием эффективной дозы слитого белка в соответствии с заявленным изобретением, и/или эффективной дозы хозяина, трансформированного с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок в соответствии с заявленным изобретением или композицией в соответствии с заявленным изобретением. Организм, нуждающийся в лечении, может быть организмом человека или животного.

Предпочтительно упомянутый способ лечения представляет собой лечение и/или профилактику инфекций, вызванных грамотрицательными и/или грамположительными бактериями, в частности вышеупомянутыми грамотрицательными и грамположительными бактериями. В частности, упомянутый способ лечения представляет собой лечение и/или профилактику инфекций кожи, мягких тканей, дыхательной системы, легких, пищеварительного тракта, глаз, ушей, зубов, носоглотки, ротовой полости, костной и мочеполовой систем, раневых поверхностей при бактериемии и/или эндокардите, вызванных, в частности, вышеупомянутыми грамотрицательными и грамположительными бактериями.

Дозировка и путь введения, используемые в способе лечения (или профилактики) в соответствии с заявленным изобретением, зависят от специфики заболевания/места локализации инфекции. Путь введения может, например, быть пероральный, локальный, носоглоточный, парентеральный, ингаляционный, внутривенный, внутримышечный, интратекальный (субарахноидальный), интраспинальный, эндобронхиальный, интрапульмональный, внутрикостный, интракардиальный, внутрисуставной, ректальный, вагинальный или любой другой путь введения. В предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения слитый белок наносят местно на биологический материал, предпочтительно на кожу, в частности, млекопитающих, предпочтительно человека. Предпочтительно слитый белок наносят системно на биологический материал, предпочтительно в кровь, в частности, млекопитающих, предпочтительно человека.

Для введения слитого белка в соответствии с заявленным изобретением и/или эффективной дозы хозяина, трансформированного с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную цепочку, кодирующую слитый белок в соответствии с заявленным изобретением или композицию в соот-

ветствии с заявленным изобретением, в очаги инфекции (или в места, где присутствует потенциальная вероятность заражения), применяют такую форму упаковки, которая защищает активные компоненты от воздействий внешних факторов, таких как протеазы, окисление, иммунный ответ и т.п., вплоть до достижения ими очага инфекции. Следовательно, лекарственная форма может представлять собой капсулу, драже, таблетку, порошок, суппозиторий, эмульсию, гель, лосьон, крем, мазь, инъекционный раствор, сироп, спрей, состав для ингаляций или любую другую приемлемую по медицинским показаниям упаковку. Предпочтительно фармацевтическая композиция может содержать подобранные носители, стабилизаторы, красители, буферы или другие подходящие реагенты. Например, для местного нанесения лекарственная форма может представлять собой лосьон, крем, гель, мазь или пластырь, для назофарингального применения - физраствор для интраназального нанесения при помощи спрея. Для перорального применения с целью лечения и/или профилактики очага инфекции, к примеру, во внутренних органах, возникает необходимость в дополнительной защите слитого белка в соответствии с заявленным изобретением от агрессивного воздействия среды желудочно-кишечного тракта вплоть до проникновения в очаг инфекции. Таким образом, при пероральном введении в очаг инфекции во внутренних органах требуется использование бактерии как носителя, который преодолевает начальные стадии пищеварения в желудке и только после этого секретируется на слитый белок в соответствии с заявленным изобретением.

В узконаправленном варианте практического воплощения заявленное изобретение также относится к использованию слитого белка в соответствии с заявленным изобретением и/или хозяина, трансформированного с использованием вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью, кодирующей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением в производстве лекарственного препарата для лечения и/или профилактики расстройств, заболеваний и прочих дисфункций, вызванных грамотрицательными и/или грамположительными бактериями, ассоциируемых с образованием бактериальных биопленок. Предпочтительным является применение слитого белка в соответствии с заявленным изобретением в производстве лекарственного препарата для лечения и/или профилактики расстройств, заболеваний и прочих дисфункций, вызванных грамотрицательными и/или грамположительными бактериями, ассоциируемых с образованием бактериальных биопленок, в сочетании или в дополнение к антибиотикам.

В одном из вариантов практического воплощения заявленное изобретение также относится к использованию слитого белка в соответствии с заявленным изобретением и/или хозяина, трансформированного с использованием вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью, кодирующей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением в производстве лекарственного препарата для лечения и/или профилактики расстройств, заболеваний и прочих дисфункций, вызванных *Pseudomonas*, ассоциируемых с образованием бактериальных биопленок, в особенности *Pseudomonas aeruginosa*, в частности, поражения внутренних органов, в частности у грудных младенцев, инфекционные менингиты, например геморрагический менингит, инфекции среднего уха, кожного покрова (*Ecthyma gangraenosum*), в частности ожоги, мочеполового тракта, риниты, бактериальные пневмонии, в частности, при которых пациент страдает от кистозного фиброза (муковисцидоза) или гематологических осложнений, например, при лейкемии, при развитии нейтропении в период проведения иммунодепрессивной терапии, септицемии, в особенности вследствие длительной внутривенной или мочевого катетеризации, полостных хирургических операций и тяжелых ожоговых поражений, эндокардита, в частности, при котором пациент находится на внутривенном катетерном введении лекарственных препаратов, или пациент с осложнениями после открытого хирургического вмешательства на сердце, при тяжелых инфекциях глаз, в частности после использования зараженных офтальмологических растворов или тяжелых ожоговых поражений лица, остеохондроза, в частности вследствие тяжелых травм или колотых ран с входным отверстием сквозь грязную одежду.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Burkholderia pseudomallei*, в особенности болезнь Уитмора, хроническая пневмония, септицемия, в частности, при которой у пациента наблюдается травматическое поражение кожного покрова. В другом узконаправленном практическом воплощении заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Salmonella thuyphimurium* и *Salmonella enteritidis*, в особенности острые гастроэнтериты и локальные гнойные процессы, в частности остеомиелит, эндокардит, холецистит и особенно менингит, вызванный бактериями *Salmonella thuyphimurium*, при котором возраст пациента менее 2 лет. В другом узконаправленном практическом воплощении заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Acinetobacter baumannii*, в частности бронхит, пневмония, раневые инфекции и септицемия, в особенности вследствие внутривенной катетеризации. В другом узконаправленном практическом воплощении заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Escherichia coli*, в особенности экстраинтестинальные инфекции, в частности аппендицит, гнойный холецистит, перитонит, гнойный менингит и инфекции мочеполового тракта, интраинтестинальные инфекции, вызванные бактериями *E. coli*, в частности эпидемический энтерит, а также инфекционные заболевания, подобные дизентерии, септицемия, энтеротоксемия, мастит и дизентерия. В другом узконаправленном практическом воплощении заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптомати-

ка вызваны бактериями *Klebsiella pneumoniae*, в частности пневмония, бактериемия, менингит и инфекции мочеполового тракта. В узконаправленном варианте практического воплощения, заявленное изобретение также относится к использованию слитого белка в соответствии с заявленным изобретением и/или хозяина, трансформированного с использованием вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью, кодирующей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением в производстве лекарственного препарата для лечения и/или профилактики расстройств, заболеваний и прочих дисфункций, вызванных *Listeria monocytogenes*, в особенности *Granulomatosis infantiseptica* (листериоз новорожденных), мононуклеоз, конъюнктивит, менингит, септический гранулематоз и листериоз беременных. В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Staphylococcus aureus*, в частности инфекции кожи, как, например, пиодермия, в частности, фолликулит, фурункулез, карбункулез, воспаления потовых желез и пемфигус (пузырчатка) и синдром чешуйчатой кожи. Синдром чешуйчатой кожи может наблюдаться в трех случаях клинического проявления: при эксфолиативном дерматите, буллезном импетиго и скарлатиноподобной эритродермии. Помимо этого дисфункция, заболевание или симптоматика, вызываемые *Staphylococcus aureus* являются *Staphylococcus pneumoniae*, госпитализмом (внутрибольничными инфекциями), в частности инфекциями хирургических ран, маститом, энтероколитом, и пищевыми отравлениями. В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Streptococcus pyogenes*, в частности тонзиллит, фарингит, скарлатина, рожистое воспаление, ревматическая лихорадка и острый гломерулонефрит. В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Streptococcus pneumoniae*, в частности пневмония, ползучая язва роговицы, отит среднего уха, менингит, перитонит, мастоидит и остеомиелит.

В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Clostridium perfringens*, в частности газовая гангрена, некротически-язвенный энтерит и пищевые отравления. В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Clostridium botulinum*, в частности ботулизм. В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Clostridium difficile*, в частности псевдомембранозный энтероколит. В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Bacillus anthracis*, в частности злокачественные (сибиреязвенные) пустулы, легочная форма сибирской язвы и желудочно-кишечная форма сибирской язвы. В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Enterococcus faecalis* или *E. faecium*, как, например, нозокомиальные инфекции и эндокардит. В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Bacillus cereus*, в частности пищевые отравления, бронхиальная пневмония, септицемия и менингит. В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis*, в частности туберкулез. В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Mycoplasma pneumoniae*, в частности пневмония, заболевания верхних дыхательных путей и воспаления среднего уха (барабанной перепонки). В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Actinomyces*, в частности актиномикоз у человека, домашнего скота, кошек и собак. В другом специализированном варианте практического воплощения заявленного изобретения, дисфункция, заболевание или симптоматика вызваны бактериями *Corynebacterium diphtheriae*, в частности локализованная форма дифтерии гланд, носа, носоглотки или среднего уха, прогрессирующая форма дифтерии гортани, трахеи и бронхов, токсическая или злокачественная форма дифтерии, дифтерия кожи и ран.

Способы устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок с использованием слитых белков в соответствии с заявленным изобретением предоставляют возможность нарушения целостности (проникновения) бактериальных биопленок с целью устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок.

Способы устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок с использованием слитых белков в соответствии с заявленным изобретением могут применяться в лечении и/или профилактике следующих инфекций: раневые инфекции, в частности при сахарном диабете, ангине, остеомиелите, бактериальном эндокардите, синусите, инфекциях роговицы, мочевыделительного тракта, инфекциях билиарного тракта, инфекционные почечные камни, уретрит, простатит, инфекции, связанные с катетеризацией, инфекции среднего уха, образование зубного налета, гингивит, периодонтит, муковисцидоз и инфекции, вызванные использованием постоянных вживленных предметов, как, например, сус-тавные протезы и сердечные клапаны.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения способы устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок при помощи слитых белков в соответствии с заявленным изобретением могут применяться для лечения и/или профилактики инфекций, вызванных присутствием инородных примесей, как, например, загрязнения и заселения бактериями катетеров, имплантатов и медицинских приборов, в частности, инструментов, аппаратов, эндоскопов, стоматологических установок, диализного оборудования, например, катетеры перитонеального диализа, кардиостимуляторы, эндотрахеальные трубки, голосовые протезы, шунты для обеспечения оттока спинномозговой жидкости, венозные катетеры, искусственные клапаны сердца и суставные протезы.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения, способы устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок при помощи слитых белков в соответствии с заявленным изобретением применяют в отношении бактериальной биопленки, образуемой *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения способы устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок при помощи слитых белков в соответствии с заявленным изобретением могут применяться для предотвращения или удаления загрязнений бактериями в учреждениях и на предприятиях здравоохранения, в сельском хозяйстве, в различных промышленных установках и инфраструктуре, в частности, в водопроводных трубах в больницах, водных системах, водопроводе, вентиляционных системах, системах обогрева и воздушного кондиционирования зданий, маслосборниках, производстве косметики и лекарственных препаратов.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения способы устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок при помощи слитых белков в соответствии с заявленным изобретением, могут применяться для предотвращения биокоррозии, в частности, в охлаждающих системах, водоочистных станциях, местных системах горячего водоснабжения, электростанциях, промышленном оборудовании и механизмах в автомобилестроении, производстве компьютеров, лакокрасочной, нефте- и газоперерабатывающей промышленности.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения, способы устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок при помощи слитых белков в соответствии с заявленным изобретением могут применяться для предотвращения биологического загрязнения, в частности, на подводных судах, морских судах, платформах, буях, сенсорных системах научно-исследовательского назначения или слежения в ВСМ и гражданской мореходстве.

Предпочтительно слитый белок в соответствии с заявленным изобретением используется как компонент терапии или профилактики, в случае, если инфекция вызвана мультирезистентными бактериальными штаммами, ассоциируемыми с бактериальными биопленками, в частности, штаммами, устойчивыми к одному или более из следующей группы антибиотиков: стрептомицин, тетрациклин, цефалотин, гентамицин, цефатоксин, цефалоспорин, цефтазидим или имипенем.

Кроме этого, способы применения слитого белка в соответствии с заявленным изобретением, предпочтительно, варианта эндолизина, варианта аутолизина или варианта бактериоцина, могут включать применение, добавление или введение в качестве компонента терапии в сочетании или добавлении к традиционным антибактериальным препаратам, таким как антибиотики, лантибиотики, бактериоцины или эндолизины и т.п. В другом предпочтительном варианте практического воплощения заявленного изобретения антибиотики применяют, добавляют или вводят согласно способам и методам применения в соответствии с заявленным изобретением, одновременно со слитым белком, до или после введения или добавления слитого белка.

В предпочтительном варианте практического воплощения слитый белок могут применять или вводить в сочетании как минимум с одним из следующих антибиотиков:  $\beta$ -лактамы, аминогликозиды, фторхинолоны, макролиды, новобиоцин, рифампицин, оксазолидиноны, фусидовая кислота, мупироцин, плевромутилин, даптомицин, ванкомицин, тетрациклины, сульфонамиды, хлорамфеникол, триметоприм, фосфомицин, циклозерин и полимиксин.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения слитый белок могут применять в способах устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок *Staphylococcus aureus* путем введения в сочетании как минимум с одним из следующих антибиотиков:  $\beta$ -лактамы, аминогликозиды, фторхинолоны, макролиды, новобиоцин, рифампицин, оксазолидиноны, фусидовая кислота, мупироцин, плевромутилин, даптомицин, ванкомицин, тетрациклины, сульфонамиды, хлорамфеникол, триметоприм, фосфомицин и циклозерин.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения, слитый белок могут применять в способах устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок *Escherichia coli* путем введения в сочетании как минимум с одним из следующих антибиотиков:  $\beta$ -лактамы, аминогликозиды, фторхинолоны, тетрациклины, сульфонамиды, хлорамфеникол, триметоприм, фосфомицин, циклозерин и полимиксин.

В другом предпочтительном варианте практического воплощения слитый белок могут применять в способах устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок *Pseudomonas aeruginosa*.

поса путем введения в сочетании как минимум с одним из следующих антибиотиков:  $\beta$ -лактамы, аминокликозиды, фторхинолоны и полимиксин.

Заявленное изобретение также относится к фармацевтическому препарату для устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок в упаковке, содержащей одно или более отделений, причем как минимум одно отделение содержит один или более слитых белков в соответствии с заявленным изобретением и/или один или более хозяинов, трансформированных с использованием нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью, кодирующей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением, или композицию в соответствии с заявленным изобретением.

В другом аспекте практической реализации заявленное изобретение относится к процессу приготовления фармацевтической композиции для устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок, причем данный процесс включает добавление путем смешивания одного или более слитых белков в соответствии с заявленным изобретением и/или одного или более хозяев, трансформированных с использованием нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью, кодирующей слитый белок в соответствии с заявленным изобретением, с фармацевтически приемлемым растворителем, эксципиентом или носителем.

В более расширенном аспекте композиция в соответствии с заявленным изобретением представляет собой косметическую композицию для устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок. Некоторые виды бактерий могут вызывать раздражение на открытых участках тела пациента, например, на кожном покрове. Для предотвращения появления таких раздражений кожного покрова или вероятного патогенного влияния упомянутых бактериальных организмов, представляется возможным применение специальных косметических составов, которые содержат достаточное количество слитого белка в соответствии с заявленным изобретением для разрушения уже размножившихся или потенциально опасных очагов инфекции, вызванных грамотрицательными и/или грамположительными бактериями.

В расширенном аспекте заявленное изобретение относится к применению слитого белка в соответствии с заявленным изобретением в качестве средства диагностики в здравоохранении, пищевой и природоохранной промышленности, в частности в качестве средства диагностики для диагностирования бактериальных инфекций, вызванных в частности грамотрицательными и/или грамположительными бактериями бактериальных биопленок. Слитый белок в соответствии с заявленным изобретением можно применять в качестве инструмента направленного разрушения патогенных бактерий, в особенности грамотрицательных и/или грамположительных патогенных бактерий. Разрушению бактериальных стенок слитым белком в соответствии с заявленным изобретением можно способствовать путем добавления детергентов, как например Triton X-100 или других добавок, которые ослабляют клеточную защиту бактерий, например, полимиксин В.

Специально направленное разрушение клеток необходимо как начальный этап последующего направленного уничтожения бактерий с использованием НК-методов, как например, полимеразная цепная реакция (ПЦР), гибридизация нуклеиновой кислоты или амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот, иммунобиологических методов, например, IMS, иммунофлюоресценции или анализ ELISA, или методов, основанных на распознавании клеточного материала бактерий, например, энзим-анализы с использованием протеинов, чувствительных к определенным группам или видам бактерий (например,  $\beta$ -галактозидаза для энтеробактерий, коагулаза для коагулаз-позитивных штаммов).

В еще одном аспекте практического воплощения, заявленное изобретение относится к применению слитого белка в соответствии с заявленным изобретением для устранения, уменьшения или предотвращения загрязнения грамотрицательными и/или грамположительными бактериями, вызванного присутствием бактериальных биопленок в пищевых продуктах, на оборудовании и помещениях на предприятиях пищевой промышленности, поверхностях (например, стеллажи и места хранения), контактирующих с пищевыми продуктами, и в прочих случаях, когда патогенные, условно патогенные или прочие нежелательные бактерии могут потенциально заразить питательные вещества или медицинское оборудование и все виды поверхностей в медицинских стационарах и хирургических блоках.

В частности, слитый белок в соответствии с заявленным изобретением могут применять в способах устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок, на профилактической основе в качестве дезинфицирующего агента. Упомянутый дезинфицирующий агент могут применять до или после хирургического вмешательства или, например, во время гемодиализа. Помимо этого терапия недоношенных детей и пациентов с ослабленным иммунитетом или пациентов с протезными устройствами, может включать слитые белки в соответствии с заявленным изобретением. Упомянутую терапию могут проводить либо на профилактической основе, либо как часть лечения в острой фазе заболевания. В этом же смысле внутрибольничные инфекции, в особенности, вызванные резистентными к антибиотикам штаммами, например, *Pseudomonas aeruginosa* (FQRP), акинетобактерии и энтеробактерии, как например *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* и *Yersinia*; метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus*, *Vancomycin-resistant Enterococcus faecalis*, *Vancomycin-resistant Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Propionibacterium acnes*, *multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis*, могут лечить на профилактической основе или

в острой фазе заболевания, с применением слитого белка в соответствии с заявленным изобретением. Таким образом, слитый белок в соответствии с заявленным изобретением могут применять в качестве дезинфектанта для устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок также в сочетании с другими ингредиентами в составе дезинфицирующего раствора, как, например, детергенты, поверхностно-активные вещества, растворители, антибиотики, лангибиотики или бактериоцины.

Применение слитого белка в соответствии с заявленным изобретением для устранения, уменьшения или предотвращения бактериальных биопленок в качестве дезинфицирующего средства, например, в клиниках, стоматологических и ветеринарных кабинетах, кухне или ванной комнате, могут сопровождать приготовлением состава, содержащего упомянутый слитый белок, в виде жидкости, порошка, геля, или ингредиента дезинфицирующих салфеток или простыней. В данный состав можно дополнительно включить подходящий носитель, добавки, растворители и/или эксципиенты для различных способов применения, а также агенты, которые способствуют повышению антимикробной активности, такие, как, например, ЭДТК или агенты, повышающие антимикробную активность слитых белков. Слитый белок можно использовать с традиционными дезинфицирующими агентами, такими, как например, этиловые спирты, альдегиды, окислители, фенолы, четвертичные аммониевые соединения или УФ-излучение. Для дезинфекции, например, поверхностей, объектов и/или приборов, слитый белок могут нанести на указанные поверхности, объекты и/или приборы. Нанесение можно осуществлять при помощи мягкой ткани, смоченной в дезинфицирующем составе, нанесенном при помощи спрея или окунания. Слитые белки могут применять в различных концентрациях, в зависимости от соответствующего способа нанесения и времени воздействия для достижения эффекта полного обеззараживания.

В дополнительном аспекте, заявленное изобретение относится к применению слитого белка в соответствии с заявленным изобретением в качестве консерванта (пищевой добавки).

Далее по тексту описания заявленного изобретения следует расширенное описание применимости заявленного изобретения; тем не менее, следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, при том, что таковые служат исключительно цели продемонстрировать примеры практического воплощения заявленного изобретения, не носят ограничительный характер, поскольку различные изменения и модификации, не выходящие за рамки цели и задач изобретения, понятны специалистам в данной области техники. Необходимо понимать, что как описание, так и примеры носят иллюстративный характер и не являются ограничительными касательно сути заявленного изобретения.

Следующие примеры иллюстрируют заявленное изобретение, но не носят ограничительного характера касательно сути заявленного изобретения. Если не указано иначе, в нижеследующих примерах использованы стандартные методики, принятые в молекулярной биологии, как, например, описано в издании Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Пример 1. Клонирование, экспрессия и очистка модифицированных вариантов эндолизина phiKZgp144 and ELgpp188.

phiKZgp144, как указано в SEQ ID NO: 1 и ELgp188, как указано в SEQ ID NO: 2, представляют собой модульные эндолизины, получаемые из фагов *Pseudomonas aeruginosa* фKZ и EL с пептидогликан-связью на N-конце и каталитическим доменом на C-конце (Briers et al., 2007).

Для амплификации открытой рамки считывания (OPC, ORF) применили phiKZgp144 и ELgp188 ПЦР стандартный 5' праймер (для phiKZgp144: 5' ATGAAAGTATTACGCAAA 3' (SEQ ID NO: 83); для ELgp188 5' ATGAACTCCGGACGAAG 3' (SEQ ID NO: 65)) и стандартный 3' праймер в соответствии с SEQ ID NO: 81 и 82 (для phiKZgp144: TTTTCTATGTGCTGCAAC (SEQ ID NO: 81); использовали для ELgp188: ATACGAAAT AACGTGACGA (SEQ ID NO: 82)). Для удлинения 5' конца открытой рамки считывания, кодирующей phiKZgp144 или ELgp188 с фрагментом гена, кодирующего девять положительно заряженных остатков (Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys - SEQ ID NO: 11) применили хвост ПЦР с удлиненным 5' праймером (для phiKZgp144: 5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGCAAAAAAGTATTACGCAAAAG 3' (SEQ ID NO 79); для ELgp188: 5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGCAAAAACTTCCGGACGAAG 3' (SEQ ID NO: 80)) и стандартные 3' праймеры в соответствии с SEQ ID NO: 81 и 82. Продукт ПЦР клонировали в экспрессионном векторе pEXP5CT/ТОРО® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) в соответствии с инструкциями производителя. Задействовали аргининовые триплеты, помимо лизиновых триплетов, с целью избежать tРНК деплеции и уменьшить риск сдвигов рамки (единственными двумя возможными триплетами для лизина являются AAA и AAG, с последующими длинными А-цепями). Инсерция дополнительных катионных кассет в рестрикционный сайт BamHI удлиняет хвост дополнительными катионными остатками. Такая инсерция создает аргининовый и сериновый триплет в каждом сайте соединения (фиг. 1). До четырех поликатионных пептидных цепочек были слиты с phiKZgp144 и ELgp188, маркированными (POLY)<sup>n</sup>-gp144 или (POLY)<sup>n</sup>-gp188 (n=1,2,3,4), содержащими, соответственно, 9, 19, 29 и 39 положительно заряженных аминокислотных остатков в N-конце. Соответственно, следующие конструкции экспрессировали в клетках *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (экспоненциально растущие клетки при 37°C, индукция с использованием 1 mM IPTG, экспрессия в течение 4 ч при 37°C):

Слитый белок	SEQ ID NO:	Количество положительно заряженных аминокислотных остатков
POLY-gp144	SEQ ID NO: 35	9
(POLY) <sup>2</sup> -gp144	SEQ ID NO: 36	19
(POLY) <sup>3</sup> -gp144	SEQ ID NO: 37	29
(POLY) <sup>4</sup> -gp144	SEQ ID NO: 38	39
POLY-gp188	SEQ ID NO: 39	9
(POLY) <sup>2</sup> -gp188	SEQ ID NO: 40	19
(POLY) <sup>3</sup> -gp188	SEQ ID NO: 41	29
(POLY) <sup>4</sup> -gp188	SEQ ID NO: 42	39

Модифицированные варианты эндолизина POLY-gp144 (SEQ ID NO: 35), (POLY)<sup>2</sup>-gp144 (SEQ ID NO: 36), POLY-gp188 (SEQ ID NO: 39) и (POLY)<sup>2</sup>-gp188 (SEQ ID NO: 40) использовали для последующих исследований. Упомянутые белки подвергли очистке с использованием Ni<sup>2+</sup> аффинной хроматографии с использованием С-конечной 6xHis-метки (Акта жидкостная экспресс-хроматография белков с использованием 1 мл His-трапа Ni-NTA колонок). Общий выход на литр экспрессионной культуры *E. coli* определили при помощи спектрометрического измерения концентрации белка и общего объема очищенного раствора. Очистку производных gp188 провели при более жестких условиях (65 mM имидазола) в сравнении с производными gp144 (50 mM имидазола) для обеспечения высокой степени очистки. Данные по общему выходу на литр экспрессионной культуры *E. coli* приведены в табл. 5.

Таблица 5. Выход рекомбинантной очистки производных эндолизина на литр экспрессионной культуры клеток *E. coli*.

Слитый белок	Эндолизин	
	phiKZgp144	ELgp188
POLY	2 мг	48 мг
(POLY) <sup>2</sup>	0,5 мг	0,06 мг

Очищенные маточные растворы показали чистоту ~90%. Масс-спектрометрический анализ очищенных растворов POLY- производных показал наличие следов *E. coli* 50S рибосомного субъединичного протеина L2 и 16S rRNA уридин-516 псевдо-уридилат синтазы. Все производные phiKZgp144 показали мультимерную формацию, которую можно конвертировать в мономеры путем присоединения β-меркаптоэтанола, что свидетельствует о том, что интерсульфидные связи вызывают мультимеризацию.

Пример 2. Антибактериальная активность модифицированных вариантов phiKZgp144 и ELgp188.

Экспоненциальные клетки (~10<sup>6</sup>/мл) *P. aeruginosa* PAO1p (Pirnay JP et al. (2003), J Clin Microbiol., 41(3): 1192-1202) разбавили 100 × (конечная плотность эквивалентна ~10<sup>6</sup>/мл) и инкубировали при комнатной температуре вместе с 10 мкг недифференцированного протеина для каждого образца (немодифицированные варианты эндолизина phiKZgp144 (SEQ ID NO: 1) и ELgp188 (SEQ ID NO: 2) модифицированные варианты эндолизина POLY-gp144 (SEQ ID NO: 35), (POLY)<sup>2</sup>-gp144 (SEQ ID NO: 36), POLY-gp188 (SEQ ID NO: 39) и (POLY)<sup>2</sup>-gp188 (SEQ ID NO: 40) при конечной концентрации 100 мкг/мл в буфере (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M имидазола). По истечении 1 ч клеточные суспензии растворили в ФСБ буфере (10e-5, 10e-4 и 10e-3) и поместили в чашку Петри (стандартная среда Лурия-Бертани, инкубация в течение ночи при 37°C). Дополнительно поместили в чашку Петри отрицательный контроль с клетками в ФСБ-буфере. Остаточные колонии пересчитали после ночной инкубации. На основе подсчета числа клеток, высчитали антибактериальную активность как относительную инактивацию (%) (=100-(N<sub>i</sub>/N<sub>0</sub>)\*100, где N<sub>0</sub> = число необработанных клеток, а N<sub>i</sub> = число обработанных клеток) и в логарифмических юнитах (=log<sub>10</sub>N<sub>0</sub>/N<sub>i</sub>) (табл. 6). Все образцы реплицировали в шесть раз. Средние/стандартные девиации приведены. Статистический анализ провели с использованием обычного t-теста.

Немодифицированные эндолизины phiKZgp144 и ELgp188 не уменьшают значительно число клеток по сравнению с отрицательным контролем. Данное наблюдение иллюстрирует эффективность функции внешней мембраны как барьера для эндолизина, разрушающего клеточные стенки грамотрицательных бактерий. В отличие от приведенных в табл. 6, инкубация с модифицированными эндолизинами POLY-gp144, (POLY)<sup>2</sup>-gp144, POLY-gp188 и (POLY)<sup>2</sup>-gp188 вызывает значительное снижение (α = 0.05) числа бактериальных клеток (99.85 ± 0.09 % для POLY-gp144 и 98.0 ± 0.2% для POLY-gp188). Увеличение длины поликатионного пептида, в свою очередь, способствует увеличению антибактериальной активности, в особенности в случае phiKZgp144 (достигается уменьшение до 99,98 ± 0.02 % или 3,7 ± 0.3 лог юнитов (log units) в течение 1 ч для (POLY)<sup>2</sup>-gp144). Кроме того, испытания показали, что модифицированные эндолизины phiKZgp144 обладают более высокой антибактериальной активностью по сравнению с мо-

дифицированными эндолизинами ELgp188.

Таблица 6. Антибактериальный эффект эндолизинов - немодифицированных и модифицированных phiKZgp144 и ELgp188 вариантов.

Экспоненциально растущие клетки	Эндолизины			
	phiKZgp144		ELgp188	
	%	log	%	log
немодифицированный эндолизин	0 ± 15	0.00 ± 0.06	10 ± 13	0.05 ± 0.06
POLY	99.85 ± 0.09	2.9 ± 0.3	98.0 ± 0.2	1.7 ± 0.1
(POLY) <sup>2</sup>	99.98 ± 0.02	3.7 ± 0.3	98.9 ± 0.4	2.0 ± 0.2

Таким образом, пример демонстрирует, что аддичия короткого пептида из девяти катионных остатков в N-конце к phiKZgp144 (SEQ ID NO: 1) уже само по себе является достаточным для того, чтобы уничтожить почти 99,9% клеток в течение 1 ч. Поли-L-лизин также обладает неотъемлемой антибактериальной активностью, хотя это свойство до сих пор приписывалось полимерам с как минимум 20 остатками (Vaara and Vaara, 1983a, 1983b). Тем не менее, совместное действие поликатионного пептида и эндолизина уничтожает клетки.

В продолжение опыта, модифицированный эндолизин POLY-gp144 подвергли диализу до 50 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>/К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> pH 7 и использовали вместо раствора недиализованного белка, как описано выше. При этом, уровень инактивации дополнительно вырос с 2,9 ± 0,3 лог юнитов до 3,9 ± 0,2 лог юнитов.

Пример 3. Экспрессия модифицированных вариантов phiKZgp144 и ELgp188 в *Pichia pastoris* в качестве хозяина для нетоксичного рекомбинантного воспроизведения.

Открытую рамку считывания, кодирующую POLY-gp144 (SEQ ID NO: 35) клонировали в pPICZαA шаттл-векторе (Invitrogen), который затем интегрировали в геном *P. pastoris* путем гомологичного рекомбинирования (в соответствии с указаниями компании-производителя; клетки *P. pastoris* X33, Invitrogen). Рекомбинирование гена индуцировали при помощи метанола (1%) в BMMY-среде, супернатат проанализировали на предмет наличия энзимной активности по истечении 1, 3 и 4 дней. Затем супернатат в объеме 30 мкл экспрессионной культуры *P. Pastoris* добавили к 270 мкл хлороформ-пермеабиллизированных клеток *P. aeruginosa* PAO1p (Pirnay JP et al. (2003), *J Clin Microbiol.*, 41(3): 1192-1202) после 1, 3 и 4 дней (буферные условия: КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>/К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> I = 120 мМ pH 6,2). Затем, измерили при помощи спектрофотометрии оптическую плотность (фиг. 2). Снижение показателей оптической плотности свидетельствует о секреции муралитического энзима *P. pastoris*. В качестве отрицательного контроля, добавили *P. pastoris* X33 без экспрессионного плазмиды. Таким образом, лизис субстрата после добавления образца супернатата является показателем успешного рекомбинантного воспроизводства и секреции POLY-gp144 (SEQ ID NO: 35) клетками *P. pastoris*. По истечении 1 дня, можно наблюдать ограниченную энзиматическую активность. Максимальную активность наблюдали по истечении 3 дней, поскольку на четвертый день отсутствовали признаки сколь-нибудь значительного повышения активности супернататов. Также не наблюдалось токсического эффекта на плотность клеток *P. pastoris*.

Во время экспрессии *P. pastoris* α-секреционный сигнал вектора вызывает секрецию рекомбинантного протеина в окружающую среду, что позволяет облегчить очистку, поскольку секретирувалось только ограниченное число других протеинов. Сайт рестрикции BamHI в 5' конце открытой рамки считывания позволяет добавить больше кассет, кодирующих дополнительные поликатионные пептиды.

Пример 4. Модифицированные варианты эндолизина phiKZgp144 с различными поликатионными пептидами.

Для испытания и сравнения потенциала поликатионных пептидов синтезировали варианты phiKZgp144 и варианты других эндолизинов, кодирующих гены, с различными поликатионными пептидами в N-конце белка. Варианты с пептидами различаются по длине, составу и inserции связывающих последовательностей. С одной стороны, получили поликатионные пептиды с мультиплицированными N-концами KRK мотива. С другой стороны, получили поликатионные пептиды, состоящие только из аргинина (R) или лизина (K). Более того, для улучшения трансляции длинных поликатионных пептидов, получили поликатионные пептиды, содержащие связывающую последовательность.

В экспрессионном векторе pET32b (Novagen, Darmstadt, Germany) клонировали различные продукты, для уменьшения потенциальной токсичности поликатионного пептида в отношении хозяина *E. coli*. Кодированный в векторе слитый протеин (тиоредоксин) маскирует поликатионный пептид и может быть устранен во время процесса очистки.

Аналогичным образом, следующие модифицированные варианты эндолизина экспрессировали в клетках *E. coli* BL21 (DE3) при 37°C до достижения показателя оптической плотности OD<sub>600nm</sub>=0,6. Затем белковую экспрессию индуцировали с использованием 1 мМ IPTG (конечная концентрация) и провели экспрессию в течение четырех часов. Затем вырастили клетки *E. coli* центрифугированием в течение 20 мин при 6000g, провели разрушение (расщепление) клеток и белковую очистку в соответствии с рекомендациями комплекта очистки S-метки (Novagen, Darmstadt, Germany):

Модифицированный вариант эндוליцина	Длина пептида	Последовательность пептида
phiKZgp144 (SEQ ID NO: 1)	0	-
pKKZ144pET32b (SEQ ID NO: 43)	10	KRKKRKKRKK (SEQ ID NO: 14)
KRK_6_pET32b (SEQ ID NO: 44)	6	KRKKRK (SEQ ID NO: 10)
KRK_12_pET32b (SEQ ID NO: 45)	12	KRKKRKKRKKRKK (SEQ ID NO: 15)
KRK_14_pET32b (SEQ ID NO: 46)	14	KRKKRKKRKKRKKR (SEQ ID NO: 16)
R9_pET32b (SEQ ID NO: 47)	9	RRRRRRRR (SEQ ID NO: 12)
K8_pET32b (SEQ ID NO: 48)	8	KKKKKKKK (SEQ ID NO: 13)
pK2KZ144_pET32b_mod3 (SEQ ID NO: 49)	38	KRKKRKKRKRKSGSGKRKKRKKRKGSGGKRKKRKKRKK (SEQ ID NO: 28)

Все белки очистили с использованием S-Tag™ rEK Purification Kit (Novagen, Darmstadt, Germany). При использовании вектора pET32b экспрессированные белки были нетоксичны в отношении хозяина, что привело к более высокому выходу получаемого белка. Очищенные маточные растворы показали высокий уровень очистки.

Экспоненциальные клетки ( $\sim 10^6$ /мл) *P. aeruginosa* PAO1p (Burn wound isolate, Queen Astrid Hospital, Brussels; Pirnay JP et al. (2003), J Clin Microbiol., 41(3): 1192-1202) разбавили  $100 \times$  (конечная концентрация эквивалентна  $\sim 10^6$ /мл), инкубировали при комнатной температуре вместе с 10 мкг недиализованного протеина для каждого образца (немодифицированные варианты эндוליцинов при конечной концентрации в 100 мкг/мл в буфере (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -NaOH pH7.4; 0.5 M NaCl; 0,5 M имидазола). По истечении 1 ч клеточные суспензии разбавили 1:100 и поместили в чашку Петри на среду Лурия-Бертани. Дополнительно поместили в чашку Петри отрицательный контроль с использованием буфера (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -NaOH pH7.4; 0.5 M NaCl; 0,5 M имидазола). Остаточные колонии пересчитали после ночной инкубации при 37°C. На основе подсчета числа клеток, высчитали антибактериальную активность как относительную инактивацию (%) ( $=100 - (N_i/N_0) * 100$ , где  $N_0$  = число необработанных клеток, а  $N_i$  = число обработанных клеток) (Табл.7). Все образцы реплицировали как минимум в четыре раза.

Таблица 7. Антибактериальный эффект эндוליцинов - немодифицированных и модифицированных phiKZgp144 и ELgp188 вариантов

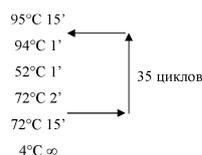
Модифицированный вариант эндוליцина	Последовательность пептида	Редукция [%]
phiKZgp144 (SEQ ID NO: 1)		0
pKKZ144pET32b (SEQ ID NO: 43)	KRKKRKKRKK (SEQ ID NO: 14)	99 – 99,9
KRK_6_pET32b (SEQ ID NO: 44)	KRKKRK (SEQ ID NO: 10)	99,9
KRK_12_pET32b (SEQ ID NO: 45)	KRKKRKKRKKRKK (SEQ ID NO: 15)	99 – 99,9
KRK_14_pET32b (SEQ ID NO: 46)	KRKKRKKRKKRKKR (SEQ ID NO: 16)	99,9
R9_pET32b (SEQ ID NO: 47)	RRRRRRRR (SEQ ID NO: 12)	99
K8_pET32b (SEQ ID NO: 48)	KKKKKKKK (SEQ ID NO: 13)	99
pK2KZ144_pET32b_mod3 (SEQ ID NO: 49)	KRKKRKKRKRKSGSGKRKKRKKRKGSGGKRKKRKKRKK (SEQ ID NO: 28)	99,9

Немодифицированные phiKZgp144 не уменьшают значительно число клеток по сравнению с отрицательным контролем. Более того, модифицированные варианты phiKZgp144 с поликатионно-пептидными N-конечными мультипликациями KRK мотива значительно увеличивают антибактериальную активность. Тем не менее, варианты с гомомерным пептидом лизина или аргинина также показали значительное снижение числа клеток по сравнению с немодифицированными phiKZgp144. К тому же, вариант с поликатионной пептидной цепочкой с 38 аминокислотными остатками и связывающей последовательностью также показал значительное повышение антибактериального эффекта.

Пример 5: Модифицированные варианты эндוליцина из *Salmonella typhimurium* фага PSP3.

PSP3gp10 в соответствии с SEQ ID NO: 8 представляет собой глобулярный эндолизин со 165 аминокислотными остатками, полученный из *Salmonella typhimurium* фага PSP3 с каталитическим лямбда-мураמידазным доменом. Как показал анализ BLASTp и Pfam, эндолизин PSP3gp10 содержит в себе каталитический домен в пределах от примерно 34 аминокислотного остатка до примерно 152 аминокислотного остатка.

Очищенный геном ДНК фага PSP3 использовали в качестве образца для амплификации открытой рамки считывания (ОРС) PSP3gp10 в реакции Hot Start Taq polymerase ПЦР (Qiagen, Germany), со следующими параметрами ПЦР:



Для упомянутого ПЦР применили стандартный 5' праймер (5' ATGGGATCCCCGGTTCAT-ТААТАСТСАССАГ 3' (SEQ ID NO: 50)) и стандартный 3' праймер (5' TGCCATCACCCCGCCAGCCGTG 3' (SEQ ID NO: 51)). Для удлинения 5' конца открытой рамки считывания, кодирующей PSP3gp10 с фрагментом гена, кодирующего поликатионный 9-мерный пептид Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys (SEQ ID NO: 11) применили хвост ПЦР (Hot Start Taq polymerase ПЦР с аналогичными параметрами) с удлиненным 5' праймером (5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGCAAACCGGTTCAT-ТААТАСТСАССАГ 3' (SEQ ID NO: 52)) и стандартный 3' праймер в соответствии с SEQ ID NO: 51. Оригинальный немодифицированный PSP3gp10 ПЦР фрагмент и пируваткиназа(ПК)-удлиненный фрагмент лигандировали в рEXP5СТ/ТОРО® экспрессионном векторе (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), следуя протоколу ТА-клонирования компании-производителя.

Рекомбинантную экспрессию PSP3gp10 в соответствии с SEQ ID NO: 8 и PKPSP3gp10 в соответствии с SEQ ID NO: 53 провели в экспоненциально растущих клетках *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysS (Invitrogen) после индукции с 1 мМ IPTG (изопропилтиогалактозид) при 37°C в течение 4 ч. Оба белка подвергли очистке с использованием  $Ni^{2+}$  аффинной хроматографии (Akta FPLC, GE Healthcare), применяя C-конечную 6xHis-метку, кодируемую рEXP5СТ/ТОРО® экспрессионным вектором.  $Ni^{2+}$  аффинную хроматографию провели в 4 последующих этапа, все при комнатной температуре:

1. Эквилибрация Histrap HP 1 мл колонки (GE Healthcare) с 10 объемами колонки отмывочного буфера (60 мМ имидазола, 0,5 мМ NaCl и 20 мМ  $NaH_2PO_4$ -NaOH при pH 7,4) при скорости потока 0,5 мл/мин.

2. Загрузка всего лизата (с требуемым объемом эндолизина) в Histrap HP 1 ml колонки при скорости потока 0,5 мл/мин.

3. Отмывка колонки с 15 объемами колонки отмывочного буфера при скорости потока 1 мл/мин.

4. Элюирование связанного эндолизина из колонки с 10 объемами колонки элюирующего буфера (500 мМ имидазола, 5 мМ NaCl и 20 мМ  $NaH_2PO_4$ -NaOH при pH 7,4) при скорости потока 0,5 мл/мин.

Общий выход обоих очищенных рекомбинантных белков на литр экспрессионной культуры *E. coli* приведен в табл. 8. Значения определили при помощи спектрофотометрического измерения белковой концентрации, а общий объем очищенного маточного раствора при длине волны 280 нм. Очищенные маточные растворы, состоящие из PSP3gp10 и PKPSP3gp10, соответственно, в элюирующем буфере (20 мМ  $NaH_2PO_4$ -NaOH pH 7,4; 0,5 М NaCl; 500 мМ имидазола) показали степень чистоты как минимум 90%, как определено визуально на SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле) гелях.

Таблица 8. Выход очищенного рекомбинантного PSP3gp10 эндолизина и его модифицированного варианта PKPSP3gp10 на литр экспрессионной культуры *E. coli*.

Эндолизины	Экспрессионный выход
PSP3gp10 (SEQ ID NO: 8)	2,15 мг
PKPSP3gp10 (SEQ ID NO: 53)	5,56 мг

Для определения анти-грамотрицательного спектра PKPSP3gp10 эндолизина в соответствии с SEQ ID NO: 53, испытали комбинацию 1,315 мкМ PKPSP3gp10 эндолизина и 0,5 мМ ЭДТК на клинических штаммах *P. aeruginosa* PAO1p и Br667, *Escherichia coli* WK6, и *Salmonella typhimurium* (см. табл. 9). Экспоненциально растущие бактериальные клетки ( $OD_{600nm}$  of 0.6), разбавленные в 100 раз до конечной плотности примерно  $10^6$ /мл каждого штамма инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре без встряхивания, с немодифицированным эндолизином PSP2gp10 (SEQ ID NO: 8) и модифицированным эндолизином PKPSP3gp10 (SEQ ID NO: 53), каждый образец в комбинации без и вместе с 0,5 мМ ЭДТК. Для инкубации, оба эндолизина использовали в буфере (20 мМ  $NaH_2PO_4$ -NaOH pH 7,4; 0,5 М NaCl; 0,5 М имидазола), причем инкубацию провели при конечной концентрации эндолизина 1.315 мкМ. В качестве контроля, каждый штамм также подвергли инкубации в течение 30 мин с 0,5 мМ ЭДТК (в таком же, как и вышеупомянутый буфер), но без эндолизина.

Таблица 9. Перечень применяемых грамотрицательных штаммов

Грамотрицательный штамм	Источник	Библиографическая ссылка
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1p	Burn wound isolate, Queen Astrid Hospital, Brussels	Pirnay <i>et al.</i> , 2003*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Br667	Burn wound isolate, Queen Astrid Hospital, Brussels	Pirnay <i>et al.</i> , 2003*
<i>Escherichia coli</i> WK6	Стандартный лабораторный экспрессионный штамм	Prof. C. Michiels
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	SGSC № 2317	Prof. C. Michiels

\*Pirnay JP *et al.* (2003). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. *J Clin Microbiol.*, 41(3):1192-1202.

После инкубации, клеточные суспензии разбавили в три раза (соответственно  $10^5$ - $10^4$ - $10^3$  клеток/мл) и по 100 мкл каждого раствора поместили в чашку Петри на среду Лурия-Бертани. Остаточные колонии пересчитали после ночной инкубации при 37°C. На основе подсчета количества клеток, рассчитали антибактериальную активность как относительную инактивацию в логарифмических юнитах ( $=\log_{10}N_0/N_i$ , где  $N_0$  = число необработанных клеток, а  $N_i$  = число обработанных клеток) (табл. 10).

Таблица 10. Антибактериальная активность немодифицированного эндолизина (PSP3gp10) и его модифицированного варианта (PKPSP3gp10) с и без ЭДТК- $\text{Na}_2$  в отношении различных экспоненциально растущих грамотрицательных видов бактерий.

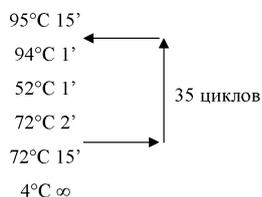
	0,5 мМ ЭДТК	1.315 мкМ PSP3gp10	1.315 мкМ PKPSP3gp10	1.315 мкМ PSP3gp10+ 0.5 мМ ЭДТК	1.315 мкМ PKPSP3gp10+ 0.5 мМ ЭДТК
<i>P. aeruginosa</i> PA01p	0.146 +/- 0.002	0.383 +/- 0.015	0.344 +/- 0.163	3.552 +/- 0.536	> 4.146
<i>P. aeruginosa</i> Br667	0.223 +/- 0.038	0.375 +/- 0.056	0.353 +/- 0.086	0.571 +/- 0.035	0.891 +/- 0.118
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.104 +/- 0.049	0.283 +/- 0.038	0.327 +/- 0.057	0.690 +/- 0.036	0.850 +/- 0.032
<i>Escherichia coli</i> WK6	0.393 +/- 0.035	0.190 +/- 0.029	0.205 +/- 0.088	0.387 +/- 0.014	0.584 +/- 0.024

Все образцы реплицировали три раза. Представлены средние +/- стандартные девиации. Максимальная наблюдаемая редукция зависит от уровня детекции 10 клеток/мл и первоначальной плотности клеток. В случае PA01p, ЭДТК действует синергически, как с немодифицированным PSP3gp10 эндолизином, так и с его модифицированным вариантом PKPSP3gp10.

Пример 6. Модифицированные варианты эндолизина из *Escherichia coli* фага P2.

P2gp09 в соответствии с SEQ ID NO: 9 представляет собой глобулярный эндо лизин со 165 аминокислотными остатками, полученный из *Escherichia coli* фага P2 с каталитическим лямбда-мураמידазным доменом. Как показал анализ BLASTp и Pfam, эндолизин P2gp09 содержит в себе каталитический домен в пределах от примерно 34 аминокислотного остатка до примерно 152 аминокислотного остатка.

Очищенный геном ДНК фага P2 использовали в качестве образца для амплификации открытой рамки считывания (ОРС) P2gp09 в стандартной ПЦР реакции с Pfu полимеразой (Fermentas), со следующими параметрами ПЦР:



Для упомянутого ПЦР применили стандартный 5' праймер (5' ATGGGATCCCCGTAAT-ТААСАСГСАТС 3' (SEQ ID NO: 54)) и стандартный 3' праймер (5' AGCCGGTAC-GCCGCCAGCGGTACGC 3' (SEQ ID NO: 55)). Для удлинения 5' конца открытой рамки считывания, кодирующей P2gp09 с фрагментом гена, кодирующего поликаатионный 9-мерный пептид Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys (SEQ ID NO: 11) применили хвост ПЦР (с аналогичными параметрами, как и упомянутый выше стандартный ПЦР) с удлиненным 5' праймером (5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGCAAAACCGGTAATТААСАСГСАТС 3' (SEQ ID NO: 56) и стандартный 3' праймер в соответствии с SEQ ID NO 55. Оригинальный немодифицированный P2gp09 ПЦР фрагмент и удлиненный фрагмент лигандировали в rEXP5CT/ТОРО® экспрессионном векторе (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), следуя протоколу ТА-клонирования компании-производителя.

Рекомбинантную экспрессию P2gp09 в соответствии с SEQ ID NO: 9 и PKP2gp09 в соответствии с SEQ ID NO: 57 провели в экспоненциально растущих клетках *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysS (Invitrogen) после индукции с 1 мМ IPTG (изопропилтиогалактозид) при 37°C в течение 4 ч. Оба белка подвергли очистке с использованием  $\text{Ni}^{2+}$  аффинной хроматографии (Akta FPLC, GE Healthcare) применяя C-конечную 6xHis-метку, кодируемую rEXP5CT/ТОРО® экспрессионным вектором. The  $\text{Ni}^{2+}$  аффинную хроматографию провели в 4 последующих этапа, все при комнатной температуре:

1. Эквилибрация Histrap HP 1 мл колонки (GE Healthcare) с 10 объемами колонки отмывочного буфера (60 мМ имидазола, 0,5 мМ NaCl и 20 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -NaOH при pH 7,4) при скорости потока 0,5 мл/мин.

2. Загрузка всего лизата (с требуемым объемом эндолизина) в Histrap HP 1 ml колонки при скорости потока 0,5 мл/мин.

3. Отмывка колонки с 15 объемами колонки отмывочного буфера при скорости потока 1 мл/мин.

4. Элюирование связанного эндолизина из колонки с 10 объемами колонки элюирующего буфера

(500 мМ имидазола, 5 мМ NaCl и 20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH при pH 7,4) при скорости потока 0,5 мл/мин.

Общий выход обоих очищенных рекомбинантных белков на литр экспрессионной культуры *E. coli* приведен в табл. 11. Значения определили при помощи спектрофотометрического измерения белковой концентрации, а общий объем очищенного маточного раствора при длине волны 280 нм. Очищенные маточные растворы, состоящие из P2gp09 и РКР2gp09, соответственно, в элюирующем буфере (20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH7.4; 0,5 М NaCl; 500 мМ имидазола) показали степень чистоты как минимум 95%, как определено визуально на SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле) гелях.

Таблица 11. Выход очищенного рекомбинантного P2gp09 эндолизина и его РК-модифицированного производного РКР2gp09 на литр экспрессионной культуры *E. coli*

Эндолизин	Экспрессионный выход
P2gp09 (SEQ ID NO: 9)	5,52 мг
РКР2gp09 (SEQ ID NO: 57)	3,40 мг

Для определения анти-грамотрицательного спектра РК2gp09 эндолизина в соответствии с SEQ ID NO: 57, испытали комбинацию 1,315 мкМ РК2gp09 эндолизина и 0,5 мМ ЭДТК на клинических штаммах *P. aeruginosa* PAO1p и Br667, *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomonas putida* G1 и на *Escherichia coli* WK6 (см. табл. 13). Экспоненциально растущие бактериальные клетки (OD<sub>600nm</sub> из 0,6) разбавленные в 100 раз до конечной плотности примерно 10<sup>5</sup>/мл каждого штамма, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре без встряхивания, с немодифицированным эндолизином P2gp09 (SEQ ID NO: 9) модифицированным эндолизином РКР2gp09 (SEQ ID NO: 57) каждый образец в комбинации без и вместе с 0,5 мМ ЭДТК. Для инкубации, оба эндолизина использовали в буфере (20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH7.4; 0,5 М NaCl; 0,5 М имидазола), причем инкубацию провели при конечной концентрации эндолизина 1,315 мкМ. В качестве контроля, каждый штамм также подвергли инкубации в течение 30 мин с 0,5 мМ ЭДТК (в таком же, как и вышеупомянутый буфер), но без эндолизина. После инкубации, клеточные суспензии разбавили в три раза (соответственно 10<sup>5</sup>-10<sup>4</sup>-10<sup>3</sup> клеток/мл) и по 100 мкл каждого раствора поместили в чашку Петри на среду Лурия-Бертани. Остаточные колонии пересчитали после ночной инкубации при 37°C. На основе подсчета количества клеток, рассчитали антибактериальную активность как относительную инактивацию в логарифмических юнитах ( $=\log_{10}N_0/N_i$ , где N<sub>0</sub> = число необработанных клеток, а N<sub>i</sub> = число обработанных клеток, оба показателя рассчитаны после инкубации) (табл. 12).

Таблица 12. Антибактериальная активность немодифицированного эндолизина (P2gp09) и его модифицированного варианта (РКР2gp09) с и без ЭДТК-Na<sub>2</sub> в отношении различных экспоненциально растущих грамотрицательных видов бактерий.

	0,5 мМ ЭДТК	1.315 мкМ P2gp09	1.315 мкМ РКР2gp09	Δ	1.315 мкМ P2gp09 + 0.5 мМ ЭДТК	1.315 мкМ РКР2gp09 + 0.5 мМ ЭДТК	Δ
<i>P. aeruginosa</i> PAO1p	0.330 +/- 0.146	0.374 +/- 0.084	0.326 +/- 0.069	-0.038	2.840 +/- 0.079	3.172 +/- 0.056	0.332
<i>P. aeruginosa</i> Br667	0.003 +/- 0.051	0.246 +/- 0.042	0.300 +/- 0.062	0.054	0.582 +/- 0.074	0.952 +/- 0.213	0.370
<i>P. putida</i> G1	0.072 +/- 0.084	0.419 +/- 0.024	1.014 +/- 0.139	0.595	3.919 +/- 0.118	> 4,386	>0.467
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	0.206 +/- 0.151	0.769 +/- 0.110	1.163 +/- 0.073	0.394	3.890 +/- 0.056	4.255 +/- 0.001	0.365
<i>Escherichia coli</i> WK6	0.153 +/- 0.046	0.751 +/- 0.053	1.104 +/- 0.039	0.353	0.784 +/- 0.071	1.545 +/- 0.102	0.749

Все образцы реплицировали три раза. Представлены средние +/- стандартные девиации. Максимальная наблюдаемая редукция зависит от уровня детекции 10 клеток/мл и первоначальной плотности клеток.

Таблица 13. Перечень применяемых грамотрицательных штаммов

Грамотрицательный штамм	Источник	Библиографическая ссылка
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1p	Burn wound isolate, Queen Astrid Hospital, Brussels	Pirnay <i>et al.</i> , 2003*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Br667	Burn wound isolate, Queen Astrid Hospital, Brussels	Pirnay <i>et al.</i> , 2003*
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Clinical isolate, UZ Gasthuisberg, Leuven	Prof J. Verhaegen
<i>Escherichia coli</i> WK6	Стандартный лабораторный экспрессионный штамм	Prof C. Michiels
<i>Pseudomonas putida</i> G1	Soil isolate, Moskow	Prof V. Krylov

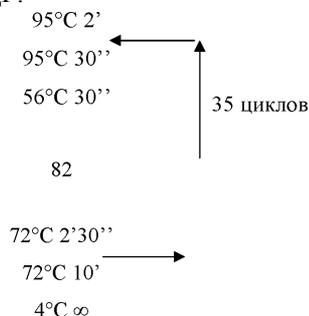
\*Pirnay JP *et al.*, (2003). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. *J Clin Microbiol.*, 41(3):1192-1202.

Пример 7. Модифицированные варианты эндолизина из *Pseudomonas putida* фага ОВР.

ОВРgpLYS в соответствии с SEQ ID NO: 7 представляет собой модульный эндолизин с 328 аминокислотными остатками, полученный из *Pseudomonas putida* фага ОВР с N-конечными пептидогликан-

связывающими доменами и С-конечным каталитическим хитиназным доменом. Как показал анализ BLASTp и Pfam, эндолизин OBPgpLYS содержит в себе каталитический домен в пределах от примерно 126 аминокислотного остатка до примерно 292 аминокислотного остатка и N-конечный пептидогликан-связывающий домен в пределах примерно с 7 по 96 аминокислотные остатки.

Очищенный геном ДНК фага ОВР использовали в качестве образца для амплификации открытой рамки считывания (ОРС) OBPgpLYS в стандартной ПЦР реакции с Pfu polymerase (Fermentas, Ontario, Canada), со следующими параметрами ПЦР:



Применили стандартный 5' праймер (5' ATGAAAAATAGCGAGAAGAAT 3' (SEQ ID NO: 58)) и стандартный 3' праймер (5' AАСТАТТССGAGTGCTTTCTTTGT 3' (SEQ ID NO: 59)). Для удлинения 5' конца открытой рамки считывания, кодирующей OBPgpLYS с фрагментом гена, кодирующего поликатионный 9-мерный пептид Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg-Lys- (SEQ ID NO: 11) применили хвост ПЦР (с аналогичными параметрами, как и упомянутый выше стандартный ПЦР) с удлиненным 5' праймером (5' ATGGGATCCAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGCAAAAAAATAGCGAG AAGAAT 3' (SEQ ID NO: 60)) и стандартный 3' праймер в соответствии с SEQ ID NO 59. Оригинальный немодифицированный OBPgpLYS ПЦР фрагмент и удлиненный фрагмент лигандировали в рEXP5CT/ТОРО® экспрессионном векторе (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) следуя протоколу ТА-клонирования компании-производителя.

Рекомбинантную экспрессию OBPgpLYS в соответствии с SEQ ID NO: 7 и РКОВPgpLYS в соответствии с SEQ ID NO: 61 провели в экспоненциально растущих клетках E. coli BL21 (λDE3) pLYS (Invitrogen) после индукции с 1 mM IPTG (изопропилтиогалактозид) при 37°C в течение 4 часов. Оба белка подвергли очистке с использованием Ni<sup>2+</sup> аффинной хроматографии (Akta FPLC, GE Healthcare), применяя С-конечную 6×His-метку, кодированную рEXP5CT/ТОРО® экспрессионным вектором. Ni<sup>2+</sup> аффинную хроматографию провели в 4 последующих этапа, все при комнатной температуре:

1. Эквилибрация Histrap HP 1 мл колонки (GE Healthcare) с 10 объемами колонки отмывочного буфера (60 mM имидазола, 0,5 mM NaCl и 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH при pH 7,4) при скорости потока 0,5 мл/мин.

2. Загрузка всего лизата (с требуемым объемом эндолизина) в Histrap HP 1 ml колонки при скорости потока 0,5 мл/мин.

3. Отмывка колонки с 15 объемами колонки отмывочного буфера при скорости потока 1 мл/мин.

4. Элюирование связанного эндолизина из колонки с 10 объемами колонки элюирующего буфера (500 mM имидазола, 5 mM NaCl и 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH при pH 7,4) при скорости потока 0,5 мл/мин.

Общий выход обоих очищенных рекомбинантных белков на литр экспрессионной культуры E.coli приведен в табл. 14. Значения определили при помощи спектрофотометрического измерения белковой концентрации, а общий объем очищенного маточного раствора при длине волны 280 нм. Очищенные маточные растворы, состоящие из OBPgpLYS и РКОВPgpLYS, соответственно, в элюирующем буфере (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH7,4; 0,5 M NaCl; 500 mM имидазола) показали степень чистоты как минимум 90%, как определено визуально на SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле) гелях.

Таблица 14. Выход очищенного рекомбинантного OBPgpLYS эндолизина и его РК-модифицированного производного РКОВPgpLYS на литр экспрессионной культуры E. coli.

Эндолизины	Экспрессионный выход
OBPgpLYS (SEQ ID NO: 7)	3,3 мг
РКОВPgpLYS (SEQ ID NO: 61)	4,7 мг

Для определения анти-грамотрицательного спектра РКОВPgpLYS эндолизина в соответствии с SEQ ID NO: 61, испытали комбинацию 1,313 мкМ РК OBPgpLYS эндолизина и 0,5 mM ЭДТК на клинических мультирезистентных штаммах P. aeruginosa Br667, Pseudomonas putida G1 (хозяин фага ОВР) и на гамме других грамотрицательных патогенов (Escherichia coli WK6, Salmonella typhimurium LT2 и Burkholderia pseudomallei) (см. табл. 16). Экспоненциально растущие бактериальные клетки (OD<sub>600nm</sub> из 0,6) разбавленные в 100 раз до конечной плотности примерно 10<sup>6</sup>/мл каждого штамма инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре без встряхивания, с немодифицированным эндолизином

ОВРgpLYS (SEQ ID NO: 7) и модифицированным эндолизином РКОВРgpLYS (SEQ ID NO: 61), каждый образец в комбинации без и вместе с 0,5 мМ ЭДТК. Для инкубации, оба эндолизина использовали в буфере (20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH 7,4; 0,5 М NaCl; 0,5 М имидазола), причем инкубацию провели при конечной концентрации эндолизина 1,313 мкМ. В качестве контроля, каждый штамм также подвергли инкубации в течение 30 мин с 0,5 мМ ЭДТК (в таком же, как и вышеупомянутый буфер), но без эндолизина. После инкубации, клеточные суспензии разбавили в три раза (соответственно 10<sup>5</sup>-10<sup>4</sup>-10<sup>3</sup> клеток/мл) и по 100 мкл каждого раствора поместили в чашку Петри на среду Лурия-Бертани. Остаточные колонии пересчитали после ночной инкубации при 37°C. На основе подсчета количества клеток, рассчитали антибактериальную активность как относительную инактивацию в логарифмических юнитах ( $=\log_{10}N_0/N_i$  где N<sub>0</sub> = число необработанных клеток, а N<sub>i</sub> = число обработанных клеток, оба показателя рассчитаны после инкубации) (табл. 15). Все образцы реплицировали в три раза. Средние +/- стандартные девиации приведены. Максимальная редукция зависит от уровня детекции в 10 клеток/мл и первоначальной клеточной плотности.

Таблица 15. Антибактериальная активность немодифицированного эндолизина (ОВРgpLYS) и его модифицированного варианта (РКОВРgpLYS) с и без ЭДТК-Na<sub>2</sub> на различных экспоненциально растущих грамотрицательных видах бактерий.

	0,5 мМ ЭДТК	1.313 мкМ ОВРgpLYS	1.313 мкМ РКОВРgpLYS	1.313 мкМ ОВРgpLYS + 0.5 мМ ЭДТК	1.313 мкМ РКОВРgpLYS + 0.5 мМ ЭДТК
<i>P. aeruginosa</i> PAO1p	0.130 +/- 0.023	2.531 +/- 0.173	3.079 +/- 0.015	4.357 +/- 1.857	> 5.687
<i>P. aeruginosa</i> Br667	0.031 +/- 0.023	1.082 +/- 0.083	1.163 +/- 0.063	3.144 +/- 0.223	5.272 +/- 0.573
<i>P. putida</i> G1	0.412 +/- 0.055	0.141 +/- 0.027	0.904 +/- 0.079	4.891 +/- 0.000	> 4.891
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	0.220 +/- 0.081	0.997 +/- 0.131	1.806 +/- 0.287	4.08 +/- 0.301	>4.861
<i>Escherichia coli</i> WK6	0.592 +/- 0.113	0.681 +/- 0.032	1.434 +/- 0.018	1.179 +/- 0.200	1.695 +/- 0.147
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.054 +/- 0.048	0.076 +/- 0.011	0.127 +/- 0.013	0.774 +/- 0.052	0.908 +/- 0.037

Таблица 16. Перечень применяемых грамотрицательных штаммов.

Грамотрицательный штамм	Источник	Библиографическая ссылка
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1p	Burn wound isolate, Queen Astrid Hospital, Brussels	Pirnay <i>et al.</i> , 2003*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Br667	Burn wound isolate, Queen Astrid Hospital, Brussels	Pirnay <i>et al.</i> , 2003*
<i>Pseudomonas putida</i> G1	Soil isolate, Moskow	Prof V.Krylov
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Clinical isolate, UZ Gasthuisberg, Leuven	Prof J. Verhaegen
<i>Escherichia coli</i> WK6	Standard laboratory expression strain	Stratagene
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	SGSC N° 2317	Prof C. Michiels

Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Pirson J, Struelens M, Duinslaeger L, Comelis P, Zizi M, Vanderkelen A. (2003). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. *J Clin Microbiol.*, 41(3): 1192-1202.

Поскольку общий эффект лечения при помощи ОВРgpLYS зависит от вида бактерий, данные в табл. 16 показывают добавочный эффект РКОВРgpLYS по сравнению с немодифицированным ОВРgpLYS в отношении всех испытуемых видов бактерий, как в отсутствие, так и в присутствии 0,5 мМ ЭДТК. Для *Pseudomonas* и *Burkholderia*, наблюдается выраженный синергический эффект с ЭДТК в активности РКОВРgpLYS.

Пример 8. Влияние различной концентрации ЭДТК на антибактериальную активность ОВРgpLYS и РКОВРgpLYS.

Для определения влияния ЭДТК на антибактериальную активность немодифицированного и модифицированного эндолизина, антибактериальную активность немодифицированного ОВРgpLYS эндолизина (SEQ ID NO: 7) и РКОВРgpLYS эндолизина (SEQ ID NO: 61) испытали на клетках *Pseudomonas aeruginosa* PAO1p (Pirnay JP *et al.* *J Clin Microbiol.*, 41(3): 1192-1202 (2003)), с использованием различных концентраций ЭДТК и эндолизина. Экспоненциально растущие бактериальные клетки (OD<sub>600nm</sub> из 0,6) разбавили в 100 раз до достижения показателя конечной плотности примерно 10 /мл и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре без встряхивания вместе с немодифицированным эндолизином ОВРgpLYS (SEQ ID NO: 7) и модифицированным эндолизином РКОВРgpLYS (SEQ ID NO: 61). Для

инкубации, каждый тип эндолизина использовали в буфере (20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH 7,4; 0,5 М NaCl; 0,5 М имидазола) при конечных концентрациях эндолизина 0,013, 0,131 и 1,315 мкМ. При этом, использовали различные концентрации ЭДТК: 0, 0,05, 0,5 и 10 мМ. В качестве контроля, инкубировали также один образец в течение 30 мин без эндолизина, вместо которого использовали добавочный буфер (20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH 7,4; 0,5 М NaCl; 0,5 М имидазола). После инкубации, клеточные суспензии разбавили в три раза (соответственно, 10<sup>5</sup>-10<sup>4</sup>-10<sup>3</sup> клеток/мл) и по 100 мкл каждого раствора поместили в чашку Петри на среду Лурия-Бертани. Пересчитали остаточные колонии после ночной инкубации при 37°C. На основе подсчета числа клеток, рассчитали антибактериальную активность как относительную инактивацию в логарифмических юнитах ( $=\log_{10}N_0/N_i$ , где N<sub>0</sub> = число необработанных клеток, а N<sub>i</sub> = число обработанных клеток, расчеты проводились в обоих случаях после инкубации) (табл. 17). Все образцы реплицировали в три раза. Средние +/- стандартные девиации приведены. По результатам анализа, максимальное уменьшение (5,69 лог-юнитов) зависит от уровня детекции 10 клеток/мл и первоначальной клеточной плотности. "Δ" показывает разницу в показателях активности соответствующих образцов OBPgpLYS и PKOBPgpLYS.

Таблица 17. Антибактериальный эффект немодифицированного эндолизина (OBPgpLYS) и его модифицированного варианта (PKOBPgpLYS) в комбинации с различными концентрациями ЭДТК в отношении экспоненциально растущих клеток *Pseudomonas aeruginosa* PAO1p.

	Концентрация ЭДТК -Na <sub>2</sub> (in mM)			
	0	0.05	0.5	10
Без эндолизина	/	0.028 +/- 0.008	0.130 +/- 0.023	1.827 +/- 0.052
0,013 мкМ OBPgpLYS	0.956 +/- 0.110	/	4.626 +/- 0.287	/
0,013 мкМ PKOBPgpLYS	0.992 +/- 0.181	/	5.204 +/- 0.000	/
Δ	0.036		0.578	
0,131 мкМ OBPgpLYS	2.158 +/- 0.027	/	4.599 +/- 0.275	/
0,131 мкМ PKOBPgpLYS	2.529 +/- 0.184	/	5.671 +/- 0.000	/
Δ	0.371		1.072	
1,315 мкМ OBPgpLYS	2.531 +/- 0.173	2.762 +/- 0.091	4.357 +/- 1.857	4.888 +/- 0.275
1,315 мкМ PKOBPgpLYS	3.079 +/- 0.015	4.145 +/- 0.015	> 5.687	> 5.687
Δ	0.548	1.383	> 1.330	> 0.799

Как следует из табл. 17, немодифицированный эндолизин OBPgpLYS уменьшает значительно число клеток с более, чем 2,5 лог-юнитов для 1,315 мкМ и с +/- 1 лог-юнит для 0,013 мкМ, по сравнению с отрицательным контролем. Модифицированный эндолизин PKOBPgpLYS показывает уменьшение в дополнительных 0,5 лог-юнитов в отношении экспоненциально растущих PAO1p клеток. Наблюдаемый антибактериальный эффект можно увеличить вплоть до редукции в 5,69 лог-юнитов (ниже уровня обнаружения) путем комбинирования PKOBPgpLYS с пермеабиллизатором внешней мембраны ЭДТК-Na<sub>2</sub> при концентрации 0,5 и 10 мМ ЭДТК. Различие в активности между немодифицированным OBPgpLYS и пируваткиназа(ПК)-модифицированным OBPgpLYS повышается при увеличении количества добавляемого эндолизина (начиная с 0,013-1,315 мкМ эндолизина). ПРИМЕР 9. Антибактериальная активность модифицированных вариантов phiKZgp144 в отношении различных грамотрицательных бактерий.

Для испытания и сравнения потенциала поликатионных пептидов phiKZgp144 и других эндолизинов, синтезировали кодирующие гены, с различными поликатионными пептидами в N-конце белка.

В экспрессионном векторе pET32b (Novagen, Darmstadt, Germany) клонировали различные продукты, для уменьшения потенциальной токсичности поликатионного пептида в отношении хозяина *E. coli*. Кодированный в векторе слитый белок (тиоредоксин) маскирует поликатионный пептид и может быть устранен во время процесса очистки.

Гены, кодирующие smi01 (YP\_001712536) и KRK9\_smi01 (SEQ ID NO: 75) полностью синтезировали (Entelechon, Regensburg, Germany) и клонировали в pET32b.

Аналогичным образом, следующие модифицированные варианты эндолизина экспрессировали в клетках *E. coli* BL21 (DE3) при 37°C до достижения показателя оптической плотности OD<sub>600nm</sub>=0.6: smi01 (YP\_001712536), KRK9\_smi01 (SEQ ID NO: 75), phiKZgp144 (SEQ ID NO: 1), pKKZ144pET32b (SEQ ID NO: 43) и POLYKZ144 (SEQ ID NO: 35). Белковую экспрессию индуцировали с использованием

1 mM IPTG (конечная концентрация) и провели экспрессию в течение четырех часов. Затем вырастили клетки *E. coli* центрифугированием в течение 20 мин при 6000g, провели разрушение (расщепления) клеток и протеиновую очистку в соответствии с рекомендациями комплекта очистки S-Tag™ rEK Purification Kit (Novagen, Darmstadt, Germany). При использовании вектора pET32b, экспрессированные белки были нетоксичны в отношении хозяина, что привело к более высокому выходу получаемого белка. Очищенные маточные растворы показали высокий уровень очистки.

Для испытаний и контрольного опыта, синтезировали и очистили phiKZgp144 и POLYgp144 в соответствии со способом, описанным в примере 1.

Экспоненциально (~10<sup>6</sup>/мл) растущие клетки *P. aeruginosa* PAO1p (Burn wound isolate, Queen Astrid Hospital, Brussels; Pirnay JP et al. (2003), *J Clin Microbiol.*, 41(3): 1192-1202), *Acinetobacter baumannii* (DSMZ 30007) или *Burkholderia solanaceum* (Isolate provided by Prof. C. Michiels) разбавили 100 × (конечная плотность эквивалентна ~10<sup>6</sup>/мл), инкубировали при комнатной температуре вместе с 10 мкг недиализованного белка для каждого образца при конечной концентрации в 100 мкг/мл в буфере (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M имидазола). По истечении 1 ч клеточные суспензии разбавили 1:100 и поместили в чашку Петри на среду Лурия-Бертани. Дополнительно, поместили в чашку Петри отрицательный контроль с использованием буфера (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH pH7.4; 0.5 M NaCl; 0.5 M имидазола). Остаточные колонии пересчитали после ночной инкубации при 37°C. На основе подсчета числа клеток, рассчитали антибактериальную активность как относительную инактивацию (%) (=100 - (N<sub>i</sub>/N<sub>0</sub>)\*100, где N<sub>0</sub> = число необработанных клеток, а N<sub>i</sub> = число обработанных клеток) (табл. 18). Все образцы реплицировали как минимум в четыре раза.

Таблица 18. Антибактериальный эффект различных модифицированных вариантов эндолизинов (NCBI количества - в скобках) в отношении различных видов бактерий

Белок	Вид бактерии	Редукция [%]
smi01 (YP_001712536)	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSMZ 30007	0
KRK9_smi01	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSMZ 30007	50
phiKZgp144	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
pKKZ144pET32b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99 - 99,9
phiKZgp144	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSMZ 30007	0
pKKZ144pET32b	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSMZ 30007	99,9
phiKZgp144	<i>Burkholderia solanacearum</i>	0
POLYKZ144	<i>Burkholderia solanacearum</i>	99 - 99,9

Немодифицированные эндолизины phiKZgp144 и smi01 (YP\_001712536) не уменьшают значительно число клеток по сравнению с отрицательным контролем. Данный опыт снова свидетельствует об эффективности внешней мембраны как барьера против разрушающего действия эндолизина на клеточные стенки грамотрицательных бактерий. В сравнении с приведенными в табл. 18, инкубация с модифицированными эндолизинами KRK9\_smi01, pKKZ144pET32b и POLY-gp144 вызывает значительную редукцию количества бактериальных клеток в отношении *Acinetobacter baumannii* (50% для KRK\_smi01; 99.9% для pKKZ144pET32b), *Pseudomonas aeruginosa* (90-99.9 % для pKKZ144pET32b) и *Burkholderia solanaceum* (90-99.9% для POLYKZ144).

Данные опыты демонстрируют применимость способа катионного/поликатионного слития для других эндолизинов. Более того, опыты убедительно продемонстрировали, что модифицированные эндолизины обладают подтвержденной антимикробной активностью в отношении целого ряда бактерий.

Пример 10. Уменьшение (редукция) биопленки *Pseudomonas aeruginosa*. В данном эксперименте, провели испытание антибактериальной активности модифицированных вариантов эндолизина SMAP29-KZ144 и РК-ОВР, эндолизинов ОВР и KZ144 и пептида РК в отношении биопленки штаммов 2572 и 2573 *Pseudomonas aeruginosa*.

Уменьшение биопленки оценили количественно при помощи пробы кристаллическим фиолетовым (Peeters et al., *J Microbiol Methods* 72: 157-165 (2008)).

Образование биопленки:

Ночные суспензионные культуры мукоидного штамма *Pseudomonas aeruginosa* 2572 (изолят пациента), *Pseudomonas aeruginosa* 2573 и немучкоидного *E. coli* BL21(DE3) разбавили до показателя оптической плотности OD600 = 0.1. На полистироловый 96-луночный планшет выселили 100 мкл культуры/лунку. После инкубирования в течение 4 ч при 37°C супернатант отделили, а прилегающие бактерии промыли с использованием 100 мкл физиологического раствора (ФР). Засеянные лунки заполнили 100 мкл жидкой среды Лурия-Бертани и инкубировали в течение дополнительных 24 ч. После отделения супернатанта, образовавшуюся биопленку снова промыли со 100 мкл ФР.

Обработка биопленки:

Биопленку обработали с использованием 50 мкг/лунку PCKZ144 или 20 мкг/лунку альгинатлиазы или 50 мкг/лунку SMAP29-KZ144 и KZ144 или 25 мкг/лунку РК-ОВР и ОВР или 1,25 мкг РК-пептида

(все в буфере с 500 мМ NaCl), разбавленными одна часть на одну часть 2× среды Лурия-Бертани (без NaCl) и инкубировали в течение 12 ч. Необработанные серии использовали в качестве отрицательного контроля (одна часть белкового буфера на одну часть 2х среды Лурия-Бертани (без NaCl). После отделения супернатанта, еще раз промыли образовавшуюся биопленку с 100 мкл ФР.

Количественный анализ биопленки:

Промытую биопленку закрепили с 300 мкл метанола (99%; 15 мин) и высушили воздухом. Окрашивание провели с использованием 100 мкл 0.3% кристаллического фиолетового. После 20 мин, лунки промыли проточной водой и 300 мкл, а 33% уксусную кислоту использовали для разбавления связанного кристаллического фиолетового из внеклеточной матрицы биопленки. После 20 мин осуществили разбавление 1:10 и измерили абсорбцию (590 нм).

Статистический анализ показал значительное уменьшение зафиксированной биопленки, с применением РККZ144 в сравнении с посевами, обработанными альгинатлиазой или необработанными. Использование РККZ144 сделало возможным уменьшить биопленку до уровня немуккоидного лабораторного штамма *E. coli*.

Также модифицированные варианты эндолизина SMAP29-KZ144 и РК-ОВР показали значительное уменьшение биопленки *Pseudomonas aeruginosa* в сравнении с эндолизинами ОВР и KZ144. РК-пептид, напротив, способствует образованию биопленки *Pseudomonas aeruginosa*.

Пример 11. Уменьшение (редукция) биопленки *Acinetobacter baumannii*. В данном эксперименте, провели испытание антибактериальной активности модифицированного варианта эндолизина РК-ОВР, эндолизина ОВР и пептида РК в отношении биопленки штамма DSMZ30007 *Acinetobacter baumannii*.

Уменьшение биопленки оценили количественно при помощи пробы кристаллическим фиолетовым (Peeters et al., *J Microbiol Methods* 72: 157-165 (2008)).

Количественный анализ образования, обработки и квантификации провели в соответствии с ПРИМЕРОМ 10.

Модифицированный вариант эндолизина РК-ОВР показал значительное уменьшение биопленки *Acinetobacter baumannii* в сравнении с эндолизином ОВР. РК-пептид, напротив, способствует образованию биопленки *Acinetobacter baumannii*.

Пример 12. Уменьшение (редукция) биопленки *Staphylococcus aureus*. В данном эксперименте, провели испытание антибактериальной активности слитых белков Ply2638-РК и РК-лизостафина, энзимов *Lysostaphin* (лизостафин) и Ply2638 и пептида РК в отношении биопленки штамма KS13 *Staphylococcus aureus*.

Уменьшение биопленки оценили количественно при помощи пробы кристаллическим фиолетовым (Peeters et al., *J Microbiol Methods* 72: 157-165 (2008)).

Количественный анализ образования, обработки и квантификации провели в соответствии с ПРИМЕРОМ 10. За исключением параметров обработки биопленки, использовали 25 мкг/лунку Ply2638А-РК и Ply2638А или 18 мкг/лунку РК-лизостафина и лизостафина или 1,25 мкг РК-пептида.

Слитые белки РК-лизостафин и РК-Ply2638 показали значительное уменьшение биопленки *Staphylococcus aureus* в сравнении с энзимами лизостафином и Ply2638. РК-пептид, напротив, способствует образованию биопленки *Staphylococcus aureus*.

Пример 13: Уменьшение (редукция) биопленки *Listeria monocytogenes*. В данном эксперименте, провели испытание антибактериальной активности модифицированного вариант эндолизина Пентапептид-Ply511 в отношении биопленки штамма ScottA *Listeria monocytogenes*.

Уменьшение биопленки оценили количественно при помощи пробы кристаллическим фиолетовым (Peeters et al., *J Microbiol Methods* 72: 157-165 (2008)).

Количественный анализ образования, обработки и квантификации провели в соответствии с ПРИМЕРОМ 10. За исключением параметров обработки биопленки, использовали 25 мкг/лунку пентапептида-Ply511.

Модифицированный вариант эндолизина РК-Ply511 показал значительное уменьшение биопленки *Listeria monocytogenes*.







037276

<400> 3

Met Lys Pro Lys Asp Glu Ile Phe Asp Glu Ile Leu Gly Lys Glu Gly  
1 5 10 15

Gly Tyr Val Asn His Pro Asp Asp Lys Gly Gly Pro Thr Lys Trp Gly  
20 25 30

Ile Thr Glu Lys Val Ala Arg Ala His Gly Tyr Arg Gly Asp Met Arg  
35 40 45

Asn Leu Thr Arg Gly Gln Ala Leu Glu Ile Leu Glu Thr Asp Tyr Trp  
50 55 60

Tyr Gly Pro Arg Phe Asp Arg Val Ala Lys Ala Ser Pro Asp Val Ala  
65 70 75 80

Ala Glu Leu Cys Asp Thr Gly Val Asn Met Gly Pro Ser Val Ala Ala  
85 90 95

Lys Met Leu Gln Arg Trp Leu Asn Val Phe Asn Gln Gly Gly Arg Leu  
100 105 110

Tyr Pro Asp Met Asp Thr Asp Gly Arg Ile Gly Pro Arg Thr Leu Asn  
115 120 125

Ala Leu Arg Val Tyr Leu Glu Lys Arg Gly Lys Asp Gly Glu Arg Val  
130 135 140

Leu Leu Val Ala Leu Asn Cys Thr Gln Gly Glu Arg Tyr Leu Glu Leu  
145 150 155 160

Ala Glu Lys Arg Glu Ala Asp Glu Ser Phe Val Tyr Gly Trp Met Lys  
165 170 175

Glu Arg Val Leu Ile  
180

<210> 4

<211> 163

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> эндолизин фага T4 для Enterobacteria

<400> 4

Met Asn Ile Phe Glu Met Leu Arg Ile Asp Glu Gly Leu Arg Leu Lys  
1 5 10 15

037276

Ile Tyr Lys Asp Thr Glu Gly Tyr Tyr Thr Ile Gly Ile Gly His Leu  
20 25 30

Leu Thr Lys Ser Pro Ser Leu Asn Ala Ala Lys Ser Glu Leu Asp Lys  
35 40 45

Ala Ile Gly Arg Asn Cys Asn Gly Val Ile Thr Lys Asp Glu Ala Glu  
50 55 60

Lys Leu Phe Asn Gln Asp Val Asp Ala Ala Val Arg Gly Ile Leu Arg  
65 70 75 80

Asn Ala Lys Leu Lys Pro Val Tyr Asp Ser Leu Asp Ala Val Arg Arg  
85 90 95

Cys Ala Leu Ile Asn Met Val Phe Gln Met Gly Glu Thr Gly Val Ala  
100 105 110

Gly Phe Thr Asn Ser Leu Arg Met Leu Gln Gln Lys Arg Trp Asp Glu  
115 120 125

Ala Ala Val Asn Leu Ala Lys Ser Arg Trp Tyr Asn Gln Thr Pro Asn  
130 135 140

Arg Ala Lys Arg Val Ile Thr Thr Phe Arg Thr Gly Thr Trp Asp Ala  
145 150 155 160

Tyr Lys Asn

<210> 5  
<211> 280  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> эндолизин для Acinetobacter baumannii  
<400> 5

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

Ala Thr Leu Gln Lys Gln Leu Ala Lys Met Gly Tyr Lys Gly Val Lys  
20 25 30

Asp Lys Pro Leu Ser Val Asp Gly His Phe Gly Glu Ser Thr Glu Phe  
35 40 45

## 037276

Ala Val Ile Gln Leu Gln Arg Lys Phe Gly Leu Val Ala Asp Gly Lys  
50 55 60

Val Gly Asp Lys Thr Arg Gln Ala Leu Ala Gly Asp Ser Val Ser Lys  
65 70 75 80

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

Pro Glu Leu Val Ile Arg Val Phe Gly Ala Val Glu Gly Leu Gly Val  
100 105 110

Gly Phe Leu Pro Asn Gly Lys Ala Lys Ile Leu Phe Glu Arg His Arg  
115 120 125

Met Tyr Phe Tyr Leu Cys Gln Ala Leu Gly Lys Thr Phe Ala Asn Ser  
130 135 140

Gln Val Lys Ile Thr Pro Asn Ile Val Asn Thr Leu Thr Gly Gly Tyr  
145 150 155 160

Lys Gly Asp Ala Ala Glu Tyr Thr Arg Leu Ser Met Ala Ile Asn Ile  
165 170 175

His Lys Glu Ser Ala Leu Met Ser Thr Ser Trp Gly Gln Phe Gln Ile  
180 185 190

Met Gly Glu Asn Trp Lys Asp Leu Gly Tyr Ser Ser Val Gln Glu Phe  
195 200 205

Val Asp Gln Gln Gln Leu Asn Glu Gly Asn Gln Leu Glu Ala Phe Ile  
210 215 220

Arg Phe Ile Glu Trp Lys Pro Gly Leu Leu Glu Ala Leu Arg Lys Gln  
225 230 235 240

Asp Trp Asp Thr Val Phe Thr Leu Tyr Asn Gly Lys Asn Tyr Lys Lys  
245 250 255

Leu Gly Tyr Gln Ala Lys Phe Gln Lys Glu Trp Asp His Leu Glu Pro  
260 265 270

Ile Tyr Arg Glu Lys Thr Ala Ala  
275 280

<210> 6  
<211> 152  
<212> PRT

## 037276

&lt;213&gt; неизвестно

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; эндолизин для E. coli K1F

&lt;400&gt; 6

Met Val Ser Lys Val Gln Phe Asn Pro Arg Ser Arg Thr Asp Ala Ile  
 1 5 10 15

Phe Val His Cys Ser Ala Thr Lys Pro Glu Met Asp Ile Gly Val Glu  
 20 25 30

Thr Ile Arg Met Trp His Lys Gln Gln Ala Trp Leu Asp Val Gly Tyr  
 35 40 45

His Phe Ile Ile Lys Arg Asp Gly Thr Val Glu Glu Gly Arg Pro Val  
 50 55 60

Asn Val Val Gly Ser His Val Lys Asp Trp Asn Ser Arg Ser Val Gly  
 65 70 75 80

Val Cys Leu Val Gly Gly Ile Asn Ala Lys Gly Gln Phe Glu Ala Asn  
 85 90 95

Phe Thr Pro Ala Gln Met Asn Ser Leu Arg Asn Lys Leu Asp Asp Leu  
 100 105 110

Lys Val Met Tyr Pro Gln Ala Glu Ile Arg Ala His His Asp Val Ala  
 115 120 125

Pro Lys Ala Cys Pro Ser Phe Asp Leu Gln Arg Trp Leu Ser Thr Asn  
 130 135 140

Glu Leu Val Thr Ser Asp Arg Gly  
 145 150

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 328

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; неизвестно

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; OBPgpLYS

&lt;400&gt; 7

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

Thr Leu Ala Ser Leu Ser Leu Tyr Gly Gly Arg Ile Asp Gly Leu Phe  
 20 25 30

037276

Gly Glu Lys Cys Arg Gly Ala Ile Ile Leu Met Leu Asn Lys Val Tyr  
 35 40 45

Pro Asn Phe Ser Thr Asn Lys Leu Pro Ser Asn Thr Tyr Glu Ala Glu  
 50 55 60

Ser Val Phe Thr Phe Leu Gln Thr Ala Leu Ala Gly Val Gly Leu Tyr  
 65 70 75 80

Thr Ile Thr Ile Asp Gly Lys Trp Gly Gly Thr Ser Gln Gly Ala Ile  
 85 90 95

Asp Ala Leu Val Lys Ser Tyr Arg Gln Ile Thr Glu Ala Glu Arg Ala  
 100 105 110

Gly Ser Thr Leu Pro Leu Gly Leu Ala Thr Val Met Ser Lys His Met  
 115 120 125

Ser Ile Glu Gln Leu Arg Ala Met Leu Pro Thr Asp Arg Gln Gly Tyr  
 130 135 140

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

Ile Asn Thr Pro Leu Arg Ile Ala His Phe Met Ala Gln Ile Leu His  
 165 170 175

Glu Thr Ala Cys Phe Lys Tyr Thr Glu Glu Leu Ala Ser Gly Lys Ala  
 180 185 190

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

Leu Phe Lys Gly Arg Gly Leu Leu Gln Ile Thr Gly Arg Leu Asn Tyr  
 210 215 220

Val Lys Cys Gln Val Tyr Leu Arg Glu Lys Leu Lys Asp Pro Thr Phe  
 225 230 235 240

Asp Ile Thr Ser Ser Val Thr Cys Ala Gln Gln Leu Ser Glu Ser Pro  
 245 250 255

Leu Leu Ala Ala Leu Ala Ser Gly Tyr Phe Trp Arg Phe Ile Lys Pro  
 260 265 270

Lys Leu Asn Glu Thr Ala Asp Lys Asp Asp Ile Tyr Trp Val Ser Val

037276

275 280 285

Tyr Val Asn Gly Tyr Ala Lys Gln Ala Asn Pro Tyr Tyr Pro Asn Arg  
 290 295 300

Asp Lys Glu Pro Asn His Met Lys Glu Arg Val Gln Met Leu Ala Val  
 305 310 315 320

Thr Lys Lys Ala Leu Gly Ile Val  
 325

<210> 8  
 <211> 165  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> PSP3gp10

<400> 8

Met Pro Val Ile Asn Thr His Gln Asn Ile Ala Ala Phe Leu Asp Met  
 1 5 10 15

Leu Ala Tyr Ser Glu Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Thr Lys Asn Arg  
 20 25 30

Gly Tyr Asp Val Ile Val Thr Gly Phe Asp Gly Ser Pro Glu Ile Phe  
 35 40 45

Thr Asp Tyr Ser Asp His Pro Phe Ala His Gly Arg Pro Pro Lys Val  
 50 55 60

Phe Asn Arg Arg Gly Glu Lys Ser Thr Ala Ser Gly Arg Tyr Gln Gln  
 65 70 75 80

Leu Tyr Ile Phe Trp Pro His Tyr Lys Lys Gln Leu Ala Leu Pro Asp  
 85 90 95

Phe Ser Pro Leu Ser Gln Asp Lys Leu Ala Ile Gln Leu Ile Arg Glu  
 100 105 110

Arg Gly Ala Ile Asp Asp Ile Arg Ala Gly Arg Ile Glu Arg Ala Val  
 115 120 125

Ser Arg Cys Arg Asn Ile Trp Ala Ser Leu Pro Gly Ala Gly Tyr Gly  
 130 135 140

Gln Arg Glu His Ser Leu Glu Lys Leu Val Thr Val Trp Arg Thr Ala  
 145 150 155 160

## 037276

Gly Gly Val Met Ala  
165

<210> 9  
<211> 165  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> P2gp09

<400> 9

Met Pro Val Ile Asn Thr His Gln Asn Ile Ala Ala Phe Leu Asp Met  
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Glu Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Thr Lys Asn Arg  
20 25 30

Gly Tyr Asp Val Ile Val Thr Gly Leu Asp Gly Lys Pro Glu Ile Phe  
35 40 45

Thr Asp Tyr Ser Asp His Pro Phe Ala His Gly Arg Pro Ala Lys Val  
50 55 60

Phe Asn Arg Arg Gly Glu Lys Ser Thr Ala Ser Gly Arg Tyr Gln Gln  
65 70 75 80

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

Phe Ser Pro Leu Ser Gln Asp Arg Leu Ala Ile Gln Leu Ile Arg Glu  
100 105 110

Arg Gly Ala Leu Asp Asp Ile Arg Ala Gly Arg Ile Glu Arg Ala Ile  
115 120 125

Ser Arg Cys Arg Asn Ile Trp Ala Ser Leu Pro Gly Ala Gly Tyr Gly  
130 135 140

Gln Arg Glu His Ser Leu Glu Lys Leu Val Thr Val Trp Arg Thr Ala  
145 150 155 160

Gly Gly Val Pro Ala  
165

<210> 10  
<211> 6  
<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> синтетический пептид

<400> 10

Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> синтетический пептид

<400> 11

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> синтетический пептид

<400> 12

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> синтетический пептид

<400> 13

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
1 5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> синтетический пептид

<400> 14

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> unknown

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 16

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 17

Lys  
 1 5 10 15

<210> 18  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 18

Lys Arg Lys Lys  
 1 5 10 15

Arg Lys Lys

<210> 19  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 19

Arg  
 1 5 10 15

Arg Arg Arg

<210> 20  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 20

Lys  
 1 5 10 15

Lys Lys Lys

<210> 21  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 21

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg  
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys  
 20

<210> 22  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

&lt;400&gt; 22

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg  
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys  
 20

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; неизвестно

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический пептид

&lt;400&gt; 23

Lys Arg Lys Lys  
 1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys  
 20

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; неизвестно

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический пептид

&lt;400&gt; 24

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly Lys Arg Lys  
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 20

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; неизвестно

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический пептид

&lt;400&gt; 25

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly Ser Gly Lys  
 1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 20

## 037276

<210> 26  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 26

Lys Arg Lys Lys  
 1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys  
 20 25

<210> 27  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 27

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg  
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 20 25 30

<210> 28  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 28

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly Ser Gly Lys  
 1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Gly Ser Gly Ser Gly Lys Arg Lys  
 20 25 30

Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 35

<210> 29  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

037276

<220>  
<223> синтетический пептид  
<400> 29  
Lys Arg Lys Lys  
1 5 10 15  
Arg Lys Lys Arg  
20 25 30  
Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
35

<210> 30  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> синтетический пептид  
<400> 30  
Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg  
1 5 10 15  
Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg  
20 25 30  
Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
35 40

<210> 31  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> синтетический пептид  
<400> 31  
Ala Met Ser Gly  
1  
<210> 32  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> неизвестно  
<220>  
<223> синтетический пептид

<220>  
 <221> прочий признак  
 <222> (3)..(3)  
 <223> где Xaa представляет собой любой другой аминокислотный остаток, чем  
 лизин, аргинин и гистидин

<400> 32

Lys Arg Xaa Lys Arg  
 1 5

<210> 33  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 33

Lys Arg Ser Lys Arg  
 1 5

<210> 34  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> синтетический пептид

<400> 34

Lys Arg Gly Ser Gly  
 1 5

<210> 35  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> POLY-gp144

<400> 35

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg  
 1 5 10 15

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

Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn  
 35 40 45

Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser



037276

<400> 36

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg  
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly  
 20 25 30

Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp  
 35 40 45

Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val  
 50 55 60

Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly  
 65 70 75 80

Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro  
 85 90 95

Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala  
 100 105 110

Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln  
 115 120 125

Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile  
 130 135 140

Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly  
 145 150 155 160

Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu  
 165 170 175

Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu  
 180 185 190

Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val  
 195 200 205

Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe  
 210 215 220

Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu  
 225 230 235 240

Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe

037276

245 250 255

Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu  
 260 265 270

Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 275 280

<210> 37  
 <211> 293  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> (POLY)3-gp144

<400> 37

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg  
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys  
 20 25 30

Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln  
 35 40 45

Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp  
 50 55 60

Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys  
 65 70 75 80

Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala  
 85 90 95

Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro  
 100 105 110

Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn  
 115 120 125

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

Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser  
 145 150 155 160

Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met  
 165 170 175

037276

Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly  
 180 185 190

Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu  
 195 200 205

Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro  
 210 215 220

Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala  
 225 230 235 240

Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe  
 245 250 255

Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly  
 260 265 270

Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val  
 275 280 285

Ala Ala His Arg Lys  
 290

<210> 38  
 <211> 304  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> (POLY)4-gp144

<400> 38

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg  
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys  
 20 25 30

Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu  
 35 40 45

Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu  
 50 55 60

Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn  
 65 70 75 80

## 037276

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

<210> 39  
 <211> 303  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно  
 <220>

037276

<223> POLY-gp188

<400> 39

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asn Phe Arg Thr  
1 5 10 15

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

Tyr Thr Gly Gln Ile Asp Gly Val Trp Gly Lys Gly Thr Ser Ser Ser  
35 40 45

Thr Glu Thr Leu Leu Arg Gly Tyr Ala Glu Val Val Gly Lys Asn Thr  
50 55 60

Gly Gly Ile Gly Leu Pro Thr Thr Ser Asp Ala Ser Gly Tyr Asn Val  
65 70 75 80

Ile Thr Ala Leu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Leu Gly Leu Tyr Ser Leu  
85 90 95

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

Ala Phe Glu Val Tyr Lys Glu Arg Tyr Arg Thr Pro Thr Tyr Asp Ile  
115 120 125

Ala Trp Ser Gly Lys Val Ser Pro Ala Phe Thr Ala Lys Val Lys Asp  
130 135 140

Trp Cys Gly Val His Val Pro Asn His Arg Ala Pro His Trp Leu Met  
145 150 155 160

Ala Cys Met Ala Phe Glu Thr Gly Gln Thr Phe Ser Pro Ser Ile Lys  
165 170 175

Asn Ala Ala Gly Ser Glu Ala Tyr Gly Leu Ile Gln Phe Met Ser Pro  
180 185 190

Ala Ala Asn Asp Leu Asn Val Pro Leu Ser Val Ile Arg Ser Met Asp  
195 200 205

Gln Leu Thr Gln Leu Asp Leu Val Phe Lys Tyr Phe Glu Met Trp Met  
210 215 220

Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Tyr Leu Thr Ile  
225 230 235 240

037276

Phe His Pro Ala Ser Val Gly Lys Lys Ala Asp Glu Val Leu Phe Leu  
 245 250 255

Gln Gly Ser Lys Ala Tyr Leu Gln Asn Lys Gly Phe Asp Val Asp Lys  
 260 265 270

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

Tyr Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Glu Asn Arg His Val Ile Ser Tyr  
 290 295 300

<210> 40  
 <211> 314  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> (POLY)2-gp188

<400> 40

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg  
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asn Phe Arg Thr Lys Asn Gly Tyr Arg  
 20 25 30

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

Asp Gly Val Trp Gly Lys Gly Thr Ser Ser Ser Thr Glu Thr Leu Leu  
 50 55 60

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

Pro Thr Thr Ser Asp Ala Ser Gly Tyr Asn Val Ile Thr Ala Leu Gln  
 85 90 95

Arg Asn Leu Ala Phe Leu Gly Leu Tyr Ser Leu Thr Val Asp Gly Ile  
 100 105 110

Trp Gly Asn Gly Thr Leu Ser Gly Leu Asp Lys Ala Phe Glu Val Tyr  
 115 120 125

Lys Glu Arg Tyr Arg Thr Pro Thr Tyr Asp Ile Ala Trp Ser Gly Lys  
 130 135 140

037276

Val Ser Pro Ala Phe Thr Ala Lys Val Lys Asp Trp Cys Gly Val His  
145 150 155 160

Val Pro Asn His Arg Ala Pro His Trp Leu Met Ala Cys Met Ala Phe  
165 170 175

Glu Thr Gly Gln Thr Phe Ser Pro Ser Ile Lys Asn Ala Ala Gly Ser  
180 185 190

Glu Ala Tyr Gly Leu Ile Gln Phe Met Ser Pro Ala Ala Asn Asp Leu  
195 200 205

Asn Val Pro Leu Ser Val Ile Arg Ser Met Asp Gln Leu Thr Gln Leu  
210 215 220

Asp Leu Val Phe Lys Tyr Phe Glu Met Trp Met Lys Arg Gly Lys Arg  
225 230 235 240

Tyr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Tyr Leu Thr Ile Phe His Pro Ala Ser  
245 250 255

Val Gly Lys Lys Ala Asp Glu Val Leu Phe Leu Gln Gly Ser Lys Ala  
260 265 270

Tyr Leu Gln Asn Lys Gly Phe Asp Val Asp Lys Asp Gly Lys Ile Thr  
275 280 285

Leu Gly Glu Ile Ser Ser Thr Leu Tyr Thr Thr Tyr Tyr Lys Gly Leu  
290 295 300

Leu Pro Glu Asn Arg His Val Ile Ser Tyr  
305 310

<210> 41  
<211> 325  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> (POLY)3-gp188

<400> 41

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg  
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys  
20 25 30

037276

Arg Lys Asn Phe Arg Thr Lys Asn Gly Tyr Arg Asp Leu Gln Ala Leu  
35 40 45

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

Lys Gly Thr Ser Ser Ser Thr Glu Thr Leu Leu Arg Gly Tyr Ala Glu  
65 70 75 80

Val Val Gly Lys Asn Thr Gly Gly Ile Gly Leu Pro Thr Thr Ser Asp  
85 90 95

Ala Ser Gly Tyr Asn Val Ile Thr Ala Leu Gln Arg Asn Leu Ala Phe  
100 105 110

Leu Gly Leu Tyr Ser Leu Thr Val Asp Gly Ile Trp Gly Asn Gly Thr  
115 120 125

Leu Ser Gly Leu Asp Lys Ala Phe Glu Val Tyr Lys Glu Arg Tyr Arg  
130 135 140

Thr Pro Thr Tyr Asp Ile Ala Trp Ser Gly Lys Val Ser Pro Ala Phe  
145 150 155 160

Thr Ala Lys Val Lys Asp Trp Cys Gly Val His Val Pro Asn His Arg  
165 170 175

Ala Pro His Trp Leu Met Ala Cys Met Ala Phe Glu Thr Gly Gln Thr  
180 185 190

Phe Ser Pro Ser Ile Lys Asn Ala Ala Gly Ser Glu Ala Tyr Gly Leu  
195 200 205

Ile Gln Phe Met Ser Pro Ala Ala Asn Asp Leu Asn Val Pro Leu Ser  
210 215 220

Val Ile Arg Ser Met Asp Gln Leu Thr Gln Leu Asp Leu Val Phe Lys  
225 230 235 240

Tyr Phe Glu Met Trp Met Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Thr Gln Leu Glu  
245 250 255

Asp Phe Tyr Leu Thr Ile Phe His Pro Ala Ser Val Gly Lys Lys Ala  
260 265 270

Asp Glu Val Leu Phe Leu Gln Gly Ser Lys Ala Tyr Leu Gln Asn Lys  
275 280 285

## 037276

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

Ser Thr Leu Tyr Thr Thr Tyr Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Glu Asn Arg  
 305 310 315 320

His Val Ile Ser Tyr  
 325

<210> 42

<211> 336

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> (POLY)4-gp188

<400> 42

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg  
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys  
 20 25 30

Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asn Phe Arg  
 35 40 45

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

Leu Tyr Thr Gly Gln Ile Asp Gly Val Trp Gly Lys Gly Thr Ser Ser  
 65 70 75 80

Ser Thr Glu Thr Leu Leu Arg Gly Tyr Ala Glu Val Val Gly Lys Asn  
 85 90 95

Thr Gly Gly Ile Gly Leu Pro Thr Thr Ser Asp Ala Ser Gly Tyr Asn  
 100 105 110

Val Ile Thr Ala Leu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Leu Gly Leu Tyr Ser  
 115 120 125

Leu Thr Val Asp Gly Ile Trp Gly Asn Gly Thr Leu Ser Gly Leu Asp  
 130 135 140

Lys Ala Phe Glu Val Tyr Lys Glu Arg Tyr Arg Thr Pro Thr Tyr Asp  
 145 150 155 160

037276

Ile Ala Trp Ser Gly Lys Val Ser Pro Ala Phe Thr Ala Lys Val Lys  
 165 170 175

Asp Trp Cys Gly Val His Val Pro Asn His Arg Ala Pro His Trp Leu  
 180 185 190

Met Ala Cys Met Ala Phe Glu Thr Gly Gln Thr Phe Ser Pro Ser Ile  
 195 200 205

Lys Asn Ala Ala Gly Ser Glu Ala Tyr Gly Leu Ile Gln Phe Met Ser  
 210 215 220

Pro Ala Ala Asn Asp Leu Asn Val Pro Leu Ser Val Ile Arg Ser Met  
 225 230 235 240

Asp Gln Leu Thr Gln Leu Asp Leu Val Phe Lys Tyr Phe Glu Met Trp  
 245 250 255

Met Lys Arg Gly Lys Arg Tyr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Tyr Leu Thr  
 260 265 270

Ile Phe His Pro Ala Ser Val Gly Lys Lys Ala Asp Glu Val Leu Phe  
 275 280 285

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

Lys Asp Gly Lys Ile Thr Leu Gly Glu Ile Ser Ser Thr Leu Tyr Thr  
 305 310 315 320

Thr Tyr Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Glu Asn Arg His Val Ile Ser Tyr  
 325 330 335

<210> 43  
 <211> 272  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> pKKZ144pET32b

<400> 43

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu  
 1 5 10 15

Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu  
 20 25 30

037276

Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn  
 35 40 45

Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp  
 50 55 60

Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys  
 65 70 75 80

Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn  
 85 90 95

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

Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser  
 115 120 125

Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp  
 130 135 140

Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly  
 145 150 155 160

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

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

Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu  
 195 200 205

Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr  
 210 215 220

Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln  
 225 230 235 240

Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile  
 245 250 255

Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 260 265 270

<210> 44  
 <211> 269  
 <212> PRT

037276

<213> неизвестно

<220>

<223> KRK\_6\_pET32b

<400> 44

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys  
 20 25 30

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

Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly  
 50 55 60

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

Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg  
 85 90 95

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

Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp  
 115 120 125

Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe  
 130 135 140

Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr  
 145 150 155 160

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

Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu  
 180 185 190

Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala  
 195 200 205

His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln  
 210 215 220

037276

Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro  
 225 230 235 240

Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val  
 245 250 255

Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 260 265

<210> 45  
 <211> 275  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> KRK\_12\_pET32b

<400> 45

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 1 5 10 15

Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln  
 20 25 30

Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile  
 35 40 45

Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn  
 50 55 60

Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu  
 65 70 75 80

Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro  
 85 90 95

Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val  
 100 105 110

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

Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala  
 130 135 140

Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu  
 145 150 155 160

037276

Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu  
 165 170 175

Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys  
 180 185 190

Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp  
 195 200 205

Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg  
 210 215 220

Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys  
 225 230 235 240

Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro  
 245 250 255

Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala  
 260 265 270

His Arg Lys  
 275

<210> 46  
 <211> 277  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> KRK\_14\_pET32b

<400> 46

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln  
 20 25 30

Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp  
 35 40 45

Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys  
 50 55 60

Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala  
 65 70 75 80

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



037276

Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu  
 20 25 30

Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn  
 35 40 45

Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp  
 50 55 60

Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys  
 65 70 75 80

Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn  
 85 90 95

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

Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser  
 115 120 125

Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp  
 130 135 140

Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly  
 145 150 155 160

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

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

Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu  
 195 200 205

Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr  
 210 215 220

Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln  
 225 230 235 240

Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile  
 245 250 255

037276

Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 260 265 270

<210> 48  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> K8\_pET32b

<400> 48

Ala Met Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg  
 1 5 10 15

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

Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn  
 35 40 45

Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser  
 50 55 60

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

Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys  
 85 90 95

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

Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala  
 115 120 125

Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe  
 130 135 140

Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met  
 145 150 155 160

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

Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn  
 180 185 190

Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr

037276

195 200 205

Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr  
 210 215 220

Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala  
 225 230 235 240

Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln  
 245 250 255

Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 260 265 270

<210> 49  
 <211> 302  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> pK2KZ144\_pET32b\_mod3

<400> 49

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser  
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser Gly  
 20 25 30

Ser Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys  
 35 40 45

Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu  
 50 55 60

Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr  
 65 70 75 80

Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp  
 85 90 95

Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser  
 100 105 110

Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser  
 115 120 125

Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly  
 130 135 140

037276

Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe  
145 150 155 160

Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln  
165 170 175

Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys  
180 185 190

Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg  
195 200 205

Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile  
210 215 220

Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu  
225 230 235 240

Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly  
245 250 255

Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn  
260 265 270

Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu  
275 280 285

Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
290 295 300

<210> 50  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер PSP3gp10 forw r

<400> 50  
atgggatccc cggtcattaa tactcaccag

30

<210> 51  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<223> праймер PSP3gp10 rev

<400> 51

tgccatcacc cgcagccg tg 22

<210> 52  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер PKPSP3gp10 forw

<400> 52  
 atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaccgg tcattaatac tcaccag 57

<210> 53  
 <211> 176  
 <212> PRT  
 <213> unknown

<220>  
 <223> PKPSP3gp10

<400> 53

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Pro Val Ile Asn  
 1 5 10 15

Thr His Gln Asn Ile Ala Ala Phe Leu Asp Met Leu Ala Tyr Ser Glu  
 20 25 30

Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Thr Lys Asn Arg Gly Tyr Asp Val Ile  
 35 40 45

Val Thr Gly Phe Asp Gly Ser Pro Glu Ile Phe Thr Asp Tyr Ser Asp  
 50 55 60

His Pro Phe Ala His Gly Arg Pro Pro Lys Val Phe Asn Arg Arg Gly  
 65 70 75 80

Glu Lys Ser Thr Ala Ser Gly Arg Tyr Gln Gln Leu Tyr Ile Phe Trp  
 85 90 95

Pro His Tyr Lys Lys Gln Leu Ala Leu Pro Asp Phe Ser Pro Leu Ser  
 100 105 110

Gln Asp Lys Leu Ala Ile Gln Leu Ile Arg Glu Arg Gly Ala Ile Asp  
 115 120 125

Asp Ile Arg Ala Gly Arg Ile Glu Arg Ala Val Ser Arg Cys Arg Asn  
 130 135 140

Ile Trp Ala Ser Leu Pro Gly Ala Gly Tyr Gly Gln Arg Glu His Ser  
 145 150 155 160

037276

Leu Glu Lys Leu Val Thr Val Trp Arg Thr Ala Gly Gly Val Met Ala  
 165 170 175

<210> 54  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер SP2gp09 forw

<400> 54  
 atgggatccc cggtaattaa cacgcatc 28

<210> 55  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер P2gp09 rev

<400> 55  
 agcccgtaacg ccgccaagcgg tacgc 25

<210> 56  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер PKP2gp09 forw

<400> 56  
 atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaccgg taattaacac gcat 54

<210> 57  
 <211> 176  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> PKP2gp09

<400> 57

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Pro Val Ile Asn  
 1 5 10 15

Thr His Gln Asn Ile Ala Ala Phe Leu Asp Met Leu Ala Val Ser Glu  
 20 25 30

Gly Thr Ala Asn His Pro Leu Thr Lys Asn Arg Gly Tyr Asp Val Ile  
 35 40 45

037276

Val Thr Gly Leu Asp Gly Lys Pro Glu Ile Phe Thr Asp Tyr Ser Asp  
 50 55 60

His Pro Phe Ala His Gly Arg Pro Ala Lys Val Phe Asn Arg Arg Gly  
 65 70 75 80

Glu Lys Ser Thr Ala Ser Gly Arg Tyr Gln Gln Leu Tyr Leu Phe Trp  
 85 90 95

Pro His Tyr Arg Lys Gln Leu Ala Leu Pro Asp Phe Ser Pro Leu Ser  
 100 105 110

Gln Asp Arg Leu Ala Ile Gln Leu Ile Arg Glu Arg Gly Ala Leu Asp  
 115 120 125

Asp Ile Arg Ala Gly Arg Ile Glu Arg Ala Ile Ser Arg Cys Arg Asn  
 130 135 140

Ile Trp Ala Ser Leu Pro Gly Ala Gly Tyr Gly Gln Arg Glu His Ser  
 145 150 155 160

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

<210> 58  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер OBPgpLYS forward

<400> 58  
 atgaaaaata gcgagaagaa t 21

<210> 59  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер OBPgpLYS reverse

<400> 59  
 aactattccg agtgctttct ttgt 24

<210> 60  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер PKOBPgpLYS forward

<400> 60

atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaaaaa atagcgagaa gaat

54

<210> 61

<211> 339

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> PKOBPgpLYS

<400> 61

Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Asn Ser Glu  
1 5 10 15

Lys Asn Ala Ser Ile Ile Met Ser Ile Gln Arg Thr Leu Ala Ser Leu  
20 25 30

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

Gly Ala Ile Ile Leu Met Leu Asn Lys Val Tyr Pro Asn Phe Ser Thr  
50 55 60

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

Leu Gln Thr Ala Leu Ala Gly Val Gly Leu Tyr Thr Ile Thr Ile Asp  
85 90 95

Gly Lys Trp Gly Gly Thr Ser Gln Gly Ala Ile Asp Ala Leu Val Lys  
100 105 110

Ser Tyr Arg Gln Ile Thr Glu Ala Glu Arg Ala Gly Ser Thr Leu Pro  
115 120 125

Leu Gly Leu Ala Thr Val Met Ser Lys His Met Ser Ile Glu Gln Leu  
130 135 140

Arg Ala Met Leu Pro Thr Asp Arg Gln Gly Tyr Ala Glu Val Tyr Ile  
145 150 155 160

Asp Pro Leu Asn Glu Thr Met Asp Ile Phe Glu Ile Asn Thr Pro Leu  
165 170 175

Arg Ile Ala His Phe Met Ala Gln Ile Leu His Glu Thr Ala Cys Phe  
180 185 190

037276

Lys Tyr Thr Glu Glu Leu Ala Ser Gly Lys Ala Tyr Glu Gly Arg Ala  
 195 200 205

Asp Leu Gly Asn Thr Arg Pro Gly Asp Gly Pro Leu Phe Lys Gly Arg  
 210 215 220

Gly Leu Leu Gln Ile Thr Gly Arg Leu Asn Tyr Val Lys Cys Gln Val  
 225 230 235 240

Tyr Leu Arg Glu Lys Leu Lys Asp Pro Thr Phe Asp Ile Thr Ser Ser  
 245 250 255

Val Thr Cys Ala Gln Gln Leu Ser Glu Ser Pro Leu Leu Ala Ala Leu  
 260 265 270

Ala Ser Gly Tyr Phe Trp Arg Phe Ile Lys Pro Lys Leu Asn Glu Thr  
 275 280 285

Ala Asp Lys Asp Asp Ile Tyr Trp Val Ser Val Tyr Val Asn Gly Tyr  
 290 295 300

Ala Lys Gln Ala Asn Pro Tyr Tyr Pro Asn Arg Asp Lys Glu Pro Asn  
 305 310 315 320

His Met Lys Glu Arg Val Gln Met Leu Ala Val Thr Lys Lys Ala Leu  
 325 330 335

Gly Ile Val

<210> 62  
 <211> 283  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> pK2KZ144pET32b

<400> 62

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys  
 1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg  
 20 25 30

Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr  
 35 40 45

037276

Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln  
 50 55 60

Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val  
 65 70 75 80

Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile  
 85 90 95

Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala  
 100 105 110

Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser  
 115 120 125

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

Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr  
 145 150 155 160

Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val  
 165 170 175

Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala  
 180 185 190

Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro  
 195 200 205

Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe  
 210 215 220

Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu  
 225 230 235 240

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

Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn  
 260 265 270

Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 275 280

<210> 63  
 <211> 294  
 <212> PRT

## 037276

&lt;213&gt; неизвестно

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; pK3KZ144pET32b

&lt;400&gt; 63

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys  
 1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 20 25 30

Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys  
 35 40 45

Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro  
 50 55 60

Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln  
 65 70 75 80

Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp  
 85 90 95

Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile  
 100 105 110

Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met  
 115 120 125

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

Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr  
 145 150 155 160

Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr  
 165 170 175

Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr  
 180 185 190

Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu  
 195 200 205

Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu  
 210 215 220

037276

Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala  
225 230 235 240

Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His  
245 250 255

Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp  
260 265 270

Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys  
275 280 285

Val Ala Ala His Arg Lys  
290

<210> 64  
<211> 305  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> pK4KZ144pET32b

<400> 64

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys  
1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
20 25 30

Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val  
35 40 45

Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu  
50 55 60

Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly  
65 70 75 80

Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu  
85 90 95

Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser  
100 105 110

Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala  
115 120 125

Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn



## 037276

<210> 66  
 <211> 282  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> KRK\_19\_pET32b

<400> 66

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly  
 20 25 30

Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp  
 35 40 45

Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val  
 50 55 60

Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly  
 65 70 75 80

Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro Ile Pro  
 85 90 95

Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala  
 100 105 110

Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln  
 115 120 125

Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile  
 130 135 140

Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly  
 145 150 155 160

Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu  
 165 170 175

Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu  
 180 185 190

Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val  
 195 200 205

037276

Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe  
 210 215 220

Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu  
 225 230 235 240

Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe  
 245 250 255

Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu  
 260 265 270

Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 275 280

<210> 67

<211> 284

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> KRK\_21\_pET32b

<400> 67

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp  
 20 25 30

Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly  
 35 40 45

Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn  
 50 55 60

Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile  
 65 70 75 80

Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Pro Pro  
 85 90 95

Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala  
 100 105 110

Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg  
 115 120 125

037276

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

Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu  
 145 150 155 160

Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly  
 165 170 175

Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser  
 180 185 190

Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg  
 195 200 205

Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His  
 210 215 220

Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn  
 225 230 235 240

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

Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr  
 260 265 270

Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 275 280

<210> 68  
 <211> 288  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> KRK\_25\_pET32b

<400> 68

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Lys Val Leu  
 20 25 30

Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu  
 35 40 45

Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn



## 037276

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; KRK\_39\_pET32b

&lt;400&gt; 69

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Lys  
 20 25 30

Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys  
 35 40 45

Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu  
 50 55 60

Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr  
 65 70 75 80

Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp  
 85 90 95

Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys Tyr Ser  
 100 105 110

Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser  
 115 120 125

Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly  
 130 135 140

Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe  
 145 150 155 160

Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln  
 165 170 175

Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys  
 180 185 190

Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg  
 195 200 205

Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile  
 210 215 220

Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu



## 037276

Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly  
145 150 155 160

Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu  
165 170 175

Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu  
180 185 190

Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val  
195 200 205

Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe  
210 215 220

Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu  
225 230 235 240

Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe  
245 250 255

Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu  
260 265 270

Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
275 280

<210> 71  
<211> 279  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> K16\_pET32b

<400> 71

Ala Met Gly Ser Lys  
1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val  
20 25 30

Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys  
35 40 45

Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe  
50 55 60

## 037276

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

<210> 72  
 <211> 294  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>

037276

<223> pKKZ-144\_K2\_pET32b

<400> 72

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu  
1 5 10 15

Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu  
20 25 30

Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn  
35 40 45

Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp  
50 55 60

Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu Phe Ser Lys  
65 70 75 80

Tyr Ser Pro Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn  
85 90 95

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

Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser  
115 120 125

Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp  
130 135 140

Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly  
145 150 155 160

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

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

Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu  
195 200 205

Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr  
210 215 220

Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys Glu Ala Gln  
225 230 235 240

037276

Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile  
 245 250 255

Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
 260 265 270

Leu Glu Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys  
 275 280 285

Lys Arg Lys Lys Arg Lys  
 290

<210> 73

<211> 285

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> pK2KZ144\_pET32b\_mod1

<400> 73

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser  
 1 5 10 15

Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg Lys Gly  
 20 25 30

Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn Leu Cys  
 35 40 45

Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn Thr Phe  
 50 55 60

Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser Asp Gly  
 65 70 75 80

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

Pro Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Pro Met Pro Thr Ala Asn Lys Ser Arg  
 100 105 110

Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val Glu Asn Ala Thr Gly Val  
 115 120 125

Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ile Glu Ser Ala Phe Asp  
 130 135 140

## 037276

Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala Thr Gly Trp Phe Gln Phe  
145 150 155 160

Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu Asn Tyr Gly Met Lys Tyr  
165 170 175

Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu Arg Lys Asp Pro Arg Ile  
180 185 190

Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met Asn Ile Leu  
195 200 205

Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Ala  
210 215 220

His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg Phe Leu Thr Thr Gly Gln  
225 230 235 240

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

Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro Lys Thr Ile Gln Glu Val  
260 265 270

Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala His Arg Lys  
275 280 285

<210> 74  
<211> 287  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> pK2KZ144\_pET32b\_mod2

<400> 74

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser  
1 5 10 15

Gly Ser Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Val Leu Arg  
20 25 30

Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln Thr Leu Leu Asn  
35 40 45

Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile Phe Gly Asn Asn  
50 55 60

Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn Cys Leu Asp Ser



## 037276

&lt;400&gt; 75

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Glu Tyr Asp  
 1 5 10 15

Met Ile Leu Lys Phe Gly Ser Lys Gly Asp Ala Val Ala Thr Leu Gln  
 20 25 30

Lys Gln Leu Ala Lys Met Gly Tyr Lys Gly Val Lys Asp Lys Pro Leu  
 35 40 45

Ser Val Asp Gly His Phe Gly Glu Ser Thr Glu Phe Ala Val Ile Gln  
 50 55 60

Leu Gln Arg Lys Phe Gly Leu Val Ala Asp Gly Lys Val Gly Asp Lys  
 65 70 75 80

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

Glu Asp Tyr Lys Lys Ala Ala Ile Arg Leu Lys Val Pro Glu Leu Val  
 100 105 110

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

Asn Gly Lys Ala Lys Ile Leu Phe Glu Arg His Arg Met Tyr Phe Tyr  
 130 135 140

Leu Cys Gln Ala Leu Gly Lys Thr Phe Ala Asn Ser Gln Val Lys Ile  
 145 150 155 160

Thr Pro Asn Ile Val Asn Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Lys Gly Asp Ala  
 165 170 175

Ala Glu Tyr Thr Arg Leu Ser Met Ala Ile Asn Ile His Lys Glu Ser  
 180 185 190

Ala Leu Met Ser Thr Ser Trp Gly Gln Phe Gln Ile Met Gly Glu Asn  
 195 200 205

Trp Lys Asp Leu Gly Tyr Ser Ser Val Gln Glu Phe Val Asp Gln Gln  
 210 215 220

Gln Leu Asn Glu Gly Asn Gln Leu Glu Ala Phe Ile Arg Phe Ile Glu  
 225 230 235 240

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



## 037276

Arg Val Ile Thr Thr Phe Arg Thr Gly Thr Trp Asp Ala Tyr Lys Asn  
 165 170 175

<210> 77  
 <211> 164  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> smi03\_KRK9

<400> 77

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Val Ser Lys  
 1 5 10 15

Val Gln Phe Asn Pro Arg Ser Arg Thr Asp Ala Ile Phe Val His Cys  
 20 25 30

Ser Ala Thr Lys Pro Glu Met Asp Ile Gly Val Glu Thr Ile Arg Met  
 35 40 45

Trp His Lys Gln Gln Ala Trp Leu Asp Val Gly Tyr His Phe Ile Ile  
 50 55 60

Lys Arg Asp Gly Thr Val Glu Glu Gly Arg Pro Val Asn Val Val Gly  
 65 70 75 80

Ser His Val Lys Asp Trp Asn Ser Arg Ser Val Gly Val Cys Leu Val  
 85 90 95

Gly Gly Ile Asn Ala Lys Gly Gln Phe Glu Ala Asn Phe Thr Pro Ala  
 100 105 110

Gln Met Asn Ser Leu Arg Asn Lys Leu Asp Asp Leu Lys Val Met Tyr  
 115 120 125

Pro Gln Ala Glu Ile Arg Ala His His Asp Val Ala Pro Lys Ala Cys  
 130 135 140

Pro Ser Phe Asp Leu Gln Arg Trp Leu Ser Thr Asn Glu Leu Val Thr  
 145 150 155 160

Ser Asp Arg Gly

<210> 78  
 <211> 194  
 <212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> smi04\_KRK9

<400> 78

Ala Met Gly Ser Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Gly Lys Pro  
1 5 10 15

Lys Asp Glu Ile Phe Asp Glu Ile Leu Gly Lys Glu Gly Gly Tyr Val  
20 25 30

Asn His Pro Asp Asp Lys Gly Gly Pro Thr Lys Trp Gly Ile Thr Glu  
35 40 45

Lys Val Ala Arg Ala His Gly Tyr Arg Gly Asp Met Arg Asn Leu Thr  
50 55 60

Arg Gly Gln Ala Leu Glu Ile Leu Glu Thr Asp Tyr Trp Tyr Gly Pro  
65 70 75 80

Arg Phe Asp Arg Val Ala Lys Ala Ser Pro Asp Val Ala Ala Glu Leu  
85 90 95

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

Gln Arg Trp Leu Asn Val Phe Asn Gln Gly Gly Arg Leu Tyr Pro Asp  
115 120 125

Met Asp Thr Asp Gly Arg Ile Gly Pro Arg Thr Leu Asn Ala Leu Arg  
130 135 140

Val Tyr Leu Glu Lys Arg Gly Lys Asp Gly Glu Arg Val Leu Leu Val  
145 150 155 160

Ala Leu Asn Cys Thr Gln Gly Glu Arg Tyr Leu Glu Leu Ala Glu Lys  
165 170 175

Arg Glu Ala Asp Glu Ser Phe Val Tyr Gly Trp Met Lys Glu Arg Val  
180 185 190

Leu Ile

<210> 79

<211> 52

<212> DNA

<213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер PKgp144 for  
 <400> 79  
 atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaaaag tattacgcaa ag 52

<210> 80  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер PKgp188 for  
 <400> 80  
 atgggatcca aacgcaagaa acgtaagaaa cgcaaaaaact tccggacgaa g 51

<210> 81  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> primer gp144 rev  
 <400> 81  
 ttttctatgt gctgcaac 18

<210> 82  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> primer gp144 rev  
 <400> 82  
 atacgaaata acgtgacga 19

<210> 83  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер gp144 for  
 <400> 83  
 atgaaagtat tacgcaaa 18

<210> 84  
 <211> 339  
 <212> PRT  
 <213> unknown

<220>  
 <223> Cpl-1

## 037276

&lt;400&gt; 84

Met Val Lys Lys Asn Asp Leu Phe Val Asp Val Ser Ser His Asn Gly  
 1 5 10 15

Tyr Asp Ile Thr Gly Ile Leu Glu Gln Met Gly Thr Thr Asn Thr Ile  
 20 25 30

Ile Lys Ile Ser Glu Ser Thr Thr Tyr Leu Asn Pro Cys Leu Ser Ala  
 35 40 45

Gln Val Glu Gln Ser Asn Pro Ile Gly Phe Tyr His Phe Ala Arg Phe  
 50 55 60

Gly Gly Asp Val Ala Glu Ala Glu Arg Glu Ala Gln Phe Phe Leu Asp  
 65 70 75 80

Asn Val Pro Met Gln Val Lys Tyr Leu Val Leu Asp Tyr Glu Asp Asp  
 85 90 95

Pro Ser Gly Asp Ala Gln Ala Asn Thr Asn Ala Cys Leu Arg Phe Met  
 100 105 110

Gln Met Ile Ala Asp Ala Gly Tyr Lys Pro Ile Tyr Tyr Ser Tyr Lys  
 115 120 125

Pro Phe Thr His Asp Asn Val Asp Tyr Gln Gln Ile Leu Ala Gln Phe  
 130 135 140

Pro Asn Ser Leu Trp Ile Ala Gly Tyr Gly Leu Asn Asp Gly Thr Ala  
 145 150 155 160

Asn Phe Glu Tyr Phe Pro Ser Met Asp Gly Ile Arg Trp Trp Gln Tyr  
 165 170 175

Ser Ser Asn Pro Phe Asp Lys Asn Ile Val Leu Leu Asp Asp Glu Glu  
 180 185 190

Asp Asp Lys Pro Lys Thr Ala Gly Thr Trp Lys Gln Asp Ser Lys Gly  
 195 200 205

Trp Trp Phe Arg Arg Asn Asn Gly Ser Phe Pro Tyr Asn Lys Trp Glu  
 210 215 220

Lys Ile Gly Gly Val Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Lys Gly Tyr Cys Leu  
 225 230 235 240

037276

Thr Ser Glu Trp Leu Lys Asp Asn Glu Lys Trp Tyr Tyr Leu Lys Asp  
 245 250 255

Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Val Leu Val Gly Ser Glu Trp Tyr  
 260 265 270

Tyr Met Asp Asp Ser Gly Ala Met Val Thr Gly Trp Val Lys Tyr Lys  
 275 280 285

Asn Asn Trp Tyr Tyr Met Thr Asn Glu Arg Gly Asn Met Val Ser Asn  
 290 295 300

Glu Phe Ile Lys Ser Gly Lys Gly Trp Tyr Phe Met Asn Thr Asn Gly  
 305 310 315 320

Glu Leu Ala Asp Asn Pro Ser Phe Thr Lys Glu Pro Asp Gly Leu Ile  
 325 330 335

Thr Val Ala

<210> 85  
 <211> 341  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Ply511

<400> 85

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

Gly Lys Leu Lys Gly Ala Asn Phe Val Ile Ala His Glu Thr Ala Asn  
 20 25 30

Ser Lys Ser Thr Ile Asp Asn Glu Val Ser Tyr Met Thr Arg Asn Trp  
 35 40 45

Lys Asn Ala Phe Val Thr His Phe Val Gly Gly Gly Gly Arg Val Val  
 50 55 60

Gln Val Ala Asn Val Asn Tyr Val Ser Trp Gly Ala Gly Gln Tyr Ala  
 65 70 75 80

Asn Ser Tyr Ser Tyr Ala Gln Val Glu Leu Cys Arg Thr Ser Asn Ala  
 85 90 95

Thr Thr Phe Lys Lys Asp Tyr Glu Val Tyr Cys Gln Leu Leu Val Asp



037276

<210> 86  
 <211> 495  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> LysK

<400> 86

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

Lys Gly Thr Val Asp Ser Pro Tyr Arg Val Lys Lys Ala Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Asp Pro Ser Phe Gly Val Met Glu Ala Gly Ala Ile Asp Ala Asp Gly  
 35 40 45

Tyr Tyr His Ala Gln Cys Gln Asp Leu Ile Thr Asp Tyr Val Leu Trp  
 50 55 60

Leu Thr Asp Asn Lys Val Arg Thr Trp Gly Asn Ala Lys Asp Gln Ile  
 65 70 75 80

Lys Gln Ser Tyr Gly Thr Gly Phe Lys Ile His Glu Asn Lys Pro Ser  
 85 90 95

Thr Val Pro Lys Lys Gly Trp Ile Ala Val Phe Thr Ser Gly Ser Tyr  
 100 105 110

Glu Gln Trp Gly His Ile Gly Ile Val Tyr Asp Gly Gly Asn Thr Ser  
 115 120 125

Thr Phe Thr Ile Leu Glu Gln Asn Trp Asn Gly Tyr Ala Asn Lys Lys  
 130 135 140

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

Ile Pro Val Lys Ala Gly Thr Thr Val Lys Lys Glu Thr Ala Lys Lys  
 165 170 175

Ser Ala Ser Lys Thr Pro Ala Pro Lys Lys Lys Ala Thr Leu Lys Val  
 180 185 190

Ser Lys Asn His Ile Asn Tyr Thr Met Asp Lys Arg Gly Lys Lys Pro  
 195 200 205

Glu Gly Met Val Ile His Asn Asp Ala Gly Arg Ser Ser Gly Gln Gln



037276

Ala Tyr Asn Gly Asn Arg Val Tyr Cys Pro Val Arg Thr Cys Gln Gly  
 465 470 475 480

Val Pro Pro Asn Gln Ile Pro Gly Val Ala Trp Gly Val Phe Lys  
 485 490 495

<210> 87  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Lysostaphin

<400> 87

Met Ala His Glu His Ser Ala Gln Trp Leu Asn Asn Tyr Lys Lys Gly  
 1 5 10 15

Tyr Gly Tyr Gly Pro Tyr Pro Leu Gly Ile Asn Gly Gly Met His Tyr  
 20 25 30

Gly Val Asp Phe Phe Met Asn Ile Gly Thr Pro Val Lys Ala Ile Ser  
 35 40 45

Ser Gly Lys Ile Val Glu Ala Gly Trp Ser Asn Tyr Gly Gly Gly Asn  
 50 55 60

Gln Ile Gly Leu Ile Glu Asn Asp Gly Val His Arg Gln Trp Tyr Met  
 65 70 75 80

His Leu Ser Lys Tyr Asn Val Lys Val Gly Asp Tyr Val Lys Ala Gly  
 85 90 95

Gln Ile Ile Gly Trp Ser Gly Ser Thr Gly Tyr Ser Thr Ala Pro His  
 100 105 110

Leu His Phe Gln Arg Met Val Asn Ser Phe Ser Asn Ser Thr Ala Gln  
 115 120 125

Asp Pro Met Pro Phe Leu Lys Ser Ala Gly Tyr Gly Lys Ala Gly Gly  
 130 135 140

Thr Val Thr Pro Thr Pro Asn Thr Gly Trp Lys Thr Asn Lys Tyr Gly  
 145 150 155 160

Thr Leu Tyr Lys Ser Glu Ser Ala Ser Phe Thr Pro Asn Thr Asp Ile  
 165 170 175

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

037276

180 185 190  
 Leu Lys Ala Gly Gln Thr Ile His Tyr Asp Glu Val Met Lys Gln Asp  
 195 200 205  
 Gly His Val Trp Val Gly Tyr Thr Gly Asn Ser Gly Gln Arg Ile Tyr  
 210 215 220  
 Leu Pro Val Arg Thr Trp Asn Lys Ser Thr Asn Thr Leu Gly Val Leu  
 225 230 235 240  
 Trp Gly Thr Ile Lys  
 245  
 <210> 88  
 <211> 286  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно  
 <220>  
 <223> PA6-gp20  
 <400> 88  
 Met Val Arg Tyr Ile Pro Ala Ala His His Ser Ala Gly Ser Asn Asn  
 1 5 10 15  
 Pro Val Asn Arg Val Val Ile His Ala Thr Cys Pro Asp Val Gly Phe  
 20 25 30  
 Pro Ser Ala Ser Arg Lys Gly Arg Ala Val Ser Thr Ala Asn Tyr Phe  
 35 40 45  
 Ala Ser Pro Ser Ser Gly Gly Ser Ala His Tyr Val Cys Asp Ile Gly  
 50 55 60  
 Glu Thr Val Gln Cys Leu Ser Glu Ser Thr Ile Gly Trp His Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Pro Asn Pro His Ser Leu Gly Ile Glu Ile Cys Ala Asp Gly Gly Ser  
 85 90 95  
 His Ala Ser Phe Arg Val Pro Gly His Ala Tyr Thr Arg Glu Gln Trp  
 100 105 110  
 Leu Asp Pro Gln Val Trp Pro Ala Val Glu Arg Ala Ala Val Leu Cys  
 115 120 125  
 Arg Arg Leu Cys Asp Lys Tyr Asn Val Pro Lys Arg Lys Leu Ser Ala  
 130 135 140

037276

Ala Asp Leu Lys Ala Gly Arg Arg Gly Val Cys Gly His Val Asp Val  
 145 150 155 160

Thr Asp Ala Trp His Gln Ser Asp His Asp Asp Pro Gly Pro Trp Phe  
 165 170 175

Pro Trp Asp Lys Phe Met Ala Val Val Asn Gly Gly Ser Gly Asp Ser  
 180 185 190

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

Gln Leu Ser Ala Gln Leu Thr Gly Ser Val Asn Lys Leu His His Asp  
 210 215 220

Val Gly Val Val Gln Val Gln Asn Gly Asp Leu Gly Lys Arg Val Asp  
 225 230 235 240

Ala Leu Ser Trp Val Lys Asn Pro Val Thr Gly Lys Leu Trp Arg Thr  
 245 250 255

Lys Asp Ala Leu Trp Ser Val Trp Tyr Tyr Val Leu Glu Cys Arg Ser  
 260 265 270

Arg Leu Asp Arg Leu Glu Ser Ala Val Asn Asp Leu Lys Lys  
 275 280 285

<210> 89  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> STM0016

<400> 89

Met Asn Pro Ile Ile Asp Gly Ile Ile Ala Leu Glu Gly Gly Tyr Val  
 1 5 10 15

Phe Asn Pro Lys Asp Lys Gly Gly Ala Thr His Trp Gly Ile Thr Glu  
 20 25 30

Ala Thr Ala Arg Ala His Gly Tyr Ala Gly Asp Met Arg Asp Leu Thr  
 35 40 45

His Ala Glu Ala Tyr Ala Ile Leu Glu Glu Asp Tyr Trp Ile Lys Pro  
 50 55 60

037276

Gly Phe Asp Val Ile Ser Thr Leu Ser Trp Pro Val Ser Phe Glu Leu  
65 70 75 80

Cys Asp Ala Ala Val Asn Ile Gly Ala Tyr His Pro Ser Ala Trp Leu  
85 90 95

Gln Arg Trp Leu Asn Val Phe Asn His Glu Gly Lys Arg Tyr Pro Asp  
100 105 110

Ile His Val Asp Gly Asn Ile Gly Pro Arg Thr Leu Ala Ala Leu Glu  
115 120 125

His Tyr Leu Ala Trp Arg Gly Gln Glu Gly Glu Ala Val Leu Val Lys  
130 135 140

Ala Leu Asn Cys Ser Gln Gly Thr Tyr Tyr Leu Asn Val Ala Glu Lys  
145 150 155 160

Asn His Asn Asn Glu Gln Phe Ile Tyr Gly Trp Ile Lys Asn Arg Val  
165 170 175

Thr

<210> 90  
<211> 208  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> N4-gp61

<400> 90

Met Ala Ile Ser Lys Lys Lys Val Gly Gly Val Gly Gly Val Ile Ala  
1 5 10 15

Ala Ile Ile Ala Ala Val Phe Ala Val Glu Gly Gly Tyr Val Asn Asp  
20 25 30

Pro Lys Asp Pro Gly Gly Glu Thr Asn His Gly Val Thr Ile Gln Val  
35 40 45

Ala Gln Lys His Lys Gln Glu Leu Glu Ser Met Tyr Asn Trp Asp Gly  
50 55 60

Ser Met Lys Asn Leu Thr Gln Glu Met Ala Ser Ser Ile Tyr Tyr Asn  
65 70 75 80





037276

Gln Gly Asp Ile Ile Gly Leu Gln Gly Asn Ser Asn Tyr Tyr Asp Asn  
 115 120 125

Pro Met Ser Val His Leu His Leu Gln Leu Arg Pro Lys Asp Ala Lys  
 130 135 140

Lys Asp Glu Lys Ser Gln Val Cys Ser Gly Leu Ala Met Glu Lys Tyr  
 145 150 155 160

Asp Ile Thr Asn Leu Asn Ala Lys Gln Asp Lys Ser Lys Asn Gly Ser  
 165 170 175

Val Lys Glu Leu Lys His Ile Tyr Ser Asn His Ile Lys Gly Asn Lys  
 180 185 190

Ile Thr Ala Pro Lys Pro Ser Ile Gln Gly Val Val Ile His Asn Asp  
 195 200 205

Tyr Gly Ser Met Thr Pro Ser Gln Tyr Leu Pro Trp Leu Tyr Ala Arg  
 210 215 220

Glu Asn Asn Gly Thr His Val Asn Gly Trp Ala Ser Val Tyr Ala Asn  
 225 230 235 240

Arg Asn Glu Val Leu Trp Tyr His Pro Thr Asp Tyr Val Glu Trp His  
 245 250 255

Cys Gly Asn Gln Trp Ala Asn Ala Asn Leu Ile Gly Phe Glu Val Cys  
 260 265 270

Glu Ser Tyr Pro Gly Arg Ile Ser Asp Lys Leu Phe Leu Glu Asn Glu  
 275 280 285

Glu Ala Thr Leu Lys Val Ala Ala Asp Val Met Lys Ser Tyr Gly Leu  
 290 295 300

Pro Val Asn Arg Asn Thr Val Arg Leu His Asn Glu Phe Phe Gly Thr  
 305 310 315 320

Ser Cys Pro His Arg Ser Trp Asp Leu His Val Gly Lys Gly Glu Pro  
 325 330 335

Tyr Thr Thr Thr Asn Ile Asn Lys Met Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Arg  
 340 345 350

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



037276

<223> SMAP-29

<400> 94

Arg Gly Leu Arg Arg Leu Gly Arg Lys Ile Ala His Gly Val Lys Lys  
1 5 10 15

Tyr Gly Pro Thr Val Leu Arg Ile Ile Arg Ile Ala Gly  
20 25

<210> 95

<211> 13

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Индолицин

<400> 95

Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg  
1 5 10

<210> 96

<211> 18

<212> PRT

<213> unknown

<220>

<223> Протегрин

<400> 96

Arg Gly Gly Arg Leu Cys Tyr Cys Arg Arg Arg Phe Cys Val Cys Val  
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 97

<211> 31

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Цекропин P1

<400> 97

Ser Trp Leu Ser Lys Thr Ala Lys Lys Leu Glu Asn Ser Ala Lys Lys  
1 5 10 15

Arg Ile Ser Glu Gly Ile Ala Ile Ala Ile Gln Gly Gly Pro Arg  
20 25 30

<210> 98

<211> 23  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Магаинин

<400> 98

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe  
 1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser  
 20

<210> 99  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Плеуроцидин

<400> 99

Gly Trp Gly Ser Phe Phe Lys Lys Ala Ala His Val Gly Lys His Val  
 1 5 10 15

Gly Lys Ala Ala Leu Thr His Tyr Leu  
 20 25

<210> 100  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Цекропин А (A. aegypti)

<400> 100

Gly Gly Leu Lys Lys Leu Gly Lys Lys Leu Glu Gly Ala Gly Lys Arg  
 1 5 10 15

Val Phe Asn Ala Ala Glu Lys Ala Leu Pro Val Val Ala Gly Ala Lys  
 20 25 30

Ala Leu Arg Lys  
 35

<210> 101  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>

## 037276

<223> Цекропин А (D. melanogaster)

<400> 101

Gly Trp Leu Lys Lys Ile Gly Lys Lys Ile Glu Arg Val Gly Gln His  
1 5 10 15

Thr Arg Asp Ala Thr Ile Gln Gly Leu Gly Ile Pro Gln Gln Ala Ala  
20 25 30

Asn Val Ala Ala Thr Ala Arg Gly  
35 40

<210> 102

<211> 21

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Буфорин II

<400> 102

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His  
1 5 10 15

Arg Leu Leu Arg Lys  
20

<210> 103

<211> 39

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Саркотоксин IA

<400> 103

Gly Trp Leu Lys Lys Ile Gly Lys Lys Ile Glu Arg Val Gly Gln His  
1 5 10 15

Thr Arg Asp Ala Thr Ile Gln Gly Leu Gly Ile Ala Gln Gln Ala Ala  
20 25 30

Asn Val Ala Ala Thr Ala Arg  
35

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Апидаэцин

037276

<400> 104

Ala Asn Arg Pro Val Tyr Ile Pro Pro Pro Arg Pro Pro His Pro Arg  
 1 5 10 15

Leu

<210> 105

<211> 24

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Аскафин 5

<400> 105

Gly Ile Lys Asp Trp Ile Lys Gly Ala Ala Lys Lys Leu Ile Lys Thr  
 1 5 10 15

Val Ala Ser His Ile Ala Asn Gln  
 20

<210> 106

<211> 22

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Нигроцин 2

<400> 106

Gly Leu Leu Ser Lys Val Leu Gly Val Gly Lys Lys Val Leu Cys Gly  
 1 5 10 15

Val Ser Gly Leu Val Cys  
 20

<210> 107

<211> 24

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Псеудин 1

<400> 107

Gly Leu Asn Thr Leu Lys Lys Val Phe Gln Gly Leu His Glu Ala Ile  
 1 5 10 15

Lys Leu Ile Asn Asn His Val Gln  
 20

<210> 108  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Раналексин

<400> 108

Phe Leu Gly Gly Leu Ile Val Pro Ala Met Ile Cys Ala Val Thr Lys  
 1 5 10 15

Lys Cys

<210> 109  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Мелитин

<400> 109

Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu  
 1 5 10 15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln  
 20 25

<210> 110  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Ликотоксин 1

<400> 110

Ile Trp Leu Thr Ala Leu Lys Phe Leu Gly Lys His Ala Ala Lys Lys  
 1 5 10 15

Leu Ala Lys Gln Gln Leu Ser Lys Leu  
 20 25

<210> 111  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Паразин 1

&lt;400&gt; 111

Lys Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly Lys Val Arg Ala Lys Ala Lys Thr  
 1 5 10 15

Arg Ser Ser

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; неизвестно

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Буфорин I

&lt;400&gt; 112

Ala Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly Lys Val Arg Ala Lys Ala Lys Thr  
 1 5 10 15

Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His Arg  
 20 25 30

Leu Leu Arg Lys Gly Asn Tyr  
 35

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; неизвестно

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Дермасептин 1

&lt;400&gt; 113

Ala Leu Trp Lys Thr Met Leu Lys Lys Leu Gly Thr Met Ala Leu His  
 1 5 10 15

Ala Gly Lys Ala Ala Leu Gly Ala Ala Ala Asp Thr Ile Ser Gln Gly  
 20 25 30

Thr Gln

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; неизвестно

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Бактенецин 1

037276

<400> 114

Arg Leu Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg  
1 5 10

<210> 115

<211> 21

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Танацин

<400> 115

Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly  
1 5 10 15

Lys Cys Gln Arg Met  
20

<210> 116

<211> 19

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Бревинин 1Т

<400> 116

Val Asn Pro Ile Ile Leu Gly Val Leu Pro Lys Val Cys Leu Ile Thr  
1 5 10 15

Lys Lys Cys

<210> 117

<211> 26

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Ранатеурин 1

<400> 117

Ser Met Leu Ser Val Leu Lys Asn Leu Gly Lys Val Gly Leu Gly Phe  
1 5 10 15

Val Ala Cys Lys Ile Asn Ile Lys Gln Cys  
20 25

<210> 118

<211> 46

<212> PRT

## 037276

<213> неизвестно

<220>

<223> Эскулентин 1

<400> 118

Gly Ile Phe Ser Lys Leu Gly Arg Lys Lys Ile Lys Asn Leu Leu Ile  
1 5 10 15

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

Thr Gly Ile Lys Ile Ala Gly Cys Lys Ile Lys Gly Glu Cys  
35 40 45

<210> 119

<211> 17

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Тахиплезин

<400> 119

Arg Trp Cys Phe Arg Val Cys Tyr Arg Gly Ile Cys Tyr Arg Lys Cys  
1 5 10 15

Arg

<210> 120

<211> 25

<212> PRT

<213> unknown

<220>

<223> Androctonin

<400> 120

Arg Ser Val Cys Arg Gln Ile Lys Ile Cys Arg Arg Arg Gly Gly Cys  
1 5 10 15

Tyr Tyr Lys Cys Thr Asn Arg Pro Tyr  
20 25

<210> 121

<211> 30

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> альфа-дефензин

037276

<400> 121

Asp Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr  
1 5 10 15

Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys  
20 25 30

<210> 122

<211> 38

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> бета-дефензин

<400> 122

Asn Pro Val Ser Cys Val Arg Asn Lys Gly Ile Cys Val Pro Ile Arg  
1 5 10 15

Cys Pro Gly Ser Met Lys Gln Ile Gly Thr Cys Val Gly Arg Ala Val  
20 25 30

Lys Cys Cys Arg Lys Lys  
35

<210> 123

<211> 18

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> тета-дефенсин

<400> 123

Gly Phe Cys Arg Cys Leu Cys Arg Arg Gly Val Cys Arg Cys Ile Cys  
1 5 10 15

Thr Arg

<210> 124

<211> 40

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> дефензин (sarcosin A)

<400> 124

Ala Thr Cys Asp Leu Leu Ser Gly Thr Gly Ile Asn His Ser Ala Cys  
1 5 10 15

037276

Ala Ala His Cys Leu Leu Arg Gly Asn Arg Gly Gly Tyr Cys Asn Gly  
 20 25 30

Lys Ala Val Cys Val Cys Arg Asn  
 35 40

<210> 125  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Тионин (crambin)

<400> 125

Thr Thr Cys Cys Pro Ser Ile Val Ala Arg Ser Asn Phe Asn Val Cys  
 1 5 10 15

Arg Ile Pro Gly Thr Pro Glu Ala Ile Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Cys  
 20 25 30

Ile Ile Ile Pro Gly Ala Thr Cys Pro Gly Asp Tyr Ala Asn  
 35 40 45

<210> 126  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 <213> unknown

<220>  
 <223> defensin from radish

<400> 126

Gln Lys Leu Cys Gln Arg Pro Ser Gly Thr Trp Ser Gly Val Cys Gly  
 1 5 10 15

Asn Asn Asn Ala Cys Lys Asn Gln Cys Ile Arg Leu Glu Lys Ala Arg  
 20 25 30

His Gly Ser Cys Asn Tyr Val Phe Pro Ala His Cys Ile Cys Tyr Phe  
 35 40 45

Pro Cys  
 50

<210> 127  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Дросомицин

037276

<400> 127

Asp Cys Leu Ser Gly Arg Tyr Lys Gly Pro Cys Ala Val Trp Asp Asn  
1 5 10 15

Glu Thr Cys Arg Arg Val Cys Lys Glu Glu Gly Arg Ser Ser Gly His  
20 25 30

Cys Ser Pro Ser Leu Lys Cys Trp Cys Glu Gly Cys  
35 40

<210> 128

<211> 25

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Гепсидин

<400> 128

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg  
1 5 10 15

Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr  
20 25

<210> 129

<211> 44

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Bac 5

<400> 129

Arg Phe Arg Pro Pro Ile Arg Arg Pro Pro Ile Arg Pro Pro Phe Tyr  
1 5 10 15

Pro Pro Phe Arg Pro Pro Ile Arg Pro Pro Ile Phe Pro Pro Ile Arg  
20 25 30

Pro Pro Phe Arg Pro Pro Leu Gly Arg Pro Phe Pro  
35 40

<210> 130

<211> 39

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> PR-39

037276

<400> 130

Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro  
1 5 10 15

Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe Pro Pro  
20 25 30

Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro  
35

<210> 131

<211> 20

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Пиррокоридин

<400> 131

Val Asp Lys Gly Ser Tyr Leu Pro Arg Pro Thr Pro Pro Arg Pro Ile  
1 5 10 15

Tyr Asn Arg Asn  
20

<210> 132

<211> 24

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> Гистатин 5

<400> 132

Asp Ser His Ala Lys Arg His His Gly Tyr Lys Arg Lys Phe His Glu  
1 5 10 15

Lys His His Ser His Arg Gly Tyr  
20

<210> 133

<211> 34

<212> PRT

<213> неизвестно

<220>

<223> sushi 1

<400> 133

Gly Phe Lys Leu Lys Gly Met Ala Arg Ile Ser Cys Leu Pro Asn Gly  
1 5 10 15

037276

Gln Trp Ser Asn Phe Pro Pro Lys Cys Ile Arg Glu Cys Ala Met Val  
20 25 30

Ser Ser

<210> 134  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> Walmagh 1

<400> 134

Gly Phe Phe Ile Pro Ala Val Ile Leu Pro Ser Ile Ala Phe Leu Ile  
1 5 10 15

Val Pro

<210> 135  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> Пентапептид

<400> 135

Phe Phe Val Ala Pro  
1 5

<210> 136  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> alpha4-helix of T4-lysozyme

<400> 136

Pro Asn Arg Ala Lys Arg Val Ile Thr Thr Phe Arg Thr  
1 5 10

<210> 137  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> неизвестно

<220>  
<223> WLBU2-вариант

037276

<400> 137

Lys Arg Trp Val Lys Arg Val Lys Arg Val Lys Arg Trp Val Lys Arg  
 1 5 10 15

Val Val Arg Val Val Lys Arg Trp Val Lys Arg  
 20 25

<210> 138  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Walmagh2

<400> 138

Gly Lys Pro Gly Trp Leu Ile Lys Lys Ala Leu Val Phe Lys Lys Leu  
 1 5 10 15

Ile Arg Arg Pro Leu Lys Arg Leu Ala  
 20 25

<210> 139  
 <211> 291  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> SMAP29-KZ144

<400> 139

Met Arg Gly Leu Arg Arg Leu Gly Arg Lys Ile Ala His Gly Val Lys  
 1 5 10 15

Lys Tyr Gly Pro Thr Val Leu Arg Ile Ile Arg Ile Ala Gly Gly Ser  
 20 25 30

Lys Val Leu Arg Lys Gly Asp Arg Gly Asp Glu Val Cys Gln Leu Gln  
 35 40 45

Thr Leu Leu Asn Leu Cys Gly Tyr Asp Val Gly Lys Pro Asp Gly Ile  
 50 55 60

Phe Gly Asn Asn Thr Phe Asn Gln Val Val Lys Phe Gln Lys Asp Asn  
 65 70 75 80

Cys Leu Asp Ser Asp Gly Ile Val Gly Lys Asn Thr Trp Ala Glu Leu  
 85 90 95

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

## 037276

100 105 110  
 Thr Ala Asn Lys Ser Arg Ala Ala Ala Thr Pro Val Met Asn Ala Val  
 115 120 125  
 Glu Asn Ala Thr Gly Val Arg Ser Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Ser  
 130 135 140  
 Ile Glu Ser Ala Phe Asp Tyr Glu Ile Lys Ala Lys Thr Ser Ser Ala  
 145 150 155 160  
 Thr Gly Trp Phe Gln Phe Leu Thr Gly Thr Trp Lys Thr Met Ile Glu  
 165 170 175  
 Asn Tyr Gly Met Lys Tyr Gly Val Leu Thr Asp Pro Thr Gly Ala Leu  
 180 185 190  
 Arg Lys Asp Pro Arg Ile Ser Ala Leu Met Gly Ala Glu Leu Ile Lys  
 195 200 205  
 Glu Asn Met Asn Ile Leu Arg Pro Val Leu Lys Arg Glu Pro Thr Asp  
 210 215 220  
 Thr Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Phe Gly Pro Gly Ala Ala Arg Arg  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Thr Thr Gly Gln Asn Glu Leu Ala Ala Thr His Phe Pro Lys  
 245 250 255  
 Glu Ala Gln Ala Asn Pro Ser Ile Phe Tyr Asn Lys Asp Gly Ser Pro  
 260 265 270  
 Lys Thr Ile Gln Glu Val Tyr Asn Leu Met Asp Gly Lys Val Ala Ala  
 275 280 285  
 His Arg Lys  
 290  
 <210> 140  
 <211> 500  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно  
 <220>  
 <223> Ply2638-PK  
 <400> 140  
 Ala Met Gly Leu Thr Ala Ile Asp Tyr Leu Thr Lys Lys Gly Trp Lys  
 1 5 10 15

037276

Ile Ser Ser Asp Pro Arg Thr Tyr Asp Gly Tyr Pro Lys Asn Tyr Gly  
20 25 30

Tyr Arg Asn Tyr His Glu Asn Gly Ile Asn Tyr Asp Glu Phe Cys Gly  
35 40 45

Gly Tyr His Arg Ala Phe Asp Val Tyr Ser Asn Glu Thr Asn Asp Val  
50 55 60

Pro Ala Val Thr Ser Gly Thr Val Ile Glu Ala Asn Asp Tyr Gly Asn  
65 70 75 80

Phe Gly Gly Thr Phe Val Ile Arg Asp Ala Asn Asp Asn Asp Trp Ile  
85 90 95

Tyr Gly His Leu Gln Arg Gly Ser Met Arg Phe Val Val Gly Asp Lys  
100 105 110

Val Asn Gln Gly Asp Ile Ile Gly Leu Gln Gly Asn Ser Asn Tyr Tyr  
115 120 125

Asp Asn Pro Met Ser Val His Leu His Leu Gln Leu Arg Pro Lys Asp  
130 135 140

Ala Lys Lys Asp Glu Lys Ser Gln Val Cys Ser Gly Leu Ala Met Glu  
145 150 155 160

Lys Tyr Asp Ile Thr Asn Leu Asn Ala Lys Gln Asp Lys Ser Lys Asn  
165 170 175

Gly Ser Val Lys Glu Leu Lys His Ile Tyr Ser Asn His Ile Lys Gly  
180 185 190

Asn Lys Ile Thr Ala Pro Lys Pro Ser Ile Gln Gly Val Val Ile His  
195 200 205

Asn Asp Tyr Gly Ser Met Thr Pro Ser Gln Tyr Leu Pro Trp Leu Tyr  
210 215 220

Ala Arg Glu Asn Asn Gly Thr His Val Asn Gly Trp Ala Ser Val Tyr  
225 230 235 240

Ala Asn Arg Asn Glu Val Leu Trp Tyr His Pro Thr Asp Tyr Val Glu  
245 250 255

Trp His Cys Gly Asn Gln Trp Ala Asn Ala Asn Leu Ile Gly Phe Glu



## 037276

<210> 141  
 <211> 348  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> Пентапептид Ply 511

<400> 141

Met Phe Phe Val Ala Pro Gly Ser Val Lys Tyr Thr Val Glu Asn Lys  
 1 5 10 15

Ile Ile Ala Gly Leu Pro Lys Gly Lys Leu Lys Gly Ala Asn Phe Val  
 20 25 30

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

Ser Tyr Met Thr Arg Asn Trp Lys Asn Ala Phe Val Thr His Phe Val  
 50 55 60

Gly Gly Gly Gly Arg Val Val Gln Val Ala Asn Val Asn Tyr Val Ser  
 65 70 75 80

Trp Gly Ala Gly Gln Tyr Ala Asn Ser Tyr Ser Tyr Ala Gln Val Glu  
 85 90 95

Leu Cys Arg Thr Ser Asn Ala Thr Thr Phe Lys Lys Asp Tyr Glu Val  
 100 105 110

Tyr Cys Gln Leu Leu Val Asp Leu Ala Lys Lys Ala Gly Ile Pro Ile  
 115 120 125

Thr Leu Asp Ser Gly Ser Lys Thr Ser Asp Lys Gly Ile Lys Ser His  
 130 135 140

Lys Trp Val Ala Asp Lys Leu Gly Gly Thr Thr His Gln Asp Pro Tyr  
 145 150 155 160

Ala Tyr Leu Ser Ser Trp Gly Ile Ser Lys Ala Gln Phe Ala Ser Asp  
 165 170 175

Leu Ala Lys Val Ser Gly Gly Gly Asn Thr Gly Thr Ala Pro Ala Lys  
 180 185 190

Pro Ser Thr Pro Ala Pro Lys Pro Ser Thr Pro Ser Thr Asn Leu Asp  
 195 200 205

Lys Leu Gly Leu Val Asp Tyr Met Asn Ala Lys Lys Met Asp Ser Ser

037276

210 215 220

Tyr Ser Asn Arg Asp Lys Leu Ala Lys Gln Tyr Gly Ile Ala Asn Tyr  
 225 230 235 240

Ser Gly Thr Ala Ser Gln Asn Thr Thr Leu Leu Ser Lys Ile Lys Gly  
 245 250 255

Gly Ala Pro Lys Pro Ser Thr Pro Ala Pro Lys Pro Ser Thr Ser Thr  
 260 265 270

Ala Lys Lys Ile Tyr Phe Pro Pro Asn Lys Gly Asn Trp Ser Val Tyr  
 275 280 285

Pro Thr Asn Lys Ala Pro Val Lys Ala Asn Ala Ile Gly Ala Ile Asn  
 290 295 300

Pro Thr Lys Phe Gly Gly Leu Thr Tyr Thr Ile Gln Lys Asp Arg Gly  
 305 310 315 320

Asn Gly Val Tyr Glu Ile Gln Thr Asp Gln Phe Gly Arg Val Gln Val  
 325 330 335

Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Gly Ala Val Ile Lys Lys  
 340 345

<210> 142  
 <211> 264  
 <212> PRT  
 <213> неизвестно

<220>  
 <223> РК-Лизостафин

<400> 142

Ala Met Gly Lys Arg Lys Lys Arg Lys Lys Arg Lys Gly Ser Ala His  
 1 5 10 15

Glu His Ser Ala Gln Trp Leu Asn Asn Tyr Lys Lys Gly Tyr Gly Tyr  
 20 25 30

Gly Pro Tyr Pro Leu Gly Ile Asn Gly Gly Met His Tyr Gly Val Asp  
 35 40 45

Phe Phe Met Asn Ile Gly Thr Pro Val Lys Ala Ile Ser Ser Gly Lys  
 50 55 60

Ile Val Glu Ala Gly Trp Ser Asn Tyr Gly Gly Gly Asn Gln Ile Gly  
 65 70 75 80

Leu Ile Glu Asn Asp Gly Val His Arg Gln Trp Tyr Met His Leu Ser  
85 90 95

Lys Tyr Asn Val Lys Val Gly Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gln Ile Ile  
100 105 110

Gly Trp Ser Gly Ser Thr Gly Tyr Ser Thr Ala Pro His Leu His Phe  
115 120 125

Gln Arg Met Val Asn Ser Phe Ser Asn Ser Thr Ala Gln Asp Pro Met  
130 135 140

Pro Phe Leu Lys Ser Ala Gly Tyr Gly Lys Ala Gly Gly Thr Val Thr  
145 150 155 160

Pro Thr Pro Asn Thr Gly Trp Lys Thr Asn Lys Tyr Gly Thr Leu Tyr  
165 170 175

Lys Ser Glu Ser Ala Ser Phe Thr Pro Asn Thr Asp Ile Ile Thr Arg  
180 185 190

Thr Thr Gly Pro Phe Arg Ser Met Pro Gln Ser Gly Val Leu Lys Ala  
195 200 205

Gly Gln Thr Ile His Tyr Asp Glu Val Met Lys Gln Asp Gly His Val  
210 215 220

Trp Val Gly Tyr Thr Gly Asn Ser Gly Gln Arg Ile Tyr Leu Pro Val  
225 230 235 240

Arg Thr Trp Asn Lys Ser Thr Asn Thr Leu Gly Val Leu Trp Gly Thr  
245 250 255

Ile Lys Leu Val Pro Arg Gly Ser  
260

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ устранения или уменьшения бактериальной биопленки на поверхности твёрдого или жидкого объекта либо на поверхности природных водных систем, включающий контактирование указанного объекта с эндолизином или бактериоцином, которые слиты с пептидом, обладающим активностью, разрушающей мембрану или липополисахарид (ЛПС) бактерий, причем указанный пептид представляет собой синтетический катионный, синтетический поликатионный, синтетический гидрофобный, синтетический амфипатичный или природный антимикробный пептид длиной от 5 до 50 аминокислотных остатков.

2. Способ по п.1, в котором указанный пептид, слитый с эндолизином или бактериоцином, представляет собой пептид длиной от 6 до 39 аминокислотных остатков.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный пептид слит с N- и/или C-концом эндолизина.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанные эндолизин или бактериоцин обладают активностью, разрушающей клеточную стенку грамотрицательных и/или грамположительных бактерий.

5. Способ по п.4, в котором грамотрицательные бактерии выбраны из Enterobacteriaceae (*Escherichia*, в частности *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, в частности *K. pneumoniae*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Yersinia*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*, в частности *P. aeruginosa*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella*, *Sphingomonas*, *Comamonas*), *Neisseria*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Brucella*, *Francisella*, *Bordetella*, *Legionella*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Gardnerella*, *Spirochaetaceae* (*Treponema*, *Borrelia*), *Leptospiraceae*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Spirillum*, *Streptobacillus*, *Bacteroidaceae* (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*), *Acinetobacter*, в частности *A. baumannii*, и в котором грамположительные бактерии выбраны из *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus equi*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Propionibacterium acnes*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diptheriae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Actinomyces tuberculosis*, *Corynebacterium diptheriae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Actinomyces*.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный эндолизин выбран из phiKZgp144 в соответствии с SEQ ID NO: 1, ELgp188 в соответствии с SEQ ID NO: 2, эндолизин фага для Salmonella в соответствии с SEQ ID NO: 3, эндолизин фага T4 для Enterobacteria в соответствии с SEQ ID NO: 4, эндолизин фага для Acinetobacter baumannii в соответствии с SEQ ID NO: 5, эндолизин фага K1F для E.coli в соответствии с SEQ ID NO: 6, OBPgpLys в соответствии с SEQ ID NO: 7, эндолизин фага PSP3 для salmonella в соответствии с SEQ ID NO: 8, эндолизин фага P2 для E.coli в соответствии с SEQ ID NO: 9, Ply511 в соответствии с SEQ ID NO: 85, Ply2638 в соответствии с SEQ ID NO: 92 или в котором указанный бактериоцин представляет собой пептид в соответствии с SEQ ID NO: 87.

7. Способ по п.1, в котором указанный катионный/поликатионный пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10-30, 32-34, или в котором антимикробный пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 93-133, или в котором гидрофобный пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 134 и 135, или в котором амфипатичный пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 136-138.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный эндолизин/бактериоцин содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 35-49, 53, 57, 62-64, 66-78 и 139-142.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором указанный твёрдый объект представляет собой камень, скалистую породу, почву, осадочные отложения, пищевой продукт, корм или косметическое средство.

10. Способ по любому из пп.1-8, в котором указанный жидкий объект представляет собой воду.

11. Способ по любому из пп.1-8, в котором указанный жидкий объект представляет собой раствор для очистки и хранения контактных линз, зубных протезов, имплантатов, протезов или ортезов.

12. Способ по любому из пп.1-8, в котором указанный объект представляет собой любое вещество, извлеченное или полученное из живого организма.

13. Способ по любому из пп.1-8, в котором указанный объект представляет собой медицинский прибор или трубу систем промышленного и питьевого водоснабжения.

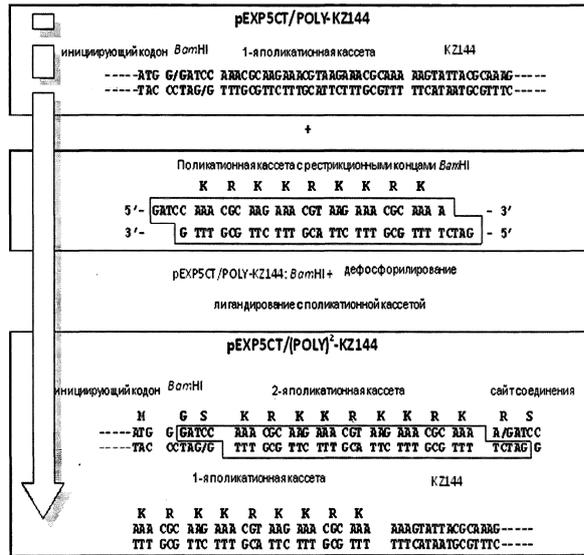
14. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором дополнительно используют антибиотики.

15. Применение эндолизина или бактериоцина, слитых с пептидом, обладающим активностью, разрушающей мембрану или ЛПС бактерий, для производства лекарственного препарата для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными и/или грамположительными бактериями, образующими биопленки, причем указанный пептид представляет собой синтетический катионный, синтетический поликатионный, синтетический гидрофобный, синтетический амфипатичный или природный антимикробный пептид длиной от 5 до 50 аминокислотных остатков.

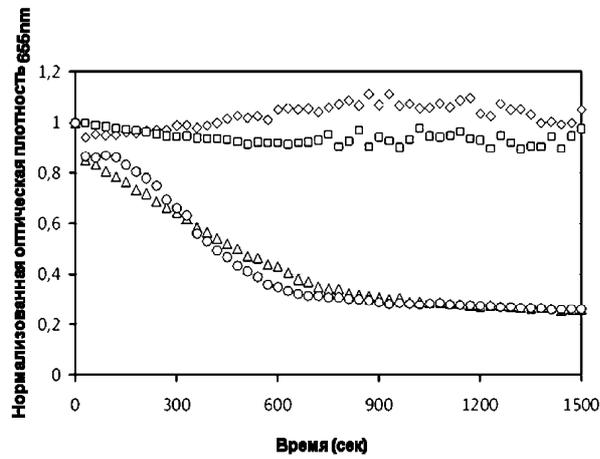
16. Применение по п.15, в котором дополнительно используют антибиотики.

17. Применение эндолизина или бактериоцина, слитых с пептидом, обладающим активностью, разрушающей мембрану или ЛПС бактерий, для устранения или уменьшения бактериальных биопленок, образованных грамотрицательными и/или грамположительными бактериями на пищевых продуктах, поверхностях оборудования и помещений на предприятиях пищевой промышленности, на поверхностях медицинского оборудования, контактирующих с пищевыми продуктами, в медицинских стационарах и хирургических блоках, причем указанный пептид представляет собой синтетический катионный, синтетический поликатионный, синтетический гидрофобный, синтетический амфипатичный или природный антимикробный пептид длиной от 5 до 50 аминокислотных остатков.

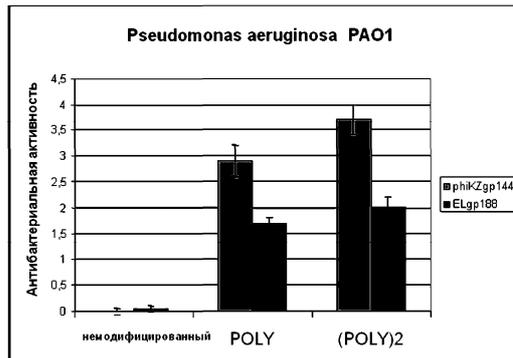
18. Применение по п.17, в котором дополнительно используют антибиотики.



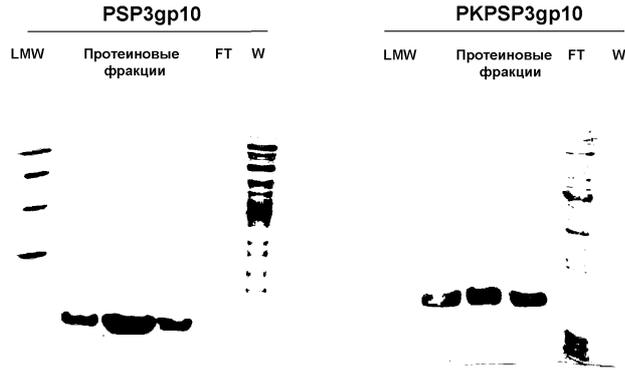
Фиг. 1



Фиг. 2

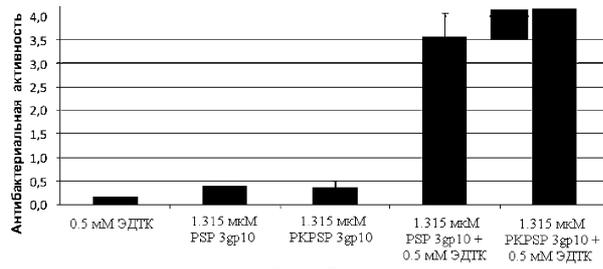


Фиг. 3



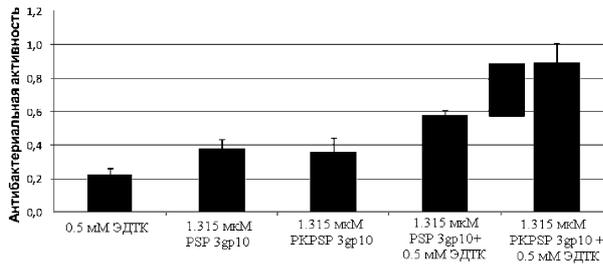
Фиг. 4

***Pseudomonas aeruginosa* PAO1p**



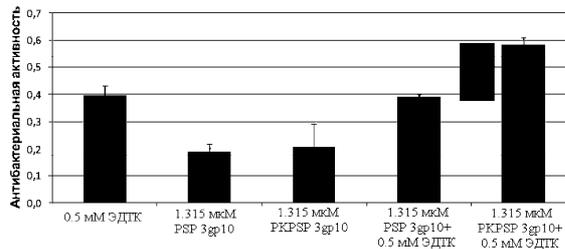
Фиг. 5А

***Pseudomonas aeruginosa* Br667**



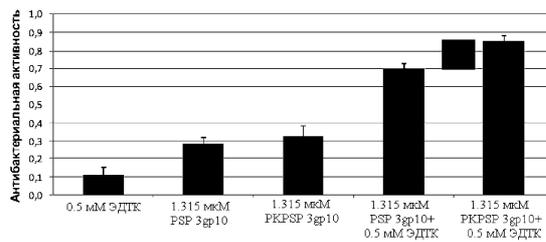
Фиг. 5Б

***Escherichia coli* WK6**

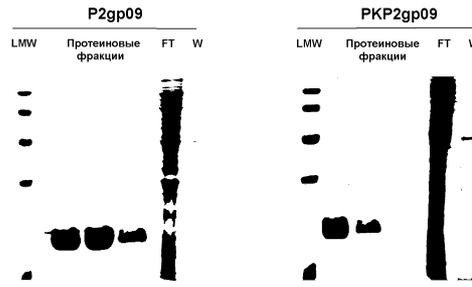


Фиг. 5В

***Salmonella typhimurium* LT2 (SGSC № 2317)**

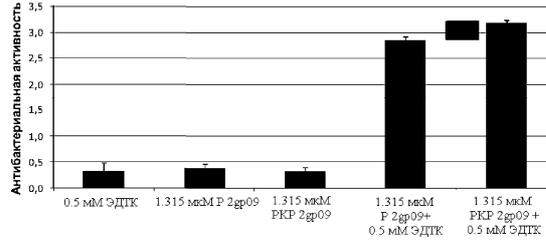


Фиг. 5Г



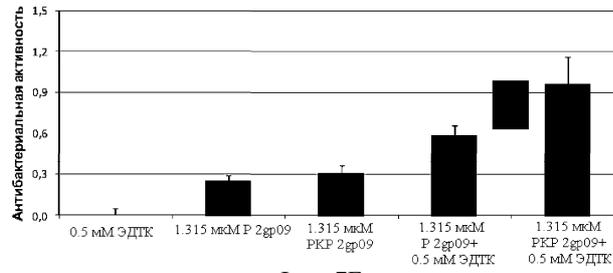
Фиг. 6

***Pseudomonas aeruginosa* PAO1p**



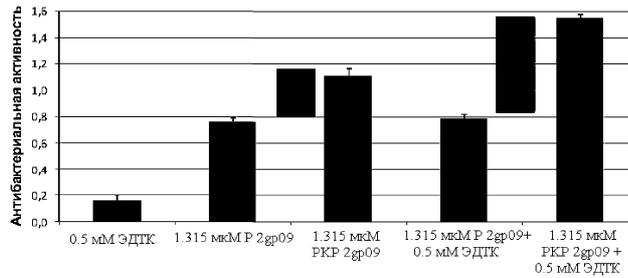
Фиг. 7А

***Pseudomonas aeruginosa* Br667**



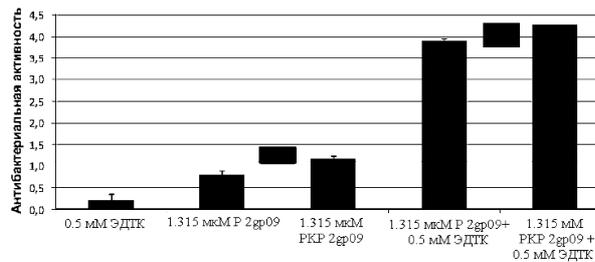
Фиг. 7Б

***Escherichia coli* WK6**

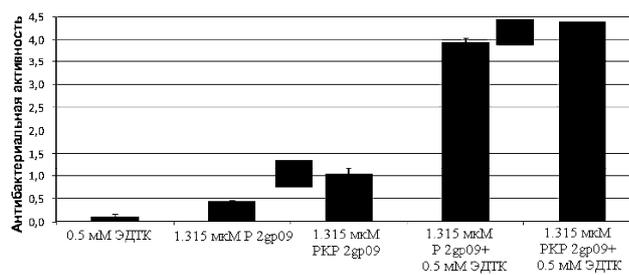


Фиг. 7В

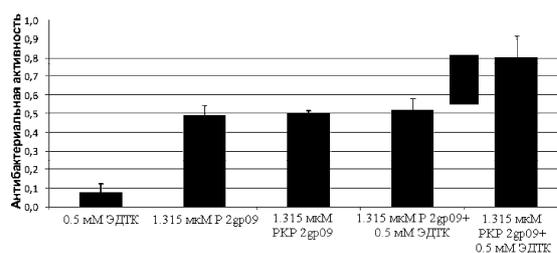
***Burkholderia pseudomallei***



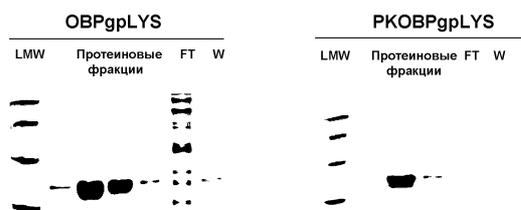
Фиг. 7Г

**Pseudomonas putida G1**

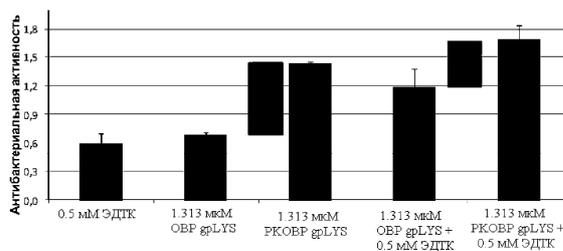
Фиг. 7Д

**Salmonella typhimuriumLT2 (SGSC N° 2317)**

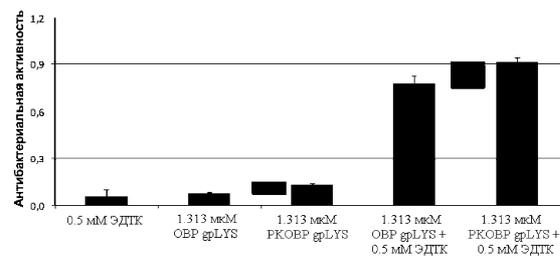
Фиг. 7Е



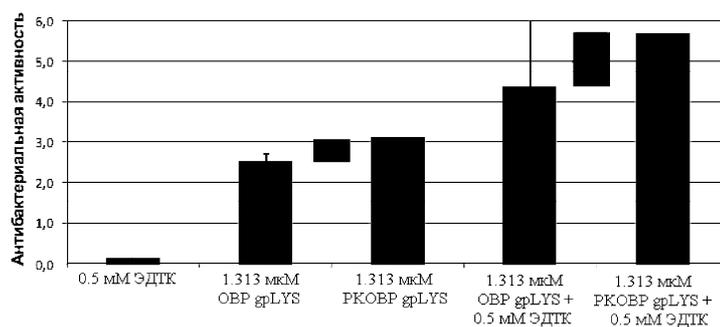
Фиг. 8

**Escherichia coli WK6**

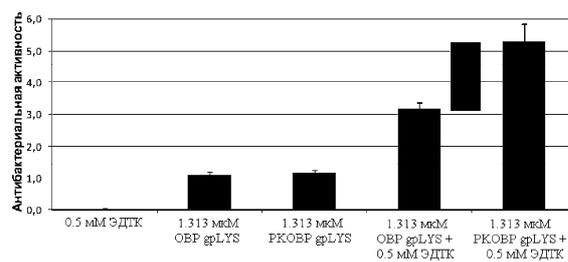
Фиг. 9А

**Salmonella typhimuriumLT2 (SGSC N° 2317)**

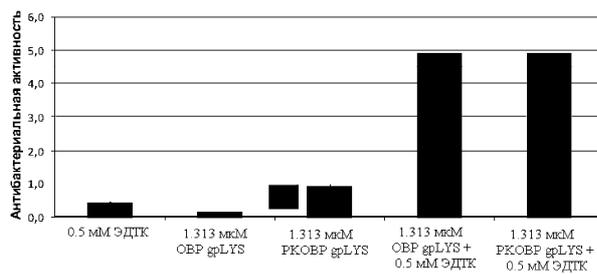
Фиг. 9Б

***Pseudomonas aeruginosa* PAO1p**

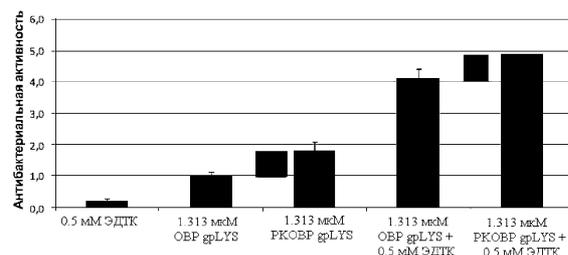
Фиг. 9В

***Pseudomonas aeruginosa* Br667**

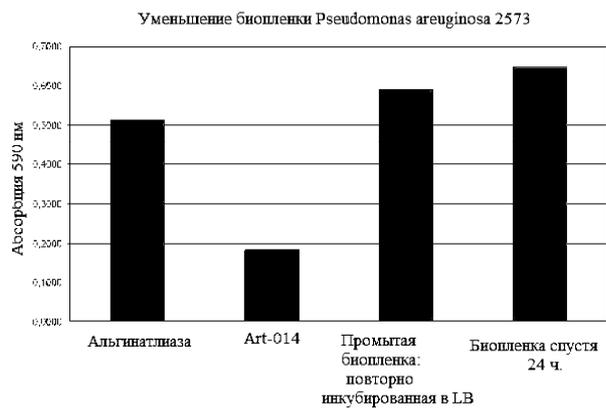
Фиг. 9Г

***Pseudomonas putida* G1**

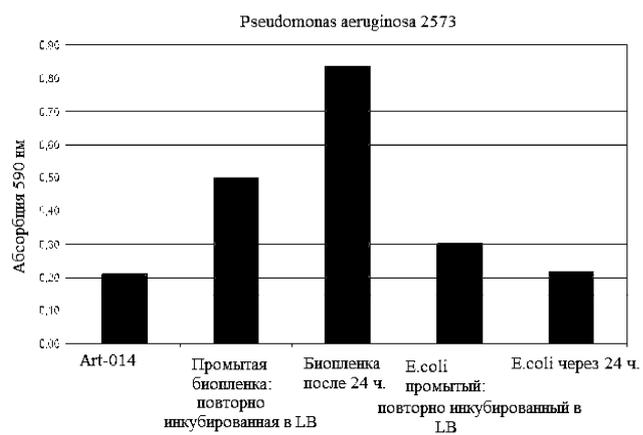
Фиг. 9Д

***Burkholderia pseudomallei***

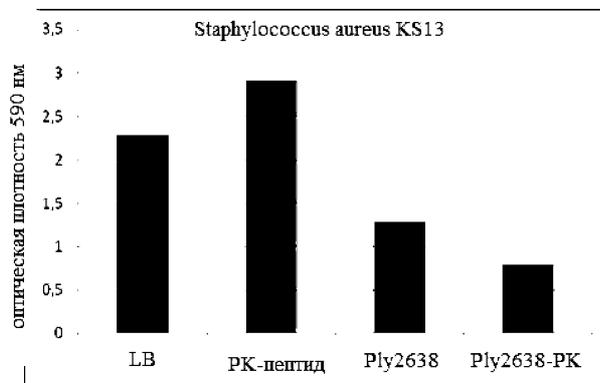
Фиг. 9Е



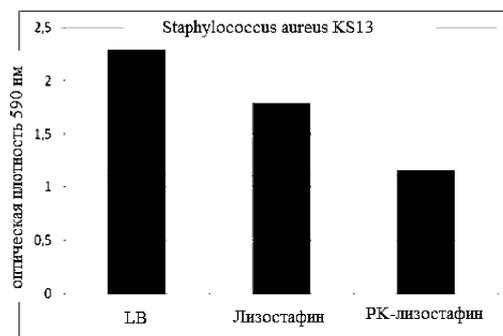
Фиг. 10А



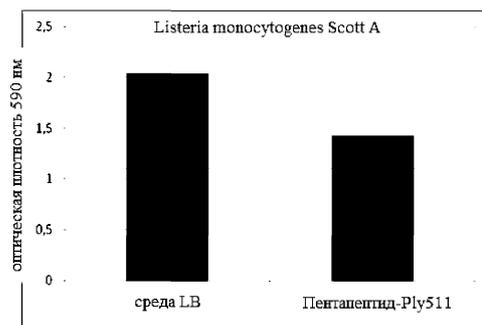
Фиг. 10Б



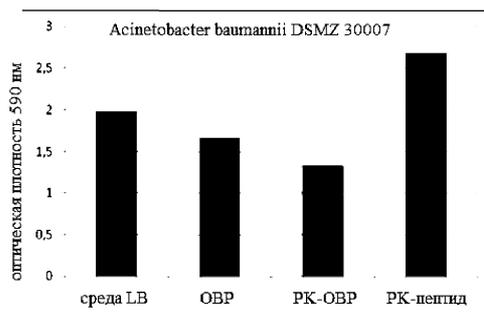
Фиг. 11А



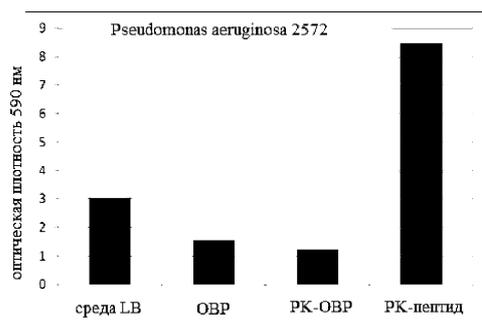
Фиг. 11Б



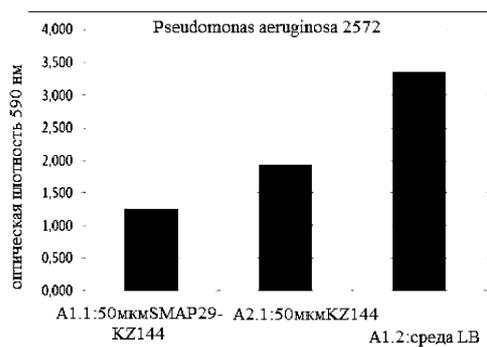
Фиг. 11В



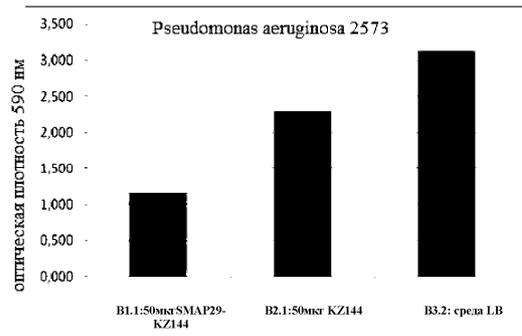
Фиг. 11Г



Фиг. 11Д



Фиг. 11Е



Фиг. 11Ж