

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037603**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.20

(21) Номер заявки
201792362

(22) Дата подачи заявки
2016.06.08

(51) Int. Cl. **A61K 38/16** (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЦЕЛИАКИИ СПРУ

(31) **62/172,557**

(32) **2015.06.08**

(33) **US**

(43) **2018.05.31**

(86) **PCT/US2016/036356**

(87) **WO 2016/200880 2016.12.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ЮНИВЕРСИТИ ОФ ВАШИНГТОН;
ЗЕ РЕДЖЕНТС ОФ ЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)**

(72) Изобретатель:

**Пальц Ингрид Суонсон, Вульф
Клэнси, Сигель Джастин Блумфилд,
Тинберг Кристина Элейн, Стюарт
Лэнс, Бейкер Дэвид (US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(56) DATABASE UNIPARC [Online], 15 January 2010 (2010-01-15), XP002760283, retrieved from EBI, accession no. UNIPARC: UPI0000402017, Database accession no. UPI0000402017, the whole document

CLANCEY WOLF ET AL.: "Engineering of Kuma030: A Gliadin Peptidase That Rapidly Degrades Immunogenic Gliadin Peptides in Gastric Conditions", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 137, no. 40, 14 October 2015 (2015-10-14), pages 13106-13113, XP055291584, US ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/jacs.5b08325, cited in the application, the whole document

SYDNEY R. GORDON ET AL.: "Computational Design of an [alpha]-Gliadin Peptidase", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 134, no. 50, 19 December 2012 (2012-12-19), pages 20513-20520, XP055291585, US ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja3094795, cited in the application, abstract, page 20515, page 20518

WO-A2-2013023151

WO-A1-2015023728

OYAMA H. ET AL.: "A CLN2-related and thermostable serine-carboxyl proteinase, kumamolysin: cloning, expression, and identification of catalytic serine residue", JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 131, no. 5, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 757-765, XP002686283, ISSN: 0021-924X, the whole document

(57) В изобретении раскрыты и предложены полипептиды и способы применения указанных полипептидов, при этом указанные полипептиды имеют аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем (a) указанный полипептид расщепляет пептид PFQPQLPY (SEQ ID NO: 140) и/или PFPQPQQPF (SEQ ID NO: 68) при pH 4; (b) остаток 467 представляет собой Ser, остаток 267 представляет собой Glu и остаток 271 представляет собой Asp; (c) указанный полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1 в одном или более положениях остатков, которые выбраны из группы, состоящей из замен аминокислоты, 221, 262E, 268, 269, 270, 319A, 320, 354E/Q/R/Y, 358S/Q/T, 368F/Q, 399, 402, 406, 424, 449, 461, 463, 105, 171, 172, 173, 174 и 456.

B1**037603****037603****B1**

Перекрестная ссылка

В заявке на данное изобретение испрашивается приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/172,557, поданной 8 июня 2015 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Целиакия спру (глютеновая энтеропатия) представляет собой широко распространенное заболевание, при котором белки пищи, известные как "глютен", содержащиеся в продуктах на основе пшеницы, ячменя и ржи, вызывают иммунный ответ в тонком кишечнике у генетически предрасположенных индивидуумов. Возникающее в результате этого воспаление может привести к разрушению ворсинок тонкого кишечника, что препятствует всасыванию питательных веществ. Симптомы могут возникнуть в раннем детстве или позже, и их тяжесть широко варьирует от диареи, усталости и уменьшения массы тела до вздутия живота, анемии и неврологических симптомов. На сегодняшний день эффективные варианты терапии данного хронического заболевания отсутствуют, помимо полного исключения из рациона глютенов. Несмотря на то, что целиакия спру остается в основном редко диагностируемой, распространенность данного заболевания в США и Европе оценивают на уровне 0,5-1,0% населения. Помимо целиакии спру, значительная часть населения, как считают, страдает от состояния, представляющего собой нецелиакийную чувствительность к глютену (НЦЧГ), которое вызывается попаданием глютена в пищеварительный тракт, но которое по своему механизму отличается от целиакии, несмотря на то, что симптомы данного состояния часто являются не отличимыми от таковых целиакии спру. Обнаружение подходящих существующих в природе ферментов в качестве терапевтических средств для перорального применения для лечения целиакии и НЦЧГ является затруднительным в связи со строгими физическими и химическими требованиями для специфичного и эффективного расщепления полученных из глютенов пептидов в жестких и в высокой степени кислотных условиях пищеварительного тракта человека. Поскольку пептиды глютена запускают иммунный ответ незамедлительно после поступления в кишечник, необходимо, чтобы любые терапевтические средства для перорального применения на основе ферментов для лечения целиакии расщепляли данные иммуногенные области глютена в желудочном компартменте и тем самым предотвращали повреждение кишечника данными пептидами глютенов в результате воспаления.

Краткое описание изобретения

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложены полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, где:

(a) остаток 467 представляет собой Ser, остаток 267 представляет собой Glu и остаток 271 представляет собой Asp;

(b) указанный полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1 в одном или нескольких положениях остатков, которая выбрана из группы, состоящей из замен аминокислот 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 и 456.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1 в одном или нескольких положениях остатков, которые выбраны из группы, состоящей из замен аминокислот 463, 221, 262E, 268, 269, 270, 319A, 320, 354E/Q/R/Y, 358S/Q/T, 368F/Q, 399, 402, 406, 424, 449 и 461.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1 в одном или нескольких положениях остатков, которая выбрана из группы, состоящей из замен аминокислот 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 и 463A/L/M/Q/R/T/V.

Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1 в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или более положениях остатков, выбранных из указанной группы.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 1 в положениях остатков 399 и 449, такие как замены аминокислот 399Q и 449Q. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 358S и 463T. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот: 262E, 269T, 354Q, 358S, 399Q, 449Q и 463T. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 319A, 368F, 399Q, 449Q и 463T. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 262E, 269T, 270V, 354Q, 358S, 399Q и 449Q. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 262E, 269T, 320M, 354Q, 358S, 399Q, 449Q и 463T. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 319A, 320M, 368F, 399Q, 449Q и 463T. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептиды содержат замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1 в одном или нескольких положениях аминокислот, которые выбраны из группы, состоящей из 105, 171, 172, 173, 174 и 456, такие как замены аминокислот 105H; 171R, A или S; 172R, A или S;

173R или S, 174S и/или 456V. Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71, где:

(a) остаток 278 представляет собой Ser, остаток 78 представляет собой Glu, и остаток 82 представляет собой Asp; и

(b) полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 71 в одном или более положениях остатков, которая выбрана из группы, состоящей из замен аминокислот 274, 32, 73E, 79, 80, 81, 130A, 165E/Q/R/Y, 169S/Q/T, 179F/Q, 210, 213, 217, 235, 260, 267 и 272.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 71 в одном или более положениях остатков, которая выбрана из группы, состоящей из замен аминокислот 274, 32, 73E, 79, 80, 81, 130A, 165E/Q/R/Y, 169S/Q/T, 179F/Q, 210, 213, 217, 235, 260 и 272.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 71 в одном или более положениях остатков, которые выбраны из группы, состоящей из замен аминокислот 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, 260E/N/Q, 272R и 274A/L/M/Q/R/T/V. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 71 в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более положениях остатков, выбранных из указанной группы. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 71 в остатках 210 и 260, включая, но не ограничиваясь указанными, замены аминокислот 210Q и 260Q. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 169S и 274T. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 73E, 80T, 165Q, 169S, 210Q, 260Q и 274T. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 130A, 179F, 210Q, 260Q и 274T. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 73E, 80T, 81V, 165Q, 169S, 210Q и 260Q. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 73E, 80T, 320M, 165Q, 169S, 210Q, 260Q и 274T. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 130A, 131M, 179F, 210Q, 260Q и 274T. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 71 в положении аминокислоты 267, включая, но не ограничиваясь заменой 267V.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-42, 44-60 и 72-112, и 114-130 и 150-155. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-42, 55-60 и 72-112 и 125-130 и 150-155.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептиды согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать гистидиновую метку на С-конце полипептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гистидиновая метка включает отщепляемую гистидиновую метку. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения отщепляемая гистидиновая метка может содержать аминокислотную последовательность GSTENLYFQSGALENNNNNN (SEQ ID NO: 139) или может состоять из указанной последовательности. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения отщепляемая гистидиновая метка может содержать аминокислотную последовательность X_N PQ(L/Q)PX_NNNNNNN (SEQ ID NO: 131), где X_N представляет собой линкер, состоящий из 1-25 остатков аминокислот.

Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения отщепляемая гистидиновая метка может содержать аминокислотную последовательность GSSGSSGSQPQLPYGSSGSSGSHNNNNN (SEQ ID NO: 132).

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид согласно любому варианту реализации настоящего изобретения. В соответствии с настоящим изобретением также предложен вектор экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащий нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению. В настоящем изобретении также предложены рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие векторы экспрессии нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, нуклеиновую кислоту, вектор экспрессии нуклеиновой кислоты и/или рекомбинантную клетку-хозяина согласно любому варианту реализации настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены способы лечения целиакии спру или нецелиакийной чувствительности к глютену (НЦЧГ), причем указанные способы включают введение индивидиуму, страдающему от целиакии спру или НЦЧГ, такого количества полипептида или фармацевтической композиции согласно любому варианту реализации настоящего изобретения, которое эффек-

тивно для лечения целиакии спру или НЦЧГ. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид или фармацевтическую композицию вводят пероральным способом.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Kuma030 способен быстро и эффективно расщеплять иммуногенные области глютена в условиях желудка. (А) Количество глютена, обнаруженное после инкубации в течение 60 мин с указанными концентрациями EPB2 и SCPEP (в соотношении 1:1), Kuma010 или Kuma030 в условиях желудка, которое измеряли методом ELISA с применением антитела G12. Исходная концентрация глютена составляла 10 мг/мл (10000 ч./млн, частей на миллион). Отметим, что значения на оси Y отложены на логарифмической шкале. (В) Количество глютена, обнаруженное через 5 или 30 мин инкубации с EPB2 и SCPEP в концентрации 400 мкг/мл или с Kuma030 в концентрации 10, 100 или 400 мкг/мл. Исходная концентрация глютена составляла 10 мг/мл. Образцы нормировали к количеству глютена, измеренному после инкубации с пепсином самим по себе. ES: EPB2 и SCPEP в массовом соотношении 1:1. Звездочка указывает, что количество глютена было ниже уровня количественного определения (5 ч./млн). (С) Хроматограммы ВЭЖХ полноразмерного пептида (серые пунктирные линии) или продуктов расщепления (черные линии) иммунодоминантных пептидов из глиадина (W02-E07, W03-E07, 33-мерный), хордеина (B08-E2E7) или секалина (R11-E4E7). В нижней части фигуры представлена аминокислотная последовательность 33-мерного пептида, положение известных иммуногенных эпитопов (горизонтальные линии), расположение сайтов расщепления Kuma030, определенное методом ЖХ-МС, жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (вертикальные линии), и пики элюирования полученных в результате продуктов расщепления (серые стрелки). Иммунодоминантные пептиды продемонстрировали следующий характер расщепления:

B08-E2E7:

PQQPIRQ||QRPYPYRQ||Q (SEQ ID NO: 61); R11-E4E5: QPFPQ||QPEQIPRQ||QP (SEQ ID NO:62); W02-E7: LQFPQPQ||LPYPQPQ (SEQ ID NO: 63); W03-E7: QPFPQPQ||QPFWPQP (SEQ ID NO: 64).

Массу и время элюирования всех пептидов подтверждали методом ЖХ-МС. Отметим, что, несмотря на то что нерасщепленный пептид W03-E07 элюировался приблизительно в то же время, что и фрагменты расщепления W03-E07, данные соединения представляют собой отдельные пики, определенные методом ЖХ-МС. уЕОП, условные единицы оптической плотности.

Фиг. 2. Глиадин, обработанный Kuma030, утрачивает свой иммуностимулирующий потенциал. (А-Е) Очищенный глиадин обрабатывали Kuma030 в указанной концентрации в течение 60 мин при pH 4,0 при температуре 37°C в присутствии 0,6 мг/мл пепсина. После желудочной фазы pH образцов увеличивали и образцы обрабатывали химотрипсином и TG2. Затем образцы подвергали воздействию линий Т-клеток от пациентов № 1 (А), № 2 (В), № 3 (С), № 4 (D) или № 5 (Е) в присутствии аутологических облученных линий В-клеток и ИФН-γ измеряли методом ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, твердофазного иммуноферментного анализа). Фитогемагглютинин (ФГА) и пепсиново-трипсиновый гидролизат глиадина (ПТ-Глиадин) использовали в качестве положительных контролей. Инкубация линий Т-клеток с антигенпрезентирующими клетками при отсутствии антигенов выступала в качестве отрицательного контроля. (F) Эпитопы, стимулирующие Т-клетки, распознанные Т-клетками, которые использовали в данном анализе, и прогнозируемые сайты расщепления Kuma030 в пределах данных эпитопов. Прогнозируемые сайты расщепления Kuma030 показаны вертикальной линией |. Сайты расщепления прогнозировали на основании активности Kuma030 в отношении пептидов глиадина, как представлено на фиг. 1F (сверху вниз: SEQ ID NO: 141, 142, 141, 142, 143, 144, 141, 142, 143, 144, 145, 145, 146, 145).

Фиг. 3. Kuma030 не является токсичным в отношении Т-клеток. Возможный токсичный эффект обработанного ферментом глиадина оценивали на мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) человека от здоровых доноров, которые стимулировали митогеном фитогемагглютинином (ФГА). (a, b) Продукция ИФН-γ Т-клетками здорового донора № 1 (А) или здорового донора № 2 (В). (С, D) Пролиферация Т-клеток здорового донора № 1 (С) или здорового донора № 2 (D). Какого-либо эффекта в отношении продукции ИФН-γ или пролиферации клеток не наблюдалось, за исключением эффекта у здорового донора № 2 в отношении пролиферации (но не в отношении продукции ИФН-γ). Поскольку снижение пролиферации клеток, стимулированных ФГА, являлось одинаковым вне зависимости от обработки ферментом, авторы настоящего изобретения заключили, что данный эффект не был вызван токсичностью образцов.

Фиг. 4. Kuma030 эффективно расщеплял глютен в сложных пищевых матрицах. (А) Количество глютена, остающееся в цельнозерновом хлебе после 30 мин инкубации с Kuma030 или комбинацией EPB2:SCPEP в соотношении 1:1 при указанных концентрациях ферментов. Исходная концентрация глютена составила 10000 ч./млн. Отметим, что значения на обеих осях отложены на логарифмической шкале. (В) Количество глютена, остающееся в пшеничном пиве после инкубации с указанными концентрациями EPB2:SCPEP в соотношении 1:1 или с Kuma030 при температуре 37 или 4°C через 5, 15 или 60 мин. Глютен обнаруживали с применением метода G12 ELISA.

Фиг. 5. Сравнение способностей Kuma010, Kuma020, Kuma030, Kuma040 и Kuma050 расщеплять

26-мерный и 33-мерный пептиды. Ферменты инкубировали в концентрации 2 мкг/мл с 1 мг/мл 33-мерного пептида (А) или 26-мерного пептида (В) в течение 60 мин. Образцы отбирали в указанные временные точки и измеряли концентрации продуктов расщепления пептида. Продукты расщепления представляли собой: из 33-мерного пептида (SEQ ID NO: 69) - LPYPQPQF (SEQ ID NO: 137); из 26-мерного пептида (SEQ ID NO: 70) - QPYPQ (SEQ ID NO: 147). Активности графически представлены в виде соотношения соответствующего сигнала m/z (масса/заряд) к таковому внутреннего стандарта.

Фиг. 6. Мутация G320M улучшает активность в 2-4 раза. Показана активность в отношении расщепления иммуногенных эпитопов DQ2.5-glia- α 1a (содержит PQL) (слева) и DQ2.5-glia- ω 1 (содержит PQQ) (справа). Образцы отбирали в указанные временные точки и измеряли концентрацию продукта расщепления пептида - PFPQPQ (SEQ ID NO: 148). Активности графически представлены в виде соотношения соответствующего сигнала m/z к таковому внутреннего стандарта.

Фиг. 7. Мутации P171R и H172R, как представляется, не оказывают отрицательного воздействия на активность. Ферментативные активности показаны для вариантов фермента Kuma030, Kuma031, Kuma032, Kuma040, Kuma041 и Kuma042 в отношении иммуногенного эпитопа глиаина DQ2.5-glia- α 1a. Образцы отбирали в указанные временные точки и измеряли концентрацию продукта расщепления пептида -PFPQPQ (SEQ ID NO: 148). Активности графически представлены в виде соотношения соответствующего сигнала m/z к таковому внутреннего стандарта. Все ферменты очищали методом анионного обмена.

Фиг. 8. Kuma062 демонстрирует больший уровень ферментативной активности, чем Kuma030 или Kuma040. Показана активность в отношении иммуногенного эпитопа глиаина DQ2.5-glia- ω 1. Слева: обнаружение полноразмерного DQ2.5-glia- ω 1; справа: обнаружение продукта расщепления PFPQPQ (SEQ ID NO: 148). Образцы отбирали в указанные временные точки и измеряли концентрацию полноразмерного пептида или продукта расщепления PFPQPQ (SEQ ID NO: 148). Активности графически представлены в виде соотношения соответствующего сигнала m/z к таковому внутреннего стандарта.

Подробное описание изобретения

Все источники, ссылки на которые приводятся, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Применяемые в настоящем документе методики, если не указано обратное, можно найти в любом из нескольких хорошо известных источников, таких как: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, edited by D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" in Methods in Enzymology (M.P. Deutscher, 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, 2nd Ed. (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY), Gene Transfer and Expression Protocols, p. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.) и the Ambion 1998 Catalog (Ambion, Austin, TX).

В настоящем документе формы единственного числа включают объекты во множественном числе, если контекст однозначно не диктует обратное. "И" в настоящем документе используется взаимозаменяемо с "или", если определено не указано обратное.

В настоящем документе остатки аминокислот сокращаются следующим образом: аланин (Ala; A), аспарагин (Asn; N), аспарагиновая кислота (Asp; D), аргинин (Arg; R), цистеин (Cys; C), глутаминовая кислота (Glu; E), глутамин (Gln; Q), глицин (Gly; G), гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

Все варианты реализации любого аспекта настоящего изобретения можно использовать в комбинации, если контекст однозначно не диктует обратное.

Согласно первому аспекту в настоящем изобретении предложены полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, где

(a) остаток 467 представляет собой Ser, остаток 267 представляет собой Glu и остаток 271 представляет собой Asp;

(b) полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1 в одном или более положениях остатков, которые выбраны из группы, состоящей из 221, 262E, 268, 269, 270, 319A, 320, 354E/Q/R/Y, 358S/Q/T, 368F/Q, 399, 402, 406, 424, 449, 461, 463, 105, 171, 172, 173, 174 и 456. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1 в одном или более положениях остатков, которые выбраны из группы, состоящей из 221, 262E, 268, 269, 270, 319A, 320, 354E/Q/R/Y, 358S/Q/T, 368F/Q, 399, 402, 406, 424, 449, 461 и 463.

SEO ID NO:1 (Kuma 011)

Kuma011

MSDMEKPWKE(10)GEEARAVLQG(20)HARAQAPQAV(30)DKGPVAGDER(40)MAV
TVVLRQR(50)RAGELAAHVE(60)RQAAIAPHAR(70)EHLKREAF(80)SHGASLDDF
A(90)ELRRFADAHG(100)LALDRANVAA(110)GTAVLSGPDD(120)AINRAFGVEL(130)
RHFDHPDGSY(140)RSYLGEVTVP(150)ASIAPMIEAV(160)LGLDTRPVAR(170)PH(17
2)FRMORRAE(180)GGFEARSO(188)A

A(190)APTAYTPLDV(200)AQAYQFPEGL(210)DGQGQCIAII(220)E(221/32)LGGGYDEAS
(230/41)LAQYFASLGV(240/51)PAPQVVSVS(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)GAKFAVYFA
P(290/101)DTTAGFLDAI(300/111)TTAIHDPTLK(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)QDGLYHVVH(368/179)FP(370/181)AASPYVLACG(380/191)GT
RLVASGGR(390/201)IAQETVWND(399/210)G(400/211)PD(402/213)GGAT(406/217)GGGV
(410/221)SRIFPLPAWQ(420/231)EHAN(424/235)VPPSAN(430/241)PGASSGRGVP(440/251
)DLAGNADPA(449/260)T(450/261)GYEVVIDGEA(460/271)T(461/272)VI(463/274)GGTS(4
67/278)AVAPLFAALVARINQKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQ
AGPGWDPCTGLGSPIGVRLLOALLPSASOPOP (SEO ID NO: 1)

Kuma010, упоминаемый в настоящем документе, идентичен Kuma011, но содержит последовательность гистидиновой метки GSTENLYFOSGALENNNNNN (SEQ ID NO: 139) на своем С-конце.

Остатки, набранные жирным шрифтом, представляют собой N-концевую часть, присутствующую в непроцессированном полипептиде; остатки, набранные нежирным шрифтом, присутствуют в процессированной версии полипептида. Числа в скобках означают количество остатков; если приведены два числа, разделенные "/", число слева представляет собой количество остатков в непроцессированной версии и число справа представляет собой количество остатков в процессированной версии. SEQ ID NO: 1 представляет собой непроцессированную версию Kuma0111; SEQ ID NO: 71 представляет собой процессированную версию Kuma011.

Как раскрыто в примерах, приведенных ниже, полипептиды согласно данному аспекту настоящего изобретения представляют собой улучшенные полипептиды для применения, например, при лечении целиакии спру. Полипептиды представляют собой модифицированные версии процессированной версии или препроцессированной версии полипептида согласно SEQ ID NO: 1 (KUMAMAX™, в дальнейшем обозначаемый Kuma010), который был раскрыт как пригодный для лечения целиакии спру (WO 2013/023151). Полипептиды для лечения целиакии спру способны к расщеплению обогащенных пролином (P) и глутамином (Q) компонентов глютена, известных как "глиадины", которые, как считают, отвечают за основной объем иммунного ответа у большинства пациентов, страдающих от целиакии спру. Полипептиды согласно настоящему изобретению демонстрируют превосходящую активность в отношении расщепления пептидов, содержащих мотив PQLP (SEQ ID NO: 65) или PQQP (SEQ ID NO: 66) (такой как PFPQPQLPY (SEQ ID NO: 67) или PFPQPQQPF (SEQ ID NO: 68), которые представляют собой субстраты, характерные для глиадина), при pH 4 по сравнению с Kuma011 и другими полипептидами, раскрытыми как пригодные для лечения целиакии спру (WO 2015/023728), и/или, как показано, улучшают продукцию полипептидов. Таким образом, полипептиды согласно настоящему изобретению представляют собой в значительной степени улучшенные терапевтические средства для лечения целиакии спру. Таким образом, полипептиды согласно настоящему изобретению расщепляют пептид PFPQPQLPY (SEQ ID NO: 67) и/или пептид PFPQPQQPF (SEQ ID NO: 68) при pH 4, а также LQLQFPQPQLPYRQPQLPYRQPQLPYRQPQPF (SEQ ID NO: 69) и/или FLQPQQPFPQQPQQPYRQPQQPFPQ (SEQ ID NO: 70).

Полипептиды согласно первому аспекту настоящего изобретения включают препроцессированные версии полипептидных ферментов согласно настоящему изобретению.

Согласно второму аспекту в настоящем изобретении предложены полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71, где:

(a) остаток 278 представляет собой Ser, остаток 78 представляет собой Glu и остаток 82 представляет собой Asp;

(b) полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 71 в одном или более положениях остатков, которые выбраны из группы, состоящей из 32, 73E, 79, 80, 81, 130A, 131, 165E/Q/R/Y, 169S/Q/T, 179F/Q, 210, 213, 217, 235, 260, 267, 272 и 274.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 71 в одном или более положениях остатков, которые выбраны из

группы, состоящей из 32, 73E, 79, 80, 81, 130A, 131, 165E/Q/R/Y, 169S/Q/T, 179F/Q, 210, 213, 217, 235, 260, 272 и 274.

Полипептиды согласно первому аспекту настоящего изобретения включают процессированные версии полипептидных ферментов согласно настоящему изобретению, и также расщепляют пептид PFPQPQLPY (SEQ ID NO: 67) и/или пептид PFPQPQQPF (SEQ ID NO: 68) при pH 4, а также LQLQPFQPQLPYRQPQLPYRQPQLPYRQPQPF (SEQ ID NO: 69) и/или FLQPQQPFQPQQPYRQPQQPFQ (SEQ ID NO: 70).

В настоящем документе "по меньшей мере на 75% идентичен" означает, что полипептид отличается своей полноразмерной аминокислотной последовательностью на 25% или менее (включая любые замены, делеции, добавления или вставки аминокислот) от полипептида, определенного в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 71.

Согласно различным вариантам реализации любого аспекта полипептидов согласно настоящему изобретению полипептиды содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 (препроцессированная) или SEQ ID NO: 71 (процессированная) или состоят из указанной последовательности.

Полипептид согласно любому аспекту полипептидов согласно настоящему изобретению может содержать замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 71 в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или всех 24 (в зависимости от варианта реализации) указанных остатках.

Согласно одному варианту реализации полипептидов согласно первому аспекту настоящего изобретения полипептид содержит одну или несколько замен аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 1 в одном или более положениях остатков, которые выбраны из группы, состоящей из 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 и 463A/L/M/Q/R/T/V. По всему тексту число означает номер остатка в полипептидной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 71, и однобуквенные сокращения аминокислот справа от числа означают возможные замены аминокислот по сравнению с остатками аминокислот, которые присутствуют в данном положении в SEQ ID NO: 1 или 71.

Согласно другому варианту реализации полипептидов согласно первому аспекту настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 1 в остатках 399 и 449. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 399Q и 449Q.

Согласно следующему варианту реализации полипептидов согласно первому аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 358S и 463T. Данные полипептиды всесторонне охарактеризованы в последующих примерах на примере полипептида, обозначенного как Kuma020, и вариантов указанного полипептида.

Согласно одному варианту реализации полипептидов согласно первому аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 262E, 269T, 354Q, 358S, 399Q, 449Q и 463T. Данные полипептиды всесторонне охарактеризованы в последующих примерах на примере полипептида, обозначенного как Kuma030, и вариантов указанного полипептида. Согласно другому варианту реализации полипептидов согласно первому аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 319A, 368F, 399Q, 449Q и I463T. Данные полипептиды всесторонне охарактеризованы в последующих примерах на примере полипептида, обозначенного как Kuma040, и вариантов указанного полипептида. Согласно следующему варианту реализации полипептидов согласно первому аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 262E, 269T, 270V, 354Q, 358S, 399Q и A449Q. Данные полипептиды всесторонне охарактеризованы в последующих примерах на примере полипептида, обозначенного как Kuma050, и вариантов указанного полипептида. Согласно одному варианту реализации полипептидов согласно первому аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 262E, 269T, 320M, 354Q, 358S, 399Q, 449Q и 463T. Данные полипептиды всесторонне охарактеризованы в последующих примерах на примере полипептида, обозначенного как Kuma060, и вариантов указанного полипептида. Согласно еще одному варианту реализации полипептидов согласно первому аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 319A, 320M, 368F, 399Q, 449Q и 463T. Данные полипептиды всесторонне охарактеризованы в последующих примерах на примере полипептида, обозначенного как Kuma070, и вариантов указанного полипептида.

Согласно другому варианту реализации полипептидов согласно первому аспекту настоящего изобретения полипептиды содержат замену аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1 в одном или нескольких положениях аминокислот, которые выбраны из группы, состоящей из 105, 171, 172, 173, 174 и 456. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения замена аминокислоты представляет собой 105H; 171R, A или S; 172R, A или S; 173R или S, 174S и/или 456V. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения замена аминокислоты представляет собой 171R, 172R и/или 456V.

Согласно одному варианту реализации полипептидов согласно второму аспекту настоящего изобретения полипептид содержит одну или несколько замен аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 71 в одном или более положениях остатков, которые выбраны из группы, состоящей из 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, 260E/N/Q, 272R и 274A/L/M/Q/R/T/V. Согласно другому варианту реализации полипептидов согласно второму аспекту настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 71 в остатках 210 и 260. Согласно следующему варианту реализации полипептидов согласно второму аспекту настоящего изобретения полипептид содержит замены аминокислот 210Q и 260Q. Согласно одному варианту реализации полипептидов согласно второму аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 169S и 274T (тип Kuma20). Согласно другому варианту реализации полипептидов согласно второму аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 73E, 80T, 165Q, 169S, 210Q, 260Q и 274T (тип Kuma30). Согласно следующему варианту реализации полипептидов согласно второму аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 130A, 179F, 210Q, 260Q и 274T (тип Kuma40). Согласно еще одному варианту реализации полипептидов согласно второму аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 73E, 80T, 81V, 165Q, 169S, 210Q и 260Q (тип Kuma50). Согласно одному варианту реализации полипептидов согласно второму аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 73E, 80T, 320M, 165Q, 169S, 210Q, 260Q и 274T (тип Kuma60). Согласно другому варианту реализации полипептидов согласно второму аспекту настоящего изобретения полипептид содержит 130A, 131M, 179F, 210Q, 260Q и 274T (тип Kuma70). Согласно еще одному варианту реализации полипептидов согласно второму аспекту настоящего изобретения полипептиды содержат замену аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 71 в одном или нескольких положениях аминокислот, которые выбраны из группы, состоящей из 267. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения замена аминокислоты представляет собой 267V.

Согласно следующему варианту реализации полипептидов согласно любому аспекту настоящего изобретения полипептиды дополнительно содержат гистидиновую метку на С-конце полипептида для облегчения выделения полипептида. Можно использовать любую подходящую гистидиновую метку; согласно одному варианту реализации настоящего изобретения метка присоединена к сайту расщепления протеазы TEV (ENLYFQS (SEQ ID NO: 149)), чтобы обеспечить эффективное удаление метки с помощью протеазы TEV после очистки, например, метка может содержать аминокислотную последовательность GSTENLYFQSGALENNNNNN (SEQ ID NO: 139) или может состоять из указанной последовательности. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гистидиновая метка представляет собой отщепляемую гистидиновую метку, которая позволяет осуществлять более легкое удаление His-метки. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения отщепляемая гистидиновая метка содержит аминокислотную последовательность X_N PQ(L/Q)PX_NNNNNNN (SEQ ID NO: 131), где X_N представляет собой линкер, состоящий из 1-25 остатков аминокислот.

Согласно одному неограничивающему примеру отщепляемая гистидиновая метка содержит аминокислотную последовательность GSSGSSGSQPQLPYGSSGSSGSNNNNNN (SEQ ID NO: 132).

Согласно одному варианту реализации любого аспекта полипептидов согласно настоящему изобретению замены аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 71 могут включать одну или несколько замен, указанных в табл. 1 или 2. Было обнаружено, что замены в данных положениях являются, как правило, хорошо переносимыми (т.е., как правило, приводят к минимальным эффектам в отношении активности или не оказывают эффектов в отношении активности), и в некоторых случаях увеличивают активность полипептидов согласно настоящему изобретению не более чем на 20%.

Таблица 1

Возможные замены аминокислот в положении
по сравнению с Kuma10

Количество остатков (препроцессированный/процессированный)	Остаток
221/32	D, N, Q, H
261/72	A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, S, T, W, Y, V
262/73	A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, M, F, 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
317/128	A, N, C, G, T, V
318/129	A, R, N, D, C, Q, E, G, H, L, K, M, F, 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
354/165	A, R, N, D, C, Q, E, G, H, L, K, M, F, 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, Y
397/208	A, C, F, Y
399/210	Q, N
402/213	Q, N, S
406/217	S
424/235	K
446/257	G, S
448/259	A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, 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, S, T, W, Y, V
464/277	A, N, D, C, S,
466/279	D, C, G, S

Согласно другому варианту реализации любого аспекта полипептидов согласно настоящему изобретению замены аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 71 могут содержать одну или несколько замен, указанных в табл. 2.

Таблица 2

Количество остатков (препроцессированный/процессированный)	Остаток
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

Согласно другому варианту реализации любого аспекта полипептидов согласно настоящему изобретению аминокислота в каждом остатке полипептидов согласно настоящему изобретению может являться таковой, как указано в табл. 3, в которой перечислены все возможные мутации в каждом положении полипептидных ферментов, предсказанные посредством вычислительного анализа мутагенеза. Как описано в последующих примерах, мутации исследовали в каждом положении, обнаруженном в активном сайте (остатки 261-264, 266-267, 270, 317-320, 350-354, 368, 397, 403-404, 446, 448, 456 и 463-468), с применением вырожденных праймеров для исследования эффектов различных замен аминокислот в отношении активности; замены, которые не препятствовали активности, могут быть введены в полипептиды согласно настоящему изобретению, как отражено в табл. 3.

Таблица 3

Возможные аминокислоты в остатках по сравнению с Kuma 010

Полно размер ный	Зрелый	Возможные аминокислоты
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, 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
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,
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,
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
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
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,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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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,
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,TYR,VAL
414	225	ALA,ASN,CYS,GLN,GLU,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,SER,THR,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
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
432	243	ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL
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
435	246	ALA,ARG,ASN,ASP,CYS,GLN,GLU,GLY,HIS,ILE,LEU,LYS,MET,PHE,PRO,SER,THR,TRP,TYR,VAL
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
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
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
449	260	ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL,
450	261	ALA, ASN, ASP, CYS, GLY, HIS, SER, THR
451	262	GLY
452	263	ALA, ASN, CYS, GLN, HIS, ILE, LEU, PHE, SER, THR, TYR, VAL
453	264	ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL,
454	265	ALA, ASN, ASP, CYS, GLY, SER, THR, VAL
455	266	ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLU, GLY, HIS, ILE, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL
456	267	ALA, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, SER, THR, VAL
457	268	ALA, ASN, ASP, CYS, GLY, ILE, MET, SER, THR, TRP, VAL
458	269	ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, LYS, MET, SER
459	270	ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL,
460	271	ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, PRO, SER, THR, TYR, VAL,
461	272	ALA, ASN, ASP, CYS, GLN, GLY, HIS, LYS, MET, SER, THR
462	273	ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLY, HIS, ILE, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL
463	274	ALA, ARG, ASN, ASP, CYS, GLN, GLU, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TRP, TYR, VAL,
464	275	GLY
465	276	GLY
466	277	ALA, ASN, ASP, CYS, GLY, SER, THR
467	278	SER
468	279	ALA, ASP, CYS, GLY, SER
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
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	Любой остаток
547	358	Любой остаток
548	359	Любой остаток
549	360	Любой остаток
550	361	Любой остаток
551	362	Любой остаток
552	363	Любой остаток
553	364	Любой остаток

Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения полипептиды согласно настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-42, 44-60 и 72-112 и 114-130 и 150-155, представленных ниже, или могут состоять из указанной последовательности. Данные полипептиды характеризуются увеличенной активностью по сравнению с Kuma010, как показано в последующих примерах, или обеспечивают улучшенную продукцию полипептидов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептиды содержат аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-42, 55-60 и 72-112 и 125-130 и 150-155, или могут состоять из указанной последовательности; все данные полипептиды демонстрируют улучшенную активность в отношении Kuma010.

N-Концевой домен набран жирным шрифтом, и изменения по сравнению с Kuma 011 отмечены рядом с названием полипептида. Во всех случаях полипептиды, описанные ниже, могут дополнительно содержать гистидиновую метку на С-конце. Можно использовать любую подходящую гистидиновую метку. Можно использовать любую подходящую гистидиновую метку; согласно одному варианту реализации настоящего изобретения метка присоединена к сайту расщепления протеазы TEV (ENLYFQS) (SEQ ID NO: 149), чтобы обеспечить эффективное удаление метки с помощью протеазы TEV после очистки, например, метка может содержать аминокислотную последовательность GSTENLYFQSGALENNNNNN (SEQ ID NO: 139) или может состоять из указанной последовательности. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения на С-конце может быть введена отщепляемая гистидиновая метка, содержащая аминокислотную последовательность X_N PQ(L/Q)P X_N NNNNNN (SEQ ID NO: 131)? где X_N представляет собой линкер, состоящий из 1-25 остатков аминокислот. Согласно одному неограничивающему примеру отщепляемая гистидиновая метка может содержать аминокислотную последовательность GSSGSSGSQPQLPYGSSGSSGSHNNNNN (SEQ ID NO: 132).

Kuma011 – K262E

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
LKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 2 (непроцессированная), SEQ ID NO: 72 (процессированная))

Kuma011 – V268A

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDEAELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
KLKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ

QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 3 (непроцессированная), SEQ ID NO: 73 (процессированная))

Kuma011 – V268S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASLGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRRAEGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPGESELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDPT
LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 4 (непроцессированная), SEQ ID NO: 74 (процессированная))

Kuma011 – V268T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASLGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRRAEGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPGETELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDPT
LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 5 (непроцессированная), SEQ ID NO: 75 (процессированная))

Kuma011 – E269L

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASLGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRRAEGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVLLDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDITTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
 HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
 KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 6 (непроцессированная), SEQ ID NO: 76
 (процессированная))

Kuma011 – E269T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVTLTIEVAGALAPGAKFAVYFAPDITTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
 HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
 KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 7 (непроцессированная), SEQ ID NO: 77
 (процессированная))

Kuma011 – L270A

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVEADIEVAGALAPGAKFAVYFAPDITTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
 HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
 KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL

QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 8 (непроцессированная), SEQ ID NO: 78 (процессированная))

Kuma011 – L270T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPGEVETDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 9 (непроцессированная), SEQ ID NO: 79 (процессированная))

Kuma011 – L270V

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPGEVEVDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 10 (непроцессированная), SEQ ID NO: 80 (процессированная))

Kuma011 – G319A

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN**

**VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWAGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPP (SEQ ID NO: 11 (непроцессированная), SEQ ID NO: 81
(процессированная))

Kuma011 – S354A

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDAGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPP (SEQ ID NO: 12 (непроцессированная), SEQ ID NO: 82
(процессированная))

Kuma011 – S354E

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDEGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ

KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 13 (непроцессированная), SEQ ID NO: 83
 (процессированная))

Kuma011 – S354Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQR
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAGDQGSTGGEQDGLY
 HVHFPAAAPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
 KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 14 (непроцессированная), SEQ ID NO: 84
 (процессированная))

Kuma011 – S354R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQR
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAGDRGSTGGEQDGLY
 HVHFPAAAPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
 KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 15 (непроцессированная), SEQ ID NO: 85
 (процессированная))

Kuma011 – S354Y

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQR
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN**

**VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAIAAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDYGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 16 (непроцессированная), SEQ ID NO: 86
(процессированная))

Kuma011 – G358N

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQR
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAIAAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTNGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 17 (непроцессированная), SEQ ID NO: 87
(процессированная))

Kuma011 – G358S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQR
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAIAAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTSGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ

KL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 18 (непроцессированная), SEQ ID NO: 88
 (процессированная))

Kuma011 – G358Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRR AEGGF EARSQA**
 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWSPEDSWTSA AIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTQGEQDGLY
 HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVARINQ
 KL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 19 (непроцессированная), SEQ ID NO: 89
 (процессированная))

Kuma011 – G358T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRR AEGGF EARSQA**
 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGP DGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPD TTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWSPEDSWTSA AIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTTGEQDGLY
 HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVARINQ
 KL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 20 (непроцессированная), SEQ ID NO: 90
 (процессированная))

Kuma011 – H368F

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN**

**VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVFFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 21 (непроцессированная), SEQ ID NO: 91
(процессированная))

Kuma011 – H368Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVQFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 22 (непроцессированная), SEQ ID NO: 92
(процессированная))

Kuma011 – D399Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ

KL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 23 (непроцессированная), SEQ ID NO: 93
 (процессированная))

Kuma011 – D402S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWGPEDSWTSAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
 HVHFPASPYPVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPSGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
 KL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 24 (непроцессированная), SEQ ID NO: 94
 (процессированная))

Kuma011 – D402Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWGPEDSWTSAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
 HVHFPASPYPVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPQGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
 KL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 25 (непроцессированная), SEQ ID NO: 95
 (процессированная))

Kuma011 – T406S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN**

**VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPQGGASGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 26 (непроцессированная), SEQ ID NO: 96
(процессированная))

Kuma011 – N424K

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASLGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPQGGASGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 27 (непроцессированная), SEQ ID NO: 97
(процессированная))

Kuma011 – A449E

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASLGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPETGYEVVIDGEATVIGGTSAPLFAALVARINQ

KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 28 (непроцессированная), SEQ ID NO: 98
 (процессированная))

Kuma011 – A449Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDITAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
 HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGVPLDAGNADPQTGYEVVIDGEATVIGGTSAPVPLFAALVARINQ
 KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 29 (непроцессированная), SEQ ID NO: 99
 (процессированная))

Kuma011 – I456V

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDITAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
 HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGVPLDAGNADPATGYEVVVDGEATVTGGTSAPVPLFAALVARIN
 QKLKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 LQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 30 (непроцессированная), SEQ ID NO: 100
 (процессированная))

Kuma011 – T461R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN**

**VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAIIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEARVTGGTSAVAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 31 (непроцессированная), SEQ ID NO: 101
(процессированная))

Kuma011 – I463A

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAIIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVAGGTSAVAPLFAALVARIN
QKLKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
LQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 32 (непроцессированная), SEQ ID NO: 102
(процессированная))

Kuma011 – I463L

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAIIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVLGGTSAVAPLFAALVARINQ

KLKGAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 33 (непроцессированная), SEQ ID NO: 103
 (процессированная))

Kuma011 – I463M

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**
 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVSVISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
 HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVMGGTSAVAPLFAALVARIN
 QKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 LQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 34 (непроцессированная), SEQ ID NO: 104
 (процессированная))

Kuma011 – I463Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
 TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**
 AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVSVISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
 HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
 NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVQGGTSAVAPLFAALVARIN
 QKLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
 LQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 35 (непроцессированная), SEQ ID NO: 105
 (процессированная))

Kuma011 – I463R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN**

**VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAIIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVRGGTSAVAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 36 (непроцессированная), SEQ ID NO: 106
(процессированная))

Kuma011 – I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQR
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAIIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 37 (непроцессированная), SEQ ID NO: 107
(процессированная))

Kuma011 – I463V

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQR
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAIIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVVGGTSAVAPLFAALVARIN

QKL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
LQALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 38 (непроцессированная), SEQ ID NO: 108
(процессированная))

Kuma023: G368S; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**
AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTSGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEH
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQ
KL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 39 (непроцессированная), SEQ ID NO: 109
(процессированная))

Кума 020, упоминаемый в примерах, представляет собой полипептид Кума023, который содержит следующую С-концевую гистидиновую метку: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

Kuma021: G368S; D399Q; A449Q; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**
AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTSGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEH
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQ
KL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 154 (непроцессированная), SEQ ID NO: 155
(процессированная))

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

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEGGFEARSQA**
AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPEGPDGEVTL DIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
LKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSTSGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 40 (непроцессированная), SEQ ID NO: 110
(процессированная))

Кума 030, упоминаемый в примерах, представляет собой полипептид Кума031, который содержит следующую С-концевую гистидиновую метку: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

Kuma041: S319A; H368F; D399Q; A449Q; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDHPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVSV
SVDGASNQPTGDPKGPDEVTLDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWAGPEDSWTSAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVFFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQPGDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 41 (непроцессированная), SEQ ID NO: 111
(процессированная))

Кума 040, упоминаемый в примерах, представляет собой полипептид Кума041, который содержит следующую С-концевую гистидиновую метку: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

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

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDHPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVSV
SVDGASNQPTGDPGPDGEVTVDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSTSGEQDGLY
HVFFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQPGDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPQTGYEVVIDGEATVIGGTSAVAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 42 (непроцессированная), SEQ ID NO: 112
(процессированная))

Кума 050, упоминаемый в примерах, представляет собой полипептид Кума051, который содержит следующую С-концевую гистидиновую метку: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

Kuma022: P171R; H172R; G368S; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDHPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARRRFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVSV
SVDGASNQPTGDPKGPDEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTSGEQDGLY
HVFFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPATGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 55 (непроцессированная), SEQ ID NO: 125
(процессированная))

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

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDHPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARRRFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDEPGDGEVTLTIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
 LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSGTSGEQDGLYH
 VHFFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDDGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
 VPPSANPGASSGRGVPDLGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQK
 LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
 ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 56 (непроцессированная), SEQ ID NO: 126
 (процессированная))

Kuma042: P171R; H172R; S319A; H368F; D399Q; A449Q; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSLGEVTVPASIAMIEAVLGLD
 TRPVARRRRFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDPKGPGEVTLTIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWAGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSGTSGEQDGLY
 HVFFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDDGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
 NVPPSANPGASSGRGVPDLGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQ
 KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
 QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 57 (непроцессированная), SEQ ID NO: 127
 (процессированная))

Kuma052: P171R; H172R; K262E; E269T; L270V; S354Q; G358S; D399Q; A449Q

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
 GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
 VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSLGEVTVPASIAMIEAVLGLD
 TRPVARRRRFRMQRRAEAGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
 SVDGASNQPTGDEPGDGEVTVTIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
 TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSGTSGEQDGLY
 HVHFFAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDDGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
 NVPPSANPGASSGRGVPDLGNADPQTGYEVVIDGEATVIGGTSAVAPLFAALVARINQ
 KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ

QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 58 (непроцессированная), SEQ ID NO: 128 (процессированная))

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

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPGPDGEVTLDEIVAGALAPGAKFAVYFAPDITAGFLDAITTAIHDP
LKPSVVSISWSMPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSGTSGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQPGDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 150 (непроцессированная), SEQ ID NO: 151 (процессированная))

Кума 060, упоминаемый в примерах, представляет собой полипептид Кума061, который содержит следующую С-концевую гистидиновую метку: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

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

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARRRFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPGPDGEVTLDEIVAGALAPGAKFAVYFAPDITAGFLDAITTAIHDP
LKPSVVSISWSMPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDQGSGTSGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQPGDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 59 (непроцессированная), SEQ ID NO: 129 (процессированная))

Kuma071: S319A; H368F; D399Q; A449Q; I463T

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIHIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPGEVTLDEIVAGALAPGAKFAVYFAPDITAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWAMPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVFFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQPGDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
NVPPSANPGASSGRGVPLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQ
KLKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 152 (непроцессированная), SEQ ID NO: 153 (процессированная))

Кума 070, упоминаемый в примерах, представляет собой полипептид Кума071, который содержит следующую С-концевую гистидиновую метку: GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139).

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

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARRRFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPGEVTLTDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWAMPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVFFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNQGPDPGGATGGGVSRIFPLPAWQEH
NVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPQTGYEVVIDGEATVTGGTSAVAPLFAALVARINQ
KLGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 60 (непроцессированная), SEQ ID NO: 130
(процессированная))

Как описано в табл. 4, изменения, внесенные в Kuma010/011, оказывают значительный эффект в отношении каталитической активности разработанных белков. В табл. 4 приведена эффективность отдельных мутаций в отношении катализа расщепления различных последовательностей пептида глиаина. В примерах представлены дополнительные данные относительно конкретных отдельных мутантов и их комбинаций.

Таблица 4

Положение (полноразмерный)	Положение (усеченный)	А.к. Kuma010	А.к. по сравнению с Kuma010/011	% Улучшения в отношении PFPQPQLPY (SEQ ID NO: 67)	% Улучшения в отношении PFPQPQQPF (SEQ ID NO: 68)
221	32	E	D,N,Q,H	105%	HO
262	73	K	E	109%	110%
268	79	V	A	107%	89%
268	79	V	S	104%	83%
268	79	V	T	127%	105%
269	80	E	L	113%	84%
269	80	E	T	263%	191%
270	81	L	A	203%	92%
270	81	L	T	307%	29%
270	81	L	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%
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%
406	217	T	S	84%	101%
424	235	N	K	285%	HO
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	L	124%	22%
463	274	I	M	123%	53%
463	274	I	Q	129%	69%
463	274	I	R	29%	110%
463	274	I	T	130%	239%
463	274	I	V	256%	141%

Мутации, улучшающие продукцию.

Мутации, которые улучшают продукцию, могут обеспечить улучшения в одной из трех категорий:

1. Изменение способа очистки.;

2. Увеличение выхода.

3. Уменьшение вероятности того, что в процессе очистки возникнет ферментативный самопроцессинг, в результате чего анализ будет упрощен.

Добавление His-метки, которая является отщепляемой в результате протеолитической активности полипептидов, раскрытых в настоящем документе, относится к категории 1; мутант R105H, как представляется, увеличивает выход примерно в 2 раза, что относит данную мутацию к категории 2; и мутации в положениях 171-174 относят данную мутацию к категории 3.

Kuma010 с His-меткой, отщепляемой Kuma010

**MSDMEKWPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRR AEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVSV
SVDGASNQPTGDPKGPDPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHA
NVPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVARINQ
KL GKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRL
QALLPSASQPQPGSSGSSGSPQLPYGSSGSSGSHHHHHH (SEQ ID NO: 43
(непроцессированная), SEQ ID NO: 113 (процессированная))

Kuma011 – R105H

**MSDMEKWPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAF AASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFRMQRR AEGGF EARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVSV
SVDGASNQPTGDPGEPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
LKPSVVSISWSPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGV PDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTS AVAPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ

ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 44 (непроцессированная), SEQ ID NO: 114 (процессированная))

Kuma011 – P171A

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARAHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDPT
LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 45 (непроцессированная), SEQ ID NO: 115 (процессированная))

Kuma011 – P171R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARRHFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIHELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDPT
LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 46 (непроцессированная), SEQ ID NO: 116 (процессированная))

Kuma011 – P171S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN**

**VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARSHFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVSV
SVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDPT
LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPLDAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 47 (непроцессированная), SEQ ID NO: 117
(процессированная))

Kuma011 – H172A

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPAFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVSV
SVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDPT
LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPLDAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 48 (непроцессированная), SEQ ID NO: 118
(процессированная))

Kuma011 – H172R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRRQRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPRFRMQRRAEGGFEARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVSV
SVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDPT
LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPLDAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVPLFAALVARINQK

LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 49 (непроцессированная), SEQ ID NO: 119
(процессированная))

Kuma011 – H172S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPSFRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDPT
LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 50 (непроцессированная), SEQ ID NO: 120
(процессированная))

Kuma011 – F173R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHRRMQRRAEAGGFARSQA**

AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDPT
LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPDLGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPQP (SEQ ID NO: 51 (непроцессированная), SEQ ID NO: 121
(процессированная))

Kuma011 – F173S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREAFASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN**

**VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHSRMQRRAEAGGFARSQA**
AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPP (SEQ ID NO: 52 (непроцессированная), SEQ ID NO: 122
(процессированная))

Kuma011 – R174S

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARPHFSMQRRAEAGGFARSQA**
AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPEGPDGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
LKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLYH
VHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
VPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVARINQK
LGKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
ALLPSASQPP (SEQ ID NO: 53 (непроцессированная), SEQ ID NO: 123
(процессированная))

Kuma012: P171R; H172R

**MSDMEKPWKEGEEARAVLQGHARAQAPQAVDKGPVAGDERMAVTVLRQRRA
GELAAHVERQAAIAPHAREHLKREFAASHGASLDDFAELRRFADAHGLALDRAN
VAAGTAVLSGPDDAINRAFGVELRHFDPDGSYRSYLGEVTVPASIAPMIEAVLGLD
TRPVARRRFRMQRRAEAGGFARSQA**
AAPTAYTPLDVAQAYQFPEGLDGQGQCIAIIELGGGYDEASLAQYFASLGVPAPQVVS
SVDGASNQPTGDPKGPGEVELDIEVAGALAPGAKFAVYFAPDTTAGFLDAITTAIHDP
TLKPSVVSISWSGPEDSWTSAAIAAMNRAFLDAAALGVTVLAAAGDSGSTGGEQDGLY
HVHFPAASPYVLACGGTRLVASGGRIAQETVWNDGPDGGATGGGVSRIFPLPAWQEHAN
NVPPSANPGASSGRGVPDLAGNADPATGYEVVIDGEATVIGGTSAPVAPLFAALVARINQ
KLKAVGYLNPTLYQLPADVFHDITEGNNDIANRAQIYQAGPGWDPCTGLGSPIGVRLQ
QALLPSASQPP (SEQ ID NO: 54 (непроцессированная), SEQ ID NO: 124
(процессированная))

По всему тексту настоящего описания термин "полипептид" используется в его наиболее широком смысле для обозначения последовательности субъединиц аминокислот, будь то существующих в природе или имеющих синтетическое происхождение. Полипептиды согласно настоящему изобретению могут содержать L-аминокислоты, D-аминокислоты (которые являются устойчивыми к протеазам, специфичным к L-аминокислотам, *in vivo*) или комбинацию D- и L-аминокислот. Полипептиды, описанные в настоящем документе, могут являться синтезированным химическим способом или экспрессированным рекомбинантным способом. Полипептиды могут быть присоединены к другим соединениям, чтобы способствовать увеличению периода полужизни *in vivo*, например, посредством пэгилирования, гэкилирования, пасилирования или гликозилирования. Такая связь может являться ковалентной или нековалентной, как понимают специалисты в данной области техники. Полипептиды могут быть присоединены к любым другим подходящим линкерам, включая, но не ограничиваясь указанными, любые линкеры, которые можно использовать для очистки или обнаружения (такие как FLAG- или His-метки).

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид согласно любому аспекту или варианту реализации настоящего изобретения. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты может содержать РНК или ДНК. В настоя-

щем документе "выделенные нуклеиновые кислоты" представляют собой таковые, которые были удалены из нормального окружения последовательностей нуклеиновой кислоты в геноме или в последовательностях к ДНК. Такие последовательности выделенной нуклеиновой кислоты могут содержать дополнительные последовательности, пригодные для способствования экспрессии и/или очистке кодируемого белка, включая, но не ограничиваясь указанными, последовательности поли(А), модифицированные последовательности Козака и последовательности, кодирующие эпитопные метки, сигналы экспорта и секреторные сигналы, сигналы внутриядерной локализации и сигналы локализации в плазматической мембране. Специалистам в данной области техники на основании идей, представленных в настоящем документе, очевидно, что последовательности нуклеиновой кислоты будут кодировать полипептиды согласно настоящему изобретению.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предложены векторы экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащие выделенную нуклеиновую кислоту согласно любому варианту реализации настоящего изобретения, функционально связанную с подходящей контрольной последовательностью. "Рекомбинантный вектор экспрессии" включает векторы, которые функционально связывают нуклеиновую кислоту, кодирующую область или ген, с любыми контрольными последовательностями, способными к осуществлению экспрессии продукта гена. "Контрольные последовательности", функционально связанные с последовательностями нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, представляют собой последовательности нуклеиновой кислоты, способные к осуществлению экспрессии молекул нуклеиновой кислоты. Контрольные последовательности не должны быть смежными с последовательностями нуклеиновой кислоты при условии, что контрольные последовательности функционируют для направления экспрессии указанных последовательностей. Таким образом, например, введение нетранслируемых, но транскрибируемых последовательностей может иметь место между последовательностью промотора и последовательностями нуклеиновой кислоты, и последовательность промотора все еще можно считать "функционально связанной" с кодирующей последовательностью. Другие такие контрольные последовательности включают, но не ограничены указанными, сигналы полиаденилирования, сигналы терминации и сайты связывания рибосомы. Такие векторы экспрессии могут относиться к любому типу, известному в данной области техники, включая, но не ограничиваясь указанными, векторы экспрессии на основе плазмид и вирусов. Контрольная последовательность, используемая для запуска экспрессии раскрытых последовательностей нуклеиновой кислоты в системе млекопитающих, может являться конститутивной (запускаемой любым из множества промоторов, включая, но не ограничиваясь указанными, CMV, SV40, RSV, актин, EF) или индуцибельной (запускаемой любым из множества индуцибельных промоторов, включая, но не ограничиваясь указанными, тетрациклин-, экдизон-, стероид-зависимые). Конструкция векторов экспрессии для применения при трансфекции прокариотических клеток также хорошо известна в данной области техники и, таким образом, может быть выполнена посредством стандартных методик. (См., например, руководства Sambrook, Fritsch, and Maniatis, in: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; *Gene Transfer and Expression Protocols*, p. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, NJ.) и Ambion 1998 Catalog (Ambion, Austin, TX). Вектор экспрессии должен являться реплицируемым в организмах-хозяевах в виде эписомы или посредством интеграции в хромосомную ДНК хозяина. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вектор экспрессии содержит плазмиду. Однако в настоящее изобретение включены другие векторы экспрессии, которые выполняют эквивалентные функции, такие как вирусные векторы.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие векторы экспрессии нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Клетки-хозяева могут являться прокариотическими или эукариотическими. Клетки можно подвергать временной или стабильной трансфекции или трансдукции. Такую трансфекцию и трансдукцию прокариотических или эукариотических клеток векторами экспрессии можно осуществить посредством методики, известной в данной области техники, включая, но не ограничиваясь указанными, стандартную трансформацию бактерий, ко-преципитацию с фосфатом кальция, электропорацию или трансфекцию, опосредованную липосомами, DEAE-декстраном, поликатионами или вирусами. (См., например, руководства *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press; *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 2nd Ed. (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY). Способ получения полипептида согласно настоящему изобретению представляет собой дополнительную часть настоящего изобретения. Способ включает этапы (а) культивирования хозяина согласно данному аспекту настоящего изобретения в условиях, способствующих экспрессии полипептида, и (b) необязательно, восстановления экспрессированного полипептида. Экспрессированный полипептид может быть восстановлен из бесклеточного экстракта, осадка клеток или восстановлен из культуральной среды. Способы очистки экспрессированных рекомбинантным способом полипептидов хорошо известны специалисту в данной области техники.

Согласно следующему аспекту в настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие полипептид, нуклеиновую кислоту, вектор экспрессии нуклеиновой кислоты и/или рекомбинантную клетку-хозяина согласно любому аспекту или варианту реализации настоящего изобрете-

ния, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно использовать, например, в способах согласно настоящему изобретению, описанных ниже. Фармацевтическая композиция может содержать, помимо полипептидов, нуклеиновых кислот и т.д. согласно настоящему изобретению, (a) лиопротектор; (b) поверхностно-активное вещество; (c) наполнитель; (d) вещество, регулирующее тоничность; (e) стабилизатор; (f) консервант и/или (g) буфер.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения буфер в фармацевтической композиции представляет собой буфер Tris, гистидиновый буфер, фосфатный буфер, цитратный буфер или ацетатный буфер. Фармацевтическая композиция может также содержать лиопротектор, например сахарозу, сорбитол или трегалозу. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант, например бензалкония хлорид, бензетоний, хлоргексидин, фенол, м-крезол, бензиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлорбутанол, о-крезол, п-крезол, хлоркрезол, нитрат фенилртути, тимеросал и бензойную кислоту, а также различные смеси указанных соединений. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит наполнитель, например глицин. Согласно третьим вариантам реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество, например полисорбат-20, полисорбат-40, полисорбат-60, полисорбат-65, полисорбат-80, полисорбат-85, полуксамер-188, сорбитанмонолаурат, сорбитанмонопальмитат, сорбитанмоностеарат, сорбитанмоноолеат, сорбитантрилаурат, сорбитантристеарат, сорбитантриолеат или комбинацию указанных веществ. Фармацевтическая композиция может также содержать вещество, регулирующее тоничность, например соединение, которое делает состав по существу изотоничным или осмоотичным с кровью человека. Примеры веществ, регулирующих тоничность, включают сахарозу, сорбитол, глицин, метионин, маннитол, декстрозу, инозитол, хлорид натрия, аргинин и гидрохлорид аргинина. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит стабилизатор, например молекулу, которая при сочетании с белком, представляющим интерес, по существу предотвращает или уменьшает химическую и/или физическую нестабильность белка, представляющего интерес, в лиофилизированной или жидкой форме. Примеры стабилизаторов включают сахарозу, сорбитол, глицин, инозитол, хлорид натрия, метионин, аргинин и гидрохлорид аргинина.

Полипептиды, нуклеиновые кислоты и т.д. согласно настоящему изобретению могут являться единственным активным средством в фармацевтической композиции либо композиция может дополнительно содержать одно или несколько других активных средств, подходящих для предназначенного применения.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, как правило, содержат комбинацию соединения, описанного в настоящем документе, и фармацевтически приемлемого носителя, разбавителя или вспомогательного вещества. Такие композиции по существу не содержат фармацевтически неприемлемых компонентов, т.е. содержат меньшие количества фармацевтически неприемлемых компонентов, чем позволяют регуляторные требования США в момент подачи заявки на данное изобретение. Согласно некоторым вариантам реализации данного аспекта настоящего изобретения, если соединение растворяют или суспендируют в воде, композиция также необязательно содержит дополнительный фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, представляют собой твердые фармацевтические композиции (например, таблетки, капсулы и т.д.).

Композиции, описанные в настоящем документе, также могут быть представлены в качестве пищевой добавки, как описано регуляторными органами США.

Данные композиции могут быть получены способом, хорошо известным в фармацевтической области, и могут быть введены любым подходящим путем. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции и составы разработаны для перорального введения. Общеизвестные фармацевтические носители, водные растворы, порошки или масляные основы, загустители и т.п. могут являться необходимыми или целесообразными.

Фармацевтические композиции могут находиться в любой подходящей форме, включая, но не ограничиваясь указанными, таблетки, драже, порошки, таблетки для рассасывания, пакеты-саше, крахмальные капсулы, эликсиры, суспензии, эмульсии, растворы, сиропы, аэрозоли (в виде твердого вещества или в жидкой среде), мази, содержащие, например, до 10% активного соединения по массе, твердые и мягкие желатиновые капсулы, стерильные инъекционные растворы и стерильные упакованные порошки.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены способы лечения целиакии спру или нецелиакии чувствительности к глютену (НЦЧГ), причем указанные способы включают введение индивидууму, страдающему от целиакии спру или НЦЧГ, количества одного или нескольких полипептидов, которые выбраны из группы, состоящей из полипептидов согласно настоящему изобретению, эффективного для лечения целиакии спру или НЦЧГ, или применение одного или нескольких из данных полипептидов для обработки пищи для употребления индивидуумами, страдающими от целиакии спру

или НЦЧГ.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что полипептиды согласно настоящему изобретению способны к расщеплению обогащенных пролином (P) и глутамином (Q) компонентов глютена, известных как "глиадины", которые, как считают, отвечают за основной объем иммунного ответа у большинства пациентов, страдающих от целиакии спру. Полипептиды согласно настоящему изобретению демонстрируют превосходящую активность в отношении расщепления пептидов, содержащих мотив PQLP (SEQ ID NO: 65) или PQQP (SEQ ID NO: 66) (такой как PFPQPQLPY (SEQ ID NO: 67) и/или PFPQPQQPF (SEQ ID NO: 68), которые представляют собой субстраты, характерные для глиадина), при pH 4 по сравнению с Kuma010/011 и другими полипептидами, раскрытыми как пригодные для лечения целиакии спру (WO 2015/023728). Таким образом, полипептиды согласно настоящему изобретению представляют собой в значительной степени улучшенные терапевтические средства для лечения целиакии спру и НЦЧГ.

Целиакия спру (также известна как целиакия или непереносимость глютена) представляет собой в высокой степени распространенное заболевание, при котором пищевые белки, содержащиеся в продуктах на основе пшеницы, ячменя и ржи, известные как "глютен", вызывают иммунный ответ в тонком кишечнике генетически предрасположенных индивидуумов. Возникающее в результате этого воспаление может привести к разрушению ворсинок тонкого кишечника, что препятствует всасыванию питательных веществ. Симптомы могут возникнуть в раннем детстве или позже, и их тяжесть широко варьирует от диареи, усталости, утраты массы тела, болей в области живота, вздутия живота, чрезмерного газообразования, расстройства пищеварения, констипации, вздутия живота, тошноты/рвоты, анемии, легкоранимости, депрессии, нервозности, задержки роста у детей, утраты волос, дерматита, нарушений менструального цикла, язв полости рта, мышечных судорог, боли в суставах, носовых кровотечений, эпилептических припадков, поноса или онемения в руках или ступнях, задержек полового созревания, дефектов зубной эмали и неврологических симптомов, таких как атаксия или парестезия. На сегодняшний день эффективные варианты терапии данного хронического заболевания отсутствуют, помимо полного исключения из рациона глютенов. Несмотря на то, что целиакия спру остается в основном редко диагностируемой, распространенность данного заболевания в США и Европе оценивают на уровне 0,5-1,0% населения. Помимо целиакии спру, значительная часть населения, как считают, страдает от состояния нецелиакийной чувствительности к глютену (НЦЧГ), которое вызывается попаданием глютена в пищеварительный тракт, но которое с механистической точки зрения отличается от целиакии, несмотря на то, что симптомы данного состояния часто являются неотличимыми от таковых целиакии спру.

В настоящем документе "лечение целиакии спру или НЦЧГ" означает достижение одного или нескольких из следующих результатов: (a) уменьшение тяжести целиакии спру или НЦЧГ; (b) ограничение или предотвращение развития симптомов, характерных для целиакии спру или НЦЧГ; (c) ингибирование ухудшения симптомов, характерных для целиакии спру или НЦЧГ; (d) ограничение или предотвращение рецидива целиакии спру или НЦЧГ у пациентов, которые ранее страдали от нарушения; (e) ограничение или предотвращение повторного проявления симптомов у пациентов, которые ранее являлись симптомами в отношении целиакии спру или НЦЧГ; и (f) ограничение развития целиакии спру или НЦЧГ у субъекта, который подвержен риску развития целиакии спру или НЦЧГ либо у которого еще не наблюдаются клинические эффекты целиакии спру или НЦЧГ.

Индивидуум, лечение которого проводят согласно способам согласно настоящему изобретению, может представлять собой любого индивидуума, страдающего от целиакии спру или НЦЧГ, включая субъектов-людей. Индивидуум может представлять собой такового, уже страдающего от симптомов, или такового, который является асимптоматичным.

В настоящем документе "эффективное количество" означает количество полипептида, которое является эффективным для лечения целиакии спру. Полипептиды, как правило, приготовлены в состав в виде фармацевтической композиции, такой как таковые, раскрытые выше, и могут быть введены посредством любого подходящего пути, включая пероральный, парентеральный путь, введение посредством ингаляции спреями или местный путь в составах с единицами дозирования, содержащих общепринятые фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные средства и наполнители. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции и составы вводят пероральным путем, например посредством таблеток, драже, таблеток для рассасывания, эликсиров, суспензий, эмульсий, растворов или сиропов.

Режимы введения доз можно корректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). Подходящий диапазон доз может составлять, например, 0,1 мг/кг - 100 мг/кг массы тела; в качестве альтернативы диапазон доз может составлять от 0,5 мг/кг до 50 мг/кг; от 1 мг/кг до 25 мг/кг или от 5 мг/кг до 10 мг/кг массы тела. Полипептиды можно доставлять в виде единичного болюса или можно вводить более одного раза (например, 2, 3, 4, 5 или более раз), что определяет лечащий врач.

Пример 1.

Глиадин в высокой степени обогащен пролином (P) и глутамином (Q), что делает данное соединение неподходящим для расщепления пищеварительными ферментами человека. Обогащенные PQ пептидные фрагменты, полученные в результате частичного расщепления глиадина, деамидируются в просвете

поскольку действие Kuma030 приводит к устранению корового 9-мерного эпитопа, который, как считают, запускает иммунный ответ²⁰.

Способность Kuma030 отщеплять данные пептиды, содержащие трипептидный мотив PQL или PQQ, и уменьшать нагрузку глиаина, которую измеряли методом на основе антител G12 и R5, согласуются с гипотезой, согласно которой Kuma030 может связываться и отщеплять пептиды с лейцином или глутамином в кармане связывания S1'.

Способность Kuma030 эффективно расщеплять иммуногенные эпитопы глиаина позволяет предположить, что инкубация глиаина с Kuma030 может уменьшить способность глиаина стимулировать опосредованный Т-клетками иммунный ответ. Анализы Т-клеток с применением клеток, полученных из биопсий кишечника пациентов, страдающих от целиакии, представляют собой золотой стандарт для такой оценки. С целью непосредственной оценки гипотезы, согласно которой инкубация с Kuma030 уменьшает или устраняет иммуностимулирующую способность глиаина, авторы настоящего изобретения проводили анализы Т-клеток, в которых клетки подвергали воздействию глиаина, обработанного Kuma030, и оценивали реакцию полученных в результате Т-клеток. В высокой степени реактивные с глиадином CD4⁺ линии Т-клеток кишечника, использованные в данном исследовании, ранее получали из слизистой оболочки кишечника; данные линии, как было показано, реагируют с разнообразными эпитопами различных семейств глиадинов²¹. Kuma030 и пепсин инкубировали с очищенным глиадином пшеницы в имитированных в лаборатории условиях желудка в течение 60 мин. Затем уровни pH образцов увеличивали с целью имитации переноса в кишечный компартмент и образцы обрабатывали химотрипсином и деамидировали TG2 для демаскировки иммуногенных эпитопов. Полученные в результате образцы глиаина презентировали линиям Т-клеток, и стимуляцию оценивали посредством измерения продукции ИФН- γ (фиг. 2А-Е) и пролиферации Т-клеток (фиг. 3А-Д). Воздействие на линии Т-клеток глиадином, обработанным пепсином, привело к стимуляции продукции ИФН- γ , и совместная обработка глиаина пепсином и Kuma030 уменьшила данный ответ, устраняя его при более высоких концентрациях. Наблюдаемое уменьшение продукции ИФН- γ не было вызвано токсичностью Kuma030. Важно отметить, что Kuma030 устранял ответ Т-клеток на глиадин на каждой исследованной линии Т-клеток вне зависимости от специфичности эпитопа Т-клеток; это свидетельствует, что Kuma030 является эффективным в отношении всех эпитопов, которые распознавали линии Т-клеток, использованные в анализе. Поскольку данные эпитопы охватывают три основных семейства глиадинов: α -, ω - и γ -глиадин, данный результат позволяет предположить, что Kuma030 способен расщеплять иммуногенные эпитопы в пределах всех соответствующих областей глиаина.

Эксперименты, описанные выше, демонстрируют способность Kuma030 расщеплять иммуногенные эпитопы глиаина в случае очищенного цельного глютена или глиаина. Однако для оценки практического применения важно оценить эффективность Kuma030 в физиологически значимых матрицах пищи и напитков. Для оценки активности Kuma030 в условиях желудочного переваривания авторы настоящего изобретения исследовали способность Kuma030 расщеплять глютен в подкисленной хлебной каше и в пшеничном пиве. Цельнозерновой хлеб растирали в искусственной слюне для имитации пережевывания при концентрации хлеба, типичной для желудка после попадания в желудочный тракт одного куса хлеба. Затем смесь подкисляли посредством добавления HCl и пепсина и добавляли глютеиназы в различных концентрациях. Затем оставшееся количество глютена количественно определяли через 30 мин пищеварения, что представляет собой среднее время задержки пищи в желудке перед высвобождением пищи в двенадцатиперстную кишку через пилорическое отверстие²². В наивысшей концентрации исследованных глютеиназ (1000 мкг/мл) обработка EBP2 и SCPEP приводила к расщеплению 84,4% глютена (фиг. 4А). Это сопоставимо с опубликованными результатами исследования I фазы, которые продемонстрировали, что EBP2 и SCPEP устраняют 70-79% глютена в исследуемой пище при соотношении фермент: глютен 1:10 в желудке человека после инкубации в течение 30 мин²³. В концентрации 62,5 мкг/мл (соотношение 1:160 (мас.:мас.)) Kuma030 уменьшал уровень глютена в хлебе до менее 20 ч./млн (порог FDA (Food and Drug Administration, Управление США по контролю над продуктами питания и лекарственными средствами) для маркировки "не содержит глютена"). Наконец, способность Kuma030 расщеплять глютен исследовали непосредственно в пшеничном пиве, поскольку в пшеничном пиве наблюдаются сравнительно высокие уровни глютена²⁴. Пиво инкубировали с Kuma030 при температуре 37 или 4°C при двух концентрациях фермента. Образцы отбирали в различные временные точки и количественно определяли концентрацию оставшегося глютена. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что инкубация пива, концентрация глютена в котором составляет ~764 ч./млн, с Kuma030 уменьшала уровень глютена до менее 20 ч./млн всего к 5 минуте (фиг. 4В). Быстрота данного эффекта является в особенности важной, поскольку жидкости высвобождаются из желудка значительно быстрее, чем твердые вещества²⁵. Неожиданно было обнаружено, что Kuma030 в значительной степени уменьшал нагрузку глютена в пшеничном пиве даже при температуре 4°C, поскольку инкубация с Kuma030 в концентрации 700 мкг/мл к 5 минуте уменьшала уровни глютена до менее 20 ч./млн.

На сегодняшний день единственной терапией целиакии является пожизненная строгая безглютеновая диета. После обнаружения обогащенных PQ иммуногенных эпитопов глиаина, которые стимулируют

ют иммунный ответ, пероральную ферментную терапию считали привлекательным вариантом лечения целиакии³. Полезной характеристикой любого терапевтического средства для перорального применения на основе фермента для лечения целиакии является способность расщеплять иммуногенные пептиды в условиях желудка, поскольку воспалительный иммунный ответ на глиадин возникает незамедлительно после поступления в кишечник²⁶. Исследования по выявлению чувствительности к глютену на пациентах, страдающих от целиакии, продемонстрировали, что нагрузка попавшего в пищеварительный тракт глютена должна поддерживаться на уровне 10 мг или менее для предотвращения повреждения кишечника^{27, 28}. В действительности, на сегодняшний день FDA предписывает, что любая пища, маркированная как "не содержащая глютена", должна содержать менее 20 ч./млн глютена, поскольку строгое соблюдение данного стандарта согласно прогнозу приведет к ежедневному попаданию в пищеварительный тракт 10 мг или менее. Таким образом, случайное попадание в пищеварительный тракт 1 г глютена (приблизительное количество глютена, присутствующее в сухарике) в желудочном компартменте должно быть уменьшено на 99% или более с целью предотвращения повреждения кишечника и симптомов, которые могут возникнуть в результате воздействия глютена. Вследствие этого существует очевидная потребность в глютеиназах, которые способны быстро разрушать иммуногенные эпитопы глиадина в условиях желудка. На модели хлебной кашицы, имитирующей попадание в пищеварительный тракт 4 г глютена, было обнаружено, что Kuma030 расщепляет >99,8% нагрузки глиадина через 30 мин при соотношении 1:160 (мас.:мас.). Дополнительно, Kuma030 специфично разрушает пептиды с дипептидным мотивом PQ, который обычно обнаруживают на всем протяжении иммуногенных областей глютена. В действительности, Kuma030 способен расщеплять все исследованные иммунодоминантные пептиды, и глиадин, обработанный Kuma030, оказался не способным стимулировать продукцию ИФН- γ всеми исследованными линиями Т-клеток, что является значимым, поскольку у пациентов, страдающих от целиакии, наблюдается бесчисленное множество ответов на различные иммуногенные эпитопы.

Перечень источников к примеру 1.

1. Rubio-Tapia, A., Ludvigsson, J.F., Brantner, T.L., Murray, J.A. & 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. & Lionetti, E. World 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 alpha-GLIADIN PEPTIDASE. *J Am Chem Soc* (2012).
5. Richter, F., Leaver-Fay, A., Khare, S.D., Bjelic, S. & Baker, D. De novo enzyme design using Rosetta3. *PLoS One* 6, e19230 (2011).
6. Shan, L., et al. Structural basis for gluten 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. & Koning, F. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics* 64, 455-460 (2012).
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. 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).
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).
13. Lupo, A., Roebuck, C., Walsh, A., Mozola, M. & 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. & 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, J. & 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 (2006).
19. Gass, J., Bethune, M.T., Siegel, M., Spencer, A. & 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).
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. & 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. & Thomas, A.G. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 27, 1044-1052 (2008).

Пример 2.

Затем получали разработанные посредством вычислений ферменты и исследовали способность данных ферментов расщеплять иммуногенные пептиды глиаина. После этого мутации, которые, как было показано, улучшают способность фермента нацеливаться на соответствующие пептиды, объединяли и исследовали в повторяющемся процессе, чтобы дополнительно увеличить активность. В последнее время разработка была распространена на карман связывания S1' с целью отдать предпочтение аминокислотам L или Q. Данная конструкторская работа значительно увеличила активность в отношении пептидов, содержащих трипептид PQL или PQQ, которые расположены в пределах корового эпитопа практически всех иммуногенных пептидов глиаина.

Использовали несколько вариантов Kuma010. Специфичные мутационные различия и их относительные эффекты в отношении активности перечислены в табл. 5.

Таблица 5

Вариант	Исходный вариант ^a	Мутация ^b	Улучшение активности по сравнению с исходным вариантом ^c
Kuma010	Кумаммолизин-As (Kumamolisin-As)	V119D S262K N291D D293T G319S D358G D368H	В 116 раз
Kuma020	Kuma010	G358S I463T	В 7 – 19 раз (PQL) В 15 – 35 раз (PQQ)
Kuma021	Kuma020	D399Q A449Q	В 1 – 2 раза (PQL) В 1,2 – 2,5 раза (PQQ)
Kuma030	Kuma021	K262E E267T S354Q	В 1,2 – 2 раза (PQL) В 1,2 – 2 раза (PQQ)
Kuma031	Kuma030	GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139) Делетирован с С-конца	Изменения отсутствуют (PQL); продукционный мутант
Kuma032	Kuma031	P171R H172R	Изменения отсутствуют (PQL); продукционный мутант
Kuma040	Kuma010	S319A H368F D399Q A449Q I463T	В 35 – 50 раз (PQL) В 30 – 40 раз (PQQ); Kuma030 в 2 раза более активен в отношении PQQ и в 2 раза менее активен в отношении PQL, чем Kuma040
Kuma041	Kuma040	GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139) Делетирован с С-конца	В 1,0 – 1,2 раза (PQL)
Kuma042	Kuma041	P171R H172R	В 1,2 – 1,5 раза (PQL)
Kuma050	Kuma021	K262E E267T S354Q L270V T463I	В 1,5 – 2 раза (PQL) В 0,01 – 0,2 раза (PQQ)
Kuma060	Kuma030	G320M	В анализах хлеба. Kuma060 приблизительно в два раза более активен, чем Kuma030
Kuma061	Kuma060	GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139) Делетирован с С-конца	Приблизительно такая же активность, что и у Kuma060.
Kuma062	Kuma061	P171R H172R	НО ^d ; приблизительно такая же активность, что и у Kuma060.
Kuma070	Kuma040	G320M	В 2 – 3 раза (PQL) В 2 – 4 раза (PQQ)
Kuma071	Kuma070	GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139) Делетирован с С-конца	НО ^d приблизительно в 0,2 раза более активен, чем Kuma 070
Kuma072	Kuma070	GSTENLYFQSGALEHHHHHH (SEQ ID NO: 139) Делетирован с С-конца P171R H172R	приблизительно в 0,7 раза более активен, чем Kuma 070;

^a Специфичный вариант Kuma0 10, который выступал в качестве исходного варианта, на основании которого были сделаны перечисленные мутации.

^b Положения мутаций указаны по сравнению с полноразмерным ферментом Kuma010.

^c Улучшение активности рассчитывали для каждого варианта в виде степени увеличения активности по сравнению с таковой "исходного" фермента - матричного фермента, который использовали для получения данного варианта. Активность измеряли в отношении одного или нескольких из следующих субстратов: меченного флуоресцентной меткой субстрата PQQPLP (SEQ ID NO: 156), 33-мерного⁵ (содержит PQL) или 26-мерного⁶ (содержит PQQ) пептида или DQ2.5-glia- α 1a (содержит PQL) или DQ2.5-glia- ω 1 (содержит PQQ)⁷. Важно отметить, что, поскольку были исследованы сотни вариантов Kuma010, было неосуществимо получить кинетические константы для каждого мутанта; таким образом, представленные показатели степени улучшения представляют собой оценочные значения, а не точные цифры. Представленные в настоящем документе показатели степени улучшения рассчитаны на основании количества продукта расщепления пептида, обнаруженного в анализе деградации методом ЖХ-МС.

^d НО: не определено.

Активности лидеров Kuma060, Kuma061 и Kuma062; и Kuma070, Kuma071 и Kuma072 сравнивали непосредственно друг с другом в анализе расщепления хлеба или пищи вместо оценки расщепления отдельного пептида для подтверждения того, что уменьшение ферментативной активности, возникающее после утраты His-метки, отсутствует. Способность Kuma070 расщеплять PQL- и PQQ-содержащие пептиды сравнивали с Kuma040, как обсуждается ниже.

Kuma020, Kuma021 и Kuma030.

Проводили последующую разработку активного сайта Kuma010 для улучшения активности в отношении субстратов, содержащих трипептиды PQL или PQQ. Конструкторская работа позволила обнаружить мутации G358S и I463T, которые вносят важный вклад в увеличение активности. Мутация G358S являлась модификацией предшествующей мутации, введенной в данном сайте в Kuma010. Мутация I463T устраняла стерическое несоответствие, возникающее в кармане связывания P1' при нацеливании на трипептидные мотивы PQL, и вводила новую прогнозируемую водородную связь, когда субстратом являлся PQQ⁴. Вариант Kuma010, содержащий две данные мутации, продемонстрировал очень большое улучшение по сравнению с исходным Kuma010 и был назван Kuma020.

В данный фермент Kuma020 были введены дополнительные мутации. D399Q и A449Q представляли собой мутации, которые располагались за пределами активного сайта, и вследствие этого согласно прогнозу не оказывали влияния на связывание субстрата. Вместо этого данные две мутации привели к появлению новых спрогнозированных внутримолекулярных водородных связей и, таким образом, согласно прогнозу стабилизировали фермент. Полученный в результате вариант, Kuma021, продемонстрировал еще большее увеличение активности.

Три другие модификации способствовали получению из Kuma021 Kuma030. Kuma030 подробно описан выше.

Kuma040 и Kuma050.

В качестве альтернативы мутациям, перечисленным выше, отличный набор мутаций исходного варианта Kuma010, S319A и H368F, привел к получению отличной архитектуры активного сайта, чем таковая, обнаруженная в Kuma030. В совокупности данные мутации вместе с D399Q, A449Q и I463T (мутации, которые также увеличивали активность Kuma030) позволили получить вариант Kuma040. Kuma041, Kuma042, Kuma070, Kuma071 и Kuma072 содержат активные сайты, подобные Kuma040, в то время как Kuma031, Kuma032, Kuma060, Kuma061 и Kuma062 содержат активные сайты, подобные Kuma030. Kuma050 представляет собой вариант Kuma010, построенный на основе исходного варианта Kuma021 с архитектурой активного сайта, которая имеет много общего с Kuma030, а не с Kuma040. Однако в Kuma050 отсутствует мутация I463T; вместо этого Kuma050 содержит мутацию L270V, которая согласно прогнозу увеличивает активность данного фермента в отношении PQL-содержащих пептидов, но согласно прогнозу препятствует доступу глутамина в карман связывания P1', тем самым уменьшая активность в отношении PQQ-содержащих субстратов. Соответственно, Kuma050 специфично демонстрирует высокий уровень активности в отношении субстратов, содержащих PQL, но не в отношении субстратов, содержащих PQQ. Профиль специфичности Kuma050 являлся желательным в связи с тем, что в нескольких исследованиях было установлено, что иммунодоминантный 33-мерный пептид из α -глиадина, который содержит несколько мотивов PQL и не содержит мотивов PQQ, может представлять собой пептид, ответственный за подавляющее большинство заболеваний в подгруппе пациентов.

Ниже представлены активности Kuma010, Kuma020, Kuma030, Kuma040 и Kuma050 в отношении в высокой степени иммуногенного 33-мерного пептида α -глиадина (LQLQPFPPQRLPYRQPLPYRQPLPYRQPPF (SEQ ID NO: 69)) и 26-мерного пептида γ -глиадина (FLPQQPFPPQPPQPPQPPQPPQPPQ (SEQ ID NO: 70)), которые представляют собой PQL- и PQQ-содержащие пептиды соответственно. Появление продуктов расщепления в течение времени (LPYRQPPF (SEQ ID NO: 137)) (для 33-мерного пептида; FLPPQ (SEQ ID NO: 138 для 26-мерного пептида) представлено на фиг. 5А, В.

В обоих случаях Kuma030 являлся доминирующим исследованным ферментом, несмотря на то, что Kuma040 продемонстрировал практически столь же мощную активность, как и Kuma030, в особенности

в отношении 26-мерного пептида. Как и ожидалось, Kuma050 продемонстрировал хорошую активность в отношении 33-мерного пептида, но крайне низкую активность в отношении 26-мерного пептида. По сравнению с Kuma030 и Kuma040 Kuma020 продемонстрировал умеренную величину активности в отношении обоих пептидов, что согласовывалось с тем, что дизайн данного фермента является промежуточным, как показано выше. Все варианты демонстрируют заметные улучшения по сравнению с исходным ферментом Kuma010.

Kuma060 и Kuma070.

Дополнительная разработанная мутация представляла собой мутацию G320M. Данная мутация не представлялась в особенности перспективной, поскольку согласно прогнозу не увеличивала активность в большой степени; и в действительности данный остаток, хотя и находился в активном сайте, как представляется, не образовывал непосредственного контакта с субстратом глиадином. Однако мутация в данном положении улучшала активность в отношении обоих субстратов в 2-4 раза. Данный результат может быть обусловлен незначительными изменениями остова Kuma010, возникшими вследствие введения метионина, в результате чего конформация остова стала еще более благоприятной для катализа. Мутацию G320M вводили в исходные варианты Kuma030 и Kuma040 для получения ферментов Kuma060 и Kuma070 соответственно.

На фиг. 6А, В представлено улучшение активности, приписываемое мутации G320M в исходном варианте Kuma040, в отношении расщепления обоих иммуногенных эпитопов DQ2.5-glia- α 1a (содержит PQL) и DQ2.5-glia- ω 1 (содержит PQQ).

Серия KumaXX1 и KumaXX2.

За исключением Kuma021, варианты Kuma010, обозначенные KumaXX1 (например, Kuma031), соответствовали варианту KumaXX0 (например, Kuma030), в котором С-концевой сайт расщепления протеазой TEV и 6 $\times$ His-метка были делетированы генетическим способом GSTENLYFQSGALENNNNNN (SEQ ID NO: 139).

Данная метка, которая изначально была добавлена к ферменту кумамолизин-As для получения высокого выхода и упрощала очистку вариантов Kuma010, была удалена в определенных лидирующих вариантах Kuma010, поскольку 6 $\times$ His-метка не является предпочтительной в биологических фармацевтических препаратах. В целом, удаление данной метки не оказывало влияния на активность фермента, несмотря на то, что удаление His-метки, как представляется, приводило к незначительному уменьшению способности фермента Kuma070 (но не фермента Kuma060) расщеплять глиадин при переваривании в желудке цельнозернового хлеба.

В вариантах Kuma010, обозначенных KumaXX2 (например, Kuma032), также отсутствовала His-метка, и данные варианты содержали следующие дополнительные мутации: P171R и H172R. Данные мутации не оказывали влияния на активность фермента, но были введены для упрощения процесса очистки. Данные мутации были введены в пропептидный домен в N-концевой области Kuma010. Поскольку данные мутации находятся в пропептидном домене, они не присутствуют в зрелом, активном ферменте. Данные две мутации находятся в N-концевой области белка, которая присутствует в активном сайте фермента до расщепления под действием низкого уровня pH. Поскольку данная область находится в близости от каталитических остатков, была высказана гипотеза, что данная область подвергается исходному отщеплению даже после очистки фермента Kuma010 в ходе стандартных процедур очистки. Частично отщепленный N-конец фермента остается тесно связанным со зрелым ферментом до тех пор, пока фермент не подвергнется воздействию кислоты. Несмотря на то, что данный исходный самопроцессинг в ходе очистки белка отрицательно не влияет на активность, самопроцессинг может усложнить интерпретацию анализа методом ДСН-ПААГ (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) лицами, недостаточно знакомыми с ферментом Kuma010. Таким образом, с целью упростить профиль ДСН-ПААГ очищенного фермента были введены мутации P171R и H172R для уменьшения количества исходного N-концевого отщепления, которое возникает в ходе процесса очистки белка.

Поскольку в вариантах KumaXX1 и KumaXX2 отсутствует His-метка, данные варианты нельзя очистить методом никель-аффинной хроматографии. Вместо этого данные варианты очищают методом анионообменной хроматографии. Следующий график демонстрирует активность вариантов Kuma030, Kuma031, Kuma032, Kuma040, Kuma041 и Kuma042 в отношении иммуногенного пептида глиадина DQ2.5-glia- α 1a. В данном случае все белки очищали методом анионообменной хроматографии (даже Kuma030 и Kuma040, которые содержат интактную 6 $\times$ гистициновую метку) для сравнения. Как показано на фиг. 7, мутации P171R и H172R, как представляется, не оказывали отрицательного влияния на активность, поскольку Kuma032 и Kuma042 демонстрируют сравнимую активность с Kuma030 и Kuma040 (Kuma042 демонстрирует даже незначительное увеличение активности в отношении данного субстрата по сравнению с Kuma040).

Вариант Kuma010 Kuma062 демонстрирует высокий уровень активности, и в Kuma062 отсутствует метка His. Сравнение Kuma062 с Kuma030 и Kuma040 показано на фиг. 8А, В (слева, обнаружение полноразмерного DQ2.5-glia- ω 1; справа, обнаружение продукта расщепления).

Ферментативная кинетика.

Оценивали биохимические параметры Kuma010, Kuma030, Kuma040 и Kuma050. Данные параметры оценивали с применением иммуногенных эпитопов глиаина DQ2.5-glia- α 1a и DQ2.5-glia- ω 1. Анализы расщепления проводили с применением 100 нМ фермента при температуре 37°C в 100 мМ буфере NaOAc, pH 4,0. В табл. 6 представлена начальная скорость реакции расщепления как функция концентрации субстрата. Из полученных данных с применением уравнения Михаэлиса-Ментен рассчитывали k_{cat} и K_m .

Биохимические параметры всех исследованных ферментов представлены в табл. 6.

Таблица 6

Фермент	[Фермент]	Субстрат	Vmax (М с ⁻¹)	Km (мМ)	Kcat (с ⁻¹)	kcat/Km (М ⁻¹ с ⁻¹)
Kuma010	100 нМ	Glia_α1	3,70E-07	4,6 мМ	3,7	819
Kuma030	100 нМ	Glia_α1	1,74E-06	1,9 мМ	17,4	9034
Kuma040	100 нМ	Glia_α1	1,49E-06	0,86 мМ	16,3	19109
Kuma050	100 нМ	Glia_α1	1,42E-06	2,5 мМ	14,2	5613
Kuma010	100 нМ	Glia_α1	1,22E-07	16,4 мМ	1,2	74
Kuma030	100 нМ	Glia_α1	2,73E-06	8,4 мМ	27,3	3268
Kuma040	100 нМ	Glia_α1	2,46E-06	15,3 мМ	24,6	1603
Kuma050	100 нМ	Glia_α1	2,78E-06	5,0 мМ	27,8	56

Мутации, введенные в Kuma030 и Kuma040, в значительной степени увеличивают активность в отношении данных пептидов, что делает перспективным применение данных ферментов для детоксикации пептидов, связанных с целиакией. Как и прогнозировали, мутации, введенные в Kuma050, увеличивали активность в отношении пептида DQ2.5-glia- α 1a, но не в отношении пептида DQ2.5-glia- ω 1.

Перечень источников к примеру 2.

- (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**.
- (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.
- (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**, 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**.
- (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* **2000**, 191, 603.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, где:

(a) остаток 467 представляет собой Ser, остаток 267 представляет собой Glu и остаток 271 представляет собой Asp;

(b) указанный полипептид содержит замену аминокислоты в одном или более положениях остатков по сравнению с остатками последовательности SEQ ID NO: 1, которая выбрана из группы, состоящей из замен аминокислот 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 и 463A/L/M/Q/R/T/V, при этом указанный полипептид обладает способностью расщеплять глиадин.

2. Полипептид по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90

или 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

3. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 399Q и 449Q.

4. Полипептид по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 358S и 463T.

5. Полипептид по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 262E, 269T, 354Q, 358S, 399Q, 449Q и 463T.

6. Полипептид по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 319A, 368F, 399Q, 449Q и I463T.

7. Полипептид по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 262E, 269T, 270V, 354Q, 358S, 399Q и A449Q.

8. Полипептид по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 262E, 269T, 320M, 354Q, 358S, 399Q, 449Q и 463T.

9. Полипептид по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 319A, 320M, 368F, 399Q, 449Q и 463T.

10. Полипептид по любому из пп.1-9, содержащий замену аминокислоты в одном или более положениях аминокислот, которые выбраны из группы, состоящей из 105, 171, 172, 173, 174 и 456 по сравнению с остатками последовательности SEQ ID NO: 1.

11. Полипептид по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59.

12. Полипептид по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59, при этом указанная аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129.

13. Полипептид по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59, которая включает по меньшей мере одну делецию аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 59.

14. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71, где:

(a) остаток 278 представляет собой Ser, остаток 78 представляет собой Glu и остаток 82 представляет собой Asp;

(b) указанный полипептид содержит замену аминокислоты в одном или более положениях остатков по сравнению с остатками последовательности SEQ ID NO: 71, которая выбрана из группы, состоящей из замен аминокислот 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, 260E/N/Q, 272R и 274A/L/M/Q/R/T/V, при этом указанный полипептид обладает способностью расщеплять глиадин.

15. Полипептид по п.14, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71.

16. Полипептид по п.14, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 210Q и 260Q.

17. Полипептид по п.14, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 169S и 274T.

18. Полипептид по любому из пп.14-17, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 73E, 80T, 165Q, 169S, 210Q, 260Q и 274T.

19. Полипептид по любому из пп.14-17, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 130A, 179F, 210Q, 260Q и 274T.

20. Полипептид по любому из пп.14-17, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 73E, 80T, 81V, 165Q, 169S, 210Q и 260Q.

21. Полипептид по любому из пп.14-17, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 73E, 80T, 131M, 165Q, 169S, 210Q, 260Q и 274T.

22. Полипептид по любому из пп.14-17, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит замены аминокислот 130A, 131M, 179F, 210Q, 260Q и 274T.

23. Полипептид по любому из пп.1-22, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-42, 44-60 и 72-112 и 114-130 и 150-155.

24. Полипептид по п.23, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 129.

25. Полипептид по любому из пп.1-24, дополнительно содержащий гистидиновую метку на С-конце указанного полипептида.

26. Полипептид по п.25, при этом указанная гистидиновая метка содержит аминокислотную последовательность GSTENLYFQSGALENNNNNN (SEQ ID NO: 139).

27. Полипептид по п.25, отличающийся тем, что указанная гистидиновая метка включает отщепляемую гистидиновую метку, содержащую аминокислотную последовательность X_N PQ(L/Q)PX_NNNNNNN (SEQ ID NO: 131), где X_N представляет собой линкер, состоящий из 1-25 остат-

ков аминокислот.

28. Полипептид по п.27, отличающийся тем, что указанная отщепляемая гистидиновая метка содержит аминокислотную последовательность GSSGSSGSQPQLPYGSSGSSGSHHHHHH (SEQ ID NO: 132).

29. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп.1-28.

30. Вектор экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.29.

31. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии нуклеиновой кислоты по п.30, для получения полипептида по любому из пп.1-28.

32. Фармацевтическая композиция для лечения целиакии спру или нецелиакийной чувствительности к глютену (НЦЧГ), содержащая эффективное количество полипептида по любому из пп.1-28 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Фармацевтическая композиция по п.32, содержащая полипептид по п.11.

34. Фармацевтическая композиция по п.32, содержащая полипептид по п.12.

35. Фармацевтическая композиция по п.32, содержащая полипептид по п.13.

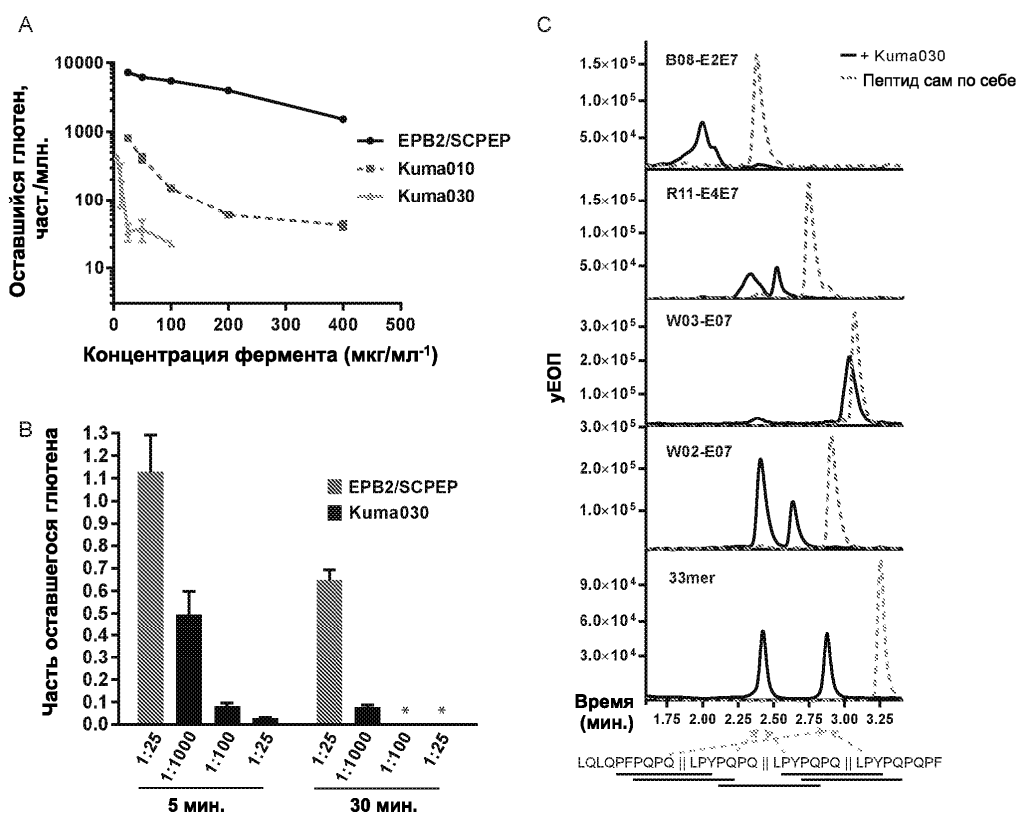
36. Способ лечения целиакии спру или нецелиакийной чувствительности к глютену (НЦЧГ), причем указанный способ включает введение индивидууму, имеющему целиакию спру или НЦЧГ, количества полипептида согласно любому из пп.1-28 или фармацевтической композиции по любому из пп.32-35, которое эффективно для лечения целиакии спру или НЦЧГ.

37. Способ по п.36, который включает введение индивидууму, имеющему целиакию спру или НЦЧГ, количества полипептида по п.11, эффективного для лечения целиакии спру или нецелиакийной чувствительности к глютену (НЦЧГ).

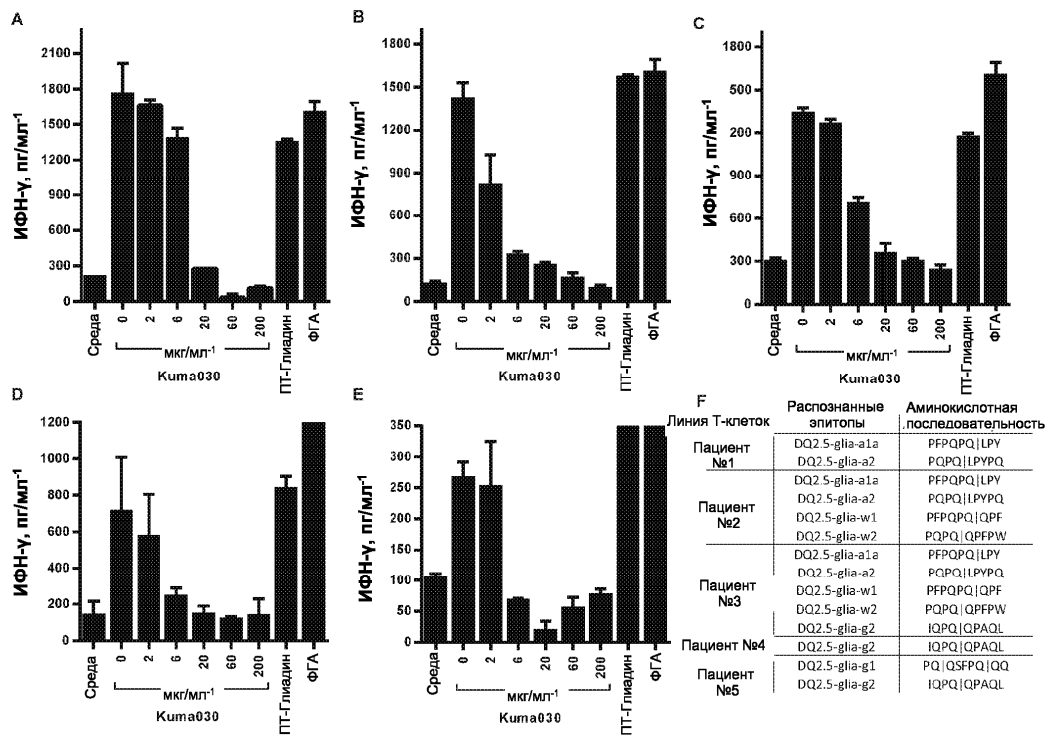
38. Способ по п.36, который включает введение индивидууму, имеющему целиакию спру или НЦЧГ, количества полипептида по п.12, эффективного для лечения целиакии спру или нецелиакийной чувствительности к глютену (НЦЧГ).

39. Способ по п.36, который включает введение индивидууму, имеющему целиакию спру или НЦЧГ, количества полипептида по п.13, эффективного для лечения целиакии спру или нецелиакийной чувствительности к глютену (НЦЧГ).

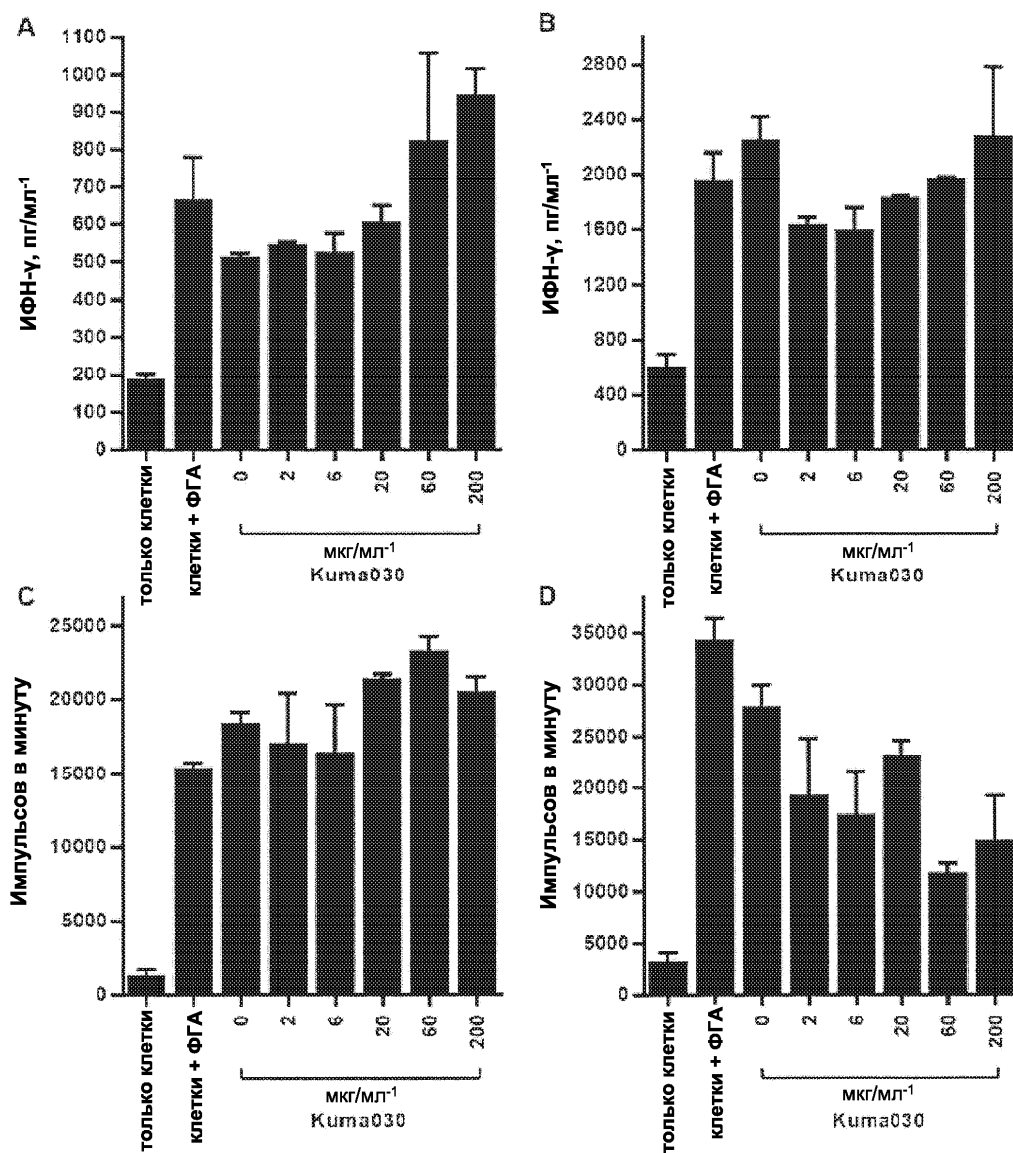
40. Способ по любому из пп.36-39, отличающийся тем, что указанный полипептид вводят перорально.



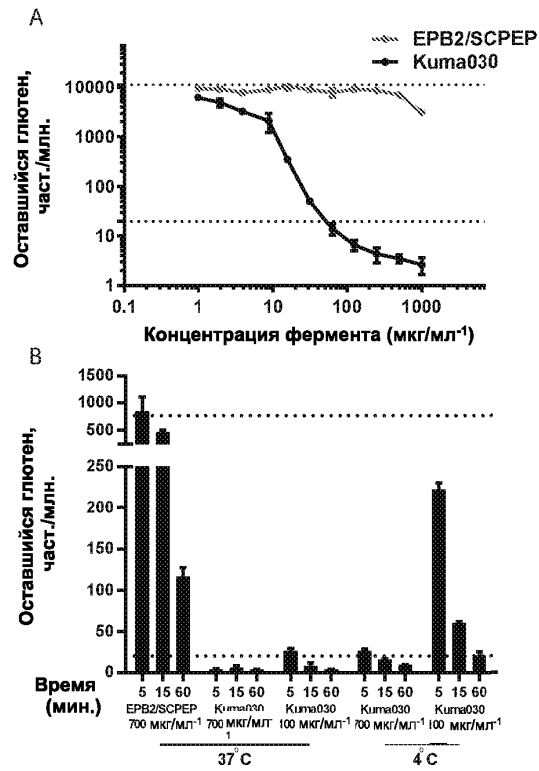
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

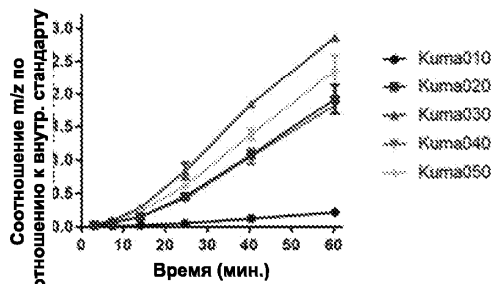


Фиг. 4

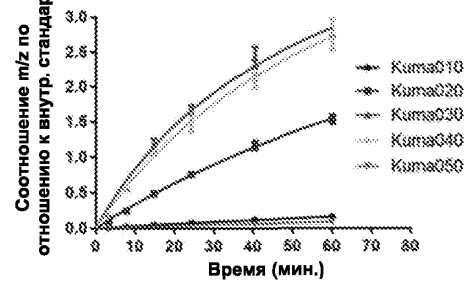
А

В

Расщепление 33-мерного пептида: появление продукта расщепления LPYRQRPQPF



Расщепление 26-мерного пептида: появление продукта расщепления FLQPQ

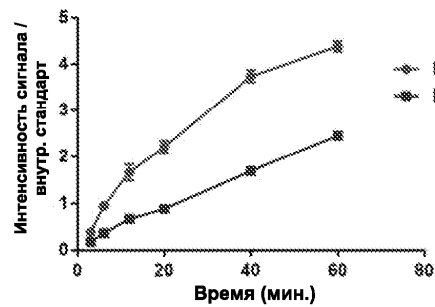


Фиг. 5

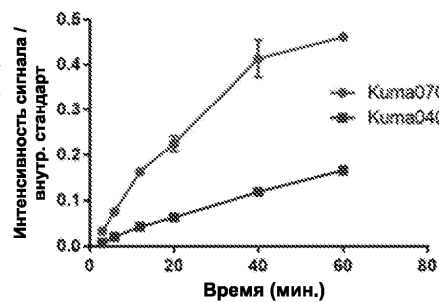
А

В

Расщепление DQ2.5-glia-1

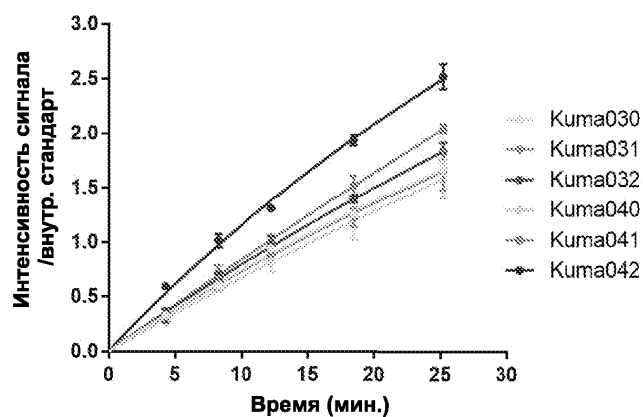


Расщепление DQ2.5-glia-1

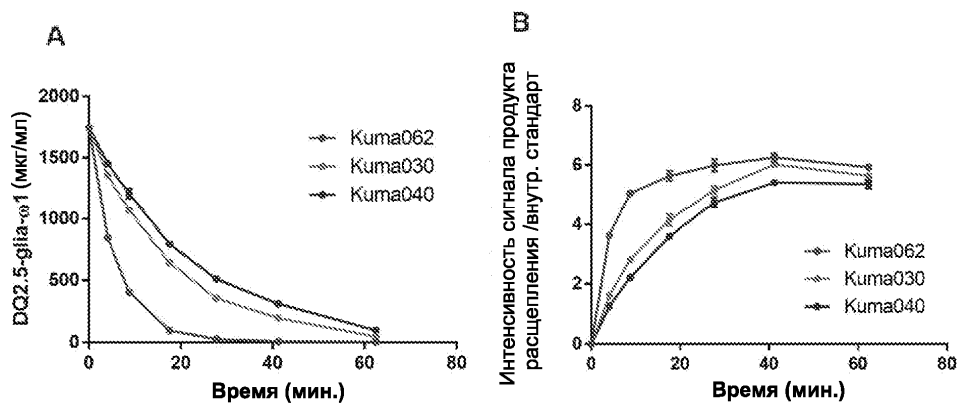


Фиг. 6

Расщепление DQ2.5-glia-1



Фиг. 7



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2