

## **COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA TRATAR LA ENFERMEDAD CELIACA**

### **REFERENCIA CRUZADA**

Esta solicitud reclama prioridad de la Solicitud  
5 Provisional de Patente Estadounidense No. 62/172,557  
presentada el 08/06/2015, incorporada por referencia en este  
documento en su totalidad.

### **ANTECEDENTES**

10 La enfermedad celiaca es una enfermedad altamente  
prevalente en la cual las proteínas dietéticas encontradas  
en productos de trigo, cebada y centeno conocidos como  
'glutenos' evocan una respuesta inmune en el intestino  
delgado de individuos genéticamente predispuestos. La  
15 inflamación resultante puede conducir a la degradación de  
las vellosidades del intestino delgado, impidiendo la  
absorción de nutrientes. Los síntomas pueden aparecer en la  
primera infancia o más adelante en la vida y varía  
ampliamente en severidad, de diarrea, fatiga y pérdida de  
20 peso a distensión abdominal, anemia y síntomas neurológicos.  
Actualmente no existen terapias eficaces para esta enfermedad  
en toda la vida excepto la eliminación total de glutenos de  
la dieta. Aunque la celiacía sigue siendo en gran parte poco  
diagnosticada, su ' prevalencia en los Estados Unidos y  
25 Europa se estima en 0.5-1.0% de la población. Además de la

celiaquía, una fracción significativa de la población se cree que sufre de la condición de sensibilidad de gluten no celiaco (NCGS), que es causada por la ingestión de gluten, pero es distinta en mecánico a la enfermedad celíaca, aunque  
5 la los síntomas son con frecuencia indistinguibles de la celiaquía. La identificación de enzimas que ocurren naturalmente adecuadas como terapia oral para la enfermedad celiaca y NCGS es difícil debido a los estrictos requisitos físicos y químicos para degradar específica y eficientemente  
10 los péptidos derivados del gluten en el duro y altamente ácido ambiente del tracto digestivo humano. Puesto que los péptidos del gluten inician la respuesta inmune inmediatamente después de entrar en los intestinos, es imperativo que cualquier enzima oral terapéutica para la  
15 enfermedad celiaca descompone estas regiones inmunogénica al gluten en el compartimento gástrico, impidiendo así que éstos péptidos de gluten causen daño intestinal debido a la inflamación.

20

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

En un aspecto, la invención proporciona polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos por lo menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en donde

(a) residuos 467 es Ser, residuo 267 es Glu y residuo 271 es Asp; y

(B) el polipéptido comprende un cambio de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en uno o más residuos seleccionado del grupo  
5 que consistente en 463, 221, 262E, 268, 269, 270, 319A, 320, 354E/Q/R/Y, 358S/Q/T, 368F Q, 399, 402, 406, 424, 449, 461, 105, 171, 172, 173, 174 y 456.

En una modalidad, el polipéptido comprende un cambio de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en uno o más residuos  
10 seleccionados del grupo que consiste en 463, 221, 262E, 268, 269, 270, 319A, 320, 354E/Q/R/Y, 358S/Q/T, 368F Q, 399, 402, 406, 424, 449 y 461.

En otra modalidad, el polipéptido comprende un cambio de aminoácido de SEQ ID NO: 1 en uno o más residuos  
15 seleccionados del grupo que consiste de 221D/N/Q/H, 262E, 268S/T/A, 269L/T, 270A/T/V, 319A, 354E/Q/R/Y, 358S/Q/T, 368F/Q, 399Q, 402S/Q, 406S, 424K, 449E/N/Q, 461R y 463A/L/M/Q/R/T/V. En otra modalidad, el polipéptido comprende un cambio de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en 2, 3,  
20 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o más residuos seleccionados del grupo.

En una modalidad, el polipéptido comprende cambios de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en los residuos 399 y 449, tales como cambios de aminoácidos 399Q y 449Q. En otra modalidad,  
25 el polipéptido comprende cambios de aminoácido 358S y 463 T.

En otra modalidad posterior, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 262E, 269T, 354Q, 358S, 399Q, 449Q y 463T. En otra modalidad, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 319A, 368F, 399Q, 449Q y 463T. En una modalidad más, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 262E 269T, 270V, 354Q, 358S, 399Q y 449Q. En una modalidad más, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 262E, 269T, 320M, 354Q, 358S, 399Q, 449Q y 463T. En otra modalidad, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 319A, 320M, 368F, 399Q, 449Q y 463T. En una modalidad, los polipéptidos comprenden un cambio de aminoácido de SEQ ID NO: 1 en una o más posiciones del aminoácido seleccionado del grupo que consiste en 105, 171, 172, 173, 174 y 456, tal como cambios de aminoácido 105H; 171R A o S; 172R, A o S; 173R o S, 174S, y/o 456V.

En otro aspecto, la invención proporciona polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido por lo menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más idéntico a la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 71, en donde

(a) residuo 278 es Ser, residuo 78 es Glu y residuo 82 es Asp; y

(b) el polipéptido comprende un cambio de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 en uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en 274, 32, 73, 79, 80, 81, 130,

165E/Q/R/Y, 169S/Q/T, Q, 179F, 210, 213, 217, 235, 260, 267 y 272.

En una modalidad, el polipéptido comprende un cambio de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 en uno o más residuos seleccionados del grupo consistente en 274, 32, 73, 79, 80, 81, 130, 165E/Q/R/Y, 169S/Q/T, Q, 179F, 210, 213, 217, 235, 260 y 272.

En una modalidad, el polipéptido comprende un cambio de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 en uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en 32D/N/Q/H, 73E, 79S/T/A, 80L/T, 81A/T/V, 130A, 165E/Q/R/Y, 169S/Q/T, 179F Q, 210Q, 213S Q, 217S, 235K, N/Q, 260E, 272R y 274A/L/M/Q/R/T/V. En otra modalidad, el polipéptido comprende un cambio de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más residuos seleccionados del grupo. En una modalidad, el polipéptido comprende cambios de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 en los residuos 210 y 260, incluyendo, pero no limitado a cambios de aminoácidos 210Q y 260Q. En otra modalidad, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 169S y 274 T. En una modalidad más, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 73E, 80T, 165Q, 169S, 210Q, 260Q y 274T. En otra modalidad, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 130A, 179F, 210Q, 260Q y 274T. En una modalidad más, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 73E, 80T, 81V, 165Q, 169S, 210Q y 260Q. En todavía una modalidad más,

el polipéptido comprende cambios de aminoácido 73E, 80T, 320M 165Q, 169S, 210Q, 260Q y 274T. En una modalidad, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 130A, 131M, 179F, 210Q, 260Q y 274T. En otra modalidad, el polipéptido  
 5 comprende un cambio de aminoácido de SEQ ID NO: 71 en la posición del aminoácido 267, incluyendo, pero no limitado a 267V.

En otra modalidad, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste  
 10 en las SEQ ID NO: 2-42, 44-60 y 72-112 y 114-130 y 150-155. En una modalidad más, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2-42, 55-60 y 72-112 y 125-130 y 150-155.

En una modalidad, los polipéptidos de la invención  
 15 pueden comprender además una etiqueta histidina en la terminal C del polipéptido. En otra modalidad, la etiqueta histidina comprende una etiqueta histidina escindible. En una modalidad específica, la etiqueta histidina escindible puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos  
 20 GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139). En otra modalidad, la etiqueta histidina escindible puede comprender la secuencia de aminoácido  $X_N$ PQ(L/Q)P $X_N$ HHHHHH (SEQ ID NO: 131), en donde  $X_N$  es un enlazador de entre 1-25 residuos de aminoácidos. En una modalidad adicional, la etiqueta

histidina escindible puede comprender la secuencia de aminoácidos GSSGSSGSQPQLPYGSSGSSGSHHHHHH (SEQ ID NO: 132).

En otro aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de cualquier  
5 modalidad de la invención. La invención además proporciona el vector de expresión de ácido nucleico que comprende los ácidos nucleicos de la invención. La invención además proporciona célula huésped recombinantes que comprenden los vectores de expresión de ácido nucleico de la invención. La  
10 invención también proporciona la composición farmacéutica, que comprende el polipéptido, ácido nucleico, vector de la expresión de ácidos nucleico y/o la célula huésped recombinante de cualquier modalidad de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de la celiaquía o sensibilidad de gluten no celiaco (NCGS), que comprende la administración a un individuo con celiaquía o NCGS, una cantidad efectiva para el tratamiento de la celiaquía o NCGS de un polipéptido o  
20 composición farmacéutica de cualquier modalidad de la invención. En una modalidad, el polipéptido o la composición farmacéutica es administrada por vía oral.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1.** Kuma030 es capaz de degradar rápida y efectivamente las regiones inmunogénicas del gluten en condiciones gástricas. (A) la cantidad de gluten detectado después de un período de incubación de 60 minutos con las concentraciones indicadas de EPB2 y SCPEP (a una proporción 1:1), Kuma010 o Kuma030 en condiciones gástricas, según lo medido por ELISA usando el anticuerpo G12. La concentración inicial de gluten fue 10 mg mL<sup>-1</sup> (10,000 ppm). Tenga en cuenta que el eje Y se grafica en escala logarítmica. (B) La cantidad de gluten detectada a 5 o 30 minutos después de la incubación con EPB2 y SCPEP a 400 µg mL<sup>-1</sup>, o Kuma030 en 10, 100 o 400 µg mL<sup>-1</sup>. La concentración inicial de gluten fue 10 mg mL<sup>-1</sup>. Las muestras fueron normalizadas a la cantidad de gluten medida después de la incubación solo con pepsina. ES: una relación de peso de 1:1 de EPB2 y SCPEP. El asterisco indica que la cantidad de gluten está por debajo del nivel de cuantificación (5 ppm). (C) La traza de HPLC de péptido de longitud larga (líneas de puntos grises) o productos de descomposición (líneas negras) de los péptidos inmunodominantes de gliadina (W02-E07, W03-E07, 33mer), hordeína (B08-E2E7) o secalina (R11-E4E7). La parte inferior de la figura muestra la secuencia de aminoácidos del péptido 33mer, la posición de los epítomos inmunogénicos conocidos (líneas horizontales), la ubicación de los sitios de escisión Kuma030 determinados por LCMS (líneas verticales), y picos

de elución de los productos de descomposición resultantes (flechas grises). Péptidos inmunodominantes mostraron los siguientes patrones de descomposición: B08-E2E7: PQQPIPQ||QPQYPQ||Q (SEQ ID NO: 61); R11-E4E5: 5 QPFPQ||QPEQIIPQ||QP (SEQ ID NO:62); W02-E7: LQFPQPQ||LPYPQPQ (SEQ ID NO: 63); W03-E7: QPFPQPQ||QPFPWQP (SEQ ID NO: 64). Todas las masas de péptidos y tiempos de elución fueron confirmados por LCMS. Cabe destacar que, aunque el péptido no digerido W03-E07 eluido en 10 aproximadamente el mismo tiempo que los fragmentos de degradación W03-E07, estos son picos separados, según lo determinado por LCMS. aAU, unidades de absorbancia arbitraria.

**Figura 2.** La gliadina tratada con Kuma030 pierde 15 potencial inmunoestimulante. (A-E) La gliadina purificada fue tratada con Kuma030 en la concentración especificada durante 60 minutos a pH 4.0 a 37° C en presencia 0.6 mg mL<sup>-1</sup> de pepsina. Después de la fase gástrica, se incrementó el pH de las muestras, y las muestras fueron tratadas con 20 quimotripsina y TG2. Las muestras fueron expuestas a líneas de células T de los pacientes #1 (**A**), #2 (**B**), #3 (**C**), #4 (**D**) o #5 (**E**), en presencia de autólogos irradiados de líneas de células B y IFN- $\gamma$  fue medido por ELISA. La fitohemaglutenina (PHA) y una peptona péptica triptica digerida de gliadina 25 (PT-Gliadina) se incluyeron como controles positivos.

Incubación de líneas de células T con células que presentan antígenos en la ausencia de los antígenos actuaron como control negativo. (**F**) los epítomos estimulatorios de células T reconocidas por las células T utilizadas en este ensayo y  
 5 en los sitios de escisión Kuma030 predichos dentro de estos epítomos. Los sitios de escisión Kuma030 predichos se muestran por una línea vertical |. Los sitios de escisión se predicen basados en la actividad Kuma030 en los péptidos de gliadina como se presentan en la figura 1**F** (de arriba a  
 10 abajo: SEQ ID NO: 141, 142, 141, 142, 143, 144, 141, 142, 143, 144, 145, 145, 146, 145).

**Figura 3.** Kuma030 no es tóxico para las células T. Se evaluó el posible efecto tóxico de la gliadina tratados con enzimas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)  
 15 de donantes sanos que fueron estimuladas con mitógeno fitohemaglutinina (PHA). (a,b) Producción IFN- $\gamma$  de células T del donante sano #1 (A) o del donante sano #2 (B). (C,D) Proliferación de células T de las células T del donante sano #1 (C) o del donante sano #2 (D). No se observó ningún efecto  
 20 sobre la proliferación celular o la producción de IFN- $\gamma$ , excepto en la proliferación del donante sano #2 (pero no en la producción de IFN- $\gamma$ ). Puesto que la reducción de la proliferación celular estimulada por PHA era la misma independientemente del tratamiento enzimático, se concluye  
 25 que este efecto no fue debido a la toxicidad de las muestras.

**Figura 4.** Kuma030 degrada eficientemente el gluten en matrices de alimentos complejos. (A) la cantidad de gluten permanece en el pan de trigo entero después de una incubación de 30 minutos con Kuma030 o con una combinación de 1:1 de EPB2:SCPEP en las concentraciones de enzima indicadas. La concentración inicial de gluten era de 10,000 ppm. Cabe señalar que ambos ejes se trazan en una escala logarítmica. (B) La cantidad de gluten restante en una cerveza de trigo después de la incubación con las concentraciones indicadas de una proporción de 1:1 de EPB2:SCPEP, o Kuma030, a 37 °C o 4 °C, en 5, 15 o 60 minutos. Gluten se detectó mediante el método ELISA G12.

**Figura 5. Comparación de las capacidades degradativas de 26-mer y 33-mer de Kuma010, Kuma020, Kuma030, Kuma040 y Kuma050.** Las enzimas se incubaron a 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  con 1  $\text{mg mL}^{-1}$  del péptido 33mer (**a**) o el péptido 26mer (**b**) durante 60 minutos. Se tomaron muestras a los horarios indicados, y se midieron las concentraciones de productos de degradación del péptido. Los productos de la degradación fueron: del péptido 33mer (SEQ ID NO: 69), LPYPQPQF (SEQ ID NO: 137); del péptido 26mer (SEQ ID NO: 70), QPYPQ (SEQ ID NO: 147). Las actividades se graficaron como la relación de la señal m/z apropiada para la del estándar interno.

**Figura 6. La mutación G320M mejora la actividad en 2-4 veces.** Se muestra es la actividad de degradación de los

epítomos inmunogénicos DQ2.5-glia  $-\alpha 1a$  (contiene PQL) (izquierda) y DQ2.5-glia  $-\omega 1$  (contiene PQQ) (derecha). Se tomaron muestras en los puntos indicados y la concentración del producto de degradación del péptido PFPQPQ (SEQ ID NO: 148) se midió. Las actividades se graficaron como la relación de la señal m/z apropiada para la del estándar interno.

**Figura 7. Las mutaciones P171R y H172R no parecen afectar negativamente la actividad.** Las actividades enzimáticas se muestran para las variantes de la enzima Kuma030, Kuma031, Kuma032, Kuma040, Kuma041 y Kuma042 en el epítomo de gliadina inmunogénico DQ2.5-glia  $-\alpha 1a$ . Se tomaron muestras en los puntos indicados y la concentración del producto de degradación del péptido PFPQPQ (SEQ ID NO: 148) se midió. Las actividades se graficaron como la relación de la señal m/z apropiada para la del estándar interno. Todas las enzimas se purificaron por intercambio de anión.

**Figura 8. Kuma062 demuestra un mayor nivel de actividad enzimática que Kuma030 o Kuma040.** Se muestra la actividad en el epítomo de gliadina inmunogénico DQ2.5-glia  $-\omega 1$ . Izquierda: detección de DQ2.5-glia  $-\omega 1$  de longitud completa; derecha: detección de PFPQPQ (SEQ ID NO: 148) producto de la degradación. Se tomaron muestras en los puntos de tiempo indicados y la concentración del producto de la degradación o del péptido de longitud completa PFPQPQ

(SEQ ID NO: 148), se midió. Las actividades se graficaron como la relación de la señal m/z apropiada para la del estándar interno.

## 5            **Descripción detallada**

Todas las referencias citadas en este documento se incorporan como referencia en su totalidad. Dentro de esta solicitud, a menos que se indique lo contrario, las técnicas utilizadas pueden encontrarse en cualquiera de varias referencias bien conocidas tales como: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), *Gene Expression Technology (Methods in Enzymology*, Vol. 185, editadi por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" en *Methods in Enzymology* (M.P. Deutshcer, ed., (1990) Academic Press, Inc.); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, CA), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 2da Ed. (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY), *Gene Transfer and Expression Protocols*, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Human Press Inc., Clifton, N.J.), y el Ambion 1998 Catalog (Ambion, Austin, TX).

Como se utiliza en este documento, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique

claramente lo contrario. "Y" tal como se utiliza en el presente documento se utiliza de manera intercambiable con "o" a menos que expresamente se indique lo contrario.

Como se utiliza en este documento, los residuos de  
 5 aminoácido se abrevian como sigue: alanina (Ala;A),  
 asparagina (Asn;N), ácido aspártico (Asp;D), arginina  
 (Arg;R), cisteína (Cys;C), ácido glutámico (Glu;E),  
 glutamina (Gln;Q), glicina (Gly;G), histidina (His;H),  
 isoleucina (Ile;I), leucina (Leu;L), lisina (Lys;K),  
 10 metionina (Met;M), fenilalanina (Phe;F), prolina (Pro;P),  
 serina (Ser;S), treonina (Thr;T), triptofano (Trp;W),  
 tirosina (Tyr;Y), y valina (Val;V).

Todas las modalidades de cualquier aspecto de la  
 invención pueden usarse en combinación, a menos que el  
 15 contexto claramente indique lo contrario.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona  
 polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos por  
 lo menos 75% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ  
 ID NO: 1, en donde

20 (a) residuos 467 es Ser, residuo 267 es Glu y residuo  
 271 es Asp; y

(b) el polipéptido comprende un cambio de aminoácidos  
 de SEQ ID NO: 1 en uno o más residuos seleccionado del grupo  
 que consistente en 221, 262E, 268, 269, 270, 319A, 320,  
 25 354E/Q/R/Y, 358S/Q/T, 368F/Q, 399, 402, 406, 424, 449, 461,

463, 105, 171, 172, 173, 174 y 456. En una modalidad, el polipéptido comprende un cambio de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en uno o más residuos seleccionado del grupo consistente en 221, 262E, 268, 269, 270, 319A, 320, 354E/Q/R/Y, 358S/Q/T, 368F/Q, 399, 402, 406, 424, 449, 461 y 463.

SEQ ID NO:1 (Kuma 011)

Kuma011

**MSDMEKWPKE (10) GEEARAVLQG (20) HARAQAPQAV (30) DKGPVAGDER (**  
**40) MAVTVVLRQ (50) RAGELAAHVE (60) RQAAIAPHAR (70) EHLKREAFAA (80)**  
**SHGASLDDFA (90) ELRRFADAHG (100) LALDRANVAA (110) GTAVLSGPDD (120)**  
**AINRAFGVEL (130) RHFDHPDGSY (140) RSYLGEVTVP (150) ASIAPMIEAV (160)**  
**) LGLDTRPVAR (170) PH (172) FRMQRRAE (180) GGFEARSQ (188) A**  
 A (190) APTAYTPLDV (200) AQAYQFPEGL (210) DGQGQCIAII (220) E (221/32)  
 LGGGYDEAS (230/41) LAQYFASLGV (240/51) PAPQVSVSV (250/61)  
 ) DGASNQPTGD (260/71) PK (262/73) GPDGE (267/78) V (268/79) E (269/80)  
 ) L (270/81) D (271/82) IEVAGALAP (280/91) GAKFAVYFAP (290/101) DTTA  
 GFLDAI (300/111) TTAIHDP TLK (310/121) PSVVSISWS (319/130) G (320/131)  
 PEDSWTSAAI (330/141) AAMNRAFLDA (340/151) AALGVTVLAA (350/161)  
 ) AGDS (354/165) GSTG (358/169) GE (360/171) QDGLYHVH (368/179) FP (370/181)  
 AASPYVLACG (380/191) GTRLVASGGR (390/201) IAQETVWND (399/210)  
 G (400/211) PD (402/213) GGAT (406/217) GGGV (410/221) SRIFPLPA  
 WQ (420/231) EHAN (424/235) VPPSAN (430/241) PGASSGRGVP (440/251) D  
 LAGNADPA (449/260) T (450/261) GYEVVIDGEA (460/271) T (461/272) VI (463/274)  
 GGTS (467/278) AVAPLFAALVARINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHD

ITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQLQALLPSASQPPQ (SEQ ID NO: 1)

Kuma010 como se referencia en el presente documento es idéntico a Kuma011, pero incluye la secuencia de etiqueta  
 5 histidina GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139) en su terminal C.

Los residuos de letra negrita representan la porción terminal N presente en el polipéptido sin procesar; las letras que no están en negrita representan residuos presentes  
 10 en la versión procesada del polipéptido. Los números entre paréntesis indican el número de residuos; donde hay dos números separados por una "/", el número de la izquierda es el número de residuo en la versión sin procesar, y el número de la derecha es el número de residuo en la versión procesada.  
 15 SEQ ID NO:1 es la versión sin procesar de Kuma011; SEQ ID NO:71 es la versión procesada de Kuma011.

Según lo establecido en los ejemplos que siguen, los polipéptidos de acuerdo con este aspecto de la invención son polipéptidos mejorados para el uso, por ejemplo, en el  
 20 tratamiento de la celiaquía. Los polipéptidos son versiones modificadas de la versión procesada o la versión preprocesada del polipéptido de SEQ ID NO: 1 (KUMAMAX™, en lo sucesivo Kuma010), el cual se divulgó como útil para el tratamiento de la celiaquía (WO2013/023151). Los polipéptidos para el  
 25 tratamiento de la celiaquía son capaces de degradar

compuestos ricos en prolina (P)- y glutamina (Q)- del gluten conocidos como 'gliadinas' que se cree son responsables de la mayor parte de la respuesta inmune en pacientes celiaquía. Los polipéptidos de la presente invención muestran actividad superior en la degradación de péptidos que tienen un PQLP (SEQ ID NO: 65) o PQQP (SEQ ID NO: 66) motivo (tal como PFPQPQLPY (SEQ ID NO: 67) y/o PFPQPQQPF (SEQ ID NO: 68)), que son sustratos representativos de la gliadina) a pH 4 comparado con Kuma011 y otros polipéptidos divulgados como útiles para el tratamiento de la celiaquía (WO2015/023728), y/o se muestra que mejoran la producción de los polipéptidos. Por consiguiente, los polipéptidos de la invención constituyen una mejora terapéutica significativa para el tratamiento de la celiaquía.

Por consiguiente, los polipéptidos de la invención degradan un PFPQPQLPY (SEQ ID NO: 67) péptido y/o un PFPQPQQPF (SEQ ID NO: 68) péptido a pH 4, así como LQLQPFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQQPF (SEQ ID NO: 69) y/o FLQPQQPFPQQPQQPYQPQQPQQPFPQ (SEQ ID NO: 70).

Los polipéptidos del primer aspecto de la invención comprenden versiones preprocesadas de las enzimas del polipéptido de la invención.

En un primer aspecto, la invención proporciona polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos por

lo menos 75% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71, en donde

(a) residuo 278 es Ser, residuo 78 es Glu y residuo 82 es Asp; y

5 (b) el polipéptido comprende un cambio de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 en uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en 32, 73E, 79, 80, 81, 130A, 131, 165E/Q/R/Y, 169S/Q/T, 179F/Q, 210, 213, 217, 235, 260, 267, 272 y 274. En una modalidad, el polipéptido comprende un  
10 cambio de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 en uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en 32, 73E, 79, 80, 81, 130A, 131, 165E/Q/R/Y, 169S/Q/T, 179F/Q, 210, 213, 217, 235, 260, 272 y 274.

Los polipéptidos del primer aspecto de la invención  
15 comprenden versiones preprocesadas de las enzimas del polipéptido de la invención y también degrada un PFPQPQLPY (SEQ ID NO: 67) péptido y/o un PFPQPQQPF (SEQ ID NO: 68) péptido a pH 4, así como LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQQPF (SEQ ID NO: 69) y/o FLQPQQPFPQQPQQPYQPQQPQQPFPQ (SEQ ID NO:  
20 70).

Como se utiliza en el presente documento, "al menos un 75% idéntico" significa que el polipéptido difiere en su secuencia de aminoácidos de longitud completa por 25% o menos (incluyendo cualquier substitución, supresiones, adiciones o

inserciones) del polipéptido definido por SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 71.

En varias modalidades de cualquier aspecto de los polipéptidos de la invención, los polipéptidos comprenden o  
 5 consisten en una secuencia de aminoácidos por lo menos 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% , 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 (preprocesado) o SEQ ID NO: 71 (procesado).

10 El polipéptido de cualquier aspecto de los polipéptidos de la invención puede comprender un cambio de aminoácido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:71 en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23o todos los 24 (dependiendo de la modalidad) de los residuos  
 15 descritos.

En una modalidad de los polipéptidos del primer aspecto de la invención, el polipéptido comprende uno o más cambios de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste de 221D/N/Q/H, 262E,  
 20 268S/T/A, 269L/T, 270A/T/V, 319A, 354E/Q/R/Y, 358S/Q/T, 368F/Q, 399Q, 402S/Q, 406S, 424K, 449E/N/Q, 461R y 463A/L/M/Q/R/T/V. Como se usa a lo largo de todo el documento, el número indica el número de residuos en la secuencia de polipéptidos SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:71, y las  
 25 abreviaturas de aminoácido de una sola letra a la derecha

del número indican las substituciones posibles de aminoácidos en comparación con el residuo de aminoácido presente en esa posición en SEQ ID NO:1 o 71.

En otra modalidad de los polipéptidos del primer  
5 aspecto de la invención, el polipéptido comprende cambios de aminoácidos SEQ ID NO: 1 en los residuos 399 y 449. En una modalidad, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 399Q y 449Q.

En una modalidad posterior de los polipéptidos del  
10 primer aspecto de la invención, el polipéptido comprende 358S y 463T. Estos polipéptidos se caracterizan ampliamente en los ejemplos que siguen, como se ejemplifica por el polipéptido señalado como Kuma020 y variantes del mismo.

En una modalidad de los polipéptidos del primer aspecto  
15 de la invención, el polipéptido comprende 262E, 269T, 354Q, 358S, 399Q, 449Q y 463T. Estos polipéptidos se caracterizan ampliamente en los ejemplos que siguen, como se ejemplifica por el polipéptido señalado como Kuma030 y variantes del mismo. En una modalidad de los polipéptidos del primer  
20 aspecto de la invención, el polipéptido comprende 319A, 368F, 399Q, 449Q y I463T. Estos polipéptidos se caracterizan ampliamente en los ejemplos que siguen, como se ejemplifica por el polipéptido señalado como Kuma040 y variantes del mismo. En una modalidad posterior de los polipéptidos del  
25 primer aspecto de la invención, el polipéptido comprende

262E, 269T, 270V, 354Q, 358S, 399Q y A449Q. Estos polipéptidos se caracterizan ampliamente en los ejemplos que siguen, como se ejemplifica por el polipéptido señalado como Kuma050 y variantes del mismo. En una modalidad de los

5 polipéptidos del primer aspecto de la invención, el polipéptido comprende 262E, 269T, 354Q, 358S, 399Q, 449Q y 463T. Estos polipéptidos se caracterizan ampliamente en los ejemplos que siguen, como se ejemplifica por el polipéptido señalado como Kuma060 y variantes del mismo. En todavía una

10 modalidad más de los polipéptidos del primer aspecto de la invención, el polipéptido comprende 319A, 320M, 368F, 399Q, 449Q y 463T. Estos polipéptidos se caracterizan ampliamente en los ejemplos que siguen, como se ejemplifica por el polipéptido señalado como Kuma070 y variantes del mismo.

15 En otra modalidad de los polipéptidos del primer aspecto de la invención, los polipéptidos comprenden cambios de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en una o más posiciones del aminoácido seleccionado del grupo consistente en 105, 171, 172, 173, 174 y 456. En una modalidad, el cambio de aminoácido

20 es 105H; 171R A o S; 172R, A o S; 173R o S, 174S, y/o 456V. En otra modalidad, el cambio de aminoácido es 171R, 172R y/o 456V.

En una modalidad de los polipéptidos del segundo aspecto de la invención el polipéptido comprende uno o más

25 cambios de aminoácido de SEQ ID NO: 71 en uno o más residuos

seleccionados del grupo que consiste en 32D/N/Q/H, 73E, 79S/T/A, 80L/T, 81A/T/V, 130A, 165E/Q/R/Y, 169S/Q/T, 179F Q, 210Q, 213S Q, 217S, 235K, N/Q, 260E, 272R y 274A/L/M/Q/R/T/V.

En otra modalidad de los polipéptidos del segundo aspecto de la invención, el polipéptido comprende cambios de aminoácidos SEQ ID NO: 71 en los residuos 210 y 260. En una modalidad más de los polipéptidos del segundo aspecto de la invención, el polipéptido comprende cambios de aminoácido 210Q y 260Q.

En una modalidad de los polipéptidos del segundo aspecto de la invención, el polipéptido comprende 169S y 274T. (Género Kuma 20) En otra modalidad de los polipéptidos del segundo aspecto de la invención, el polipéptido comprende 73E, 80T, 165Q, 169S, 210Q, 260Q y 274T. (Género Kuma 30) En otra modalidad de los polipéptidos del segundo aspecto de la invención, el polipéptido comprende 7130A, 179F, 210Q, 260Q y 274T. (Género Kuma 40) En otra modalidad de los polipéptidos del segundo aspecto de la invención, el polipéptido comprende 73E, 80T, 81V, 165Q, 169S, 210Q y 260Q. (Género Kuma 50) En otra modalidad de los polipéptidos del segundo aspecto de la invención, el polipéptido comprende 73E, 80T, 320M, 165Q, 169S, 210Q, 260Q y 274T. (Género Kuma 60) En otra modalidad de los polipéptidos del segundo aspecto de la invención, el polipéptido comprende 130A, 131M, 179F, 210Q, 260Q y 274T. (Género Kuma 70) En aún otra modalidad de los polipéptidos del segundo aspecto de la invención, los

polipéptidos comprenden cambios de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 en una o más posiciones del aminoácido seleccionados del grupo consistente en 267. En una modalidad, el cambio del aminoácido es 267V.

5 En una modalidad más de los polipéptidos de cualquier aspecto de la invención, los polipéptidos además comprenden una etiqueta histidina en el término C del polipéptido, para facilitar el aislamiento del polipéptido. Puede utilizarse cualquier etiqueta histidina adecuada; en una modalidad, la

10 etiqueta está relacionada con un asiento de corte proteasa TEV (ENLYFQS) (SEQ ID NO: 149) para permitir su remoción eficiente con proteasa TEV después de la purificación, por ejemplo, la etiqueta puede comprender o consistir de la secuencia de aminoácidos GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO:

15 139). En otra modalidad, la etiqueta de histidina es una etiqueta histidina escindible, que permite la fácil eliminación de la etiqueta His. En una modalidad, la etiqueta histidina escindible comprende la secuencia de aminoácido  $X_N$ PQ(L/Q)PX<sub>N</sub>HHHHHH (SEQ ID NO: 131), en donde  $X_N$

20 es un enlazador de entre 1-25 residuos de aminoácidos. En un ejemplo no limitante, la etiqueta histidina escindible comprende la secuencia de aminoácidos GSSGSSGSQPQLPYGSSGSSGSHHHHHH (SEQ ID NO: 132).

En una modalidad de cualquier aspecto de los

25 polipéptidos de la invención, las substituciones del

aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 71 puede comprender una o más de las sustituciones observadas en las Tablas 1 o 2. Las sustituciones en esas posiciones se encontraron como generalmente bien toleradas (es decir, 5 generalmente resultan en efectos menores o falta de los mismos en la actividad) y en algunos casos para aumentar la actividad de los polipéptidos de la invención en no más del 20%.

10

15

20

25

Tabla 1. Sustituciones de aminoácidos posibles en posición relativa a Kumal0.

|    | Número de residuo<br>(preprocesado/procesado) | Residuo                                                    |
|----|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
|    | 221/32                                        | D, N, Q, H                                                 |
| 5  | 261/72                                        | A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M,<br>S, T, W, Y, V    |
|    | 262/73                                        | A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, M, F,<br>T, W, Y, V       |
|    | 264/75                                        | A, N, D, C, Q, E, G, S, T, Y                               |
|    | 266/77                                        | A, C, S                                                    |
|    | 268/79                                        | S, T                                                       |
|    | 269/80                                        | L, T                                                       |
|    | 270/81                                        | A, R, N, D, C, Q, E, G, I, K, S, T, V                      |
| 10 | 317/128                                       | A, N, C, G, T, V                                           |
|    | 318/129                                       | A, R, N, D, C, Q, E, G, H, L, K, M, F,<br>S, T, Y, V       |
|    | 319/130                                       | A, N, D, C, Q, H, M, T                                     |
|    | 320/131                                       | A, R, N, D, C, Q, K, M, S                                  |
|    | 350/161                                       | N, D, C, G, S, T                                           |
|    | 351/162                                       | G, S                                                       |
|    | 353/164                                       | A, R, N, C, Q, E, G, I, K, M, S, T, V                      |
| 15 | 354/165                                       | A, R, N, D, C, Q, E, G, H, L, K, M, F,<br>T, W, Y          |
|    | 358/169                                       | A, S, N, Q, T                                              |
|    | 368/179                                       | A, R, N, C, Q, E, G, K, M, F, S, T, W,<br>Y                |
|    | 397/208                                       | A, C, F, Y                                                 |
|    | 399/210                                       | Q, N                                                       |
|    | 402/213                                       | Q, N, S                                                    |
|    | 406/217                                       | S                                                          |
| 20 | 424/235                                       | K                                                          |
|    | 446/257                                       | G, S                                                       |
|    | 448/259                                       | A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M,<br>F, S, T, W, Y, V |
|    | 449/260                                       | Q, E, G, N                                                 |
|    | 456/267                                       | A, N, D, C, Q, E, G, H, L, S, T, V                         |
|    | 461/272                                       | R                                                          |
|    | 463/274                                       | A, R, N, D, C, Q, E, G, H, L, K, M, F,<br>S, T, W, Y, V    |
| 25 | 464/277                                       | A, N, D, C, S,                                             |
|    | 466/279                                       | D, C, G, S                                                 |

En otra modalidad de cualquier aspecto de los polipéptidos de la invención, las substituciones del aminoácido en comparación con SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 71 puede comprender una o más de las sustituciones observadas en la Tabla 1.

| Número de residuo<br>(preprocesado/procesado) | Residuo                      |
|-----------------------------------------------|------------------------------|
| 221/32                                        | D, N, Q, H                   |
| 261/72                                        | S                            |
| 262/73                                        | A, R, N, D, Q, E, G, L, M, T |
| 264/75                                        | A                            |
| 268/79                                        | S, T                         |
| 269/80                                        | L, T                         |
| 270/81                                        | A, T, V                      |
| 317/128                                       | A, T                         |
| 319/130                                       | A                            |
| 354/165                                       | A, R, N, D, Q, E, K, T, Y    |
| 358/169                                       | A, S, N, Q, T                |
| 368/179                                       | A, N, D, Q, E, S, T          |
| 402/213                                       | Q, S                         |
| 406/217                                       | S                            |
| 424/235                                       | K                            |
| 446/257                                       | S                            |
| 449/260                                       | Q, N, A                      |
| 456/267                                       | V                            |
| 461/272                                       | R                            |
| 463/274                                       | A, R, Q, L, M, T, V          |

En otra modalidad de cualquier aspecto de los polipéptidos de la invención, del aminoácido en cada residuo de los polipéptidos de la invención puede ser como se indica en la Tabla 3, que enumera todas las mutaciones posibles en cada posición en las enzimas de polipéptido según lo predicho por el análisis de mutagénesis computacional. Como se describe en los ejemplos siguientes, las mutaciones se

probaron en cada posición encontrada en el sitio activo  
(residuos 261-264, 266-267, 270, 317-320, 350-354, 368, 397,  
403-404, 446, 448, 456 y 463-468) utilizando cebadores  
degenerados para probar los efectos de varias sustituciones  
5 de aminoácidos en actividad; las que no interfirieron con la  
actividad pueden ser incorporadas en los polipéptidos de la  
invención, tal como se refleja en la Tabla 3.

10

15

20

25

Tabla 3. Posibles aminoácidos en residuos relativos a Kuma 010

5

10

15

20

25

| Longitud<br>residuo | Maduro(a) | Posibilidades de Aminoácido                                                                        |
|---------------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 190                 | 1         | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, PRO, SER, THR, TRP, TYR, VAL |
| 191                 | 2         | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LYS, MET, PHE, PRO, SER, THR, TRP, VAL           |
| 192                 | 3         | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, LEU, LYS, MET, PHE, PRO, SER, THR, TRP, TYR           |
| 193                 | 4         | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, PRO, SER, THR, TRP, TYR, VAL |
| 194                 | 5         | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL           |
| 195                 | 6         | ALA, ASN, CYS, GLN, HIS, LEU, MET, PHE, THR, TYR                                                   |
| 196                 | 7         | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR                     |
| 197                 | 8         | ALA, GLY, PRO, SER                                                                                 |
| 198                 | 9         | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL      |
| 199                 | 10        | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR                |
| 200                 | 11        | ALA, ASN, ASP, CYS, GLY, ILE, SER, THR, VAL                                                        |
| 201                 | 12        | ALA, CYS, GLY, SER                                                                                 |
| 202                 | 13        | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL      |
| 203                 | 14        | ALA, GLY, SER                                                                                      |
| 204                 | 15        | ALA, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TYR                     |
| 205                 | 16        | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL      |
| 206                 | 17        | ALA, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TYR, VAL                |
| 207                 | 18        | ALA, CYS, GLN, GLU, GLY, LYS, PRO, SER, THR, TRP                                                   |
| 208                 | 19        | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, PRO, SER, THR, TRP, TYR, VAL |
| 209                 | 20        | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL      |
| 210                 | 21        | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, LEU, MET, SER, THR, VAL                                    |
| 211                 | 22        | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, LYS, MET, PHE, SER, THR, TYR                          |
| 212                 | 23        | GLY                                                                                                |
| 213                 | 24        | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL           |
| 214                 | 25        | GLY                                                                                                |
| 215                 | 26        | ALA, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, SER, THR                                                        |
| 216                 | 27        | ALA, ASN, ASP, CYS, GLN, GLY, SER, THR, VAL                                                        |
| 217                 | 28        | ALA, CYS, ILE, LEU, SER, THR, VAL                                                                  |
| 218                 | 29        | ALA, GLY, SER                                                                                      |
| 219                 | 30        | ALA, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, MET, SER, THR, VAL                               |
| 220                 | 31        | ALA, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, ILE, SER, THR, VAL                                              |
| 221                 | 32        | ALA, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, ILE, SER, THR, VAL                                              |
| 222                 | 33        | ALA, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, ILE, LEU, LYS, SER, THR, VAL                                    |
| 223                 | 34        | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLU, GLY, LYS, MET, SER                                                   |
| 224                 | 35        | GLY                                                                                                |
| 225                 | 36        | GLY                                                                                                |
| 226                 | 37        | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLU, GLY, HIS, LEU, PHE, SER, THR, TRP, TYR                               |
| 227                 | 38        | ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, LYS, MET, SER                                              |

|    |     |    |                                                                                 |
|----|-----|----|---------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 228 | 39 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
|    | 229 | 40 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 230 | 41 | ALA,GLY,SER                                                                     |
|    | 231 | 42 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,SER,THR                                         |
|    | 232 | 43 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
| 10 | 233 | 44 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 234 | 45 | ALA,ASN,CYS,GLY,HIS,PHE,SER,TYR                                                 |
|    | 235 | 46 | ALA,ASN,ASP,CYS,HIS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR                                     |
|    | 236 | 47 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 237 | 48 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
| 15 | 238 | 49 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,MET,SER,THR,VAL                     |
|    | 239 | 50 | GLY                                                                             |
|    | 240 | 51 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,SER,THR,TYR,VAL                 |
|    | 241 | 52 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
|    | 242 | 53 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LYS,MET,PRO,SER,THR,VAL                 |
| 20 | 243 | 54 | ALA,GLY,PRO,SER                                                                 |
|    | 244 | 55 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
|    | 245 | 56 | ALA,ASN,CYS,GLY,SER,THR,VAL                                                     |
|    | 246 | 57 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 247 | 58 | ALA,ARG,ASP,CYS,GLY,ILE,LYS,MET,PRO,SER                                         |
| 25 | 248 | 59 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL         |
|    | 249 | 60 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,PRO,SER,THR                     |
|    | 250 | 61 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,SER,THR,VAL                                     |
|    | 251 | 62 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 252 | 63 | ASN,ASP,GLY,SER                                                                 |
|    | 253 | 64 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP                     |
|    | 254 | 65 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 255 | 66 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,MET,SER,THR                                                 |
|    | 256 | 67 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 257 | 68 | ALA,ARG,ASN,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LYS,MET,PRO,SER,THR,VAL                         |
|    | 258 | 69 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 259 | 70 | GLY                                                                             |
|    | 260 | 71 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 261 | 72 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 262 | 73 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 263 | 74 | GLY                                                                             |
|    | 264 | 75 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,PRO,SER,THR,TRP                                     |
|    | 265 | 76 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,SER,THR,VAL                                         |
|    | 266 | 77 | ALA,CYS,GLY,SER                                                                 |
|    | 267 | 78 | GLU                                                                             |

5

10

15

20

25

|     |     |                                                                                 |
|-----|-----|---------------------------------------------------------------------------------|
| 268 | 79  | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,SER,THR,VAL                                                 |
| 269 | 80  | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                     |
| 270 | 81  | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,SER,THR,VAL                         |
| 271 | 82  | ASP                                                                             |
| 272 | 83  | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,MET,SER,THR,VAL                                 |
| 273 | 84  | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,SER,THR                                             |
| 274 | 85  | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,ILE,SER,THR,VAL                                             |
| 275 | 86  | ALA,CYS,GLY,SER                                                                 |
| 276 | 87  | GLY                                                                             |
| 277 | 88  | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 278 | 89  | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,MET,SER,THR,VAL                             |
| 279 | 90  | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 280 | 91  | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,MET,PHE,PRO,SER,TRP,TYR                         |
| 281 | 92  | GLY                                                                             |
| 282 | 93  | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 283 | 94  | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 284 | 95  | CYS,HIS,ILE,LEU,MET,PHE,THR,TYR,VAL                                             |
| 285 | 96  | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 286 | 97  | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,SER,THR,VAL                                                 |
| 287 | 98  | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,HIS,LEU,PHE,SER,TYR                                         |
| 288 | 99  | HIS,PHE                                                                         |
| 289 | 100 | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 290 | 101 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 291 | 102 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 292 | 103 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL         |
| 293 | 104 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PRO,SER,THR,VAL             |
| 294 | 105 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 295 | 106 | GLY                                                                             |
| 296 | 107 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,VAL                     |
| 297 | 108 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR             |
| 298 | 109 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 299 | 110 | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 300 | 111 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                         |
| 301 | 112 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,VAL                 |
| 302 | 113 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,SER,THR,TRP,VAL                     |
| 303 | 114 | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 304 | 115 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,SER,THR,VAL                                 |
| 305 | 116 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL         |
| 306 | 117 | ALA,ASN,ASP,SER                                                                 |
| 307 | 118 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |

|    |     |     |                                                                                 |
|----|-----|-----|---------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 308 | 119 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 309 | 120 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR             |
|    | 310 | 121 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 311 | 122 | ALA,CYS,GLY,PRO,SER                                                             |
|    | 312 | 123 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR                 |
| 10 | 313 | 124 | ALA,CYS,GLY,ILE,SER,THR,VAL                                                     |
|    | 314 | 125 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,SER,THR,VAL                                     |
|    | 315 | 126 | ALA,CYS,GLY,SER,THR                                                             |
|    | 316 | 127 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,MET,SER,THR,VAL                             |
|    | 317 | 128 | ALA,ASN,CYS,GLY,SER,THR,VAL                                                     |
| 15 | 318 | 129 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL         |
|    | 319 | 130 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLY,HIS,MET,SER,THR                                         |
|    | 320 | 131 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLY,LYS,MET,SER                                         |
|    | 321 | 132 | ALA,CYS,GLY,PRO,SER                                                             |
|    | 322 | 133 | ALA,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,SER                                                 |
| 20 | 323 | 134 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,VAL,    |
|    | 324 | 135 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 325 | 136 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,PHE,SER,TRP,TYR                     |
|    | 326 | 137 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR             |
|    | 327 | 138 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 25 | 328 | 139 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 329 | 140 | ALA,ASP,CYS,GLY,SER                                                             |
|    | 330 | 141 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                     |
|    | 331 | 142 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 332 | 143 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 333 | 144 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                     |
|    | 334 | 145 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLU,GLY,MET,SER,THR,VAL                                     |
|    | 335 | 146 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 336 | 147 | ALA,ARG,CYS,GLN,GLU,GLY,MET,SER                                                 |
|    | 337 | 148 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL         |
|    | 338 | 149 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 339 | 150 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 340 | 151 | ALA,ASN,ASP,GLY,SER                                                             |
|    | 341 | 152 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LYS,MET,SER,THR,VAL                     |
|    | 342 | 153 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 343 | 154 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 344 | 155 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR             |
|    | 345 | 156 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TYR,VAL         |
|    | 346 | 157 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,PHE,SER,THR                             |
|    | 347 | 158 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LYS,MET,PRO,SER,THR,VAL                         |
|    | 348 | 159 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,SER,THR,VAL                                     |

|    |     |     |                                                                                 |
|----|-----|-----|---------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 308 | 119 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 309 | 120 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR         |
|    | 310 | 121 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 311 | 122 | ALA,CYS,GLY,PRO,SER                                                             |
|    | 312 | 123 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR                 |
| 10 | 313 | 124 | ALA,CYS,GLY,ILE,SER,THR,VAL                                                     |
|    | 314 | 125 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,SER,THR,VAL                                     |
|    | 315 | 126 | ALA,CYS,GLY,SER,THR                                                             |
|    | 316 | 127 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,MET,SER,THR,VAL                             |
|    | 317 | 128 | ALA,ASN,CYS,GLY,SER,THR,VAL                                                     |
| 15 | 318 | 129 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 319 | 130 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLY,HIS,MET,SER,THR                                         |
|    | 320 | 131 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLY,LYS,MET,SER                                         |
|    | 321 | 132 | ALA,CYS,GLY,PRO,SER                                                             |
|    | 322 | 133 | ALA,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,SER                                                 |
| 20 | 323 | 134 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,VAL,    |
|    | 324 | 135 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 325 | 136 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,PHE,SER,TRP,TYR                     |
|    | 326 | 137 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR         |
|    | 327 | 138 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 25 | 328 | 139 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 329 | 140 | ALA,ASP,CYS,GLY,SER                                                             |
|    | 330 | 141 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                     |
|    | 331 | 142 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 332 | 143 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 333 | 144 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                     |
|    | 334 | 145 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLU,GLY,MET,SER,THR,VAL                                     |
|    | 335 | 146 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 336 | 147 | ALA,ARG,CYS,GLN,GLU,GLY,MET,SER                                                 |
|    | 337 | 148 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 338 | 149 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 339 | 150 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 340 | 151 | ALA,ASN,ASP,GLY,SER                                                             |
|    | 341 | 152 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LYS,MET,SER,THR,VAL                     |
|    | 342 | 153 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 343 | 154 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
|    | 344 | 155 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR         |
|    | 345 | 156 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TYR,VAL         |
|    | 346 | 157 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,PHE,SER,THR                             |
|    | 347 | 158 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LYS,MET,PRO,SER,THR,VAL                         |
|    | 348 | 159 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,SER,THR,VAL                                     |

|    |     |     |                                                                              |
|----|-----|-----|------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 349 | 160 | ALA,CYS,GLY,SER,THR                                                          |
|    | 350 | 161 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,SER,THR                                                  |
|    | 351 | 162 | ALA,GLY,SER                                                                  |
|    | 352 | 163 | GLY                                                                          |
|    | 353 | 164 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LYS,MET,SER,THR,VAL                      |
| 10 | 354 | 165 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR          |
|    | 355 | 166 | GLY                                                                          |
|    | 356 | 167 | ALA,GLY,SER                                                                  |
|    | 357 | 168 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,MET,SER,THR,VAL                          |
|    | 358 | 169 | ALA,GLY,SER                                                                  |
| 15 | 359 | 170 | ASN,GLY                                                                      |
|    | 360 | 171 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                  |
|    | 361 | 172 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL, |
|    | 362 | 173 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL, |
|    | 363 | 174 | ASN,ASP,GLY,SER                                                              |
| 20 | 364 | 175 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR          |
|    | 365 | 176 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLY,HIS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR                          |
|    | 366 | 177 | ALA,ASN,ASP,CYS,HIS,LYS,SER                                                  |
|    | 367 | 178 | ALA,ASP,CYS,GLY,SER,THR,VAL                                                  |
|    | 368 | 179 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR              |
| 25 | 369 | 180 | ALA,CYS,HIS,PHE,SER,TYR                                                      |
|    | 370 | 181 | ALA,ASP,CYS,GLY,PRO,SER                                                      |
|    | 371 | 182 | ALA,GLY,SER                                                                  |
|    | 372 | 183 | ALA,CYS,GLY,SER                                                              |
|    | 373 | 184 | ALA,GLY,SER                                                                  |
|    | 374 | 185 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PRO,SER,THR,TRP,VAL      |
|    | 375 | 186 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL      |
|    | 376 | 187 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,HIS,ILE,LEU,SER,THR,VAL                                  |
|    | 377 | 188 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL              |
|    | 378 | 189 | ALA,GLY,SER                                                                  |
|    | 379 | 190 | ALA,ASP,CYS,GLY,SER,THR                                                      |
|    | 380 | 191 | GLY                                                                          |
|    | 381 | 192 | GLY                                                                          |
|    | 382 | 193 | ALA,CYS,GLY,SER,THR                                                          |
|    | 383 | 194 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                  |
|    | 384 | 195 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,SER,THR                                      |
|    | 385 | 196 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,TRP,VAL          |
|    | 386 | 197 | ALA,CYS,GLY,MET,SER,THR                                                      |
|    | 387 | 198 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL, |
|    | 388 | 199 | ASN,ASP,GLY,LYS,SER                                                          |
|    | 389 | 200 | GLY                                                                          |
|    | 390 | 201 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL, |

5

10

15

20

25

|     |     |                                                                                 |
|-----|-----|---------------------------------------------------------------------------------|
| 391 | 202 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLY,ILE,MET,PRO,SER,THR,VAL                                 |
| 392 | 203 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR             |
| 393 | 204 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR             |
| 394 | 205 | ALA,CYS,GLN,GLU,GLY,SER,THR                                                     |
| 395 | 206 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LYS,MET,SER,THR,VAL                         |
| 396 | 207 | ALA,CYS,GLY,SER,THR,VAL                                                         |
| 397 | 208 | ALA,CYS,PHE,TRP,TYR                                                             |
| 398 | 209 | ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,MET,SER                                                     |
| 399 | 210 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,LYS,MET,SER                                 |
| 400 | 211 | GLY                                                                             |
| 401 | 212 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 402 | 213 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
| 403 | 214 | GLY                                                                             |
| 404 | 215 | GLY                                                                             |
| 405 | 216 | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 406 | 217 | ALA,CYS,GLY,SER,THR                                                             |
| 407 | 218 | GLY                                                                             |
| 408 | 219 | GLY                                                                             |
| 409 | 220 | GLY                                                                             |
| 410 | 221 | ALA,ASN,CYS,GLY,ILE,SER,THR,VAL                                                 |
| 411 | 222 | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 412 | 223 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                 |
| 413 | 224 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL             |
| 414 | 225 | ALA,ASN,CYS,GLN,GLU,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL                 |
| 415 | 226 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 416 | 227 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,PRO,SER,THR,VAL                 |
| 417 | 228 | ALA,CYS,GLN,GLU,GLY,MET,PRO,SER,THR                                             |
| 418 | 229 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 419 | 230 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,PHE,SER,TRP,TYR                             |
| 420 | 231 | GLN,GLU                                                                         |
| 421 | 232 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
| 422 | 233 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 423 | 234 | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 424 | 235 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL,    |
| 425 | 236 | ALA,CYS,GLY,PRO,SER,THR,VAL                                                     |
| 426 | 237 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 427 | 238 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL         |
| 428 | 239 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,SER,THR,VAL                                         |
| 429 | 240 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,SER                                                         |

|    |     |     |                                                                                 |
|----|-----|-----|---------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 430 | 241 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,SER,THR                                                     |
|    | 431 | 242 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
|    |     |     | ALA                                                                             |
|    |     |     | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
|    | 432 | 243 | ALA                                                                             |
| 10 | 433 | 244 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 434 | 245 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
|    |     |     | ALA                                                                             |
|    |     |     | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
|    | 435 | 246 | ALA                                                                             |
| 15 | 436 | 247 | GLY                                                                             |
|    | 437 | 248 | ALA,ARG,ASN,CYS,GLN,SER,THR                                                     |
|    | 438 | 249 | GLY                                                                             |
|    | 439 | 250 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,MET,SER,THR,VAL                                 |
|    | 440 | 251 | ALA,GLY,PRO,SER                                                                 |
| 20 | 441 | 252 | ASP                                                                             |
|    | 442 | 253 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,MET,SER,THR                                     |
|    | 443 | 254 | ALA,GLY,SER                                                                     |
|    | 444 | 255 | ALA,GLY                                                                         |
|    | 445 | 256 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,SER                                                         |
| 25 | 446 | 257 | ALA,GLY,SER                                                                     |
|    | 447 | 258 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,SER,THR                                                     |
|    | 448 | 259 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
|    |     |     | ALA                                                                             |
|    |     |     | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 449 | 260 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,HIS,SER,THR                                                 |
|    | 450 | 261 | GLY                                                                             |
|    | 451 | 262 | ALA,ASN,CYS,GLN,HIS,ILE,LEU,PHE,SER,THR,TRP,VAL                                 |
|    | 452 | 263 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 453 | 264 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,SER,THR,VAL                                                 |
|    | 454 | 265 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLU,GLY,HIS,ILE,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL                 |
|    | 455 | 266 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,SER,THR,VAL                             |
|    | 456 | 267 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,ILE,MET,SER,THR,TRP,VAL                                     |
|    | 457 | 268 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LYS,MET,SER                                     |
|    | 458 | 269 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 459 | 270 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
|    | 460 | 271 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLY,HIS,LYS,MET,SER,THR                                     |
|    | 461 | 272 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLY,HIS,ILE,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL             |
|    | 462 | 273 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
|    | 463 | 274 | GLY                                                                             |
|    | 464 | 275 | GLY                                                                             |
|    | 465 | 276 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,SER,THR                                                     |
|    | 466 | 277 | SER                                                                             |
|    | 467 | 278 | ALA,ASP,CYS,GLY,SER                                                             |
|    | 468 | 279 |                                                                                 |

5

10

15

20

25

|     |     |                                                                                 |
|-----|-----|---------------------------------------------------------------------------------|
| 469 | 280 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,SER,THR,VAL                                                 |
| 470 | 281 | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 471 | 282 | ALA,CYS,GLY,PRO,SER                                                             |
| 472 | 283 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,MET,SER,THR,VAL                             |
| 473 | 284 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL         |
| 474 | 285 | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 475 | 286 | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 476 | 287 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                     |
| 477 | 288 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LYS,MET,SER,THR,VAL                         |
| 478 | 289 | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 479 | 290 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,TRP,TYR             |
| 480 | 291 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                         |
| 481 | 292 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,MET,SER                                             |
| 482 | 293 | ALA,GLN,GLU,HIS,LYS,THR                                                         |
| 483 | 294 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,PHE,SER,TRP,TYR                     |
| 484 | 295 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                     |
| 485 | 296 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,TRP,TYR,VAL         |
| 486 | 297 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 487 | 298 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PRO,SER,THR,TRP,VAL             |
| 488 | 299 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,SER,THR,VAL                     |
| 489 | 300 | GLY                                                                             |
| 490 | 301 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 491 | 302 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,VAL         |
| 492 | 303 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PRO,SER,THR,VAL             |
| 493 | 304 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 494 | 305 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 495 | 306 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,MET,SER,THR                                 |
| 496 | 307 | ALA,HIS,PHE,SER,THR,TYR                                                         |
| 497 | 308 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR         |
| 498 | 309 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,MET,SER,THR                                 |
| 499 | 310 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR         |
| 500 | 311 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 501 | 312 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 502 | 313 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,ILE,MET,SER,THR,VAL                                         |
| 503 | 314 | ALA,ASN,ASP,CYS,HIS,LEU,MET,PHE,SER,THR,TYR,VAL                                 |
| 504 | 315 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL         |
| 505 | 316 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PRO,SER,THR,TRP,VAL         |
| 506 | 317 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLY,ILE,SER,THR,VAL                                         |
| 507 | 318 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL         |
| 508 | 319 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 509 | 320 | GLY                                                                             |

5

10

15

20

25

|     |     |                                                                                 |
|-----|-----|---------------------------------------------------------------------------------|
| 510 | 321 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,SER,THR,TRP,TYR                     |
| 511 | 322 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLY,SER                                                         |
| 512 | 323 | ALA,ASN,ASP,CYS                                                                 |
| 513 | 324 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LYS,MET,SER,THR,VAL                             |
| 514 | 325 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL         |
| 515 | 326 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LYS,MET,SER                                 |
| 516 | 327 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 517 | 328 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 518 | 329 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR             |
| 519 | 330 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 520 | 331 | HIS,PHE,THR,TRP,TYR                                                             |
| 521 | 332 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TYR,VAL         |
| 522 | 333 | ALA,GLY,SER                                                                     |
| 523 | 334 | CYS,GLY,HIS,LYS,MET,PHE,SER,TYR                                                 |
| 524 | 335 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL |
| 525 | 336 | GLY                                                                             |
| 526 | 337 | HIS,PHE,TRP                                                                     |
| 527 | 338 | ALA,ASN,ASP,CYS,SER                                                             |
| 528 | 339 | ALA,GLY,PRO,SER                                                                 |
| 529 | 340 | ALA,ASP,CYS,GLY,SER,THR                                                         |
| 530 | 341 | ALA,ASN,CYS,GLY,SER,THR,VAL                                                     |
| 531 | 342 | GLY                                                                             |
| 532 | 343 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,LYS,MET,SER                                 |
| 533 | 344 | GLY                                                                             |
| 534 | 345 | ALA,CYS,GLY,SER,THR                                                             |
| 535 | 346 | ALA,CYS,GLY,PRO,SER,THR                                                         |
| 536 | 347 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TYR,VAL             |
| 537 | 348 | GLY                                                                             |
| 538 | 349 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 539 | 350 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR             |
| 540 | 351 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,LYS,SER,THR,VAL                                 |
| 541 | 352 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,LYS,MET,SER,THR                             |
| 542 | 353 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP,TYR,VAL     |
| 543 | 354 | ALA,ARG,CYS,GLN,GLU,GLY,MET,SER,THR                                             |
| 544 | 355 | ALA,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,LEU,MET,SER,THR                                     |
| 545 | 356 | ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,TRP             |
| 546 | 357 | Cualquier residuo                                                               |
| 547 | 358 | Cualquier residuo                                                               |
| 548 | 359 | Cualquier residuo                                                               |
| 549 | 360 | Cualquier residuo                                                               |
| 550 | 361 | Cualquier residuo                                                               |

|     |     |                   |
|-----|-----|-------------------|
| 551 | 362 | Cualquier residuo |
| 552 | 363 | Cualquier residuo |
| 553 | 364 | Cualquier residuo |

En una modalidad más, los polipéptidos de la invención  
 5 comprenden o consiste de la secuencia de aminoácidos  
 seleccionados del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 2-42,  
 44-60 y 72-112 y 114-130 y 150-155, mostrada a continuación.  
 Estos polipéptidos han aumentado la actividad con respecto a  
 Kuma010, como se muestra en los ejemplos que siguen, o  
 10 proporcionan producción mejorada de los polipéptidos. En  
 una modalidad, los polipéptidos comprenden o consisten en la  
 secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste  
 en las SEQ ID NO: 2-42, 55-60 y 72-112, 125-130 y 150-155;  
 estos polipéptidos muestran todos mejor actividad con  
 15 Kuma010.

El dominio Terminal N se encuentra en negrita, y se  
 observan cambios con respecto a Kuma 011 junto al nombre del  
 polipéptido. En todos los casos, los polipéptidos que se  
 describen a continuación pueden comprender además una  
 20 etiqueta histidina en la terminal C. Puede utilizarse  
 cualquier etiqueta histidina adecuada; Puede utilizarse  
 cualquier etiqueta histidina adecuada; en una modalidad la  
 etiqueta se vincula a una corte sit de proteasa TEV (ENLYFQS)  
 (SEQ ID NO: 149) para permitir su remoción eficiente con  
 25 proteasa TEV después de la purificación, por ejemplo, la

etiqueta puede comprender o consistir de la secuencia de aminoácidos GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139). En otra modalidad, la etiqueta histidina escindible puede incorporarse en la termina C, que comprende la secuencia de aminoácido  $X_N$ PQ(L/Q)PX<sub>N</sub>HHHHHH (SEQ ID NO: 131), en donde  $X_N$  es un enlazador de entre 1-25 residuos de aminoácidos. En un ejemplo no limitante, la etiqueta histidina escindible puede comprender la secuencia de aminoácidos GSSGSSGSQPQLPYGSSGSSGSHHHHHH (SEQ ID NO: 132).

10

Kuma011 - K262E

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRRQRAG  
ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDHPDGSYRSYLG EVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
HFRMQORRAEGGFEARSQA**

15

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT  
TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
QE HANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVA  
RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 2 (sin procesar), SEQ ID NO: 72  
(procesado))

20

25

Kuma011 - V268A

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
 HFRMQORRAEGGFEARSQA**

5           AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPDGE**A**ELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAVAPLFAALVA  
 10 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 3 (sin procesar), SEQ ID NO. 73  
 (procesado))

Kuma011 - V268S

15           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
 HFRMQORRAEGGFEARSQA**

              AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 20 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPDGE**S**ELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 4 (sin procesar), SEQ ID NO: 74  
(procesado))

Kuma011 - V268T

5           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDHPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA

10   PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGETELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT  
TAIH DPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
RINQKL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

15   VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 5 (sin procesar) (SEQ ID NO:16)  
75 (procesado))

Kuma011 - E269L

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**

20   **ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDHPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA

          PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVLLDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT

25   TAIH DPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE

QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVDPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 6 (sin procesar) SEQ ID NO: 76  
 5 (procesado))

Kuma011 - E269T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
 10 **AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVTLDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 15 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVDPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 7 (sin procesar), SEQ ID NO: 77  
 (procesado))

20

Kuma011 - L270A

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
 25 **HFRMQORRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVEADIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 5 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 8 (sin procesar), SEQ ID NO: 78  
 (procesado))

10 Kuma011 - L270T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

15 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVETDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 20 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 9 (sin procesar), SEQ ID NO. 79  
 (procesado))

25 Kuma011 - L270V

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
 HFRMQORRAEGGFEARSQA**

5           AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVEVDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 10 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 10 (sin procesar), SEQ ID NO.  
 80 (procesado))

Kuma011 - G319A

15           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
 HFRMQORRAEGGFEARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 20 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWAGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 11 (sin procesar), SEQ ID NO: 81 (procesado))

Kuma011 - S354A

5           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA

10   PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT

          TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDAGSTGGE

          QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW

          QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVA

          RINQKL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

15   VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 12 (sin procesar), SEQ ID NO: 82 (procesado))

Kuma011 - S354E

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**

20   **ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA

          PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT

25   TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDEGSTGGE

QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPP (SEQ ID NO: 13 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 5 83 (procesado))

Kuma011 - S354Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
 10 **AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSGTGE  
 15 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPP (SEQ ID NO: 14 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 84 (procesado))

20

Kuma011 - S354R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
 25 **HFRMQORRAEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDRGSTGGE  
 QDGLYHVFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 5 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 15 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 85 (procesado))

10 Kuma011 - S354Y

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGFARSQA**

15 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDYGSTGGE  
 QDGLYHVFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 20 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 16 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 86 (procesado))

Kuma011 - G358N

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
 HFRMQORRAEGGFEARSQA**

5           AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTNGE  
 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVDPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 10 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 17 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 87 (procesado))

Kuma011 - G358S

15           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
 HFRMQORRAEGGFEARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 20 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTSGE  
 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVDPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 18 (sin procesar), SEQ ID NO: 88 (procesado))

Kuma011 - G358Q

5           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA

10   PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT

          TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTQGE

          QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW

          QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVA

          RINQKL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

15   VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 19 (sin procesar), SEQ ID NO: 89 (procesado))

Kuma011 - G358T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**

20   **ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA

          PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT

25   TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTTGE

QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 20 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 5 90 (procesado))

Kuma011 - H368F

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
 10 **AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 15 QDGLYHVFFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 21 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 91 (procesado))

20

Kuma011 - H368Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
 25 **HFRMQORRAEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVQFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 5 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 22 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 92 (procesado))

10 Kuma011 - D399Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGFARSQA**

15 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDPGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 20 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 23 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 93 (procesado))

Kuma011 - D402S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
HFRMQORRAEGGFEARSQA**

5           AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPSGGATGGGVSRIFPLPAW  
QEHANVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVA  
10 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
VRLQLALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 24 (sin procesar), SEQ ID NO:  
94 (procesado))

Kuma011 - D402Q

15           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
HFRMQORRAEGGFEARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
20 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPQGGATGGGVSRIFPLPAW  
QEHANVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVA  
RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 25 (sin procesar), SEQ ID NO: 95 (procesado))

Kuma011 - T406S

5           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA

10   PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT

          TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE

          QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPQGGASGGGVSRIFPLPAW

          QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVA

          RINQKL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

15   VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 26 (sin procesar), SEQ ID NO: 96 (procesado))

Kuma011 - N424K

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**

20   **ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA

          PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT

25   TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE

QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPQGGASGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 27 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 5 97 (procesado))

Kuma011 - A449E

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTTVLRRQRAG**  
**ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
 10 **AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIATIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 15 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPQGGASGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 28 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 98 (procesado))

20

Kuma011 - A449Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTTVLRRQRAG**  
**ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
 25 **HFRMQORRAEGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 5 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPQTGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 29 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 99 (procesado))

10 Kuma011 - I456V

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

15 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVVDGEATVTGGTSAPVAPLFAALVA  
 20 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 30 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 100 (procesado))

Kuma011 - T461R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
 HFRMQORRAEGGFARSQA**

5           AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVDPDLGNADPATGYEVVIDGEARVTGGTSAVAPLFAALVA  
 10 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPP (SEQ ID NO: 31 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 101 (procesado))

Kuma011 - I463A

15           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
 HFRMQORRAEGGFARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 20 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVDPDLGNADPATGYEVVIDGEATVAGGTSVAVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 32 (sin procesar), SEQ ID NO: 102 (procesado))

Kuma011 - I463L

5           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA

10   PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT

          TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE

          QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW

          QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVLGGTSAVAPLFAALVA

          RINQKL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

15   VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 33 (sin procesar), SEQ ID NO: 103 (procesado))

Kuma011 - I463M

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**

20   **ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA

          PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT

25   TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE

QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVMGGTSAVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 34 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 5 104 (procesado))

Kuma011 - I463Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
 10 **AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 15 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVQGGTSAVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 35 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 105 (procesado))

20

Kuma011 - I463R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
 25 **HFRMQORRAEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 5 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVRGGTSAVAPLFAALVA  
 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 36 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 106 (procesado))

10 Kuma011 - I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGF EARSQA**

15 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVA  
 20 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 37 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 107 (procesado))

Kuma011 - I463V

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
 HFRMQORRAEGGFEARSQA**

5           AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVVGGTSAVAPLFAALVA  
 10 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 38 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 108 (procesado))

Kuma023: G368S; I463T

15           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
 HFRMQORRAEGGFEARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 20 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTSGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 39 (sin procesar), SEQ ID NO: 109 (procesado))

Kuma 020 como se indica en los ejemplos es el polipéptido Kuma023 que incluye la siguiente etiqueta de histidina terminal C: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

Kuma021: G368S; D399Q; A449Q; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
ELA AHVERQA AIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
10 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLG EVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
HFRMQORRAEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT  
TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSGTSGE  
15 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGP DGGATGGGVSRIFPLPAW  
QEHANVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVA  
RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 154 (sin procesar), SEQ ID NO: 155 (procesado))

20

Kuma031: K262E; E269T; S354Q; G358S; D399Q; A449Q; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
ELA AHVERQA AIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**

**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVTLDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 5 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSTSGE  
 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDPGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVA  
 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 40 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 10 110 (procesado))

Kuma 030 como se indica en los ejemplos es el  
 polipéptido Kuma031 que incluye la siguiente etiqueta de  
 histidina terminal C: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

15 Kuma041: S319A; H368F; D399Q; A449Q; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQORRAEGGFEARSQA**

20 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPDPGEVTLDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWAGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVFFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDPGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVA  
 25 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

VRLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 41 (sin procesar), SEQ ID NO: 111 (procesado))

Kuma 040 como se indica en los ejemplos es el polipéptido Kuma041 que incluye la siguiente etiqueta de histidina terminal C: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

Kuma051: K262E; E269T; L270V; S354Q; G358S; D399Q; A449Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRRQRAG**  
**10 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFRMQRRRAEGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIATIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVTVDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
**15 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSGE**  
**QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDPGGATGGGVSRIFPLPAW**  
**QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLGNADPQTGYEVVIDGEATVIGGTSAPVPLFAALVA**  
**RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG**  
 VRLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 42 (sin procesar), SEQ ID NO:  
**20 112 (procesado))**

Kuma 050 como se indica en los ejemplos es el polipéptido Kuma051 que incluye la siguiente etiqueta de histidina terminal C: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

**25** Kuma022: P171R; H172R; G368S; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARR  
 RFRMQORRAEGGFEARSQA**

5           AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTSGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVDPDLGNADPATGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVA  
 10 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 55 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 125 (procesado))

Kuma032: P171R; H172R; K262E; E269T; S354Q; G358S;  
 15 D399Q; A449Q; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARR  
 RFRMQORRAEGGFEARSQA**

20           AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVTLTIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSGTSGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDPGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVDPDLGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVA  
 25 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 56 (sin procesar), SEQ ID NO: 126 (procesado))

Kuma042: P171R; H172R; S319A; H368F; D399Q; A449Q;

5 I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARR  
RFRMQORRAEGGFEARSQA**

10 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVTL D IEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT  
TAIHDPTLKPSVVSISWAGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
QDGLYHVFFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGP DGGATGGGVSRIFPLPAW  
QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTS AVAPLFAALVA  
15 RINQKL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 57 (sin procesar), SEQ ID NO: 127 (procesado))

Kuma052: P171R; H172R; K262E; E269T; L270V; S354Q;

20 G358S; D399Q; A449Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARR  
RFRMQORRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVTVDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSTSGE  
 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDPGGATGGGVSRIFPLPAW  
 5 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPQTGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 58 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 128 (procesado))

10 Kuma061: K262E; E269T; S354Q; G358S; D399Q; A449Q;  
I463T

**MSDMEKWPKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDHPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
 15 **HFRMQORRAEGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVTVLDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSMPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSTSGE  
 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDPGGATGGGVSRIFPLPAW  
 20 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 150 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 151 (procesado))

Kuma 060 como se indica en los ejemplos es el polipéptido Kuma061 que incluye la siguiente etiqueta de histidina terminal C: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

5            Kuma062: P171R; H172R; K262E; E269T; S354Q; G358S; D399Q; A449Q; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIA PMIEAVLGLDTRPVARR  
10 RFRMQORRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVTL D IEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAIT  
TAIHDPTLKPSVVSISWSMPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSTSGE  
QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDPGGATGGGVSRIFPLPAW  
15 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVA  
RINQKL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
VRL LQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 59 (sin procesar), SEQ ID NO:  
129 (procesado))

20            Kuma071: S319A; H368F; D399Q; A449Q; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIA PMIEAVLGLDTRPVARR  
HFRMQORRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVTLTLDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWAMPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVFFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDPGGATGGGVSRIFPLPAW  
 5 QEHANVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 152 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 153 (procesado))

Kuma 070 como se indica en los ejemplos es el  
 10 polipéptido Kuma071 que incluye la siguiente etiqueta de  
 histidina terminal C: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

Kuma072: P171R; H172R; S319A; H368F; D399Q; A449Q;  
I463T

15 **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARR**  
**RFRMQRRRAEGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 20 PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGPGEVTLTLDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWAMPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVFFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDPGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 60 (sin procesar), SEQ ID NO:  
130 (procesado))

Como se describe en la Tabla 4, los cambios  
5 realizados en Kuma010/011 tienen efecto significativo sobre  
la actividad catalítica de las proteínas de diseño. La Tabla  
4 muestra la eficacia de las mutaciones individuales en la  
catalización de la degradación de diversas secuencias de  
péptidos de gliadina. Los ejemplos proporcionan más datos  
10 sobre mutantes individuales y combinación específicos.

15

20

25

Tabla 5

|    | Posición<br>(Longitud<br>completa) | Posición<br>(truncada) | Kuma010<br>A.A. | A.A. con<br>respecto a<br>Kuma010/011 | % de mejora<br>en<br>PFPQPQLPY<br>(SEQ ID NO:<br>67) | % de mejora<br>en<br>PFPQPQQPF<br>(SEQ ID NO:<br>68) |
|----|------------------------------------|------------------------|-----------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 5  | 221                                | 32                     | E               | D,N,Q,H                               | 105%                                                 | ND                                                   |
|    | 262                                | 73                     | K               | E                                     | 109%                                                 | 110%                                                 |
|    | 268                                | 79                     | V               | A                                     | 107%                                                 | 89%                                                  |
|    | 268                                | 79                     | V               | S                                     | 104%                                                 | 83%                                                  |
|    | 268                                | 79                     | V               | T                                     | 127%                                                 | 105%                                                 |
| 10 | 269                                | 80                     | E               | cv                                    | 113%                                                 | 84 %                                                 |
|    | 269                                | 80                     | E               | T                                     | 263%                                                 | 191%                                                 |
|    | 270                                | 81                     | cv              | A                                     | 203%                                                 | 92 %                                                 |
|    | 270                                | 81                     | cv              | T                                     | 307%                                                 | 29%                                                  |
|    | 270                                | 81                     | cv              | V                                     | 474%                                                 | 61 %                                                 |
|    | 319                                | 130                    | S               | A                                     | 154%                                                 | 184%                                                 |
|    | 354                                | 165                    | S               | A                                     | 152%                                                 | 140%                                                 |
|    | 354                                | 165                    | S               | E                                     | 124%                                                 | 120%                                                 |
|    | 354                                | 165                    | S               | Q                                     | 145%                                                 | 141%                                                 |
|    | 354                                | 165                    | S               | R                                     | 109%                                                 | 82%                                                  |
| 15 | 354                                | 165                    | S               | Y                                     | 46%                                                  | 105%                                                 |
|    | 358                                | 169                    | G               | N                                     | 120%                                                 | 99 %                                                 |
|    | 358                                | 169                    | G               | S                                     | 331%                                                 | 224%                                                 |
|    | 358                                | 169                    | G               | Q                                     | 147%                                                 | 149%                                                 |
|    | 358                                | 169                    | G               | T                                     | 283%                                                 | 128%                                                 |
|    | 368                                | 179                    | H               | F                                     | 334%                                                 | 104%                                                 |
|    | 368                                | 179                    | H               | Q                                     | 199%                                                 | 195%                                                 |
|    | 399                                | 210                    | D               | Q                                     | 149%                                                 | 208%                                                 |
|    | 402                                | 213                    | D               | S                                     | 94%                                                  | 108%                                                 |
|    | 402                                | 213                    | D               | Q                                     | 164%                                                 | 111%                                                 |
| 20 | 406                                | 217                    | T               | S                                     | 84%                                                  | 101%                                                 |
|    | 424                                | 235                    | N               | K                                     | 285%                                                 | ND                                                   |
|    | 449                                | 260                    | A               | E                                     | 149%                                                 | 208%                                                 |
|    | 449                                | 260                    | A               | N                                     | 119%                                                 | 118%                                                 |
|    | 461                                | 272                    | T               | R                                     | 120%                                                 | 86 %                                                 |
|    | 463                                | 274                    | I               | A                                     | 51%                                                  | 234%                                                 |
|    | 463                                | 274                    | I               | cv                                    | 124%                                                 | 22%                                                  |
|    | 463                                | 274                    | I               | M                                     | 123%                                                 | 53 %                                                 |
|    | 463                                | 274                    | I               | Q                                     | 129%                                                 | 69 %                                                 |
|    | 463                                | 274                    | I               | R                                     | 29%                                                  | 110%                                                 |
| 25 | 463                                | 274                    | I               | T                                     | 130%                                                 | 239%                                                 |
|    | 463                                | 274                    | I               | V                                     | 256%                                                 | 141%                                                 |

### MUTACIONES DE PRODUCCIÓN MEJORADA

Las mutaciones que mejoran la producción pueden proporcionar mejoras en una de tres categorías: 1. Alterar el método de purificación; 2. aumentar el rendimiento; y 3. disminuir la probabilidad de que el autoprocesamiento enzimático ocurrirá durante la purificación, simplificando el análisis de esta manera. Además de la etiqueta His que es extraíble por la actividad proteolítica de los polipéptidos divulgados en el presente documento cae en la categoría 1; el mutante R105H parece mejorar el rendimiento en ~ 2 veces, colocando esta mutación en la categoría 2; y las mutaciones en las posiciones 171-174 colocan estos mutantes en categoría 3.

15

#### Kuma010 con Kuma010-Etiqueta His escindible

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLG EVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
HFRMQRR AEGGF EARSQA**

20

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
PQVVSVSVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
QE HANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVA

25

RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPQPGSSGSSGSQPQLPYGSSGSSGSHHHHHH (SEQ ID NO: 43  
 (sin procesar), SEQ ID NO: 113 (procesado))

5 Kuma011 - R105H

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP  
 HFRMQORRAEGGFARSQA**

10 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 15 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 44 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 114 (procesado))

Kuma011 - P171A

20 **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
 ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARA  
 HFRMQORRAEGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 25 PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT

TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 5 VRLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 45 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 115 (procesado))

Kuma011 - P171R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
 10 **ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARR**  
**HFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIATIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 15 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 46 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 20 116 (procesado))

Kuma011 - P171S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**

**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDHPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARSHFRMQORRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
5 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAVAPLFAALVA  
RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
VRLQLALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 47 (sin procesar), SEQ ID NO:  
10 117 (procesado))

Kuma011 - H172A

**MSDMEKWPKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG  
ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT  
15 AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDHPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARSAFRMQORRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
20 QDGLYHVFHFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAVAPLFAALVA  
RINQKLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
VRLQLALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 48 (sin procesar), SEQ ID NO:  
118 (procesado))

Kuma011 - H172R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
 5 **RFRMQRRRAEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 10 QE HANVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRL LQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 49 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 119 (procesado))

15 Kuma011 - H172S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**SFRMQRRRAEGGF EARSQA**

20 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QE HANVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVA  
 25 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 50 (sin procesar), SEQ ID NO: 120 (procesado))

Kuma011 - F173R

5           **MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HRRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA

10   PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
TAIHDP TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
RINQKL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG

15   VRLLQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 51 (sin procesar), SEQ ID NO: 121 (procesado))

Kuma011 - F173S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**

20   **ELA AHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HSRMQORRAEGGF EARSQA**

          AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT

25   TAIHDP TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE

QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 52 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 5 122 (procesado))

Kuma011 - R174S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
 10 **AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARP**  
**HFSMQORRAEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCI AIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVSVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 15 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 QEHANVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLLQALLPSASQPP (SEQ ID NO: 53 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 123 (procesado))

20

Kuma012: P171R; H172R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRAG**  
**ELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRANVAAGT**  
**AVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLDTRPVARR**  
 25 **RFRMQORRAEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIATIELGGGYDEASLAQYFASLGVPA  
 PQVVSVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAIT  
 TAIHDPTLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGE  
 QDGLYHVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAW  
 5 QEHANVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVA  
 RINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIG  
 VRLQLALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 54 (sin procesar), SEQ ID NO:  
 124 (procesado))

10 Como se utiliza a lo largo de la presente solicitud,  
 se utiliza el término "polipéptido" en su sentido más amplio  
 para referirse a una secuencia de aminoácidos de subunidad,  
 ya sea que ocurra naturalmente o de origen sintético. Los  
 polipéptidos de la invención pueden comprender L-  
 15 aminoácidos, D-aminoácidos (que son resistentes a las  
 proteasas de aminoácidos específicos L en vivo) o una  
 combinación de D - y L-aminoácidos. Los polipéptidos aquí  
 descritos pueden ser sintetizados químicamente o expresados  
 por vía recombinante. Los polipéptidos pueden estar  
 20 vinculado con otros compuestos para promover una vida media  
*in vivo*, tales como por PEGilación, HESilación, PASilación o  
 glicosilación. Dicho vínculo puede ser covalente o no  
 covalente como lo entiende el experto en la materia. Los  
 polipéptidos pueden vincularse con cualquier otro vinculador  
 25 adecuados, incluyendo, pero no limitado a cualquier

vinculador que pueda ser utilizado para la purificación o detección (tales como etiquetas FLAG o His).

En otro aspecto, la presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican los polipéptidos de cualquier aspecto o modalidad de la invención. La secuencia de ácido nucleico aislado puede comprender el ARN o ADN. Como se utiliza en este documento, "los ácidos nucleicos aislados" son aquellos que se han extraído de sus secuencias de ácidos nucleicos circundantes normales en el genoma o en las secuencias de ADNc. Estas secuencias de ácido nucleico aisladas pueden comprender secuencias adicionales útiles para promover la expresión y/o purificación de la proteína codificada, incluyendo, pero no limitado a las secuencias de poliA, secuencias Kozak modificadas y secuencias que codifican las etiquetas de epítipo, señales de exportación y señales secretoras, señales de localización nuclear y señales de localización de membrana plasmática. Será evidente para los expertos en la materia, basado en las enseñanzas en el presente documento, qué secuencias de ácido nucleico codifican los polipéptidos de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores de expresión de ácido nucleico que comprenden el ácido nucleico aislado de cualquier modalidad de la invención operativamente vinculado a una secuencia de control adecuado. El "Vector de expresión recombinante" incluye vectores que

vinculan operativamente una región codificante de ácido nucleico o gen para cualquier secuencia de control capaz de efectuar expresión del producto del gen. "Las secuencias de control" vinculadas operablemente a las secuencias de ácido nucleico de la invención son secuencias de ácido nucleico capaces de afectar la expresión de las moléculas de ácido nucleico. Las secuencias de control no necesitan ser contiguas a las secuencias de ácido nucleico, mientras que hagan la función de dirigir la expresión de los mismos. Por consiguiente, por ejemplo, las secuencias transcritas todavía sin traducir que intervienen pueden presentarse entre una secuencia del promotor y las secuencias de ácidos nucleicos y la secuencia del promotor puede todavía considerarse "vinculada operablemente" a la secuencia de codificación. Otras secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, las señales de poliadenilación, señales de terminación y sitios de unión del ribosoma. Estos vectores de expresión pueden ser de cualquier tipo conocido en la materia, incluyendo, pero no limitados a plásmido y vectores de expresión basados en virus. La secuencia de control utilizada para expresión de impulso de las secuencias de ácido nucleico divulgada en un sistema mamífero puede ser constitutiva (impulsado por cualquiera de una variedad de promotores, incluyendo, pero no limitado a, CMV, SV40, RSV, actina, EF) o inducibles (impulsado por cualquiera de una

serie de promotores inducibles incluyendo, pero no limitado a, tetraciclina, ecdisona, respuesta al esteroide). La construcción de vectores de expresión para su uso en la transfección de células procariotas también es conocida en la materia y de esta manera se puede lograr mediante técnicas estándar. (Ver, por ejemplo, Fritsch, Sambrook y Maniatis, en: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; *Gene Transfer and Expression Protocols*, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Human Press Inc., Clifton, N.J.), y el Ambion 1998 Catalog (Ambion, Austin, TX). El vector de expresión debe ser replicable en los organismos huésped como un episoma o por integración en el ADN cromosómico huésped. En una modalidad preferida, el vector de expresión comprende un plásmido. Sin embargo, la invención pretende incluir otros vectores de expresión que sirven funciones equivalentes, tales como vectores virales.

En otro aspecto, la presente invención proporciona células huésped recombinantes que comprenden los vectores de expresión de ácido nucleico de la invención. Las células huésped pueden ser procariotas o eucariotas. Las células pueden transfectarse o transducirse transitoria o establemente. Estas transfección y transducción de los vectores de expresión en las células procariotas y eucariotas pueden realizarse mediante cualquier técnica conocida en la materia, incluyendo, pero no limitado a las transformaciones

bacterianas estándar, coprecipitación de fosfato de calcio, electroporación, o mediado por liposomas, mediado por dextrano DEAE, mediado policationico o transfección mediada por virus. (Ver, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press; *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 2da Ed. (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY). Un método de producción de un polipéptido de acuerdo con la invención es una parte adicional de la invención. El método comprende los pasos de (a) cultivar un huésped de acuerdo con este aspecto de la invención bajo condiciones propicias para la expresión del polipéptido, y (b) opcionalmente, recuperar el polipéptido expresado. El polipéptido expresado puede recuperarse del extracto libre de células, pellets celulares, o recuperarse del medio de cultivo. Los métodos para purificar polipéptidos expresados de manera recombinante son bien conocidos por el experto en la materia.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas, que comprenden el polipéptido, ácido nucleico, vector de expresión de ácido nucleico y/o la célula huésped recombinante de cualquier aspecto o modalidad de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden utilizarse, por ejemplo, en los métodos de la invención

descritos a continuación. La composición farmacéutica puede comprender además de los polipéptidos, ácidos nucleicos, etc. de la invención (a) un lioprotector; (b) un surfactante; (c) un agente de carga; (d) un agente de ajuste de tonicidad; 5 (e) un estabilizador; (f) un preservativo y/o (g) un tampón.

En algunas modalidades, el tampón en la composición farmacéutica es un tampón Tris, un tampón histidina, un tampón fosfato, un tampón citrato o un tampón acetato. La composición farmacéutica también puede incluir un 10 lioprotector, por ejemplo, sacarosa, sorbitol o trehalosa. En algunas modalidades, la composición farmacéutica incluye un preservativo, por ejemplo, cloruro de benzalconio, bencetonio, clorohexidina, fenol, m-cresol, alcohol bencílico, metilparabeno, propilparabeno, clorobutanol, o- 15 cresol, p-cresol, clorocresol, nitrato fenilmercúrico, timerosal, ácido benzoico y diversas mezclas de los mismos. En otras modalidades, la composición farmacéutica incluye a un agente de carga, como la glicina. En otras modalidades, la composición farmacéutica incluye un surfactante, por 20 ejemplo, polisorbato-20, polisorbato-40, polisorbato-60, polisorbato-65, polisorbato-80 polisorbato-85, poloxámero-188, monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, monooleato de sorbitán, trilaurato de sorbitán, triestearato de sorbitán, trioleato 25 de sorbitán o una combinación de los mismos. La composición

farmacéutica también puede incluir a un agente de ajuste de tonicidad, por ejemplo, un compuesto que produce la formulación sustancialmente isotónica o isoosmótica con sangre humana. Los agentes de ajuste de tonicidad ejemplar  
5 incluyen sacarosa, sorbitol, glicina, metionina, manitol, dextrosa, inositol, cloruro de sodio, arginina y clorhidrato de arginina. En otras modalidades, la composición farmacéutica incluye además un estabilizador, por ejemplo, una molécula que, cuando se combina con una proteína de  
10 interés sustancialmente previene o reduce la inestabilidad química y/o física de la proteína de interés en forma líquida o liofilizada. Los estabilizadores ejemplares incluyen sacarosa, sorbitol, glicina, metionina, inositol, cloruro de sodio, arginina y clorhidrato de arginina.

15 Los polipéptidos, ácidos nucleicos, etc. de la invención puede ser el único agente activo en la composición farmacéutica, o la composición además puede comprender uno o más otros agentes activos adecuados para el uso previsto.

Las composiciones farmacéuticas descritas en este  
20 documento generalmente comprenden una combinación de un compuesto que se describe en el presente documento y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones están sustancialmente libres de componentes farmacéuticamente no - aceptables, es decir,  
25 contienen cantidades de componentes farmacéuticamente - no

aceptables inferiores a los permitidos por los requerimientos regulatorios de los EE. UU. en el momento de presentación de esta solicitud. En algunas modalidades de este aspecto, si el compuesto se disuelve o suspende en agua, la composición  
5 además comprende opcionalmente un adicional portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son composiciones farmacéuticas sólidas (por ejemplo, tableta, cápsulas, etc.).

10 Las composiciones descritas en el presente documento se podían proporcionar también como suplemento dietético como se describe por las agencias reguladoras de Estados Unidos.

Estas composiciones pueden prepararse de una manera bien conocida en la materia farmacéutica y pueden ser  
15 administradas por cualquier vía adecuada. En una modalidad preferida, las composiciones farmacéuticas y formulaciones están diseñadas para la administración oral. Pueden ser necesarios o deseables los portadores farmacéuticos convencionales acuosos, polvo o bases aceitosas y espesantes  
20 y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser en cualquier forma adecuada, incluyendo, pero no limitado a, tabletas, píldoras, polvos, pastillas, bolsitas, sobres, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes,  
25 aerosoles (como un medio sólido o líquido), ungüentos que

contienen, por ejemplo, hasta un 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina suaves y duras, soluciones inyectables estériles y polvos empaquetados estériles.

En otro aspecto, la presente invención proporciona  
5 métodos para el tratamiento de la celiaquía o sensibilidad de gluten no celiaca (NCGS), que comprende administrar a un individuo con celiaquía o NCGS una cantidad efectiva para el tratamiento de la celiaquía o NCGS de uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en los polipéptidos de  
10 la de la invención, o usando uno o más de estos polipéptidos para procesar alimentos para el consumo por personas con celiaquía o NCGS

Los inventores de la presente invención han descubierto que los polipéptidos de la invención son capaces de degradar  
15 compuestos ricos en prolina (P)- y glutamina (Q)- del gluten conocidos como 'gliadinas' que se cree son responsables de la mayor parte de la respuesta inmune en pacientes celiaquía. Los polipéptidos de la presente invención muestran actividad superior en la degradación de péptidos que tienen un PQLP  
20 (SEQ ID NO: 65) o PQQP (SEQ ID NO: 66) motivo (tal como PFPQPQLPY (SEQ ID NO: 67) y/o PFPQPQQPF (SEQ ID NO: 68)), que son sustratos representativos de la gliadina) a pH 4 comparado con Kuma010/011 y otros polipéptidos divulgados como útiles para el tratamiento de la celiaquía  
25 (WO2015/023728). Por consiguiente, los polipéptidos de la

invención constituyen una mejora terapéutica significativa para el tratamiento de la celiarquía y NCGS.

La enfermedad celiaca (también conocida como celiarquía o intolerancia al gluten) es una enfermedad altamente  
5 prevalente en la cual las proteínas dietéticas encontradas en productos de trigo, cebada y centeno conocidos como 'glutenos' evocan una respuesta inmune en el intestino delgado de individuos genéticamente predispuestos. La inflamación resultante puede conducir a la degradación de  
10 las vellosidades del intestino delgado, impidiendo la absorción de nutrientes. Los síntomas pueden aparecer en la primera infancia o más adelante en vida y la varían ampliamente en severidad, desde diarrea, fatiga, pérdida de peso, dolor abdominal, distensión abdominal, exceso de gases, indigestión,  
15 estreñimiento, distensión abdominal, náusea/vómito, anemia, hematomas, depresión, ansiedad, retraso en el crecimiento en niños, pérdida de cabello, dermatitis, perdidas menstruales, úlceras en la boca, calambres musculares, dolor en las articulaciones, sangrado  
20 nasal, convulsiones, hormigueo o entumecimiento en manos o pies, retraso de la pubertad, defectos en el esmalte de los dientes y síntomas neurológicos tales como ataxia o parestesia. Actualmente no existen terapias eficaces para esta enfermedad en toda la vida excepto la eliminación total  
25 de glutenos de la dieta. Aunque la celiarquía sigue siendo en

gran parte poco diagnosticada, su ' prevalencia en los Estados Unidos y Europa se estima en 0.5-1.0% de la población. Además de la celiarquía, una fracción significativa de la población se cree que sufre de la condición de

5 sensibilidat de gluten no celiaco (NCGS), que es causada por la ingestión de gluten, pero es distinta en mecánico a la enfermedad celíaca, aunque la los síntomas son con frecuencia indistinguibles de la celiarquía.

Como se utiliza en este documento, "tratamiento de

10 celiarquía o NCGS" significa cumplir uno o más de los siguientes: (a) reducir la severidad de la celiarquía o NCGS; (b) limitar o prevenir el desarrollo de síntomas característicos de la celiarquía o NCGS; (c) inhibir el empeoramiento de los síntomas característicos de la celiarquía

15 o NCGS; (d) limitar o prevenir la recurrencia de la celiarquía o NCGS en pacientes que previamente han tenido el trastorno; (e) limitar o prevenir la recurrencia de los síntomas en pacientes que estaban previamente sintomáticos para la celiarquía o NCGS; y (f) limitar el desarrollo de celiarquía o

20 NCGS en un sujeto en riesgo de desarrollar celiarquía o NCGS o aún no mostrando los efectos clínicos de la celiarquía o NCGS.

El individuo por tratar según los métodos de la invención puede ser cualquier persona que padece celiarquía o

25 NCGS, incluyendo a seres humanos. El individuo puede ser

alguien que ya sufre los síntomas o alguien que es asintomático.

Como se utiliza en este documento, una "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de polipéptido que es eficaz para el tratamiento de la celiaquía. Los polipéptidos se formulan típicamente como una composición farmacéutica, tal como se divulga anteriormente y pueden administrarse por cualquier vía conveniente, incluyendo por vía oral, parental, por el aerosol de inhalación o por vía tópica en formulaciones de unidad de dosificación que contienen portadores farmacéuticamente aceptables convencionales, adyuvantes y vehículos. En una modalidad preferida, las composiciones farmacéuticas y formulaciones se administran oralmente, tales como por tabletas, píldoras, pastillas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones o jarabes.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la óptima respuesta deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Un rango de dosificación conveniente puede, por ejemplo, ser 0.1 ug/kg-100 mg/kg de peso corporal; alternativamente, puede ser 0.5 ug/kg a 50 mg/kg; 1 ug/kg a 25 mg/kg, o 5 ug/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Los polipéptidos pueden ser entregados en un único bolo, o pueden administrarse más de una vez (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más veces) de acuerdo con lo determinado por un médico.

### Ejemplo 1

La gliadina es altamente enriquecida en prolina (P) y glutamina (Q), lo que la hace recalcitrante a la degradación por las enzimas digestivas humanas. Los fragmentos de péptido rico en PQ derivados de la digestión parcial de la gliadina se deamina en el lumen intestinal, permitiendo de esta manera el enlace de HLA-DQ2 o DQ8 y la estimulación de una respuesta inflamatoria Th1 en pacientes con CD<sup>3</sup>. La endopeptidasa de gliadina KUMAMAX<sup>TM</sup> (en adelante denominada Kuma011 o Kuma 010 si refiere a Kuma011 incluyendo la etiqueta de histidina terminal C: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139)), que demuestra la estabilidad y funcionalidad en condiciones gástricas, fue previamente diseñado para degradar los péptidos que contienen el motivo de dipéptido PQ<sup>4</sup>. Basado en la estructura cristalina de Kuma010 (PDB ID 4NE7), se rediseña el sitio activo de Kuma010 que selecciona las mutaciones para aumentar la actividad contra los péptidos de gliadina inmunogénica. Luego se analizaron las mutantes diseñados para el aumento de la actividad contra 33mer altamente inmunogénico (LQLQPFPPQPQLPYPPQPQLPYPPQPQLPYPPQPQPF (SEQ ID NO: 69)) y 26mer (FLQPQQPFPPQQPQQPYPPQQPQQPQQPFPQ (SEQ ID NO: 70)) péptidos de gliadina<sup>6,7</sup>. Estos péptidos albergan motivo del tripéptido PQL o PQQ, representante de los epítomos de célula T gliadina mostraron ser tóxicos para la

mayoría de los pacientes celiacos<sup>8</sup>. De esta manera, se construyó la variante Kuma030. Kuma030 es 44 veces más activo contra los péptidos que contienen PQQ y 11 veces más activos que los péptidos que contienen PQL, que Kuma010.

5           Basado en el modelado molecular, la supuesta interfaz de enlace de péptido S1' de Kuma010 consiste en residuos hidrofóbicos completamente y debe, por lo tanto, preferir residuos hidrofóbicos tales como leucina y residuos no polares tales como glutamina, en P1'. El bolsillo de enlace

10 S1' de Kuma030 introduce una isoleucina para la mutación de treonina (I463T), que se predice que proporciona un enlace de hidrógeno con una glutamina P1', lo que permite que esta enzima alberga leucina y glutamina en el subsitio S1' y por lo tanto se dirige tanto a tripéptidos PQL, como PQQ. Kuma030

15 también incorpora seis mutaciones adicionales (K262E, E269T, S354Q, G358S, D399Q, A449Q) que proporcionan mayor eficiencia catalítica sobre los péptidos 26mer y 33mer. G358S se predice para estabilizar el bucle que contiene una histidina diseñada introducida en Kuma010 que se predice que es un enlace de

20 hidrógeno a los residuos de glutamina P1. Las mutaciones restantes se predicen para estabilizar la estructura de la proteína como se modeló.

Mientras decenas de epítomos ricos en PQ se han enlazado a CD, varios péptidos derivados de la gliadina

25 (trigo), hordeina (cebada), y secalina (centeno) se ha

demostrado que representan la gran mayor parte de la respuesta inmune en CD y por lo tanto se han clasificado como inmunodominantes<sup>8</sup>. En el trigo, estos incluyen los péptidos W02-E07 (LQPFPQPQLPYQPQ (SEQ ID NO: 133)), W03-E07  
5 (QPFPQPQQPFPWQP (SEQ ID NO: 134)) y el péptido 33mer, que contiene la secuencia W02-E07<sup>6,9</sup>. Estos péptidos albergan varios epítomos que mostraron ser altamente inmunogénicos<sup>9-11</sup>. Para evaluar la capacidad de Kuma030 de destruir a estos epítomos en todo el gluten, el gluten de trigo purificado se  
10 incubó con Kuma030 bajo condiciones gástricas simuladas (pH 4.0 a 37°C con 0.6 mg mL<sup>-1</sup> de pepsina)<sup>12</sup>. El resto de la fracción de gluten después de la degradación fue cuantificada utilizando ensayos de ELISA basados en anticuerpos R5 o G12 que reconocen los motivos de aminoácidos QQPFP (SEQ ID NO:  
15 135) y QPQLPY (SEQ ID NO: 136), respectivamente, que abarcan todos los epítomos inmunodominantes en los péptidos anteriores<sup>13,14</sup>. Para comparar la actividad de Kuma030 con las de las glutenasas publicados, también se examinaron la glutenasas EPB2 y SCPEP, que son actualmente las pioneras a  
20 una proporción de 1:1 como una enzima de combinación terapéutica enzimática para CD<sup>15</sup>. Las enzimas EPB2 y SCPEP generadas en este trabajo se verificaron que tienen actividades consistentes con la de los valores publicados<sup>16,17</sup>. Tras la incubación con gluten, se observó una  
25 reducción de dosis dependiente en el QQPFP (SEQ ID NO: 135),

o QPQLPY- (SEQ ID NO: 136) carga que utiliza Kuma030, Kuma010 o una combinación de 1:1 de EPB2 y SCPEP (Fig. 1A). En una relación p:p 1:25 de enzima: gluten, EPB2 y SCPEP descomposición de 84.8% de gluten presente, consistente con

5 los informes previamente publicados de esta combinación de enzima<sup>18,19</sup>. Kuma030 fue muy eficaz en la eliminación de estos epítomos de péptidos en todo el gluten, con una proporción de 1:400 de enzima: el gluten es suficiente para reducir el gluten inmunogénico presente en más del 99.5% en 60 minutos,

10 como se cuantifica por ambos métodos utilizados (Fig. 1A). La reducción de Kuma030-dependiente de la carga inmunogénica del gluten es rápida, con > 98% de degradación conseguido por 5 minutos en una proporción de 1:25 (Fig. 1B). La espectroscopía de masas de los productos de escisión de

15 Kuma030 reveló que Kuma030 escindió cada péptido después del motivo de dipéptido de PQ en los epítomos inmunodominantes del trigo (33mer, W02-E07 y W03-E07) y también los de cebada B08-E2E7 (PQQPIPPQQPQPYPQQ (SEQ ID NO: 61)) y centeno R11-E2E7 (QPFPPQQPEQIIPQQP)<sup>9</sup> (SEQ ID NO: 62) (Fig. 1C). Mientras

20 que estos péptidos intactos son altamente inmunoestimulantes, los productos de descomposición del péptido no se predicen para estimular el sistema inmunológico, ya que se pensaba que los resultados de acción de Kuma030 en la eliminación del epítomo 9mer de núcleo para

25 desencadenar la respuesta inmune<sup>20</sup>. La capacidad de Kuma030

para escindir estos péptidos que contienen un PQL o un motivo de tripéptido PQQ y reducir la carga de gliadina medida por anticuerpos G12 y R5, son consistentes con la hipótesis de que Kuma030 puede enlazar y escindir péptidos con leucina o  
5 una glutamina en el bolsillo de enlace S1'.

La capacidad de Kuma030 para degradar eficientemente epítomos de gliadina inmunogénica sugiere que la incubación de gliadina con Kuma030 puede reducir su capacidad para estimular una respuesta inmune mediada por células T. Los  
10 ensayos de células T utilizando células derivadas de las biopsias intestinales de pacientes celíacos representan el estándar de oro para esta evaluación. Evaluar directamente la hipótesis de que la incubación con Kuma030 disminuirá o eliminará la capacidad de inmunoestimulantes de gliadina, se  
15 realizaron ensayos de célula T en el cual las células se expusieron a gliadina tratada con Kuma030 y se evaluó la reacción de células T resultantes. Las líneas celulares CD4<sup>+</sup> T intestinales altamente reactivas a la gliadina utilizadas en este estudio se generaron previamente de la mucosa  
20 intestinal y han mostrado reacción a una variedad de epítomos en familias de gliadinas diferentes<sup>21</sup>. Kuma030 y la pepsina se incubaron con gliadina de trigo purificada en condiciones gástricas simuladas en laboratorio durante 60 minutos. Con el fin de imitar el tránsito en el compartimento intestinal,  
25 entonces aumentaron los niveles de pH de las muestras, y las

muestras fueron tratadas con quimotripsina y deamidadas con TG2 para desenmascarar los epítomos inmunogénicos. Las muestras de gliadina resultantes se presentaron a las líneas celulares T y se evaluó la estimulación mediante la medición de la producción de IFN- $\gamma$  (Fig. 2A-E) y la proliferación de la célula T (Figura 3A-D). La exposición de líneas de células T a la gliadina tratada con pepsina dio lugar a la estimulación de la producción de IFN- $\gamma$ , y el tratamiento conjunto de gliadina con pepsina y Kuma030 redujo esta respuesta, eliminándola en altas concentraciones. Las disminuciones observadas en la producción de IFN- $\gamma$  no eran debidas a la toxicidad Kuma030. De manera importante, Kuma030 eliminó la respuesta de la célula T a la gliadina en cada línea de célula T probada independientemente de la especificidad de la célula T del epítomo, indicando que Kuma030 es eficaz contra los epítomos reconocidos por las líneas de célula T utilizadas en este ensayo. Puesto que estos epítomos abarcan las tres familias principales de la gliadina:  $\alpha$ -,  $\omega$  y  $\gamma$ -gliadina, esto sugiere que la Kuma030 es capaz de degradar epítomos inmunogénicos dentro de todas las regiones pertinentes de gliadina.

Los experimentos anteriores demuestran la capacidad de Kuma030 para degradar epítomos de gliadina inmunogénica en el contexto de gluten de trigo purificado o gliadina. Sin embargo, para evaluar la aplicación práctica, es importante

evaluar la efectividad de Kuma030 en matrices de bebidas y alimentos fisiológicamente relevantes. Para evaluar la actividad de Kuma030 en escenarios de digestión gástrica, se probó la capacidad de Kuma030 para romper el gluten en una  
5 mezcla de pan acidificado y una cerveza de trigo. El pan integral se molió en saliva artificial para simular la masticación a una concentración de pan representativa de la del estómago después de la ingestión de una rebanada de pan. La mezcla luego se acidificó por la adición de HCl y pepsina,  
10 y se agregaron glutenasas a diferentes concentraciones. Luego se cuantificó la cantidad de gluten restante después de 30 minutos de digestión, que representa el tiempo promedio que pasan de los alimentos en el estómago antes del comienzo de la ingesta de liberación en el duodeno a través de la abertura  
15 pilórica<sup>22</sup>. A mayor concentración glutenásica probada ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), el tratamiento con EPB2 y SCPEP dio lugar a la degradación del gluten en 84.4% (Fig. 4A). Esto es comparable a los resultados publicados de un estudio fase I mostrando EPB2 y SCPEP eliminaron 70-79% de gluten en una comida de  
20 prueba en una relación 1:10 de enzima:gluten en el estómago humano después de un tiempo de incubación de 30 minutos<sup>23</sup>. En una concentración de  $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (una relación 1:160 p:p), Kuma030 redujo el nivel de gluten en el pan por debajo de 20 ppm (el umbral de FDA para el etiquetado "libre de gluten").  
25 Por último, la capacidad de degradar gluten de Kuma030 fue

probada directamente en una cerveza de trigo, dado que las cervezas de trigo demuestran niveles de gluten comparativamente altos<sup>24</sup>. La cerveza se incubó con Kuma030 a 37° C o 4° C en dos concentraciones de enzima. Se tomaron  
5 muestras en diferentes puntos de tiempo y se cuantificó la concentración de gluten restante. Se encontró que la incubación de la cerveza, que demostró una concentración de gluten ~764 ppm, con Kuma030 disminuyó el nivel de gluten disminuir a 20 ppm por 5 minutos (Fig. 4B). La rapidez de  
10 este efecto es particularmente importante, ya que los líquidos se vacían a través del estómago considerablemente más rápido que los sólidos<sup>25</sup>. Sorprendentemente, Kuma030 redujo significativamente la carga del gluten de la cerveza de trigo incluso a 4° C, dado que la incubación con el Kuma030  
15 a 700 µg mL<sup>-1</sup> redujo los niveles de gluten por debajo de 20 ppm por 5 minutos.

En este momento, la única terapia para la enfermedad celíaca es una dieta libre de gluten estricta de por vida. La terapia oral se ha considerado una opción atractiva para  
20 CD dada la identificación de los epítomos de gliadina inmunogénica ricos en PQ que estimulan la respuesta inmune<sup>3</sup>. Una característica útil de cualquier enzima oral terapéutica para CD es la capacidad para romper los péptidos inmunógenos en condiciones gástricas, ya que la respuesta inmune  
25 inflamatoria a la gliadina se produce inmediatamente al

entrar en el intestino<sup>26</sup>. Los estudios de reto de gluten en pacientes con CD han demostrado que la carga de gluten ingerida debe mantenerse a 10 mg o menos con el fin de prevenir el daño intestinal<sup>27,28</sup>. De hecho, la FDA exige  
5 actualmente que los alimentos etiquetados como "libre de gluten" deberán demostrar menos de 20 ppm de gluten, puesto que la estricta observancia de esta norma está prevista para resultar en una ingesta diaria de 10 mg o menos. De esta manera, la ingestión accidental de 1 g de gluten  
10 (aproximadamente la cantidad de gluten presente en un crotón) se debe reducir en un 99% o más en el compartimento gástrico para prevenir el daño intestinal y los síntomas que pudieran surgir de la exposición al gluten. Por lo tanto, existe una clara necesidad de glutenasas que puedan destruir rápidamente  
15 los epítomos de gliadina inmunogénica en condiciones gástricas. En un modelo de mezcla de pan que representa la ingestión de 4 g de gluten, Kuma030 se encontró que degrada > 99.8% de la carga de gliadina 30 minutos en una proporción de 1:160 p:p. Además, Kuma030 destruye específicamente  
20 péptidos con el motivo dipéptido PQ, el cual se encuentra comúnmente en todas las regiones inmunogénicas del gluten. De hecho, Kuma030 es capaz de degradar todos los péptidos inmunodominantes probados y la gliadina tratada con Kuma030 no pudo estimular la producción IFN  $\gamma$  de todas las líneas  
25 de célula de T probadas, que es significativa ya que los

pacientes CD demuestran un sinnúmero de respuestas a diferentes epítomos inmunogénicos.

### **Referencias para el ejemplo 1**

- 5           1. Rubio-Tapia, A., Ludvigsson, J.F., Brantner, T.L.,  
Murray, J.A. y Everhart, J.E. The prevalence of celiac  
disease in the United States. Am J Gastroenterol 107, 1538-  
1544; quiz 1537, 1545 (2012).
2. Catassi, C., Gatti, S. y Lionetti, E. World  
10 perspective and celiac disease epidemiology. Dig Dis 33, 141-  
146 (2015).
3. Sollid, L.M. Coeliac disease: dissecting a complex  
inflammatory disorder. Nat Rev Immunol 2, 647-655 (2002).
4. Gordon, S.R., et al. COMPUTATIONAL DESIGN OF AN  
15 alpha-GLIADIN PEPTIDASE. J Am Chem Soc (2012).
5. Richter, F., Leaver-Fay, A., Khare, S.D., Bjelic,  
S. y Baker, D. De novo enzyme design using Rosetta3. PLoS  
One 6, e19230 (2011).
6. Shan, L., et al. Structural basis for gluten  
20 intolerance in celiac sprue. Science 297, 2275-2279 (2002).
7. Shan, L. Identification and analysis of  
multivalent proteolytically resistant peptides from gluten:  
implications for celiac sprue. Journal of Proteome Research  
(2005).

8. Sollid, L.M., Qiao, S.W., Anderson, R.P., Gianfrani, C. y Koning, F. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics* 64, 455-460 (2012).
- 5        9. Tye-Din, J.A., et al. Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med* 2, 41ra51 (2010).
- 10       10. Arentz-Hansen, H., et al. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* 191, 603-612 (2000).
11. Arentz-Hansen, H., et al. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 123, 803-809 (2002).
- 15       12. Chang, J.H., et al. A novel placement method of the Bravo wireless pH monitoring capsule for measuring intragastric pH. *Dig Dis Sci* 54, 578-585 (2009).
- 20       13. Lupo, A., Roebuck, C., Walsh, A., Mozola, M. y Abouzied, M. Validation study of the Veratox R5 rapid ELISA for detection of gliadin. *J AOAC Int* 96, 121-132 (2013).
14. Moron, B., et al. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *Am J Clin Nutr* 87, 405-414 (2008).

15. Lahdeaho, M.L., et al. The Glutenase ALV003 Attenuates Gluten-Induced Mucosal Injury in Patients with Celiac Disease. *Gastroenterology* (2014).
16. Bethune, M.T., Strop, P., Tang, Y., Sollid, L.M. y  
5 Khosla, C. Heterologous expression, purification, refolding, and structural-functional characterization of EP-B2, a self-activating barley cysteine endoprotease. *Chem Biol* 13, 637-647 (2006).
17. Ehren, J., Govindarajan, S., Moron, B., Minshull,  
10 J. y Khosla, C. Protein engineering of improved prolyl endopeptidases for celiac sprue therapy. *Protein Eng Des Sel* 21, 699-707 (2008).
18. Siegel, M., et al. Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue. *Chem Biol* 13, 649-658  
15 (2006).
19. Gass, J., Bethune, M.T., Siegel, M., Spencer, A. y Khosla, C. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology* 133, 472-480 (2007).
20. Petersen, J., et al. T-cell receptor recognition of HLA-DQ2-gliadin complexes associated with celiac disease. *Nat Struct Mol Biol* 21, 480-488 (2014).
21. Camarca, A., et al. Intestinal T cell responses to gluten peptides are largely heterogeneous: implications for

a peptide-based therapy in celiac disease. *J Immunol* 182, 4158-4166 (2009).

22. Pera, P., et al. Influence of mastication on gastric emptying. *J Dent Res* 81, 179-181 (2002).

5        23. Siegel, M., et al. Safety, tolerability, and activity of ALV003: results from two phase 1 single, escalating-dose clinical trials. *Dig Dis Sci* 57, 440-450 (2012).

24. Picariello, G., et al. Proteomics, peptidomics, and immunogenic potential of wheat beer (weissbier). *J Agric Food Chem* 63, 3579-3586 (2015).

25. Houghton, L.A., et al. Relationship of the motor activity of the antrum, pylorus, and duodenum to gastric emptying of a solid-liquid mixed meal. *Gastroenterology* 94, 1285-1291 (1988).

26. Castillo, N.E., Theethira, T.G. y Leffler, D.A. The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 3, 3-11 (2015).

27. Catassi, C., et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr* 85, 160-166 (2007).

28. Akobeng, A.K. y Thomas, A.G. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 27, 1044-1052 (2008).

## Ejemplo 2

Las enzimas diseñadas por computadora fueron producidas y probadas por su capacidad descomponer los péptidos de gliadina inmunogénica. Las mutaciones que demostraron mejorar la capacidad de la enzima para dirigirse a péptidos relevantes fueron combinadas y probadas en un proceso iterativo para aumentar aún más la actividad. Más recientemente, el diseño se ha extendido al bolsillo de enlace S1' para preferir aminoácidos L o Q. Este esfuerzo de ingeniería tiene mayor actividad en péptidos que contienen un tripéptido PQL o PQQ, que se localizaron dentro del epítipo del núcleo de virtualmente todos los péptidos de gliadina inmunogénica.

Se utilizaron diversas variantes de Kuma010. Las diferencias mutacionales específicas y sus efectos relativos sobre la actividad se enumeran en la Tabla 6 a continuación.

20

25

Tabla 6

|    | Variante | Fondo <sup>a</sup> | Mutación <sup>b</sup>                                               | Mejora de la actividad sobre Fondo <sup>c</sup>                                                                   |
|----|----------|--------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | Kuma010  | Kumamolisinina-As  | V119D<br>S262K<br>N291D<br>D293T<br>G319S<br>D358G<br>D368H         | 116x                                                                                                              |
|    | Kuma020  | Kuma010            | G358S<br>I463T                                                      | 7-19x (PQL)<br>15-35x (PQQ)                                                                                       |
| 10 | Kuma021  | Kuma020            | D399Q<br>A449Q                                                      | 1-2x (PQL)<br>1.2-2.5x (PQQ)                                                                                      |
|    | Kuma030  | Kuma021            | K262E<br>E267T<br>S354Q                                             | 1.2-2x (PQL)<br>1.2-2x (PQQ)                                                                                      |
|    | Kuma031  | Kuma030            | GSTENLYFQSGALEHHHHHHH<br>(SEQ ID NO: 139)<br>Borrada del terminal C | Sin cambio (PQL);<br>mutante de producción                                                                        |
|    | Kuma032  | Kuma031            | P171R<br>H172R                                                      | Sin cambio (PQL);<br>mutante de producción                                                                        |
| 15 | Kuma040  | Kuma010            | S319A<br>H368F<br>D399Q<br>A449Q<br>I463T                           | 35-50x (PQL)<br>30-40 x (PQQ);<br>Kuma030 es 2 veces más activo en PQQ y 2 veces menos activo en PQL, que Kuma040 |
|    | Kuma041  | Kuma040            | GSTENLYFQSGALEHHHHHHH<br>(SEQ ID NO: 139)<br>Borrada del terminal C | 1.0-1.2x (PQL)                                                                                                    |
| 20 | Kuma042  | Kuma041            | P171R<br>H172R                                                      | 1.2-1.5x (PQL)                                                                                                    |
|    | Kuma050  | Kuma021            | K262E<br>E267T<br>S354Q<br>L270V<br>T463I                           | 1.5-2x (PQL)<br>0.01-0.2x (PQQ)                                                                                   |
| 25 | Kuma060  | Kuma030            | G320M                                                               | En los ensayos de pan. Kuma060 está sobre dos veces tan                                                           |

|    |         |                                                                                                          |                                                               |
|----|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
|    |         |                                                                                                          | activo como Kuma030                                           |
|    | Kuma061 | GSTENLYFQSGALEHHHHHHH<br>(SEQ ID NO: 139)<br><br>Borrada del terminal C                                  | sobre la misma actividad que Kuma060.                         |
| 5  | Kuma062 | Kuma061<br><br>P171R<br>H172R                                                                            | ND <sup>d</sup> ; sobre la misma actividad que Kuma060.       |
|    | Kuma070 | Kuma040<br><br>G320M                                                                                     | 2-3x (PQL)<br>2-4x (PQQ)                                      |
|    | Kuma071 | Kuma070<br><br>GSTENLYFQSGALEHHHHHHH<br>(SEQ ID NO: 139)<br><br>Borrada del terminal C                   | ND <sup>d</sup> ; alrededor de 0.2 X tan activo como Kuma 070 |
| 10 | Kuma072 | Kuma070<br><br>GSTENLYFQSGALEHHHHHHH<br>(SEQ ID NO: 139)<br><br>Borrada del terminal C<br>P171R<br>H172R | alrededor de 0.7X tan activo como Kuma 070;                   |

<sup>a</sup>variante Kuma010 específico que sirve como fondo sobre el cual se hicieron las mutaciones mencionadas.

15 <sup>b</sup>Posiciones mutacionales se indican en relación con la enzima Kuma010 de longitud completa.

<sup>c</sup>Mejora de la actividad se calculó para cada variante como un aumento en la actividad con relación a la de la enzima de "fondo", la enzima plantilla utilizada para hacer  
20 esa variante. La actividad se midió en uno o más de los siguientes sustratos: un PQQQLP etiquetado por fluorescencia (SEQ ID NO: 156) sustrato, 33mer<sup>5</sup> (contiene PQL) o 26mer<sup>6</sup> (contiene PQQ) péptidos o DQ2.5-glia- $\alpha$ 1a (contiene PQL) o DQ2.5-glia- $\omega$ 1 (contiene PQQ)<sup>7</sup>. Es importante señalar que,  
25 dado que cientos de variantes Kuma010 se analizaron, hubiera

sido impráctico obtener constantes cinéticas para cada mutante, por lo consiguiente la cantidad de veces de mejora mostró en este caso estimaciones en lugar de números definitivos. El número de veces de mejora presentados en  
5 este documento se calculó de la cantidad de degradación de péptido detectado en el ensayo de degradación por LC-MS.

<sup>d</sup>ND: no determinado. Las actividades de las derivaciones Kuma060, Kuma061, and Kuma062; and Kuma070, Kuma071, and Kuma072; se compararon directamente entre sí en  
10 ensayos de degradación de pan o alimentos en vez de por evaluación de la degradación de péptidos individual para confirmar que no hay disminución de la actividad enzimática ocurrida tras la pérdida de la etiqueta His. La capacidad de Kuma070 para descomponer los péptidos que contienen PQL y  
15 PQQ se comparó con Kuma040 como se explica a continuación.

#### *Kuma020, Kuma021 y Kuma030*

El sitio activo de Kuma010 experimentó mayor esfuerzo de diseño para mejorar la actividad frente a sustratos que  
20 contengan tripéptidos PQL o PQQ. Los esfuerzos de ingeniería identificaron las mutaciones G358S y I463T como importantes contribuyentes al aumento de la actividad. La mutación G358S era un refinamiento a una mutación anterior en este sitio en Kuma010. La mutación de I463T eliminó el impedimento  
25 estérico en el bolsillo de enlace P1' cuando se dirigieron a

los motivos de tripéptido PQL e introdujeron un nuevo enlace de hidrógeno predicho cuando PQQ fue el sustrato<sup>4</sup>. La variante Kuma010 que alberga estas dos mutaciones demostró una gran mejora sobre Kuma010 original y fue nombrada  
5 Kuma020.

Esta enzima Kuma020 sufrió mutaciones adicionales. D399Q y A449Q fueron las mutaciones que se encontraron fuera del sitio activo y por lo tanto no se preveían que afectaran el enlace al sustrato. En cambio, estas dos mutaciones  
10 dieron lugar a nuevos enlaces de hidrógeno intramolecular predichos y así se predijeron para estabilizar la enzima. La variante resultante, Kuma021, mostró un aumento en la actividad.

Tres otros refinamientos contribuyeron a la generación  
15 de Kuma030 a partir de Kuma021. Kuma030 se describe en detalle más arriba.

#### *Kuma040 y Kuma050*

Como una alternativa a las mutaciones mencionadas, un  
20 conjunto diferente de las mutaciones en el fondo Kuma010, S319A y H368F, condujo a una arquitectura de sitio activo diferente a la encontrada en Kuma030. Estas mutaciones, junto con D399Q, A449Q y I463T, (mutaciones que también aumentan la actividad en Kuma030) conforman la variante  
25 Kuma040. Kuma041, Kuma042, Kuma070, Kuma071 y Kuma072 tienen

Kuma040 como sitios de activos, mientras que Kuma031, Kuma032, Kuma060, Kuma061 y Kuma062 tienen Kuma030 como sitios de activos.

Kuma050 es una variante de Kuma010 construida en el fondo Kuma021 con una arquitectura de sitio activo que tiene más en común con Kuma030 que con Kuma040. Sin embargo, Kuma050 carece de la mutación I463T y alberga en su lugar una mutación L270V que se predice para aumentar su actividad contra péptidos que contienen PQL, pero se prevé que impida que la glutamina acceda al bolsillo de enlace P1', lo que disminuye actividad en los sustratos que contienen PQQ. En consecuencia, Kuma050 específicamente muestra un alto nivel de actividad contra sustratos que contengan PQL, pero no contra los sustratos que contienen PQQ. El perfil de especificidad de Kuma050 fue deseado debido a que varios estudios han indicado que el péptido inmunodominante 33mer de  $\alpha$ -gliadina, que contiene varios motivos PQL y no motivos PQQ, puede ser el péptido responsable de la mayor parte de la enfermedad en un subgrupo de pacientes.

Las actividades de Kuma010, Kuma020, Kuma030, Kuma040 y Kuma050 se muestran a continuación para el péptido 33mer altamente inmunogénico de  $\alpha$ -gliadina (LQLQPFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 69)) y el péptido 26mer de  $\gamma$ -gliadina (FLQPQQPFPQQPQQPYQPQQPQQPFPQ (SEQ ID NO: 70)), que representa péptidos que contienen PQL- y

PQQ-, respectivamente. La aparición de productos de degradación en el tiempo (LPYPQPQPF (SEQ ID NO: 137) para el péptido 33mer; FLQPQ (SEQ ID NO: 138) para el péptido 26mer) se muestran en las figuras 5A-B.

5           En ambos casos, Kuma030 fue la enzima probada dominante, a través de Kuma040 se demostró la actividad casi tan potente como Kuma030 especialmente contra el péptido 26mer. Como se esperaba, Kuma050 demostró buena actividad en el péptido 33mer, pero actividad pobre en el péptido  
10 26mer. En comparación con Kuma030 y Kuma040, Kuma020 demostró una moderada cantidad de actividad en ambos péptidos, consistente con que sea un diseño intermedio como se muestra anteriormente. Todas las variantes demuestran una mejora marcada en la enzima Kuma010 original.

15

#### *Kuma060 y Kuma070*

Una mutación diseñada adicional fue la mutación G320M. Esta mutación no parecía especialmente prometedora ya que no se predijo que mejorara grandemente la actividad, y de hecho,  
20 este residuo, mientras se encuentra en el sitio activo, no parece hacer contacto directo con el sustrato de gliadina. Sin embargo, la mutación en esta posición mejoró la actividad de 2 a 4 veces en ambos sustratos. Esto podría ser debido a pequeños cambios en la cadena principal Kuma010 ocasionados  
25 por la incorporación de la metionina, volviéndola en una

confirmación de que es aún más favorable para la catálisis. La mutación de G320M fue incorporada a los fondos Kuma030 y Kuma040 para generar enzimas Kuma060 y Kuma070, respectivamente.

5 Las Figuras 6A-B muestran la mejora en la actividad atribuida a la mutación G320M en el fondo Kuma040 en la degradación de ambos epítomos inmunogénicos DQ2.5-glia- $\alpha$ 1a (contiene PQL) y DQ2.5-glia- $\omega$ 1 (contiene PQQ).

10 *Las series KumaXX1 y Kuma XX2*

Con la excepción de las variantes de Kuma021, Kuma010 etiquetadas KumaXX1 (ex. Kuma031) corresponde a la variante KumaXX0 (ex. Kuma030) en el cual la proteasa TEV terminal C sitio de corte y la etiqueta 6xHis se a borrado genéticamente

15 (GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139)). Esta etiqueta, que originalmente fue agregada a la enzima Kumamolisin-As de alto rendimiento, purificación fácil de variantes de Kuma010, se eliminó en ciertas variantes de plomo de Kuma010 como la etiqueta 6x His no es preferible en productos farmacéuticos

20 biológicos. En general, la eliminación de esta etiqueta no afectó la actividad de la enzima, aunque la eliminación de la etiqueta His pareció resultar en una ligera disminución en la capacidad de la enzima Kuma070 (pero no la enzima Kuma060) para degradar la gliadina en una digestión gástrica

25 de pan de trigo entero.

Las variantes de Kuma010 con la etiqueta KumaXX2 (ex Kuma032) también falta la etiqueta His y contienen las mutaciones adicionales siguientes: P171R y H172R. Estas mutaciones no afectan la actividad de la enzima, pero se incorporan para simplificar el proceso de purificación. Estas mutaciones se introdujeron en el dominio propéptido en la región termina N de Kuma010. Ya que estas mutaciones se encuentran dentro del dominio propéptido, no están presentes en la enzima madura, activa. Estas dos mutaciones caen dentro de la región terminal N de la proteína que se asienta en el sitio de actividad de la enzima antes de la escisión después de la exposición a pH bajo. Puesto que esta región se encuentra en proximidad de los residuos catalíticos, se presume que esta es la región que sufre el evento de escisión inicial después de la purificación de la enzima Kuma010 durante procedimientos de purificación estándar. La terminal N de la enzima escindida parcialmente permanece estrechamente asociada con la enzima madura hasta que la enzima se expone al ácido. Si bien este auto procesamiento inicial durante la purificación de las proteínas no afecta negativamente la actividad, puede complicar la interpretación del análisis de SDS-PAGE por individuos que no estén familiarizados con la enzima Kuma010. Por consiguiente, con el fin de simplificar el perfil de SDS-PAGE de enzima purificada, se incorporaron las mutaciones P171R y H172R para reducir la cantidad de

escisión inicial de terminal N que ocurre durante el proceso de purificación de proteínas.

Ya que las variantes KumaXX1 y KumaXX2 carecen de una etiqueta His, no se purifican mediante cromatografía de afinidad de Ni. En cambio, estas variantes se purifican por la cromatografía de intercambio aniónico. El siguiente gráfico demuestra la actividad de las variantes Kuma030, Kuma031, Kuma032, Kuma040, Kuma041 y Kuma042 en péptido de gliadina inmunogénica DQ2.5-glia- $\alpha$ 1a. En este caso, todas las proteínas se purificaron por cromatografía de intercambio de anión (incluso Kuma030 y Kuma040 que albergan una etiqueta 6x histidina intacta), con el fin de comparar. Como se muestra en la Figura 7, las mutaciones P171R y H172R no parecen afectar negativamente la actividad como Kuma032 y Kuma042 demuestran actividad comparable como Kuma030 y Kuma040 (Kuma042 incluso muestra un ligero incremento en la actividad frente a este sustrato en comparación con el Kuma040).

La variante de Kuma010, Kuma062 demuestra una alta cantidad de actividad y carece de la etiqueta His. Una comparación de Kuma062 con Kuma030 y Kuma040 se muestra en las Figuras 8A-B (izquierda, detección de la longitud total de DQ2.5-glia- $\omega$ 1; derecha, detección del producto de degradación):

### CINÉTICA ENZIMÁTICA

Los parámetros bioquímicos se estimaron para: Kuma010, Kuma030, Kuma040 y Kuma050. Estas se estimaron utilizando epítomos de gliadina inmunogénica DQ2.5-glia- $\alpha$ 1a y DQ2.5-glia- $\omega$ 1. Los ensayos de degradación se realizaron con 100 nM de enzima a 37°C en 100 mM de tampón NaOAc de pH 4.0. La siguiente tabla muestra la velocidad inicial de la reacción de degradación en función de la concentración de sustrato.  $k_{cat}$  y  $K_M$  se calcularon de esto usando la ecuación Michaelis-Menten.

Los parámetros bioquímicos de todas las enzimas probadas se muestran en la Tabla 7, a continuación.

**Tabla 7**

| Enzima  | [Enzima] | Sustrato         | Vmax ( $M s^{-1}$ ) | Km (mM) | Kcat ( $s^{-1}$ ) | kcat/Km ( $M^{-1} s^{-1}$ ) |
|---------|----------|------------------|---------------------|---------|-------------------|-----------------------------|
| Kuma010 | 100 nM   | Glia_ $\alpha$ 1 | 3.70E-07            | 4.6 mM  | 3.7               | 819                         |
| Kuma030 | 100 nM   | Glia_ $\alpha$ 1 | 1.74E-06            | 1.9 mM  | 17.4              | 9034                        |
| Kuma040 | 100 nM   | Glia_ $\alpha$ 1 | 1.49E-06            | 0.86 mM | 16.3              | 19109                       |
| Kuma050 | 100 nM   | Glia_ $\alpha$ 1 | 1.42E-06            | 2.5 mM  | 14.2              | 5613                        |
| Kuma010 | 100 nM   | Glia_ $\alpha$ 1 | 1.22E-07            | 16.4 mM | 1.2               | 74                          |
| Kuma030 | 100 nM   | Glia_ $\alpha$ 1 | 2.73E-06            | 8.4 mM  | 27.3              | 3268                        |
| Kuma040 | 100 nM   | Glia_ $\alpha$ 1 | 2.46E-06            | 15.3 mM | 24.6              | 1603                        |
| Kuma050 | 100 nM   | Glia_ $\alpha$ 1 | 2.78E-06            | 5.0 mM  | 27.8              | 56                          |

Las mutaciones hechas a Kuma030 y Kuma040 incrementaron en gran medida la actividad contra estos péptidos, lo cual es prometedor para su uso en los péptidos desintoxicantes que se vinculan a la enfermedad celiaca. Como se predijo, las mutaciones realizadas a la actividad incrementada de

Kuma050 en el péptido DQ2.5-glia- $\alpha$ 1a, pero no en el péptido DQ2.5-glia- $\omega$ 1.

### Referencias para el ejemplo 2

- 5           (1) Gordon, S. R.; Stanley, E. J.; Wolf, S.; Toland, A.; Wu, S. J.; Hadidi, D.; Mills, J. H.; Baker, D.; Pultz, I. S.; Siegel, J. B. *Journal of the American Chemical Society* **2012**.
- 10           (2) Wlodawer, A.; Li, M.; Gustchina, A.; Tsuruoka, N.; Ashida, M.; Minakata, H.; Oyama, H.; Oda, K.; Nishino, T.; Nakayama, T. *J Biol Chem* **2004**, 279, 21500.
- 15           (3) Leaver-Fay, A.; Tyka, M.; Lewis, S. M.; Lange, O. F.; Thompson, J.; Jacak, R.; Kaufman, K.; Renfrew, P. D.; Smith, C. A.; Sheffler, W.; Davis, I. W.; Cooper, S.; Treuille, A.; Mandell, D. J.; Richter, F.; Ban, Y. E.; Fleishman, S. J.; Corn, J. E.; Kim, D. E.; Lyskov, S.; Berrondo, M.; Mentzer, S.; Popovic, Z.; Havranek, J. J.; Karanicolas, J.; Das, R.; Meiler, J.; Kortemme, T.; Gray, J. J.; Kuhlman, B.; Baker, D.; Bradley, P. *Methods Enzymol* **2011**,  
20   487, 545.
- (4) Wolf, C.; Siegel, J. B.; Tinberg, C.; Camarca, A.; Gianfrani, C.; Paski, S.; Guan, R.; Montelione, G.; Baker, D.; Pultz, I. S. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137, 13106.

(5) Shan, L.; Molberg, O.; Parrot, I.; Hausch, F.; Filiz, F.; Gray, G. M.; Sollid, L. M.; Khosla, C. *Science* **2002**, 297, 2275.

(6) Shan, L. *Journal of Proteome Research* **2005**.

5 (7) Sollid, L. M.; Qiao, S. W.; Anderson, R. P.; Gianfrani, C.; Koning, F. *Immunogenetics* **2012**, 64, 455.

(8) Arentz-Hansen, H.; Korner, R.; Molberg, O.; Quarsten, H.; Vader, W.; Kooy, Y. M.; Lundin, K. E.; Koning, F.; Roepstorff, P.; Sollid, L. M.; McAdam, S. N. *J Exp Med*  
10 **2000**, 191, 603.