



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 993**

51 Int. Cl.:
A61K 38/48 (2006.01)
A61P 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03711089 .7**
96 Fecha de presentación : **14.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1572127**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Tratamiento con enzimas de productos alimenticios para celiaquía.**

30 Prioridad: **14.02.2002 US 357238 P**
14.05.2002 US 380761 P
28.06.2002 US 392782 P
31.10.2002 US 422933 P
20.11.2002 US 428033 P
20.12.2002 US 435881 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.06.2011

73 Titular/es: **The Board of Trustees of the Leland
Stanford Junior University**
1705 El Camino Real
Palo Alto, California 94306, US

72 Inventor/es: **Hausch, Felix;**
Gray, Gary;
Shan, Lu y
Khosla, Chaitan

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 361 993 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento con enzimas de productos alimenticios para celiacía

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] En 1953 se reconoció por primera vez que la ingestión de gluten, una proteína alimentaria común presente en trigo, cebada y centeno, producía una enfermedad en individuos sensibles. El gluten es una mezcla compleja de glutenina rica en glutamina y prolina y moléculas de prolamina, que se cree que es responsable de la inducción de enfermedad. La ingestión de tales proteínas por individuos sensibles produce un aplanamiento del revestimiento epitelial similar a alfombra normalmente lujoso del intestino delgado que se sabe que es responsable de la eficaz y extensa digestión terminal de péptidos y otros nutrientes. Síntomas clínicos de la celiacía incluyen fatiga, diarrea crónica, intolerancia de nutrientes, pérdida de peso, distensión abdominal, anemia, además de un riesgo sustancialmente posible del desarrollo de osteoporosis y tumores malignos intestinales (linfoma y carcinoma).
10 La enfermedad tiene una incidencia de aproximadamente 1 de cada 200 en poblaciones europeas.

[0002] Una enfermedad relacionada es la dermatitis herpetiforme, que es una erupción crónica caracterizada por grupos de vesículas intensamente pruríticas, pápulas y lesiones similares a urticaria. Los depósitos de IgA se producen en casi toda la piel de aspecto normal y perilesional. La enteropatía asintomática sensible al gluten se encuentra en el 75 al 90% de los pacientes y en algunos de sus parientes. La aparición es normalmente gradual. El picor y el escozor son intensos, y el rascarse frecuentemente oculta las lesiones primarias con eczematización de piel cercana, conduciendo a un diagnóstico erróneo de eczema. El estricto cumplimiento terapéutico de una dieta sin gluten durante periodos prolongados puede controlar la enfermedad en algunos pacientes, obviando o reduciendo el requisito de farmacoterapia. Algunas veces se recetan dapsona, sulfapiridina y colchicinas para aliviar el picor.
20
25

[0003] Generalmente se considera que la celiacía es una enfermedad autoinmunitaria y los anticuerpos encontrados en el suero de los pacientes soportan una teoría de una naturaleza inmunológica de la enfermedad. Los anticuerpos para la transglutaminasa de tejido (tTG) y la gliadina aparecen en casi el 100% de los pacientes con celiacía activa, y la presencia de tales anticuerpos, particularmente de la clase IgA, se ha usado en el diagnóstico de la enfermedad.
30

[0004] La gran mayoría de los pacientes expresa las moléculas HLA-DQ2 [DQ(a1*0501, b1*02)] y/o DQ8 [DQ(a1*0301, b1*0302)]. Se cree que la lesión intestinal se produce por interacciones entre oligopéptidos de gliadina específicos y el antígeno HLA-DQ2 o DQ8, que a su vez induce la proliferación de linfocitos T en las capas subepiteliales. Los linfocitos colaboradores T1 y las citocinas desempeñan aparentemente una función importante en un proceso inflamatorio local que conduce a atrofia vellositaria del intestino delgado.
35

[0005] Actualmente no hay una buena terapia para la enfermedad, excepto evitar completamente todos los alimentos que contengan gluten. Aunque la eliminación del gluten ha transformado el pronóstico para niños y lo ha mejorado sustancialmente para adultos, algunas personas todavía mueren de la enfermedad, principalmente adultos que tenían una enfermedad grave desde el principio. Una causa importante de muerte es la enfermedad linforreticular (especialmente linfoma intestinal). No se sabe si una dieta sin gluten disminuye este riesgo. La remisión clínica aparente está frecuentemente asociada a recaída histológica que sólo se detecta por biopsias de evaluación o por un aumento de los títulos de EMA.
40
45

[0006] El gluten se usan tan ampliamente, por ejemplo, en sopas comerciales, salsas, helados, perritos calientes y otros alimentos que los pacientes necesitan listas detalladas de productos alimenticios para evitarlos y consejo experto de un bromatólogo familiar con la enfermedad celíaca. La ingestión de incluso pequeñas cantidades de gluten puede evitar la remisión o inducir recaída. También pueden requerirse vitaminas complementarias, minerales y antianémicos, dependiendo de la deficiencia. Algunos pacientes responden mal o no responden a la eliminación del gluten, tanto debido a que el diagnóstico es incorrecto como debido a que la enfermedad es resistente al tratamiento. En el último caso, los corticosteroides orales (por ejemplo, prednisona 10 a 20 mg dos veces al día) pueden inducir respuesta.
50

[0007] En vista de la naturaleza grave y extendida de la celiacía, se necesitan procedimientos mejorados para tratar o mejorar los efectos de la enfermedad. La presente invención trata tales necesidades.
55

[0008] Messer y col., Gut, agosto de 1964, vol 5; 295-303, se refiere a estudios del mecanismo de destrucción de la acción tóxica del gluten de trigo en enfermedad celíaca mediante papaina bruta.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0009] La presente invención proporciona procedimientos para tratar los síntomas de la celiaquía y/o la dermatitis herpetiforme disminuyendo los niveles de oligopéptidos tóxicos del gluten en productos alimenticios, tanto antes de como después de la ingestión por un paciente. La presente invención se refiere al descubrimiento de que ciertos oligopéptidos del gluten son resistentes a la escisión por las enzimas gástricas y pancreáticas, de que la presencia de tales péptidos produce efectos tóxicos y de que el tratamiento enzimático puede eliminar tales péptidos y sus efectos tóxicos. Por digestión con glutenasas que son prolil-endopeptidasas, estos oligopéptidos tóxicos se escinden en fragmentos, previniéndose o aliviándose así sus efectos tóxicos en pacientes con celiaquía o dermatitis herpetiforme.

[0010] Por consiguiente, la presente invención proporciona una preparación que comprende una glutenasa que puede atenuar la toxicidad del gluten para uso en un procedimiento de reducción de los síntomas de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme en un sujeto mediante la administración de dicha preparación a dicho sujeto, en el que dicha glutenasa es una prolil-endopeptidasa (PEP).

[0011] En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para hacer que un producto alimenticio que contiene gluten sea menos tóxico para un individuo que padece celiaquía, comprendiendo dicho procedimiento poner dicho producto alimenticio que contiene gluten en contacto con una prolil-endopeptidasa *in vitro*, escindiéndose los péptidos de gluten inmunogénicos en el producto alimenticio que contiene gluten en fragmentos no tóxicos.

[0012] Estas y otras realizaciones de la invención se explican en este documento más adelante y en las reivindicaciones adjuntas.

[0013] En un aspecto de la presente divulgación, un producto alimenticio se trata con una glutenasa antes del consumo por el paciente. En otro aspecto de la presente divulgación, una glutenasa se administra a un paciente y actúa internamente para destruir los oligopéptidos tóxicos, en otro aspecto de la presente divulgación, un organismo recombinante que produce una glutenasa se administra a un paciente. En otro aspecto de la presente divulgación se usa terapia génica para proveer al paciente de un gen que expresa una glutenasa que destruye los oligopéptidos tóxicos.

[0014] En un aspecto, la presente divulgación describe procedimientos para la administración de formulaciones entéricas de una o más glutenasas, pudiendo estar cada una presente como un agente único o una combinación de agentes activos. En otro aspecto de la presente divulgación, formas estabilizadas de glutenasas se administran al paciente, formas estabilizadas que son resistentes a la digestión en el estómago, por ejemplo, a condiciones ácidas. Procedimientos alternativos de administración incluyen modificación genética de células del paciente, por ejemplo, enterocitos, para expresar aumentos de niveles de peptidasas que pueden escindir oligopéptidos inmunogénicos de gliadina; pretratamiento de alimentos con glutenasas; la introducción de microorganismos que expresan tales peptidasas de manera que colonicen transitoria o permanentemente el tracto intestinal del paciente intestinal; y similares.

[0015] En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que contienen una o más glutenasas que son prolil-endopeptidasas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales formulaciones incluyen formulaciones en las que la prolil-endopeptidasa está contenida dentro de un recubrimiento entérico que permite la administración del agente activo al intestino y formulaciones en las que los agentes activos están estabilizados para resistir la digestión en las condiciones ácidas del estómago. La formulación puede comprender una o más glutenasas o una mezcla o "combinación" de agentes que tienen diferentes actividades.

[0016] En otro aspecto, la invención proporciona productos alimenticios derivados de alimentos que contienen gluten que han sido tratados para eliminar o para reducir a niveles no tóxicos los oligopéptidos derivados del gluten que son tóxicos para pacientes con celiaquía, y procedimientos para tratar alimentos para hidrolizar oligopéptidos tóxicos del gluten. En otros aspectos, la divulgación proporciona microorganismos recombinantes útiles en la hidrólisis de los oligopéptidos derivados del gluten que son tóxicos para pacientes con celiaquía de productos alimenticios; procedimientos para producir glutenasas que digieren los oligopéptidos derivados del gluten que son tóxicos para pacientes con celiaquía; preparaciones purificadas de las glutenasas que digieren los oligopéptidos derivados del gluten que son tóxicos para pacientes con celiaquía; y vectores recombinantes que codifican la expresión de glutenasas que digieren los oligopéptidos derivados del gluten que son tóxicos para pacientes con celiaquía.

[0017] Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se describen más adelante en más detalle.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 [0018]

Figs. 1A-1B. La membrana del borde en cepillo catalizó la digestión del péptido de gliadina inmunodominante. Fig. 1A: Trazas de EM-CL de péptidos tal como se muestra después de la digestión con 27 ng/μl de proteína de membrana del borde en cepillo (BBM) de rata durante el tiempo indicado. Los productos de reacción se separaron por HPLC en fase inversa y se detectaron por espectroscopía de masas (recuentos de iones m/z = 300-2000 g/mol). Los fragmentos de péptidos indicados se confirmaron por patrones de fragmentación de EM en tándem característicos. El pico de SEQ ID NO:2 pyroQLQFPQPQLPY se corresponde con una especie piroglutaminada del extremo N que se genera durante la purificación por HPLC del material de partida sintético. Fig. 1 B: Abundancia de productos de digestión individuales en función del tiempo. Los fragmentos de péptidos en la Fig. 1A se cuantificaron integrando el área del pico de EM correspondiente (m/z = 300-2000 g/mol). Las intensidades de EM resultantes se representan en función del tiempo de digestión (sólo con BBM). El experimento de digestión se repitió en presencia de DPP IV exógena de *Aspergillus fumigatus* (Chemicon International, CA, 0,28 μU de DPP IV/ng de proteína de BBM) y se analizó como antes (barras blancas). La abundancia relativa de diferentes productos intermedios podría estimarse a partir de las trazas UV₂₈₀ y experimentos de control usando patrones auténticos. El esquema insertado muestra un diagrama interpretativo de las vías de digestión de QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1) y sus productos intermedios, las peptidasas de BBM que participan en cada etapa y los residuos de aminoácidos que son liberados. La vía de ruptura preferida se indica en negrita. APN = aminopeptidasa N, CPP = carboxipeptidasa P, DPP IV = dipeptidil-dipeptidasa IV.

Fig. 2A-2B. Digestión del extremo C del péptido de gliadina inmunodominante por la membrana del borde en cepillo. Fig. 2A: PQPQLPYPQPQLPY (SEQ ID NO:3) se digirió por 27 ng/μl de preparaciones de proteína de membrana del borde en cepillo (BBM) durante el tiempo indicado y se analizó como en la Fig. 1A. La identidad del material de partida y el producto PQPQLPYPQPQLP (SEQ ID NO:4) se corroboraron por fragmentación de EM-EM. La intensidades de masa intrínsecas de los dos péptidos fueron idénticas, y el coeficiente de extinción UV₂₈₀ de PQPQLPYPQPQLP (SEQ ID NO:4) fue la mitad del coeficiente de extinción del material de partida según la pérdida de una tirosina. Todos los otros productos intermedios fueron: 51%. El esquema de más abajo muestra la vía de digestión de BBM propuesta de PQPQLPYPQPQLPY (SEQ ID NO:3) sin procesamiento del extremo N observado (flecha cruzada) y la eliminación de la tirosina del extremo C por carboxipeptidasa P (CPP) en negrita. Otro procesamiento del extremo C por dipeptidil-carboxipeptidasa (DCP) fue demasiado lento para permitir el análisis de las posteriores etapas de digestión (flechas de puntos). Fig. 2B: Influencia de la dipeptidil-carboxipeptidasa sobre la digestión del extremo C. PQPQLPYPQPQLPY (SEQ ID NO:3) en solución salina tamponada con fosfato:solución salina tamponada con Tris = 9:1 se digirió por BBM sola o con adición de DCP de pulmón de conejo exógena (Cortex Biochemicals, CA) o captopril. Después de la incubación durante la noche, la fracción de PQPQLPYPQPQLP (SEQ ID NO:4) acumulada (en comparación con cantidades iniciales de PQPQLPYPQPQLPY (SEQ ID NO:3) a t = 0 min) se analizó como en la Fig. 2A, pero con un gradiente de acetonitrilo del 20-65% en 6-35 minutos.

Fig. 3. Aceleración dependiente de la dosis de la digestión mediada por el borde en cepillo por endoproteasas exógenas. Como se observa de la Fig. 2A-2B, el péptido PQPQLPYPQPQLP (SEQ ID NO:4) es estable a una posterior digestión. Este péptido se digirió con 27 ng/μl de membranas del borde en cepillo, tanto solas, con cantidades crecientes de prolil-endopeptidasa exógena (PEP, actividad específica 28 μU/pg) de *Flavobacterium meningosepticum* (US Biological, MA) como con elastasa adicional (E-1250, Sigma, MO), bromelaína (B-5144, Sigma, MO) o papaína (P-5306, Sigma, MO) (12). Después de una hora, la fracción de PQPQLPYPQPQLP (SEQ ID NO:4) restante (en comparación con la cantidad inicial t = 0 min) se analizó y se cuantificó como en la Fig. 1.

Figura 4. Productos de digestión de α2-gliadina mediada por proteasas gástricas y pancreáticas bajo condiciones fisiológicas. El análisis se realizó por EM-CL. Los péptidos más largos están marcados por flechas y también en la secuencia de α2-gliadina (recuadro).

Figura 5. Digestión *in vivo* de la membrana del borde en cepillo de péptidos. Trazas de CL-UV₂₁₆ de 25 μM de LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO:12) antes de la perfusión y después de la perfusión (tiempo de residencia = 20 min). Trazas de CL-UV₂₁₆ de 60 μM de QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1)

transportados a través de la capa epitelial. Sin embargo, los glútenes son particularmente resistentes a las peptidasas, que puede atribuirse al contenido de prolina normalmente alto de estas proteínas, un residuo que es inaccesible para la mayoría de las peptidasas gástricas.

- 5 **[0024]** La asimilación normal de proteínas alimentarias por el intestino humano puede dividirse en tres fases principales: (i) iniciación de la proteólisis en el estómago por pepsina y escisión del extremo endo y C altamente eficiente en la cavidad del intestino delgado superior (duodeno) por proteasas y carboxipeptidasas pancreáticas secretadas; (ii) procesamiento adicional de fragmentos de oligopéptidos resultantes por exo y endopeptidasas ancladas en la membrana de la superficie de borde en cepillo del epitelio del intestino delgado superior (yeyuno); y
- 10 (iii) transporte facilitado de los aminoácidos, di- y tripéptidos resultantes a través de las células epiteliales en la lámina propia, de la que estos nutrientes entran en los capilares para la distribución por todo el cuerpo. Debido a que la mayoría de las proteasas y peptidasas normalmente presentes en el estómago e intestino delgado humanos son incapaces de hidrolizar los enlaces amida de residuos de prolina, en el presente documento se muestra que la abundancia de residuos de prolina en gliadinas y proteínas relacionadas de trigo, centeno y cebada pueden
- 15 constituir un obstáculo digestivo importante para las enzimas que participan en las fases (I) y (II) anteriores. Esto conduce a un aumento de la concentración de oligopéptidos derivados del gluten relativamente estable en el intestino. Además, debido a que la actividad de aminopeptidasa y especialmente de carboxipeptidasa hacia oligopéptidos con residuos de prolina en los extremos N y C, respectivamente, es baja en el intestino delgado, la desintoxicación de oligopéptidos del gluten en la fase (III) anterior también es baja. Administrando PEP que pueden
- 20 escindir tales oligopéptidos del gluten según los procedimientos de la invención, la cantidad de péptidos tóxicos disminuye, reduciéndose o bloqueándose así la progresión de la enfermedad.

[0025] La transglutaminasa de tejido (tTGasa), una enzima encontrada en la superficie extracelular en muchos órganos que incluyen el intestino, cataliza la formación de enlaces iso-peptídicos entre residuos de glutamina

25 y lisina de diferentes polipéptidos, conduciendo a reticulaciones proteína-proteína en la matriz extracelular. La enzima tTGasa es el foco primario de la respuesta del autoanticuerpo en celiacía. Las gliadinas, secalinas y hordeínas contienen varias secuencias ricas en residuos de Pro-Gln que son sustratos de alta afinidad para tTGasa; la desamidación catalizada por tTGasa de al menos algunas de estas secuencias aumenta espectacularmente su afinidad por HLA-DQ2, el alelo del MHC de clase II presente en >90% de pacientes con celiacía. La presentación

30 de estos epitopes desamidados por células presentadoras de antígeno positivas para DQ2 estimula eficazmente la proliferación de linfocitos T específicos para gliadina de biopsias intestinales de la mayoría de los pacientes con celiacía. Los efectos tóxicos del gluten incluyen inmunogenicidad de los oligopéptidos del gluten, que conduce a inflamación; la teoría de la lectina predice que los péptidos de gliadina también pueden unirse directamente a receptores de superficie.

35 **[0026]** La presente divulgación se refiere generalmente a procedimientos y a reactivos útiles en el tratamiento de productos alimenticios que contienen gluten con enzimas que digieren los oligopéptidos tóxicos para pacientes con celiacía. Aunque en este documento se ejemplifican enzimas específicas, distintas enzimas y procedimientos alternativos evidentes para aquellos expertos en la materia tras la contemplación de esta divulgación son igualmente

40 aplicables y adecuados para uso. Los procedimientos de la divulgación, además de las pruebas para determinar su eficacia en un paciente o aplicación particular, pueden llevarse a cabo según las enseñanzas en este documento usando procedimientos habituales en la materia. Por tanto, la práctica puede emplear técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología dentro del alcance de aquellos expertos en la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía

45 tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Galt, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols In Molecular Biology" (F.M. Ausubel y col., eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis y col., eds., 1994); y "Current Protocols in

50 immunology" (J.E. Coligan y col., eds., 1991); además de ediciones actualizadas o revisadas de todas las anteriores.

[0027] Como se usa en este documento, el término "glutenasa" se refiere a una PEP útil en los procedimientos de la presente invención que puede escindir, sola o en combinación con enzimas endógenas o exógenamente añadidas, oligopéptidos tóxicos de proteínas del gluten de trigo, cebada, avena y centeno en

55 fragmentos no tóxicos. El gluten es la fracción de proteína en la masa del cereal que puede subdividirse en gluteninas y prolaminas, que se subclasifican en gliadinas, secalinas, hordeínas y aveninas de trigo, centeno, cebada y avena, respectivamente. Para una discusión adicional de proteínas del gluten véase la revisión de Wieser (1998) Acta Paediatr Suppl. 412:3-9.

- [0028]** En una realización, el término “glutenasa” como se usa en este documento se refiere a una enzima proteasa o peptidasa que cumple uno o más de los criterios proporcionados en este documento. Usando estos criterios, un experto en la materia puede determinar la idoneidad de una enzima candidata para uso en los procedimientos de la revelación. Muchas enzimas cumplirán múltiples criterios que incluyen dos, tres, cuatro o más de los criterios, y algunas enzimas cumplirán todos los criterios. Los términos “proteasa” o “peptidasa” pueden referirse a una glutenasa y como se usa en este documento describen una proteína o fragmento de la misma con la capacidad de escindir enlaces peptídicos, pudiendo ser el enlace peptídico escindible tanto ser terminal como interno en oligopéptidos o proteínas mayores. Las PEP son glutenasas útiles en la práctica de la presente invención.
- 10 **[0029]** Las PEP de la invención incluyen enzimas proteasas y peptidasas que tienen al menos aproximadamente el 20% de identidad de secuencias al nivel de aminoácidos, más normalmente al menos aproximadamente el 40% de identidad de secuencias, y preferentemente al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencias con una de las siguiente peptidasas: prolil-endopeptidasa (PEP) de *F. meningosepticum* (número de acceso de GenBank D10980), PEP de *A. hydrophila* (número de acceso de GenBank D14005), PEP de
- 15 *S. capsulata* (número de acceso de GenBank AB010298).
- [0030]** La identificación basada en homología (por ejemplo, por un análisis de secuencias PILEUP) de prolil-endopeptidasas pueden ser realizada rutinariamente por aquellos expertos en la materia tras la contemplación de esta divulgación para identificar PEP adecuadas para uso en los procedimientos de la presente invención. Las PEP se producen en microorganismos, plantas y animales. Las PEP pertenecen a la superfamilia de las serina-proteasas de enzimas y tienen una tríada catalítica conservada compuesta por residuos de Ser, His y Asp. Se han caracterizado algunos de estos homólogos, por ejemplo, las enzimas de *F. meningosepticum*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas punctata*, *Novosphingobium capsulatum*, *Pyrococcus furiosus* y de fuentes de mamífero son PEP bioquímicamente caracterizadas. Otras tales como las enzimas de *Nostoc* y *Arabidopsis* es probable que sean
- 20 PEP, pero no se han caracterizado completamente hasta la fecha. Todavía otras, tales como las enzimas de *E. coli* y *M. xanthus*, pueden no ser PEP, pero son miembros homólogos de la superfamilia de las serina-proteasas y pueden ser materiales de partida útiles en la ingeniería de proteínas para hacer una PEP útil en la práctica de la presente invención. Con respecto a la enzima de *F. meningosepticum*, la identidad de secuencias por emparejamiento de esta familia de enzimas está en el intervalo del 30-60%. Por consiguiente, las PEP incluyen enzimas que tienen
- 25 $>30\%$ de identidad con la enzima de *F. meningosepticum* (como en las enzimas de *Pyrococcus*), o que tiene $>40\%$ de identidad (como en las enzimas de *Novosphingobium*), o que tiene $>50\%$ de identidad (como en las enzimas de *Aeromonas*) con la enzima de *F. meningosepticum*.
- 30 **[0031]** Una glutenasa que es una PEP de la invención incluye una peptidasa o proteasa que tiene una actividad específica de al menos 2,6 U/mg, preferentemente 26 U/mg y más preferentemente 260 U/mg para la escisión de un péptido que comprende uno de más de los siguientes motivos: Gly-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA (en la que Z es un grupo benciloxicarbonilo), y Hip-His-Leu, en la que “Hip” es ácido hipúrico, pNA es para-nitroanilida, y 1 U es la cantidad de enzima requerida para catalizar la reposición de 1 μmol de sustrato por minuto.
- 35 **[0032]** Una PEP de la invención incluye una enzima que pertenecen a la siguiente clasificación de enzimas EC 3.4.21.26.
- [0033]** Una PEP de la invención incluye una enzima que tiene una k_{cat}/K_m de al menos aproximadamente 2,5 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$, normalmente al menos aproximadamente 250 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ y preferentemente al menos aproximadamente 25000 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ para la escisión de cualquiera de los siguientes péptidos bajo condiciones óptimas; QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1), PQQPLYPQQLPY (SEQ ID NO:3), QPQQSFQQQ (SEQ ID NO:13), QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:14), PQQPLYPQQLPY (SEQ ID NO:15), QPQQSFPEQQ (SEQ ID NO:18). Una glutenasa de la invención incluye peptidasa o proteasa que tiene una especificidad $k_{\text{cat}}/K_m > 2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el sustrato fluorogénico extinguido Abz-QPQQP-Tyr(NO₂)-D.
- 40 **[0034]** Una PEP útil en la práctica de la presente invención puede identificarse por su capacidad para escindir un sustrato pretratado para eliminar oligopéptidos tóxicos del gluten, siendo un “sustrato pretratado” una proteína gliadina, hordeína, secalina o avenina que ha sido tratada con cantidades fisiológicas de proteasas gástricas y pancreáticas que incluyen pepsina (relación mástica 1:100), tripsina (1:100), quimotripsina (1:100), elastasa (1:500) y las carboxipeptidasas A y B (1:100). La digestión con pepsina puede realizarse a pH 2 durante 20 min para imitar la digestión gástrica, seguida de tratamiento adicional de la mezcla de reacción con tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa a pH 7 durante 1 hora para imitar la digestión duodenal por enzimas pancreáticas secretadas. El sustrato pretratado comprende oligopéptidos resistentes a la digestión, por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas.
- 50
- 55

[0035] La capacidad de una peptidasa o proteasa para escindir un sustrato pretratado puede determinarse midiendo la capacidad de una enzima para aumentar la concentración de extremos NH₂ libres en una mezcla de reacción que contiene 1 mg/ml de sustrato pretratado y 10 µg/ml de la peptidasa o proteasa, incubada a 37°C durante 1 hora. Una glutenasa útil en la práctica de la presente divulgación aumentará la concentración del extremo amino libre bajo tales condiciones, normalmente al menos aproximadamente el 25%, más normalmente al menos aproximadamente el 50%, y preferentemente al menos aproximadamente el 100%, una glutenasa incluye una enzima que puede reducir la concentración molar residual de oligopéptidos superior a aproximadamente 1000 Da en 1 mg/ml de "sustrato pretratado" después de 1 hora de incubación con 10 µg/ml de la enzima al menos aproximadamente 2 veces, normalmente al menos aproximadamente 5 veces, y preferentemente al menos aproximadamente 10 veces. La concentración de tales oligopéptidos puede estimarse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño y similares.

[0036] Una PEP de la invención incluye una enzima que puede reducir la potencia por la que un "sustrato pretratado" puede antagonizar la unión de PQPELPYPQPQLP (SEQ ID NO:17) a HLA-DQ2. La capacidad de un sustrato para unirse a HLA-DQ es indicativa de su toxicidad; fragmentos más pequeños de aproximadamente B aminoácidos están generalmente no establemente unidos al MHC de clase II. El tratamiento con una glutenasa que digiere oligopéptidos tóxicos, reduciendo la concentración de los oligopéptidos tóxicos, evita que una mezcla que los contiene compita con un péptido de prueba por la unión al MHC. Para probar si una glutenasa candidata puede usarse para los fines de la presente divulgación, 1 mg/ml de disolución de "sustrato pretratado" puede incubarse primero con 10 µg/ml de la glutenasa candidata y luego puede cuantificarse la capacidad de la disolución resultante para desplazar PQPELPYPQPQLP (SEQ ID NO:18) radiactiva preunida a moléculas HLA-DQ₂, siendo una reducción del desplazamiento con respecto a un control no tratado indicativa de la utilidad en los procedimientos de la presente divulgación.

[0037] Una PEP de la invención incluye una enzima que reduce la respuesta de anticuerpos anti-tTG a una "dieta de exposición a gluten" en un paciente con celiaquía al menos aproximadamente 2 veces, más normalmente al menos aproximadamente 5 veces, y preferentemente al menos aproximadamente 10 veces. Una "dieta de exposición a gluten" se define como la ingestión de 100 g de pan por día durante 3 días por un paciente adulto con celiaquía previamente a una dieta sin gluten. La respuesta del anticuerpo anti-tTG puede medirse en sangre periférica usando procedimientos de diagnóstico clínico habituales como se conocen en la técnica.

[0038] Excluido del término "glutenasa" están las siguientes peptidasas: pepsina humana, tripsina humana, quimotripsina humana, elastasa humana, papaína de papaya y bromelaína de piña, y normalmente se excluyen enzimas que tienen más del 98% de identidad de secuencias al nivel de aminoácidos con tales peptidasas, más normalmente se excluyen enzimas que tienen más del 90% de identidad de secuencias al nivel de aminoácidos con tales peptidasas, y preferentemente se excluyen enzimas que tienen más del 70% de identidad de secuencias al nivel de aminoácidos con tales peptidasas.

[0039] Entre las proteínas del gluten con posible efecto perjudicial para pacientes con celiaquía están incluidas las proteínas de almacenamiento del trigo cuyas especies incluyen *Triticum aestivum*; *Triticum eathlopicum*; *Triticum baeoticum*; *Triticum militinae*; *Triticum monococcum*; *Triticum sinskajae*; *Triticum timopheevii*; *Triticum turgidum*, *Triticum urertu*, *Triticum vavilovii*; *Triticum zhukovskilo*; etc. Una revisión de los genes que codifican las proteínas de almacenamiento del trigo puede encontrarse en Colot (1990) Genet Eng (N Y) 12:225-41. La gliadina es la fracción de proteína soluble en alcohol del gluten de trigo. Las gliadinas son normalmente ricas en glutamina y prolina, particularmente en la parte del extremo N. Por ejemplo, los 100 primeros aminoácidos de α- y γ-gliadinas contienen ~35% y ~20% de residuos de glutamina y prolina, respectivamente. Se han caracterizado muchas gliadinas del trigo, y como hay muchas cepas de trigo y otros cereales, se anticipa que muchas más secuencias se identificarán usando procedimientos rutinarios de biología molecular. En un aspecto de la presente divulgación se proporcionan plantas genéticamente modificadas que se diferencian de sus homólogos que se producen naturalmente en que tienen proteínas de gliadina que contienen un contenido reducido de residuos de glutamina y prolina.

[0040] Ejemplos de secuencias de gliadina incluyen, pero no se limitan a, secuencias de gliadina alfa de trigo, por ejemplo, como se proporcionan en los números de acceso de Genbank AJ133612; AJ133611; AJ133610; AJ133609; AJ133608; AJ133607; AJ133606; AJ133605; AJ133604; AJ133603; AJ133602; D84341.1; U51307; U51306; U51304; U51303; U50984; y U08287. Una secuencia de omega-gliadina de trigo se expone en el número de acceso de GenBank AF280605.

[0041] Con los fines de la presente divulgación, oligopéptidos tóxicos de gliadina son péptidos derivados

- durante la digestión humana normal de gliadinas y proteínas de almacenamiento relacionadas como se ha descrito anteriormente de cereales alimentarios, por ejemplo trigo, centeno, cebada y similares. Se cree que tales oligopéptidos actúan de antígenos para los linfocitos T en celiacía. Para la unión a las proteínas del MHC de clase II, los péptidos inmunogénicos tienen normalmente de aproximadamente 8 a 20 aminoácidos de longitud, más normalmente de aproximadamente 10 a 18 aminoácidos. Tales péptidos pueden incluir motivos PXP tales como los motivos PQPQLP (SEQ ID NO:8). La determinación de si un oligopéptido es inmunogénico para un paciente particular o no se determina fácilmente por ensayos de activación de linfocitos T estándar y otros ensayos conocidos para aquellos expertos en la materia.
- 5
- 10 **[0042]** Como se demuestra en este documento, durante la digestión, los oligopéptidos resistentes a peptidasas quedan después de la exposición de los glútenes, por ejemplo gliadina, a las enzimas digestivas normales. Ejemplos de oligopéptidos resistentes a peptidasas se proporcionan, por ejemplo, como se expone en SEQ ID NO:5, 6, 7 y 10. Otros ejemplos de oligopéptidos de gliadina inmunogénicos se describen en Wieser (1995) *Baillieres Clin Gastroenterol* 9(2):191-207.
- 15
- [0043]** La determinación de si una enzima candidata digerirá o no un oligopéptido tóxico del gluten, como se trata anteriormente, puede determinarse empíricamente. Por ejemplo, un candidato puede combinarse con un oligopéptido que comprende uno o más de los motivos Gly-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA, Hip-His-Leu, Abz-QLP-Tyr(NO₂)-PQ, Abz-PYPQPQ-Tyr(NO₂), PQP-Lys(Abz)-LP-Tyr(NO₂)-PQPQLP PQPQLP-Tyr(NO₂)-PQP-Lys(Abz)-L;
- 20 con uno o más de los oligopéptidos QLQPFQPQLPY (SEQ ID NO:1), PQPQLPYPQPQLPY (SEQ ID NO:3), QPQSFPEQQ (SEQ ID NO:13), QLQPFQPQLPY (SEQ ID NO:14), PQPQLPYPQPQLPY (SEQ ID NO:15), QPQSFPEQQ (SEQ ID NO:16) o LQLQPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQLPY (SEQ ID NO:12); o con un sustrato pretratado que comprende una o más de las proteínas de gliadina, hordeína, secalina o avenina que han sido tratadas con cantidades fisiológicas de proteasas gástricas y pancreáticas. En cada caso se determina que el
- 25 candidato es una glutenasa de la divulgación si puede escindir el oligopéptido. Las glutenasas que tienen una baja toxicidad para células humanas y son activas en las condiciones fisiológicas presentes en el borde en cepillo intestinal se prefieren para uso en algunas aplicaciones y, por tanto, puede ser útil cribar tales propiedades en glutenasas candidatas.
- 30 **[0044]** Los sustratos de oligopéptidos o proteínas para tales ensayos pueden prepararse según técnicas convencionales tales como síntesis, técnicas recombinantes, aislamiento de fuentes naturales o similares. Por ejemplo, la síntesis de péptidos en fase sólida implica la adición sucesiva de aminoácidos para crear una cadena peptídica lineal (véase Merrifield (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154). La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para producir el péptido.
- 35
- [0045]** Las glutenasas candidatas para uso en la práctica de la presente divulgación pueden obtenerse a partir de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de proteínas naturales y sintéticas. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la mutación de proteínas al azar y dirigida. Alternativamente están disponibles bibliotecas de proteínas naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animal o se producen fácilmente. Los extractos de trigo en germinación y otros pastos son de interés como fuente de enzimas candidatas. Las bibliotecas y los compuestos producidos natural o sintéticamente se modifican fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y tales medios pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o al azar tales como acilación, alquilación, esterificación y amidificación para producir análogos estructurales de proteínas.
- 40
- 45 **[0046]** Generalmente, una variedad de mezclas de ensayo se ejecutan en paralelo con diferentes concentraciones de peptidasa para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Normalmente, una de estas concentraciones sirve de control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección. Puede incluirse una variedad de otros reactivos en un ensayo de cribado. Éstos incluyen reactivos como
- 50 sales, detergentes y similares que se usan para facilitar la actividad óptima y/o reducir interacciones no específicas o de fondo. Pueden usarse reactivos que mejoran la eficiencia del ensayo. La mezcla de componentes se añade en cualquier orden que proporcione la actividad requerida. Las incubaciones se realizan a cualquier temperatura adecuada, normalmente entre 4 y 40°C. Los periodos de incubación se seleccionan para la actividad óptima, pero también pueden optimizarse para facilitar la rápida selección de alto rendimiento u otros fines. Normalmente será
- 55 suficiente entre 0,1 y 1 horas.
- [0047]** El nivel de digestión del polipéptido tóxico puede compararse con un valor de referencia. La desaparición del material de partida y/o la presencia de productos de digestión puede monitorizarse mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, un marcador detectable puede conjugarse con un péptido, y entonces

se determina el cambio en el peso molecular asociado al marcador, por ejemplo, precipitación con ácido, exclusión de peso molecular y similares. El valor de referencia puede ser un valor para una muestra de control o un valor estadístico que es representativo de una población de control. Pueden realizarse diversos controles para garantizar que una actividad observada sea auténtica, que incluye realizar reacciones en paralelo, controles positivos y negativos, respuesta a dosis y similares,

[0048] Las glutenasas activas identificadas por los procedimientos de selección descritos en este documento pueden servir de compuestos conductores para la síntesis de compuestos análogos para identificar glutenasas con propiedades mejoradas. La identificación de compuestos análogos puede realizarse usando técnicas tales como análisis de campo autoconsciente (SCF), análisis por interacción de configuración (CI) y análisis dinámico en modo normal. Las prolil-endopeptidasas están ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales y se han clonado de *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto y col. (1991) J. Biochem. 110, 873-8); *Aeromonas hydrophila* (Kanatent y col. (1993) J. Biochem. 113, 790-6); *Sphingomonas capsulata* (Kabashlma y col. (1998) Arch. Biochem. Biophys. 358, 141-148), *Pyrococcus furiosus* (Robinson y col. (1995) Gene 152, 103-6); cerdo (Rennex y col. (1991) Biochemistry 30, 2195-2030); y similares. La idoneidad de una enzima particular se determina fácilmente por los ensayos descritos anteriormente, por ensayos clínicos, determinación de la estabilidad en formulaciones y similares. Otras fuentes de PEP incluyen *Lactobacilli* (Habibi-Najafi y col. (1994) J. Dairy Sci. 77, 385-392), de los que el gen de interés puede clonarse fácilmente basándose en homología de secuencias con las PEP anteriores o mediante procedimientos de genética inversa habituales que implican la purificación, secuenciación de aminoácidos, traducción inversa y clonación del gen que codifica la enzima extracelular diana.

[0049] En este documento también se describen glutenasas que son peptidasas presentes en el borde en cepillo, que se complementan. Las formulaciones de interés pueden comprender tales enzimas en combinación con otras peptidasas. Las peptidasas presentes en el borde en cepillo incluyen dipeptidil-peptidasa IV (DPP IV, EC 3.4.14.5) y dipeptidil-carboxipeptidasa (DCP, EC 3.4.15.1). Puede usarse la forma humana de estas proteínas, o pueden aislarse formas modificadas de otras fuentes adecuadas. Ejemplos de enzimas DPP IV incluyen *Aspergillus spp.* (por ejemplo, Byun y col. (2001) J. Agric. Food Chem. 49, 2061-2063), bacterias de rumiantes tales como *Prevotella albensis* M384 (base de datos de proteínas NCBI sitio n° CAC42932), bacterias dentales tales como *Porphyromonas gingivalis* W83 (Kumugai y col. (2000) Infect. Immun. 68, 716-724), lactobacilus tales como *Lactobacillus helveticus* (por ejemplo, Vesanto y col., (1995) Microbiol. 141, 3067-3075) y *Lactococcus lactis* (Mayo y col., (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57, 38-44). Otras candidatas a DPP IV pueden ser fácilmente reconocidos basándose en homología con las enzimas anteriores, preferentemente >30% de identidad de secuencias. Similarmente, dipeptidil-carboxipeptidasas secretadas que escinden secuencias X-Pro del extremo C se encuentran en muchas fuentes microbianas que incluyen *Pseudomonas spp.* (por ejemplo, Ogasawara y col., (1997) Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 858-863), *Streptomyces spp.* (por ejemplo, Miyoshi y col., (1992) J. Biochem. 112, 253-257) y *Aspergilli spp.* (por ejemplo, Ichishima y col., (1977) J. Biochem. 81, 1733-1737). De particular interés es la enzima de *Aspergillus saitoi* (Ichishima), debido a su alta actividad a valor de pH ácido. Aunque todavía no se han clonado los genes que codifican muchas de estas enzimas, pueden clonarse fácilmente mediante procedimientos de genética inversa habituales. Las enzimas DCP I pueden purificarse a partir del medio extracelular basándose en su capacidad para hidrolizar Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro, Z-Gly-Pro (SEQ ID NO:19), o Hip-Gly-Pro. Alternativamente, los genes de DCP I putativa pueden identificarse basándose en la homología con la enzima de *E. coli* (base de datos de proteínas NCBI sitio CAA41014.) En este documento también se describen glutenasas que son endoproteasas encontradas en granos en desarrollo de cereales tóxicos tales como trigo, cebada y centeno. Por ejemplo, Dominguez y Cejudo (Plant Physiol. 112, 1211-1217, 1996) han mostrado que el endosperma de trigo (es decir, la parte del grano que contiene gliadina y glutenina) contiene una variedad de proteasas neutras y ácidas. Aunque estas proteasas no se han caracterizado individualmente, se espera que sean una fuente especialmente rica de glutenasas. Además, aunque todavía no se han clonado los genes que codifican estas proteasas, Dominguez y Cejudo han establecido un ensayo de SDS-PAGE conveniente para la identificación y separación de estas proteasas. Después de la escisión de las bandas de proteínas correspondientes del gel puede obtenerse información de secuencias limitada. Por tanto, el ADNc que codifica estas proteasas puede clonarse fácilmente a partir de esta información usando procedimientos de genética inversa establecidos y expresarse en huéspedes bacterianos o fúngicos heterólogos. De particular interés son las proteasas que hidrolizan α 2-gliadina dentro de la secuencia 33-mera de aminoácidos identificada en el Ejemplo 2 más adelante. De interés adicional son los subconjuntos de estas proteasas que retienen la actividad al valor de pH ácido (pH 2-5) encontrado en el estómago.

[0050] La secuencia de aminoácidos de una glutenasa, por ejemplo, una glutenasa que se produce naturalmente, puede alterarse de diversas formas conocidas en la técnica para generar cambios elegidos como diana en la secuencia y enzimas glutenasas adicionales útiles en las formulaciones y composiciones de la divulgación. Tales variantes serán normalmente variantes funcionalmente preservadas que se diferencian,

normalmente en secuencia, de la proteína nativa o parental correspondiente, pero que todavía retienen la actividad biológica deseada. Las variantes también incluyen fragmentos de una glutenasa que retiene la actividad enzimática. Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para generar cambios elegidos como diana, por ejemplo, expresión en fago en combinación con mutaciones al azar y elegidas como diana, introducción de mutaciones rastreadoras y similares.

[0051] Una variante puede ser sustancialmente similar a una secuencia nativa, es decir, diferenciándose en al menos un aminoácido, y puede diferenciarse en al menos dos, pero normalmente no más de aproximadamente diez aminoácidos (dependiendo el número de diferencias del tamaño de la secuencia nativa). Los cambios de secuencias pueden ser sustituciones, inserciones o deleciones. Pueden usarse mutaciones rastreadoras que introducen sistemáticamente alanina, u otros residuos, para determinar aminoácidos clave. Las sustituciones de aminoácidos conservativas normalmente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: (glicina, alanina); (valina, isoleucina, leucina); (ácido aspártico, ácido glutámico); (asparagina, glutamina); (serina, treonina); (lisina, arginina); y (fenilalanina, tirosina).

[0052] Los fragmentos de glutenasa de interés incluyen fragmentos de al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, más normalmente al menos aproximadamente 50 aminoácidos contiguos, y pueden comprender 100 o más aminoácidos, hasta la proteína completa, y pueden extenderse adicionalmente para comprender secuencias adicionales. En cada caso, el criterio clave es si el fragmento retiene o no la capacidad para digerir los oligopéptidos tóxicos que contribuyen a los síntomas de celiaquía.

[0053] Modificaciones de interés que no alteran la secuencia primaria incluyen derivatización química de proteínas, por ejemplo, acetilación o carboxilación. También se incluyen modificaciones de glicosilación, por ejemplo, aquellas hechas modificando los patrones de glicosilación de una proteína durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, exponiendo la proteína a enzimas que afectan la glicosilación tales como enzimas de glicosilación o deglicosilación de mamífero. También se engloban secuencias que tienen residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

[0054] En la práctica de la presente divulgación también son útiles proteínas que han sido modificadas usando técnicas de biología molecular y/o química de manera que se mejore su resistencia a la degradación proteolítica y/o a condiciones ácidas tales como aquellas encontradas en el estómago, y para optimizar propiedades de solubilidad o para hacerlas más adecuadas como agente terapéutico. Por ejemplo, el esqueleto de la peptidasa puede ciclarse para potenciar la estabilidad (véase Friedler y col. (2000) J. Biol. Chem. 275:23783-23789). Análogos de tales proteínas incluyen aquellos que contienen residuos distintos de L-aminoácidos que se producen naturalmente, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos que se producen no naturalmente.

[0055] Las proteínas de glutenasa de la presente divulgación pueden prepararse por síntesis *in vitro* usando procedimientos convencionales como se conoce en la técnica. Están disponibles diversos aparatos sintéticos comerciales, por ejemplo, sintetizadores automatizados de Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Beckman, y otros fabricantes. Usando sintetizadores, uno o más aminoácidos no naturales pueden sustituirse fácilmente por los aminoácidos que se producen naturalmente. La secuencia particular y el modo de preparación se determinará por conveniencia, economía, pureza requerida y similares. Si se desea, durante la síntesis pueden introducirse diversos grupos en la proteína que permiten la ligación a otras moléculas o a una superficie. Por ejemplo, pueden usarse cisteínas para preparar tioéteres, pueden usarse histidinas para la ligación a un complejo de ión metálico, pueden usarse grupos carboxilo para formar amidas o ésteres, pueden usarse grupos amino para formar amidas, y similares.

[0056] Las proteínas de glutenasa útiles en la práctica de la presente divulgación también pueden aislarse y purificarse según procedimientos convencionales a partir de sistemas de producción recombinantes y de fuentes naturales. Puede prepararse un lisado a partir del huésped de expresión y el lisado purificarse usando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad y/u otras técnicas de purificación. Normalmente, las composiciones usadas en la práctica de la divulgación comprenderán al menos el 20% en peso del producto deseado, más normalmente al menos aproximadamente el 75% en peso, preferentemente al menos aproximadamente el 95% en peso, y para fines terapéuticos, normalmente al menos aproximadamente el 99,5% en peso, en relación con los contaminantes relacionados con el procedimiento de preparación del producto y su purificación. Normalmente, los porcentajes se basarán en proteína total.

[0057] En un aspecto, la presente divulgación proporciona una preparación purificada de una glutenasa. Antes de la presente divulgación no había necesidad de una glutenasa que pudiera ser ingerida por un ser humano o mezclarse con un producto alimenticio. Por tanto, la mayoría de las glutenasas no existían en una forma libre de

contaminantes que pudieran ser perjudiciales para un ser humano si los ingería. Por tanto, existe la necesidad de tales preparaciones de glutenasa. La presente divulgación proporciona productos alimenticios novedosos que se derivan de productos alimenticios que contienen gluten, pero que han sido tratados para reducir la concentración y la cantidad de los oligopéptidos y secuencias de oligopéptidos descubiertas que son tóxicas para pacientes con celiacía. Aunque se han preparado alimentos sin gluten y con contenido de gluten reducido, los productos alimenticios descritos aquí se diferencian de tales productos alimenticios no sólo por el modo en que se preparan, mediante el tratamiento del producto alimenticio con una glutenasa, sino también por su contenido, ya que los procedimientos de la técnica anterior producen la alteración de componentes no tóxicos (para pacientes con celiacía) del producto alimenticio, produciendo un sabor y composición diferentes. Los productos alimenticios de la técnica anterior incluyen, por ejemplo, almidón de trigo del Codex Alimentarius, que está disponible en Europa y tiene <100 ppm de gluten. El almidón se prepara normalmente mediante procedimientos que aprovechan el hecho de que el gluten es insoluble en agua, mientras que el almidón es soluble.

[0058] Como se ha descrito aquí, a un paciente con celiacía, además de proporcionársele una glutenasa o alimento tratado según los presentes procedimientos, se le proporciona un inhibidor de transglutaminasa de tejido, un agente antiinflamatorio, un agente antiulceroso, un agente estabilizante de mastocitos y/o un agente para la alergia. Ejemplos de tales agentes incluyen inhibidores de la HMG-CoA reductasa con propiedades antiinflamatorias tales como compactina, lovastatina, simvastatina, pravastatina y atorvastatina; antagonistas de receptores antialérgicos de la histamina H1 tales como acrivastina, cetirizina, desloratadina, ebastina, fexofenadina, levocetirizina, loratadina y mizolastina; antagonistas de receptores de los leucotrienos tales como montelukast y zafirlukast; inhibidores de la COX-2 tales como celecoxib y rofecoxib; inhibidores de la MAP cinasa p38 tales como BIRB-796; y agentes estabilizantes de mastocitos tales como cromoglicato de sodio (cromolina), pemirolast, proxicromil, repirinast, doxantrazol, amlexanox, nedocromil y probicromil.

[0059] Como se usa en este documento, compuestos que están “comercialmente disponibles” pueden obtenerse de fuentes comerciales que incluyen, pero no se limitan a, Acros Organics (Pittsburgh PA), Aldrich Chemical (Milwaukee WI, que incluye Sigma Chemical y Fluka), Apin Chemicals Ltd. (Milton Par, RU), Avocado Research (Lancashire R.U.), BDH Inc. (Toronto, Canadá), Bionet (Cornwall, R.U.), Chemservice Inc. (West Chester PA), Crescent Chemical Co. (Hauppauge NY), Eastman Organic Chemicals, Eastman Kodak Company (Rochester NY), Fisher Scientific Co. (Pittsburgh PA), Fisons Chemicals (Leicestershire RU), Frontier Scientific (Logan UT), ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa CA), Key Organics (Cornwall R.U.), Lancaster Synthesis (Windham NH), Maybridge Chemical Co. Ltd. (Cornwall R.U.), Parish Chemical Co. (Orem UT), Pfaltz & Bauer, Inc. (Waterbury CN), Polyorganix (Houston TX), Pierce Chemical Co. (Rockford IL), Riedel de Haen AG (Hannover, Alemania), Spectrum Quality Product, Inc. (New Brunswick, NJ), TCI America (Portland OR), Trans World Chemicals, Inc. (Rockville MD), Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond VA), Novabiochem y Argonaut Technology.

[0060] Los compuestos útiles para coadministración con las glutenasas y productos alimenticios tratados también puede prepararse mediante procedimientos conocidos para un experto en la materia. Como se usa en este documento, los “procedimientos conocidos para un experto en la materia” pueden identificarse por diversos libros de referencia y bases de datos. Libros de referencia y tratados adecuados que detallan la síntesis de reactivos útiles en la preparación de compuestos de la presente divulgación, o proporcionan referencias a artículos que describen la preparación, incluyen por ejemplo, “Synthetic Organic Chemistry”, John Wiley & Sons, Inc., New York; S. R. Sandler y col., “Organic Functional Group Preparations”, 2ª ed., Academic Press, New York, 1983; H. O. House, “Modern Synthetic Reactions”, 2ª ed., W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, Calif. 1972; T. L. Gilchrist, “Heterocyclic Chemistry”, 2ª ed., John Wiley & Sons, New York, 1992; J. March, “Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure”, 4ª ed., Wiley-Interscience, New York, 1992. También pueden identificarse reactivos específicos y análogos mediante los índices de productos químicos conocidos preparados por el Servicio de Resúmenes Químicos de la Sociedad Química Americana, que están disponibles en la mayoría de las bibliotecas públicas y de universidades, además de mediante bases de datos en línea (puede contactarse con la Sociedad Química Americana, Washington, D.C., www.acs.org para más detalles). Los productos químicos que son conocidos, pero que no están comercialmente disponibles en catálogos, pueden ser preparados por encargo por casas de síntesis química, proporcionando muchas de las casas de suministro de productos químicos habituales (por ejemplo, aquellas enumeradas anteriormente) servicios de síntesis por encargo.

[0061] Las proteínas de glutenasa de la divulgación y/o los compuestos administrados con las mismas se incorporan en una variedad de formulaciones para administración terapéutica. En un aspecto, los agentes se formulan en composiciones farmacéuticas mediante combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados y se formulan en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, disoluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles,

microesferas y aerosoles. Como tales, la administración de la glutenasa y/u otros compuestos puede lograrse en diversas vías, normalmente mediante administración por vía oral. La glutenasa y/u otros compuestos pueden ser sistémicos después de la administración o pueden localizarse en virtud de la formulación, o por el uso de un implante que sirve para retener la dosis activa en el sitio de implantación.

5

[0062] En formas de dosificación farmacéutica, la glutenasa y/u otros compuestos pueden administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, o también pueden usarse solos o en asociación apropiada, además de en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los agentes pueden combinarse, como se describe previamente, para proporcionar una combinación de actividades. Los siguientes procedimientos y excipientes son a modo de ejemplo.

10

[0063] Para preparaciones orales, los agentes pueden usarse solos o en combinación con aditivos apropiados para preparar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa de sodio; con lubricantes tales como talco o estearato de magnesio; y, si se desea, con diluyentes, agentes de tamponamiento, agentes humectantes, conservantes y aromatizantes.

15

[0064] Las formulaciones orales comprenden recubrimientos entéricos, de manera que el agente activo se administra al tracto intestinal. Las formulaciones entéricas se usan frecuentemente para proteger un principio activo del contenido fuertemente ácido del estómago. Tales formulaciones se crean recubriendo una forma farmacéutica sólida con una película de un polímero que es insoluble en entornos ácidos y soluble en entornos básicos. Películas a modo de ejemplo son ftalato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de polivinilo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de metacrilato y ftalato de acetato de celulosa.

20

25

[0065] Otras formulaciones entéricas comprenden microesferas de polímeros manipuladas hechas de polímeros biológicamente erosionables que muestran fuertes interacciones adhesivas con la mucosa gastrointestinal y los revestimientos celulares y pueden atravesar tanto el epitelio de absorción de la mucosa como el epitelio asociado al folículo que cubre el tejido linfóide de parches de Peyer. Los polímeros mantienen contacto con el epitelio intestinal durante periodos de tiempo prolongados y en realidad penetran a través de él y entre las células. Véase, por ejemplo, Mathiowitz y col. (1997) Nature 386 (6623): 410-414. Los sistemas de administración de fármacos también pueden utilizar un núcleo de hidrogeles superporosos (SPH) y material compuesto de SPH (SPHC) como se describe por Dorkoosh y col. (2001) J Control Release 71(3):307-18.

30

35

[0066] En otra realización, un microorganismo, por ejemplo, cultivo bacteriano o de levadura, que puede producir glutenasa se administra a un paciente. Un cultivo tal puede formularse como una cápsula entérica; por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos n° 6.008.027.

40

[0067] Alternativamente, los microorganismos estables a la acidez del estómago pueden administrarse en una cápsula, o mezclarse con preparaciones de alimentos.

[0068] En otra realización, la glutenasa se mezcla con alimento, o se usa para pretratar productos alimenticios que contienen glútenes. La glutenasa presente en alimentos puede ser enzimáticamente activa antes de o durante la ingestión, y puede encapsularse o tratarse de otro modo para controlar el momento adecuado de la actividad. Alternativamente, la glutenasa puede encapsularse para lograr una liberación controlada después de la ingestión, por ejemplo, en el tracto intestinal.

45

[0069] Las formulaciones se proporcionan normalmente en una forma farmacéutica unitaria, refiriéndose el término "forma farmacéutica unitaria" a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de glutenasa en una cantidad calculada suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas farmacéuticas unitarias dependen del complejo particular empleado y del efecto que va a lograrse, y la farmacodinámica asociada a cada complejo en el huésped.

50

55

[0070] Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, soportes o diluyentes, están comercialmente disponibles. Además, están comercialmente disponibles sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares. Cualquier compuesto útil en los procedimientos y

composiciones de la divulgación puede proporcionarse como una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable. "Sal de adición de base farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la efectividad biológica y las propiedades de los ácidos libres, que son no biológicamente o de otro modo no deseables. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas que se producen naturalmente, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromo, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Bases orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitclohexilamina, colina y cafeína.

15

[0071] Dependiendo del paciente y la afección que está tratándose y de la vía de administración, la glutenasa puede administrarse en dosificaciones de 0,01 mg a 500 mg/kg de peso corporal al día, por ejemplo, aproximadamente 20 mg/día para una persona promedio. Una dosis típica de glutenasa en pacientes será al menos aproximadamente 1 mg/adulto, más normalmente al menos aproximadamente 10 mg; y preferentemente al menos aproximadamente 50 mg; normalmente no más de aproximadamente 5 g, más normalmente no más de aproximadamente 1 g, y preferentemente no más de aproximadamente 500 mg. Las dosificaciones se ajustarán apropiadamente para formulación pediátrica. En niños, la dosis eficaz puede ser menor, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 mg, o 0,5 mg. En terapia de combinación que implica, por ejemplo, una PEP+DPP IV o PEP+DCP I, puede darse una dosis comparable de las dos enzimas; sin embargo, la relación estará influida por la estabilidad relativa de las dos enzimas a inactivación gástrica y duodenal.

20

25

Aquellos expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función de la enzima específica, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a efectos secundarios. Algunas de las glutenasas son más potentes que otras. Dosificaciones preferidas para una enzima dada pueden ser fácilmente determinadas por aquellos expertos en la materia mediante una variedad de medios. Un medio preferido es medir la potencia fisiológica de un compuesto dado.

30

[0072] Otras formulaciones de interés incluyen formulaciones de glutenasas que codifican ADN de interés, de manera que eligen como diana células intestinales para la modificación genética. Por ejemplo, véase la patente de EE.UU. n° 6.258.789 que desvela la alteración genética de células epiteliales intestinales.

35

[0073] Los procedimientos de la divulgación se usan para tratar alimentos que van a ser consumidos o que son consumidos por individuos que padecen celiacía y/o dermatitis herpetiforme administrando una dosis eficaz de glutenasa. Si la glutenasa se administra directamente a un ser humano, entonces el (los) agente(s) activo(s) está(n) contenidos en una formulación farmacéutica. Alternativamente, los efectos deseados pueden obtenerse incorporando glutenasa en productos alimenticios o administrándola a organismos vivos que expresan glutenasa, y similares. El diagnóstico de pacientes adecuados puede utilizar una variedad de criterios conocidos para aquellos expertos en la materia. Un aumento cuantitativo en los anticuerpos específicos para gliadina, y/o transglutaminasa de tejido, es indicativo de la enfermedad. Los antecedentes familiares y la presencia de los alelos de HLA HLA-DQ2 [DQ(a1*0501, b1*02)] y/o DQ8 [DQ(a1*0301, b1*0302)] son indicativos de una susceptibilidad a la enfermedad.

45

[0074] El efecto terapéutico puede medirse en términos de resultado clínico o puede determinarse por pruebas inmunológicas o bioquímicas. La supresión de la actividad de linfocitos T perjudiciales puede medirse enumerando células Th1 reactivas, cuantificando la liberación de citocinas en los sitios de lesiones o usando otros ensayos para la presencia de linfocitos T autoinmunitarios conocidos en la técnica. Alternativamente puede buscarse una reducción en síntomas de una enfermedad.

50

[0075] Pueden emplearse diversos procedimientos para administración, preferentemente usando administración por vía oral, por ejemplo, con comidas. La dosificación de la formulación terapéutica variará ampliamente dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de administración, el modo de administración, la eliminación del agente del huésped y similares. La dosis inicial puede ser mayor, seguida de dosis de mantenimiento más pequeñas. La dosis puede administrarse tan poco frecuentemente como semanalmente o bisemanalmente, o más frecuentemente fraccionarse en dosis más pequeñas y administrarse diariamente, con comidas, bisemanalmente, o de otro modo según se necesita para mantener un nivel de dosificación eficaz.

55

[0076] Los siguientes ejemplos se exponen de manera que se provea a aquellos expertos en la materia de una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar la presente divulgación, y no pretenden representar que los experimentos de más adelante son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos por garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura y similares), pero pueden estar presentes algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados centígrados y la presión es a o próxima a atmosférica.

EJEMPLO 1

DETECCIÓN DE PÉPTIDOS INMUNODOMINANTES DE GLIADINA Y ENZIMAS QUE LOS DEGRADAN

[0077] Los siguientes ejemplos describen el descubrimiento y la caracterización de un número pequeño de péptidos inmunodominantes de gliadina que explican la mayoría de la actividad estimulante del gluten alimentario en los linfocitos T intestinales y periféricos encontrada en pacientes con celiaquía. La cinética proteolítica de estos péptidos inmunodominantes se analizó en la superficie del intestino delgado. Se usaron vesículas de la membrana del borde en cepillo de intestinos de rata adulta para mostrar que estos péptidos ricos en prolina-glutamina son excepcionalmente resistentes al procesamiento enzimático, y que la dipeptidil-peptidasa IV y la dipeptidil-carboxipeptidasa son las enzimas limitantes de la velocidad en su digestión. La complementación de la membrana del borde en cepillo con cantidades traza de una prolil-endopeptidasa bacteriana conduce a la rápida destrucción de estos péptidos de gliadina. Estos resultados proporcionan la base para las terapias mediadas por enzimas para tratar alimento para la provisión a pacientes con celiaquía, y para tratar tales pacientes directamente, que ofrecen distintas ventajas con respecto a la única opción terapéutica actual, que es la estricta exclusión de alimento que contiene gluten.

[0078] Para investigar la digestión del gluten se utilizó análisis de cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas (EM-CL-EM) para investigar las rutas y la cinética asociada de la hidrólisis de péptidos de gliadina inmunodominantes tratados con preparaciones de BBM de rata. Debido a que el roedor es un excelente modelo de animal pequeño para la estructura y la función intestinal humana, la BBM de rata se eligió como un sistema de modelo adecuado para estos estudios.

[0079] Las fracciones de BBM se prepararon a partir de mucosa del intestino delgado de rata como se describe en Ahnen y col. (1982) J. Biol. Chem. 257, 12129-35. Se determinó que las actividades específicas de las peptidasas de BB conocidas eran 127 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ para aminopeptidasa N (APN, EC 3.4.11.2), 60 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ para dipeptidil-peptidasa IV (DPP IV, EC 3.4.14.5) y 41 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ para dipeptidil-carboxipeptidasa (DCP, EC 3.4.15.1) usando ensayos estándar. No fue detectable actividad de prolina-aminopeptidasa (EC 3.4.11.5) ni prolil-endopeptidasa (PEP, EC 3.4.21.26) ($<5 \mu\text{U}/\mu\text{g}$). Se usaron fosfatasa alcalina y sucrasa como enzima de BBM de control con actividades de 66 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ y 350 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$, respectivamente.

[0080] Las fracciones de BBM se purificaron parcialmente a partir de la mucosa del intestino delgado de ratas hembra adultas mantenidas con una dieta a voluntad de pienso para roedores habitual basado en trigo. El contenido de proteína total se determinó por un procedimiento modificado de Lowry con BSA como patrón. La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó con fosfato de nitrofenilo. La actividad de la sucrasa se midió usando un ensayo de glucosa acoplado. Continuamente se ensayaron DPP IV, prolina-aminopeptidasa y APN a 30°C en Tris-HCl 0,1M, pH 8,0, que contenía 1 mM de las p-nitroanilidas ($\epsilon = 8,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) Gly-Pro-pNA, Pro-pNA o Leu-pNA, la última en DMSO al 1% adicional para mejorar la solubilidad. La actividad de DCP se midió en una reacción de 100 μl como la liberación de ácido hipúrico de Hip-His-Leu. La actividad de PEP se determinó continuamente con Z-Gly-Pro-pNA 0,4 mM en PBS:H₂O:dioxano (8:1,2:0,8) a 30°C. Una unidad es el consumo de 1 μmol de sustrato por minuto.

[0081] DPP IV y DCP están ambas reguladas por incremento por un alto contenido de prolina en la dieta. Sin embargo, se encontró que la actividad de APN usando sustratos estándar era superior a la de DPP IV incluso cuando se alimentaron dietas extremas ricas en prolina. Por tanto, aunque se ha observado una mayor actividad de DCP frente a CPP con el péptido modelo Z-GPLAP a concentraciones de saturación, una diferencia en los valores de K_m podría representar fácilmente la relación inversa medida. La cantidad de 100 μM se eligió como la concentración inicial de péptido debido a que se consideró que la cinética de no saturación (k_{cat}/K_m) era fisiológicamente más relevante que las velocidades máximas de hidrólisis (k_{cat}).

[0082] Se investigó la proteólisis con la preparación de BBM usando el péptido QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1), un producto de digestión quimotriptica de α -9 gliadina (Arentz-Hansen y col. (2000) J. Exp. Med. 191, 603-

12). Se ha mostrado que este péptido estimula la proliferación de linfocitos T aislados de la mayoría de los pacientes con celiaquía, y de aquí que se considere que posee un epítipo inmunodominante. Se sometió a digestión de BBM, seguido de análisis por EM-CL-EM. Una mezcla de digestión de 50 μ l estándar contuvo 100 μ M de péptido sintético, triptófano 10 μ M y Cbz-triptófano como patrones internos, y las preparaciones de BBM se resuspendieron con un contenido final de proteína de 27 ng/ μ l y proteínas exógenas, como se indica, en solución salina tamponada con fosfato. Después de la incubación a 37°C durante el tiempo indicado, las enzimas se inactivaron mediante calentamiento a 95°C durante 3 minutos. Las mezclas de reacción se analizaron por EM-CL (SpectraSystem, ThermoFinnigan) usando una columna de fase inversa C18 (Vydac 218TP5215, 2,1x150 mm) con agua:acetonitrilo:ácido fórmico (0,1%):ácido trifluoroacético (0,025%) como fase móvil (flujo: 0,2 ml/min) y un gradiente de 10% de acetonitrilo durante 3 minutos, 10-20% durante 3 minutos, 20-25% durante 21 minutos seguido de un lavado al 95%. Los fragmentos de péptidos en el intervalo de masa de m/z = 300-2000 se detectaron por espectroscopia de masas de ionización por electropulverización usando una trampa de iones LCQ y sus identidades se confirmaron por patrones de fragmentación de EM-EM.

15 **[0083]** Mientras que el péptido parental QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1) desapareció con un semivida aparente de 35 min, se observó que varios productos intermedios se acumulaban durante periodos prolongados (Fig. 1A). Se encontró que las intensidades de EM (m/z = 300-2000 g/mol) y las absorbancias UV₂₈₀ de los péptidos parentales QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1) y PQPQLPYQPQLPY (SEQ ID NO:3) dependían linealmente de la concentración en el intervalo de 6-100 μ M. Los péptidos de referencia PQPQLPYQPQLPY (SEQ ID NO:4), QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:5), QPQFPQPQLPY (SEQ ID NO:6) y QPFPQPQLPY (SEQ ID NO:7) se generaron individualmente por proteólisis limitada de los péptidos parentales con 10 μ g/ml de carboxipeptidasa A (C-0261, Sigma) y/o 5,9 μ g/ml de leucina-aminopeptidasa (L-5006, Sigma) durante 160 min a 37°C y se analizaron por EM-CL como en la Fig. 1.

25 **[0084]** De hecho, el posterior procesamiento del péptido se retrasó sustancialmente (Fig. 1B). Las identidades de los productos intermedios principales se confirmaron por EM en tándem, y se sugirió un grado de estabilidad anormalmente alto de la proteína PQPQLPY (SEQ ID NO:8), un motivo común en péptidos estimulantes de linfocitos T. Basándose en estos datos y las preferencias conocidas de aminoácidos de las peptidasas de BBM, la ruptura digestiva de QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1) se reconstruyó como se muestra en el inserto de la Fig. 1B. La ruta preferida implica la escisión seriada de los residuos de glutamina y leucina del extremo N por la aminopeptidasa N (APN), seguido de eliminación de la tirosina del extremo C por la carboxipeptidasa P (CPP) e hidrólisis del QP-dipéptido del extremo N restante por DPP IV. Como se observa en la Fig. 1B, el producto intermedio QPFPQPQLPY (SEQ ID NO:6) (formado por el ataque de APN en los dos primeros residuos del extremo N) y sus derivados son cada vez más resistentes a la posterior hidrólisis. Debido a que pareció que el alto contenido de prolina era una causa principal de esta resistencia proteolítica, la digestión se comparó con un péptido de control de no prolina comercialmente disponible RRLIEDNEYTARG (SEQ ID NO:9) (Sigma, St. Louis, MO). La hidrólisis inicial fue mucho más rápida ($t_{1/2}$ = 10 min). Y, lo que es más importante, los productos intermedios digestivos sólo se observaron transitoriamente y se eliminaron completamente en el transcurso de una hora, reflejando una especificidad continuamente alta de BBM por los péptidos intermedios.

40 **[0085]** Debido a que los tres productos intermedios principales QPFPQPQLPY (SEQ ID NO:10), QPFPQPQLPY (SEQ ID NO:7), FPQPQLPY (SEQ ID NO:11) observados durante la digestión mediada por BBM de QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1) son sustratos para DPP IV, el experimento se repitió en presencia de un exceso de actividad de 6 veces de DPP IV fúngica exógena. Mientras que la disminución relativamente rápida del péptido parental y los niveles intermedios de QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:5) fueron en gran parte invariables, la acumulación de sustratos de DPP IV se suprimió completamente, y la digestión completa se observó en el transcurso de cuatro horas. (Fig. 1B, barras blancas).

50 **[0086]** Para investigar las etapas limitantes de la velocidad en la digestión mediada por BBM de péptidos de gliadina del extremo C se usó otro péptido inmunodominante conocido de α -gliadina de trigo, PQPQLPYQPQLPY (SEQ ID NO:3). Aunque es poco probable que los péptidos con residuos de prolina en el extremo N se formen en el intestino delgado (no se observó ninguno durante la digestión de BBM de QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1), Fig. 1A), sirven de modelo útil para el análisis del procesamiento del extremo C, debido a que el extremo N de este péptido puede considerarse proteolíticamente inaccesible debido a la mínima actividad de prolina-aminopeptidasa en la BBM. Como se muestra en la Fig. 2, este péptido es incluso más estable que QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1). En particular, la eliminación del residuo de tirosina del extremo C por la carboxipeptidasa P (CPP) es el primer acontecimiento en su ruptura, y es más de cuatro veces más lenta que la actividad de APN en QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1) (Fig. 1 B). El sustrato de DCP PQPQLPYQPQLPY (SEQ ID NO:4) emerge como un producto intermedio importante tras la catálisis con la carboxipeptidasa P, y es altamente resistente a la posterior digestión,

supuestamente debido al bajo nivel de la actividad de DCP endógena naturalmente asociada a la BBM. Para confirmar la función de DCP como enzima limitante de la velocidad en el procesamiento del extremo C de péptidos de gliadina inmunodominantes, las mezclas de reacción se complementaron con DCP de pulmón de conejo. La DCP exógena redujo significativamente la acumulación de PQPQLPYPQPQLP (SEQ ID NO:4) después de la incubación durante la noche en un modo dependiente de la dosis. En cambio, la cantidad de PQPQLPYPQPQLP (SEQ ID NO:4) acumulada aumentó más de 2 veces en presencia de 10 µM de captopril, un inhibidor específico para DCP, en comparación con BBM sin complementar.

[0087] En conjunto, los resultados anteriores demuestran que (i) péptidos de gliadina inmunodominantes son excepcionalmente estables a la ruptura catalizada por peptidasas de BBM, y (ii) DPP IV y especialmente DCP son etapas limitantes de la velocidad en este procedimiento de ruptura en los extremos N y C de los péptidos, respectivamente. Debido a que las exopeptidasas de BBM están restringidas al procesamiento del extremo N o C, se investigó si la generación de extremos de péptidos libres adicionales por las enzimas pancreáticas aceleraría la digestión. De las proteasas pancreáticas probadas, sólo la elastasa pudo hidrolizar PQPQLPYPQPQLPY (SEQ ID NO:3) a una alta concentración (no fisiológica) de 100 ng/µl. No se detectó proteólisis con tripsina ni quimotripsina.

[0088] Alertado por el alto contenido de prolina como un distintivo de la mayoría de los péptidos de gliadina inmunogénicos, una endopeptidasa específica para prolina se probó para la generación de nuevos extremos de péptidos libres. Una búsqueda bibliográfica sobre proteasas disponibles condujo a la identificación de prolil-endopeptidasa (PEP) de *Flavobacterium meningosepticum*, que es específica para la escisión del extremo C de prolinas y está fácilmente disponible de fuentes recombinantes (Yoshimoto y col. (1991) J. Biochem. 110, 873-8). El producto intermedio de PQPQLPYPQPQLP (SEQ ID NO:4) estable se digirió con BBM en presencia de PEP exógena. La Fig. 3 muestra la aceleración dependiente de la dosis de la digestión de PQPQLPYPQPQLP (SEQ ID NO:4) con concentración de PEP creciente. Tan sólo fueron suficientes 3,5 pg de PEP/27 ng de proteína de BBM para duplicar el grado de proteólisis de este fragmento de gliadina en comparación con la incubación con BBM sola. En comparación, otras proteasas comúnmente usadas como papaína, bromelaina o elastasa porcina fueron mucho menos eficientes, requiriendo cantidades 30 veces (papaína) o 3000 veces (bromelaina, elastasa) mayores de enzima en comparación con PEP para dar resultados similares. Su proteólisis se restringió a la escisión de los enlaces Gln⁴-Leu⁵ y/o Gln¹¹-Leu¹².

[0089] La prolil-endopeptidasa (EC 3.4.21.26) tenía una preferencia por el enlace de Pro⁸-Gln⁹ y a un menor grado por el enlace de Pro⁶-Tyr⁷ del péptido de PQPQLP¹YP¹QPQLP (SEQ ID NO:4). Se encontró una escisión preferencial similar para QLQFPF¹QPQLPY (SEQ ID NO:1). Esto concuerda con la preferencia de esta prolil-endopeptidasa por una segunda prolina en la posición S2' (Bordusa y Jakubke (1998) Bioorg. Med. Chem. 6, 1775-80). Basándose en este motivo de P¹XP y en los presentes datos, hasta 16 sitios de escisión nuevos importantes pueden predecirse en la secuencia de α2-gliadina, una fuente importante de epítopes inmunodominantes identificados hasta ahora con el tratamiento con PEP. Todos ellos se localizan en el parte crítica del extremo N. Puede esperarse que la escisión interna por PEP genere sustratos adicionales (de otro modo inaccesibles) para DPP IV y DCP, complementándose así el procedimiento de asimilación natural de gliadinas por la BBM. Por tanto, la especificidad de prolil-endopeptidasa es idealmente apta para la desintoxicación de péptidos de gliadina inactivo persistentes en celiacía.

[0090] Los datos anteriores demuestran que los péptidos de gliadina ricos en prolina son extraordinariamente resistentes a la digestión por endo- y exopeptidasas del intestino delgado y, por tanto, es probable que se acumulen a altas concentraciones en la cavidad intestinal después de una comida rica en gluten. La implicación patológica de la resistencia digestiva es reforzada por la estrecha correlación observada de contenido de prolina y toxicidad celíaca como se observa en los diversos cereales comunes (Schuppan (2000) Gastroenterology 119, 234-42). Este análisis de las rutas digestivas de péptidos inmunodominantes también proporciona un mecanismo para determinar si las enzimas que pueden acelerar este procedimiento excepcionalmente lento pueden ser terapéuticamente útiles en la dieta para celiacía.

[0091] La adición de DPP IV y DCP exógenas puede compensar el procesamiento de prolina intrínsecamente lento por la BBM, aunque ambas enzimas se basan en la generación eficaz de extremos N y C libres por escisión endoproteolítica. En una realización preferida se usa una prolil-endopeptidasa (PEP) bacteriana soluble, que se mostró que era extremadamente eficiente en la hidrolización de fragmentos de gliadina ricos en prolina. Aunque la PEP se expresa en cerebro, pulmón, riñón e intestino humano, tal actividad no ha sido informada en el borde en cepillo.

[0092] La complementación de la dieta para celiacía con PEP biodisponible (con o sin DPP IV y/o DCP), en

virtud de facilitar la escisión de péptidos de gliadina a fragmentos no tóxicos y/o digestibles, es útil en la atenuación o eliminación de la respuesta inflamatoria al gluten. Una pauta de tratamiento tal es análoga al tratamiento de terapia con enzimas usado para tratar intolerancia a la lactosa, en la que lactasa administrada por vía oral es eficaz en la escisión y, por tanto, la desintoxicación de la lactosa en productos lácteos. Las prolil-endopeptidasas están ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales y se han clonado de *Aeromonas hydrophila* (Kanatani y col. (1993) J. Biochem. 113, 790-6); *Pyrococcus furiosus* (Robinson y col. (1995) Gene 152, 103-6) y de cerebro de cerdo (Rennex y col. (1991) Biochemistry 30, 2195-2030). Estas isozimas constituyen peptidasas desintoxicantes alternativas. Además, la prolil-endopeptidasa usada en este estudio es fácilmente receptiva a la manipulación de proteínas mediante evolución dirigida. Por tanto, puede lograrse la optimización de la especificidad de PEP hacia péptidos de gliadina inmunogénicos.

EJEMPLO 2

Caracterización adicional de péptidos de gliadina inmunodominantes y medios para su digestión

15

[0093] Se sabe desde hace tiempo que los principales componentes tóxicos del gluten de trigo son una familia de proteínas ricas en Pro-Gln muy relacionada llamada gliadinas. Parece que los péptidos de un segmento corto de α -gliadina explican la mayoría del reconocimiento específico para gluten por linfocitos T CD4+ de pacientes con celiaquía. Estos péptidos son sustratos de transglutaminasa de tejido (tTGasa), el auto-antígeno primario en celiaquía, y los productos de esta reacción enzimática se unen a la molécula HLA DQ2 de clase II. Este ejemplo describe una combinación de estudios en animales y seres humanos *in vitro* e *in vivo* usados para caracterizar esta región "inmunodominante" de α -gliadina como parte de un producto proteolítico anormalmente largo generado por el procedimiento digestivo que: (a) es excepcionalmente resistente a la posterior ruptura por las proteasas de borde en cepillo gástricas, pancreáticas e intestinales; (b) es el sustrato de mayor especificidad de transglutaminasa de tejido humano (tTGasa) descubierto hasta la fecha; (c) contiene al menos seis copias solapantes de epítopes que se sabe que son reconocidas por linfocitos T derivados de pacientes; (d) estimula clones de linfocitos T representativos que reconocen estos epítopes con eficacia submicromolar; y (e) tiene homólogos en proteínas de todos los granos alimentarios tóxicos, pero no tiene homólogos en proteínas de granos alimentarios no tóxicos. En conjunto, estos hallazgos demuestran que la aparición de síntomas tras la exposición a gluten en el paciente con celiaquía puede remontarse a un pequeño segmento de α -gliadina. Finalmente, se muestra que este péptido "super-antigénico" largo puede desintoxicarse *in vitro* e *in vivo* mediante tratamiento con prolil-endopeptidasa bacteriana, proporcionando una terapia de peptidasa para celiaquía.

20

25

30

[0094]

La identificación de péptidos estables de proteasa gástrica, proteasa pancreática y peptidasa de la membrana del borde en cepillo catalizó la digestión de α 2-gliadina recombinante: la proteína α 2-gliadina, una α -gliadina representativa (Arentz-Hansen y col. (2000) Gut 46:46), se expresó en forma recombinante y se purificó a partir de *E. coli*. El gen de α 2-gliadina se clonó en el plásmido pET28a (Novagen) y se transformó en el huésped de expresión BL21 (DE3) (Novagen). Las células transformadas se cultivaron en cultivos de 1 litro de medio LB que contenía 50 μ g/ml de kanamicina a 37°C hasta que se logró la DO_{600} 0,6-1. La expresión de la proteína α 2-gliadina se indujo con la adición de isopropil- β -D-tiogalactósido 0,4 mM (Sigma) y los cultivos se incubaron adicionalmente a 37°C durante 20 horas. Las células que expresaban la α 2-gliadina recombinante se centrifugaron a 3600 rpm durante 30 minutos. El sedimento se resuspendió en 15 ml de tampón de disrupción (fosfato de sodio 200 mM; NaCl 200 mM; DTT 2,5 mM; benzamidina 1,5 mM; EDTA 2,5 mM; 2 mg/l de pepstatina; 2 mg/l de leupeptina; 30% v/v de glicerina) y se lisó por sonicación (1 minuto; control de salida fijado a 6). Después de la centrifugación a 45000 g durante 45 min, el sobrenadante se desechó y el sedimento que contenía la proteína gliadina se resuspendió en 50 ml de urea 7 M en Tris 50 mM (pH = 8,0). La suspensión se centrifugó de nuevo a 45000 g durante 45 min y el sobrenadante se recogió para la purificación. El sobrenadante que contenía α 2-gliadina se incubó con 1 ml de resina de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA; Qiagen) durante la noche y luego se cargó en lotes a una columna con 2 ml de Ni-NTA. La columna se lavó con urea 7 M en Tris 50 mM (pH = 8,0) y la α 2-gliadina se eluyó con imidazol 200 mM, urea 7 M en Tris 50 mM (pH = 4,5). Las fracciones que contenían α 2-gliadina se reunieron en una concentración final de disolución de etanol al 70% y se añadieron dos volúmenes de NaCl 1,5 M para precipitar la proteína. La disolución se incubó a 4°C durante la noche y el precipitado final se recogió por centrifugación a 45000 g durante 30 min, se aclaró en agua y se recentrifugó para eliminar la urea. La etapa de purificación final de la α -2 gliadina se desarrolló con HPLC en fase inversa. Las fracciones de proteína purificada en Ni-NTA se reunieron en tampón urea 7 M y se inyectaron a una columna de fase inversa de poliestireno Vydac (Hesperia, CA) (d.i. 4,6 mm x 25 cm) con el disolvente de partida (30% de disolvente B: 1:1 de acetonitrilo de calidad para HPLC/isopropanol : 0,1% de TFA). El disolvente A fue una disolución acuosa con 0,1% del TFA. El gradiente de separación se extendió del 30-100% de disolvente B durante 120 min a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min.

55

[0104] Aunque las proteínas del gluten de granos alimentarios tales como trigo, centeno y cebada son componentes centrales de una dieta nutritiva, pueden ser extremadamente tóxicas para pacientes que padecen celiaquía. Para aclarar la base estructural de la toxicidad del gluten en celiaquía se realizó un análisis proteolítico exhaustivo sobre una gliadina recombinante representativa bajo condiciones fisiológicamente relevantes. Se descubrió un producto de péptido anormalmente largo y proteolíticamente activo cuya relevancia fisiológica se confirmó por estudios que implicaban proteínas de la membrana del borde en cepillo de intestinos de rata y humanos, además de ensayos de perfusión intestinal en ratas vivas. En conjunto, estos datos demuestran que este péptido y sus homólogos encontrados en otras proteínas de trigo, centeno y cebada contribuyen significativamente a la respuesta inflamatoria a trigo alimentario en pacientes con celiaquía.

10

[0105] La ausencia de modelos animales satisfactorios para celiaquía implica que la naturaleza patogénica fundamental de los péptidos del gluten identificados en este estudio sólo puede verificarse en pacientes humanos. Aunque es probable que esto sea una tarea formidable, y en cualquier caso necesitaría realizarse de un modo que no dañara al paciente, los resultados anteriores demuestran que los efectos perjudiciales de la ingestión de gluten por pacientes con celiaquía pueden mejorarse por tratamiento con enzimas de alimentos que contienen gluten. Específicamente, la coadministración de una forma biodisponible de una prolil-endopeptidasa adecuada con gluten alimentario atenuaría su toxicidad escindiendo el péptido 33-mero estable en productos no inmunogénicos. Dada la ausencia de una opción terapéutica satisfactoria para celiaquía y la notoria dificultad asociada al mantenimiento a largo plazo de una dieta sin gluten, las terapias con peptidasa de la presente invención proporcionan una alternativa a la estricta abstinencia de los números rápidamente crecientes de individuos afectados por esta enfermedad.

20

Ejemplo 3

Complementación con peptidasa como terapia para celiaquía - Demostración de eficacia y seguridad en ratas y seres humanos *in vivo*

25

[0106] Como se ha descrito anteriormente, la celiaquía es una enfermedad engendrada por los péptidos de gliadina en trigo, centeno o cebada que interactúan con el intestino delgado para producir una cascada de acontecimientos que conducen a la destrucción de la mucosa intestinal y a la consiguiente intolerancia de nutrientes y vitaminas. Los péptidos de gliadina son altamente resistentes a la digestión por proteasas gástricas y pancreáticas, además de por las peptidasas integrales de la superficie de borde en cepillo intestinal. La interacción de α -gliadina recombinante con pepsina, quimotripsina, tripsina y elastasa de mamífero ha mostrado que un péptido de 33 residuos rico en residuos de glutamina (Q) y prolina (P) (LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO:12)) es un producto de digestión final importante. Si este 33-mero se expone al intestino delgado de rata intacto o a membranas del borde en cepillo intestinales humanas, es inmune a ruptura adicional. Este péptido tiene especificidad muy alta por la estimulación de la proliferación de linfocitos T en cultivos de linfocitos de sangre periférica de pacientes con celiaquía, pero no en cultivos de linfocitos de individuos normales. Debido a la resistencia de este y otros péptidos de gliadina a la digestión pancreática e intestinal y la abundancia de residuos de prolina en estos péptidos, el péptido 33-mero y otros péptidos de gliadina se expusieron a una prolil-endopeptidasa, que demostró que esta enzima es altamente eficaz bajo condiciones fisiológicas en la rotura de enlaces peptídicos entre la prolina y el siguiente residuo en la cadena del péptido. La consiguiente escisión del péptido de gliadina hizo que fuera incapaz de inducir la proliferación de linfocitos, demostrando que el procesamiento adicional del péptido de gliadina debería evitar su reacción tóxica con el intestino en pacientes con celiaquía.

30

35

40

[0107] Este ejemplo describe experimentos para demostrar que una PEP es eficaz en digerir adicionalmente los péptidos de gliadina tóxicos bajo condiciones fisiológicas. Pacientes con celiaquía, según los procedimientos de la presente invención, pueden consumir una dieta normal junto con un complemento de PEP que digerirá el péptido de gliadina tóxico y sorteará la reacción que conduce a la proliferación de células T y a la destrucción de la mucosa intestinal. Esto es un tratamiento alternativo e innovador en celiaquía - la sustitución de una estricta dieta sin gluten con una endopeptidasa digestiva exógena que promueve el metabolismo y la desintoxicación esencial del péptido de gliadina. Los estudios descritos en este ejemplo pueden usarse para documentar la eficacia y seguridad e incluyen un estudio piloto en controles y pacientes celíacos con harina de trigo tratada con PEP. Éstos son estudios importantes que permiten el establecimiento de un ensayo clínico completo en seres humanos normales y aquellos con celiaquía.

45

[0108] Los estudios descritos en este ejemplo incluyen lo siguiente:

Determinar si la complementación de peptidasa exógena digiere péptidos de gliadina resistentes a productos absorbibles no tóxicos en la rata *in vivo* bajo condiciones fisiológicas. Este estudio implica:

Expresión y purificación de prolil-endopeptidasa (rPEP) recombinante;

Examen de la acción de rPEP sobre péptidos de gliadina en intestino de rata *in vivo*; y determinación de condiciones óptimas para la eficaz digestión y el análisis de los efectos sobre la estructura intestinal y la función con administración aguda y crónica.

Realizar pruebas clínicas preliminares de la eficacia de PEP en el procesamiento de los péptidos de gliadina resistentes en harina de trigo a productos no tóxicos.

Establecer las condiciones ideales para envolver las rPEP para lograr la eficaz digestión de péptidos de gliadina *in vivo*, que incluye la preparación de formulaciones de rPEP (cápsulas de polianhídrido, cápsulas de metacrilato-glicol; OROS).

[0109] Como se describe en los ejemplos precedentes, los experimentos que implican la exposición de α -gliadina a proteasas pancreáticas purificadas han demostrado la producción de un péptido rico en glutamina y prolina de 33 residuos (LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO:12)) como producto final importante. Si este péptido se administra por perfusión en el intestino delgado de la rata intacta bajo condiciones fisiológicas o se incuba con membranas del borde en cepillo intestinales humanas, su digestión es relativamente retardada con respecto a la de la mayoría de los péptidos alimentarios tales como mioglobina de músculo periférico. Los experimentos demuestran que una prolil-endopeptidasa (PEP) (de *Flavobacterium meningosepticum*) a concentraciones molares de sólo una centésima de aquellas del péptido de gliadina 33-mero resistente a la digestión puede escindirlos eficientemente en péptidos más pequeños que son 1) péptidos residuales no tóxicos (como se estima a partir del ensayo de proliferación de células T humanas), y 2) pueden digerirse fácilmente adicionalmente y ser absorbidos por el intestino de rata. Las condiciones para la acción óptima de la PEP sobre el péptido 33-mero de α -gliadina resistente y otros péptidos de gliadina que reaccionan en el ensayo de proliferación de células T pueden determinarse mediante los procedimientos expuestos en este ejemplo.

[0110] Para demostrar que la complementación con peptidasa exógena digiere péptidos de gliadina resistentes a productos absorbibles no tóxicos *in vivo* bajo condiciones fisiológicas puede realizarse la expresión y purificación de la prolil-endopeptidasa recombinante (rPEP). La prolil-endopeptidasa recombinante (rPEP) de *Flavobacterium meningosepticum* puede construirse y expresarse como se ha detallado por Yoshimoto Tet y col., y por Uchiyama y col. También pueden obtenerse preparaciones recombinantes de una enzima PEP de *Aeromonas hydrophila* como se ha detallado por Shen y col. o de *Sphingomonas capsulata* (Kabashima T, Fujii M, Meng Y, Ito K, Yoshimoto T., Prolyl endopeptidase from *Sphingomonas capsulata*: isolation and characterization of the enzyme and nucleotide sequence of the gene, Arch Biochem Biophys. 1998 Oct 1;358(1):141-8.)

[0111] Para demostrar que la acción de rPEP sobre los péptidos de gliadina en intestino de rata *in vivo* y para determinar las condiciones óptimas para la eficiente digestión pueden realizarse estudios de perfusión intestinal en ratas intactas del siguiente modo. Ratas Sprague-Dawley (300-400 g) se anestesian con pentobarbital, el abdomen se atraviesa por una incisión en la línea media y se aísla una longitud de 10-20-cm de yeyuno y se cateteriza como se ha detallado previamente. Un péptido de prueba (GLGG 1mM) que se sabe que se digiere eficientemente en la superficie intestinal se perfunde por el segmento aislado a 0,4 ml por min en NaCl 154 mM / polietilenglicol al 0,1% para permitir el cálculo de cualquier flujo de agua. La desaparición del péptido de prueba y la aparición de cualquier producto permitirá el cálculo de la digestión y la absorción de la superficie intestinal. Estos resultados se comparan con los de los péptidos de gliadina resistentes digestivos QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO:1), PQPQLPYQPQLPY (SEQ ID NO:3) y el 33-mero LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO:12). El péptido GLGG es fácilmente hidrolizado a Leu y Gly libres y al dipéptido GG; el alto contenido de prolina de los péptidos de gliadina hace que sean sustratos malos para las peptidasas de la membrana intestinal disponibles. Las muestras de la luz intestinal tomadas en el sitio del catéter distal se analizan por cromatografía líquida-espectrometría de masas (SpectraSystem, ThermoFinnigan) en una columna de fase inversa C18 como se ha detallado previamente. Los fragmentos de péptidos se detectan y sus identidades se confirman por patrones de fragmentación de espectrometría de masas en condiciones en las que hay una relación lineal de estos péptidos y sus productos.

[0112] Después de haberse establecido el grado de digestión y absorción relativo de los péptidos GLGG y de gliadina pueden realizarse experimentos para demostrar la eficacia de PEP en la digestión de los péptidos en este modelo de rata *in vivo*. Inicialmente, la PEP se perfunde mediante un catéter separado en el sitio de infusión proximal del segmento del yeyuno aislado a concentraciones molares que oscilan de 1:1000 a 1:1 de las de los péptidos de prueba. Los experimentos preliminares muestran que una relación molar de PEP:péptido de 1:100 es suficiente para la eficiente escisión en el extremo C de residuos de prolilo internos para la secuencia de gliadina. Pero también es importante probar la PEP a mayores concentraciones en el caso de que se requiera y se desee más actividad de peptidasa para la escisión total de los péptidos de gliadina y para evaluar efectos secundarios

reclutan voluntarios de control que se ha establecido que no tienen celiacía y estudios de anticuerpos celiacos negativos. Durante este periodo se dan magdalenas de control hechas con harina que ha sido tratada con proteasas pancreáticas desnaturalizadas \pm PEP. Las magdalenas PEP+ se dan durante las dos primeras semanas seguidas de una pausa de dos semanas de los desayunos, y las magdalenas PEP- se administran durante las segundas sesiones de desayunos de dos semanas. El estudio puede ser de simple ciego, ignorando los sujetos si la PEP se incluye en el estudio. El médico y el nutricionista sabrán que la harina se ha expuesto sólo a las proteasas pancreáticas o también a PEP, en el caso de que haya cualquier reacción adversa al material de PEP. Todos los sujetos del estudio rellenarán un cuestionario referente a sus observaciones durante cada periodo de dos semanas, además de durante el tiempo de pausa de dos semanas, y las dos semanas después del segundo periodo de desayuno de magdalenas. Aunque la obtención de una biopsia mediante endoscopia sería un control ideal de la eficacia de PEP, esto no puede justificarse éticamente basándose en los datos actualmente disponibles. La endoscopia puede ofrecerse sólo si se necesita como un aspecto del cuidado del paciente. Los participantes se reunirán inicialmente brevemente con el investigador médico responsable que estará disponible durante todo el estudio. Los participantes serán entrevistados y el cuestionario será revisado por un nutricionista y médico antes del estudio, al final de cada periodo de dos semanas y dos semanas después de completarse el estudio. El investigador principal será en última instancia responsable de la realización del ensayo y se reunirá regularmente con el médico responsable y el nutricionista al que se le delegarán los aspectos del día a día del estudio. Adultos de edad de 17 y mayores pueden ser elegidos para el estudio. Se reclutarán tanto hombres como mujeres con celiacía mediante organizaciones de ayuda a celiacos. Pueden reclutarse individuos de diversos grupos étnicos, que incluyen asiático y africano-americanos, aunque la mayoría de los pacientes con celiacía son caucásicos. Pueden participar tanto hombres como mujeres; hay una proporción algo mayor de pacientes femeninos con celiacía (-65%). Los participantes tendrán acceso durante las 24 horas al equipo de gastroenterología, y un miembro del equipo estará disponible para consulta. La eficacia se monitorizará mediante las respuestas comparativas de participantes durante el periodo de control cuando se ingiere harina tratada con proteasa sin la PEP frente a la misma harina que ha sido tratada con PEP.

[0117] Las condiciones adecuadas para envolver la rPEP para lograr una eficiente digestión de péptidos de gliadina *in vivo* pueden determinarse del siguiente modo. Para desarrollar una preparación de PEP agradable al paladar para permitir la digestión *in vivo* de los péptidos tóxicos en seres humanos puede ser útil formular la PEP de manera que pueda pasar al intestino delgado sin ser destruida por el riguroso entorno ácido del estómago. Además, esta formulación puede proporcionar la rápida liberación de PEP tras la entrada en el duodeno en el que las proteasas pancreáticas secretadas ejercen su acción máxima dentro del contenido luminal para escindir las proteínas alimentarias. Hay varios ejemplos muy estudiados y ampliamente usados de tales sistemas de administración para otras sustancias. El desarrollo de una formulación optimizada para un fármaco de PEP eficaz que puede administrar cantidades farmacológicamente útiles de esta enzima en el intestino delgado superior como un complemento digestivo puede realizarse del siguiente modo. Para procesar los péptidos de gliadina resistentes a la digestión pueden usarse estrategias de formulación seleccionadas que se han usado satisfactoriamente para la administración de otros complementos de enzima. En particular, las formulaciones previamente usadas para proteasas pancreáticas y lactasa se evalúan mediante el uso de PEP recombinante de *Flavobacterium meningosepticum* y *Aeromonas hydrophila*. Estas enzimas se expresan y se purifican como se ha descrito por A. Kitazono y col. y A. Kanatani y col. Las enzimas pancreáticas se usaron durante los años setenta para tratar insuficiencia exocrina pancreática. Aunque resultados clínicos tempranos fueron variables debido a la inactivación gástrica de las enzimas exógenamente administradas, una reactivación del interés en las ayudas digestivas que contienen enzimas se produjo aproximadamente en 1960 con el desarrollo de recubrimientos entéricos estables a ácidos (I.R. Wilding, S.S. Davis, y D. T. O'Hagan, Targeting of drugs and vaccines to the gut. Pharmac. Ther. 62, 97-124, (1994)). Similarmente, los recubrimientos entéricos estables a ácidos también se han usado para la administración de lactasa al duodeno de pacientes con deficiencia de lactasa. En una realización, las formulaciones de PEP de la invención comprenden una PEP en un recubrimiento entérico estable.

[0118] PEP particulada liofilizada mezclada con bicarbonato (como tampón) se recubre con Eudragit S100, L30D o L 100-44 según instrucciones del fabricante (Rohm America). Alternativamente pueden usarse ftalato de acetato de celulosa, ftalato de metilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa como recubrimientos para la preparación de pellas resistentes a los ácidos gástricos. Estos recubrimientos entéricos se usan comúnmente para la formulación de pancreatina (véase T. Sipos (1978), Preparation of enteric coated digestive enzyme compositions, patente de EE.UU. nº 4.079.125; y T. Sipos (1998), High buffer-containing enteric coating digestive enzyme bile acid compositions and method of treating digestive disorders therewith, patente de EE.UU. 5.750.104).

[0119] Una estrategia alternativa útil en la preparación de formulaciones de la invención, usada satisfactoriamente con lactasa (B.J. Langner (1999), Enteric polymer coated capsule containing dried bacterial

culture for supplying lactase, patente de EE.UU. 6.008.027), implica llenar cápsulas de gelatina con 50-90% de PEP liofilizada, estando el resto de la capacidad llena de desecantes estabilizantes tales como óxido de silicio, dióxido de silicio o celulosa microcristalina y tampón bicarbonato. Las cápsulas se recubren entéricamente con el polímero Eudragit (Rohm America) o ftalato de acetato de polivinilo (Sureteric, Merck Frosst) y se secan vacío antes de uso.

5 Similarmente, la diastasa se ha formulado con Eudragit RS100 y recubrimientos de ftalato de acetato de celulosa para uso entérico (S.P. Vyas, P.J. Gogoi, S. Pande, y V.K. Dixit, Enteric spherules diastase in enzyme preparations. J. Microencapsulation. 8, 447-454, 1991). Para demostrar que estas u otras formulaciones aumentan la biodisponibilidad de PEP en el intestino delgado pueden realizarse los siguientes experimentos. Primero puede evaluarse la capacidad de la actividad de PEP para resistir 0,5-2 h de tratamiento gástrico simulado (pepsina, en HCl

10 0,1 N, pH 2). Si puede retenerse reproduciblemente >10% de la actividad, la formulación se expone a condiciones simuladas en el duodeno (tampón a pH 6,5 que contiene tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa a una relación molar 1:100 y elastasa a una relación 1:500 con la α 2-gliadina putativa). Idealmente, la liberación completa de la actividad de PEP se lograría en el transcurso de 15 minutos. Las formulaciones que satisfacen los criterios anteriores se alimentan inicialmente a ratas adultas conjuntamente con comidas sin gluten con adiciones conocidas

15 de α 2-gliadina recombinante (cuyo comportamiento proteolítico en respuesta a enzimas gástricas y pancreáticas + PEP se ha caracterizado bien). Pueden evaluarse las dosis de PEP en el intervalo de 10-1000 unidades/kg de peso corporal. Los animales se sacrifican dos horas después de las comidas, y los contenidos derivados del intestino delgado se analizan por EM-CL para actividad de PEP residual y el grado al que se ha proteolizado la gliadina. En particular se estima la concentración del péptido de gliadina 33-mero resistente a la digestión. Las formulaciones que

20 dan >90% de reducción en la concentración de este péptido se evalúan más exhaustivamente para la posible toxicidad, como se ha detallado anteriormente para los estudios en ratas iniciales con PEP soluble en agua PEP.

[0120] Los procedimientos descritos en este documento se realizan bajo un protocolo para animales autorizado descrito más adelante. A ratas macho Sprague-Dawley, 250-300 g, (o ratas Fisher para los estudios de

25 intestino deficiente en DPP IV) se les permite el acceso a pienso para ratas basado en trigo regular hasta el experimento. A las ratas se les permite agua sólo durante 8 horas antes del experimento para asegurar la eliminación del pienso residual en el intestino delgado superior. Después de anestesiarse la rata con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (50 mg/kg), la cavidad abdominal se abre y se hace una pequeña incisión en un segmento del yeyuno localizado 10 cm más allá del ligamento de Trietz. La canulación se hace con un catéter de

30 polietileno (3 mm de di, 4 mm de de) y se sutura 2 cm distal a la incisión. Una segunda cánula se coloca en un modo similar 10 cm distal a la primera estando la cánula orientada proximalmente. Después de aclarar el segmento yeyunal intacto aislado con disolución de Ringer (NaCl 140 mM, KHCO₃ 10 mM, K₂HPO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgCl₂ 1,2 mM) a 37°C para eliminar cualquier residuo intraluminal, el bucle aislado del intestino se devuelve a la cavidad abdominal. La incisión se cubre con envoltura de plástico transparente y la temperatura intraabdominal se

35 mantiene a 37°C colocando una lámpara incandescente de 30 vatios a - 30 cm del animal. Una disolución 2 mM de un péptido de gliadina de 7-14 residuos (purificado y caracterizado por HPLC-espectrometría de masas) se perfunde en disolución de Ringer que contiene [¹⁴C]inulina (un marcador de concentración de la dilución) para establecer un estado estacionario de concentraciones de péptido residual y productos más pequeños en el sitio de recogida distal a la recogida (estudios previos con otros péptidos y carbohidratos han revelado que el estado estacionario se

40 alcanza en 10-20 minutos). Las muestras recogidas en el sitio distal se recuperan y se analizan por HPLC-EM para el péptido residual y productos de péptidos o aminoácidos más pequeños. Las muestras se recogen durante 3 periodos sucesivos de 10 minutos después de alcanzarse un estado estacionario, y se usa una serie de gliadina y péptidos de no gliadina. Los animales pueden mantenerse normalmente bajo anestesia durante un periodo de 3 a 6 horas mediante la adición de pequeños incrementos de pentobarbital (~5 mg por 30-60 minutos). Al final del

45 experimento, el segmento intestinal y un segmento de control adyacente se recuperan y se toman muestras de hígado, riñón y sangre para el análisis del péptido de prueba y sus productos. La eutanasia terminal se lleva a cabo mediante una sobredosis de anestesia para producir apnea hasta que no hay contracción del corazón.

[0121] Aunque pueden emplearse otros procedimientos y reactivos, este ejemplo proporciona enzimas,

50 formulaciones de enzimas y protocolos de ensayo en animales y clínicos para demostrar la eficacia de terapia mediada por enzimas para celiaquía.

Ejemplo 4

55 Expresión heteróloga de PEP en *Lactobacilli*

[0122] En una realización de la presente invención, un paciente con celiaquía está provisto de un organismo recombinante modificado para expresar una PEP de la invención. El organismo recombinante se selecciona de aquellos organismos que pueden colonizar la mucosa intestinal sin perjuicio para el paciente, proporcionándose así

una fuente endógena de PEP al paciente. Como ejemplo, *Lactobacilli* tales como *L. casei* y *L. plantarium* pueden colonizar la mucosa intestinal y secretar enzimas PEP localmente. Dado su amplio uso en el procesamiento de alimentos, también pueden usarse como una fuente eficiente de PEP para uso industrial (para tratar productos alimenticios) y médico (para preparar PEP para formulación farmacéutica). Las PEP pueden expresarse en tales

5 *Lactobacilli* usando tecnologías de ADN recombinante habituales. Por ejemplo, Shaw y col. (Shaw, DM, Gaerthe, B; Leer, RJ, Van der Stap, JGMM, Smittenaar, C.; Den Bak-Glashouwer, Heijne, MJ, Thole, JER, Tielen FJ, Pouwels, PH, Havenith, CEG (2000) *Immunology* 100, 510-518) han manipulado especies de *Lactobacilli* para expresar la toxina del tétanos intracelular y unida a la superficie. Los genes de PEP intactos (incluyendo secuencias conductoras para la secreción bacteriana eficiente) pueden clonarse en vectores de expresión lanzadera tales como pLP401 o

10 pLP503 bajo el control del promotor de la amilasa (regulable) o el promotor de la lactato-deshidrogenasa (constitutivo), respectivamente. Alternativamente pueden generarse cepas de *Lactobacilli* recombinantes de calidad para alimento por tecnología de recombinación específica para sitio (por ejemplo, véase Martin MC, Alonso, JC, Suarez JE, y Alvarez MA *Appl. Env. Microbiol.* 66, 2599-2604, 2000). Se usan condiciones de cultivo estándar para la fermentación de *Lactobacilli* tales como aquellos descritas por Martin y col.

15

Ejemplo 5

Expresión heteróloga de PEP en levaduras

20 **[0123]** Células y organismos que se producen tanto naturalmente como recombinantes pueden usarse para producir las PEP útiles en la práctica de la presente invención. PEP preferidas y células productoras incluyen aquellas de organismos conocidos por ser generalmente considerados como seguros tales como *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Sphingomonas*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Xanthomonas*, *Pyrococcus*, *Bacillus* y *Streptomyces*. Las enzimas PEP extracelulares pueden obtenerse a partir de microorganismos tales como *Aspergillus oryzae* y

25 *Lactobacillus casei*. Las células preferidas incluyen aquellas que ya se usan en la preparación de productos alimenticios, pero que se han modificado para expresar una glutenasa útil en la práctica de la presente invención. Como ejemplo, cepas de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae* son útiles para la expresión de alto nivel de proteínas heterólogas secretadas. Los genes que codifican cualquiera de las PEP descritas anteriormente (sólo proteína madura) pueden clonarse en plásmidos de expresión diseñados para la producción óptima de proteínas secretadas. Un ejemplo de una estrategia de expresión heteróloga tal se describe en Parekh, R.N. y Wittrup, K.D. (Biotechnol. Prog. 13, 117-122, 1997). Pueden usarse vectores tanto autorreplicantes (por ejemplo, 2 micrómetros) como integrantes (por ejemplo, pAUR101). El promotor de GAL1-10 es un ejemplo de un promotor inducible, mientras que el promotor de ADH2 es un ejemplo de un promotor constitutivo. El ADNc que codifica la PEP madura está fusionado en la dirección 3' de una secuencia conductora que contiene una región pre-pro sintética que incluye

30 un sitio de escisión de la señal y un sitio de escisión Kex2p. BJ5464 de *S. cerevisiae* puede usarse como huésped para la producción de la peptidasa. Condiciones de fermentación en matraces agitados se describen por Parekh y Wittrup en la referencia anteriormente citada. Alternativamente pueden usarse cultivos de lotes alimentados a alta densidad de células para la producción a gran escala de las peptidasas; un procedimiento representativo para este fin se describe en Calado, C.R.C, Mannesse, M., Egmond, M., Cabral, J.M.S. y Fonseca, L.P. (Biotechnol. Bioeng. 40 78, 692-698, 2002).

Ejemplo 6

Formulación de cápsulas entéricas de prolil-endopeptidasa

45

[0124] Se llenan cápsulas de gelatina con 100 mg de prolil-endopeptidasa y 10 mg de dióxido de silicio. Las cápsulas se recubren estéricamente con el polímero Eudragit y se colocan en una cámara de vacío durante 72 horas. Entonces, las cápsulas se mantienen a un intervalo de temperatura de 10°C a 37°C y un nivel de humedad controlada del 35-40%.

50

Ejemplo 7

Estudios de formulación de cápsulas entéricas de prolil-endopeptidasa

55 **[0125]** Se realiza un estudio en el que los pacientes con celiaquía se enrolan en un estudio de dos semanas de duración. Se usan cápsulas de gelatina que contiene 90% de prolil-endopeptidasa mezclada con 10% de dióxido de silicio. La cápsulas se llenan a mano con la mezcla, se unen y se recubren con un recubrimiento entérico Sureteric al 10% (un polímero de poli(ftalato de acetato de vinilo) desarrollado por la empresa filial canadiense de Merck & Company). Las muestras se prueban para ácidos mediante exposición del recubrimiento a HCl 1 N durante

inmortal secretora de inmunoglobulinas. Muchas de tales líneas celulares (tales como mielomas) son conocidas para aquellos expertos en la materia. Además, los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno pueden producirse por ingeniería genética. En esta técnica, como con el procedimiento de hibridomas estándar, las células productoras de anticuerpo están sensibilizadas para el antígeno o inmunógeno deseado. El ARN mensajero aislado de las células o hibridomas del bazo inmunitarias se usa como molde para preparar ADNc usando amplificación por PCR. Se produce una biblioteca de vectores, conteniendo cada uno un gen de la cadena pesada y un gen de la cadena ligera que retiene la especificidad inicial por antígenos mediante inserción de secciones apropiadas del ADNc de inmunoglobulinas amplificado en los vectores de expresión. Se construye una biblioteca combinatoria combinando la biblioteca de genes de la cadena pesada con la biblioteca de genes de la cadena ligera. Esto produce una biblioteca de clones que coexpresa una cadena pesada y ligera (que se parece al fragmento Fab o fragmento de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo). Los vectores que llevan estos genes están cotransfectados en un huésped (por ejemplo, bacterias, células de insecto, células de mamífero, u otra célula huésped de producción de proteínas adecuada). Si la síntesis de genes de anticuerpos se induce en el huésped transfectado, las proteínas de la cadena pesada y ligera se autoensamblan para producir anticuerpos activos que pueden detectarse cribando con el antígeno o inmunógeno.

[0131] El péptido 33-mero es excepcionalmente resistente a la proteólisis gastrointestinal, permitiendo así que el péptido persista cuando se desplaza por el tracto intestinal. Por tanto, este péptido incluye múltiples copias de epítopes inmunogénicos de gliadina que son reconocidos por anticuerpos en la mayoría de pacientes celíacos. Debido a que se sabe que los epítopes multivalentes provocan una respuesta inmunitaria especialmente vigorosa (por ejemplo Boniface y col., 1998, *Immunity* 9: 459), el 33-mero y sus derivados desamidados tienen propiedades inflamatorias en el intestino del celíaco, incluso a bajas dosis. Además, como se sabe que la tTGasa se liga transitoriamente a su sustrato, en este documento se describen proteínas de fusión en las que toda o una parte de un tTGasa de mamífero que incluyen, pero no se limitan a, tTGasa humana, bovina, equina y porcina, está ligada, normalmente covalentemente, al 33-mero, siendo el sitio de enlace un sitio para la desamidación eventual. Esta proteína de fusión es un estimulador altamente potente de linfocitos T de pacientes con celiaquía en la que la proteína de fusión imita exactamente los complejos formados en pacientes con celiaquía y es reconocida por los anticuerpos anti-tTGasa y por linfocitos T en aquellos pacientes.

[0132] En este documento se describe un diagnóstico para celiaquía que es una prueba de orina. Es muy conocido que la permeabilidad del intestino delgado aumenta durante la celiaquía activa y se reduce de nuevo cuando se sigue una estricta dieta sin gluten (por ejemplo Johnston y col., 2001, *Lancet* 358: 259). Como el péptido 33-mero atraviesa el intestino delgado, una pequeña cantidad del péptido derivado de una comida de prueba inducirá fugas, y a su vez será transportado a través de la capa epitelial, y pasará a la orina. Dada su resistencia proteolítica, este péptido emergerá en la orina, y puede detectarse por procedimientos analíticos estándar tales como CL-espectrometría de masas en tándem o una prueba de diagnóstico basada en anticuerpos. La presencia del péptido en la orina es diagnóstico de celiaquía. La sensibilidad de este procedimiento de diagnóstico podría aumentarse mediante el uso de ¹³C u otros péptidos marcados. Además, en la práctica habitual, un individuo del que se sospecha que tiene celiaquía se pone normalmente a una dieta sin gluten y luego se expone al gluten algunas semanas después para ver si los síntomas reaparecen. Las pruebas de diagnóstico descritas pueden usarse tras la primera sospecha del médico de que un individuo padece celiaquía, evitándose así los efectos perjudiciales de poner al individuo de nuevo a una dieta que contiene gluten y reinducir los síntomas de enfermedad.

[0133] También se describe un diagnóstico para celiaquía que es una prueba de sangre. Como se trata anteriormente, el 33-mero también puede detectarse en muestras de sangre periférica cuando se ingiere en pequeñas cantidades por individuos con celiaquía o en el momento de un cribado inicial en un consultorio médico.

[0134] En este documento se describe un diagnóstico para celiaquía que se basa en tinción de la biopsia intestinal. Pueden usarse formas marcadas del 33-mero (por ejemplo, péptido conjugado con una marca fluorescente u otra marca) para teñir muestras de biopsia intestinal de pacientes con celiaquía. Debido a su multivalencia y a la alta afinidad anticipada para células presentadoras de antígeno y, a su vez, linfocitos T inflamatorios, tales péptidos pueden usarse para detectar la presencia de células inmunitarias específicas para enfermedad en tejido de biopsia. De particular relevancia es el uso de tales ensayos para identificar pacientes cuya enfermedad está en remisión como resultado de una dieta sin gluten. Como se observa anteriormente, las prácticas clínicas habituales no pueden diagnosticar un paciente cuando está en una dieta sin gluten, y requieren que el paciente se someta a la incomodidad de una dieta que contiene gluten durante un periodo de tiempo significativo.

[0135] También se describe un diagnóstico para celiaquía en el que formas marcadas del 33-mero se usan para detectar células inmunitarias específicas para enfermedad en sangre periférica.

- [0136]** Adicionalmente, la presente divulgación proporciona un diagnóstico para celiacía que se basa en una exposición de la mucosa bucal. Los péptidos inflamatorios del gluten pueden usarse para detectar celiacía mediante exposición local a la mucosa bucal de pacientes (véase Lahteenoja y col., 2000, Am. J. Gastroenterol. 95: 2880). Dada la resistencia proteolítica y la inmunogenicidad del 33-mero, el 33-mero puede ser especialmente útil en un procedimiento de diagnóstico en el que el péptido se pone en contacto con la mucosa bucal de un individuo, y se hace un diagnóstico de celiacía si resulta inflamación. De nuevo, una ventaja particular de una prueba tal sería su sensibilidad para detectar un paciente cuya enfermedad está en remisión debido a una dieta sin gluten.
- [0137]** El diagnóstico implica detectar la presencia de linfocitos T reactivos con el 33-mero o un homólogo desamidado del mismo, o un homólogo ligado a tTGasa del mismo en un tejido, fluido corporal o heces de un individuo. Los linfocitos T también pueden detectarse por proliferación en respuesta a exposición a un antígeno y presentarse por células presentadoras de antígeno autólogas o alogénicas adecuadas. La presencia de tales linfocitos T reactivos indica la presencia de una respuesta inmunitaria en marcha. El antígeno usado en los ensayos puede ser el 33-mero completo, homólogo desamidado, o un homólogo ligado a tTGasa; o péptidos derivados del mismo, normalmente tales péptidos tendrán al menos aproximadamente 12 aminoácidos de longitud. Puede prepararse un subconjunto de péptidos, o una mezcla que engloba la secuencia completa. Pueden generarse péptidos solapantes, estando cada péptido desplazado en el marco de 1 a 5 aminoácidos, generándose así un conjunto de epítopes.
- [0138]** La cuantificación de linfocitos T puede realizarse determinando la unión afín de los receptores de linfocitos T presentes sobre una célula a un complejo de MHC / péptido, por ejemplo, usando tetrámeros del MHC de clase I o clase II (véase Altman y col. Science (1996) 274: 94-96; McMichael y O'Callaghan J Exp Med. (1998) 187: 1367-1371). Los tetrámeros del MHC son complejos de los fragmentos solubles de cuatro moléculas del MHC que están asociadas a un péptido específico. El tetrámero puede unirse a un fluorocromo u otra marca detectable (véase Ogg y col. (1998) Curr Opin Immunol. 10: 393-396). El tetrámero puede comprender un fragmento soluble de molécula HLA-DQ2 [DQ(a1*0501, b1*02)] y/o DQ8 [DQ(a1*0301, b1*0302)], u otros tipos de MHC apropiados para el individuo que se prueba.
- [0139]** El diagnóstico puede determinar el nivel de reactividad, por ejemplo, basándose en el número de linfocitos T reactivos encontrados en una muestra con respecto a un control negativo de un huésped que no ha recibido tratamiento, o normalizado a la curva de datos obtenida de uno o más controles positivos. Además de detectar la presencia cualitativa y cuantitativa de linfocitos T reactivos para antígeno, los linfocitos T pueden tiparse como para la expresión de citocinas que se sabe que aumentan o suprimen respuestas inflamatorias. Aunque no es necesario para fines de diagnóstico, también puede desearse tipar la especificidad epítópica de los linfocitos T reactivos, particularmente para uso en la administración terapéutica de péptidos.
- [0140]** En otra realización, el diagnóstico implica detectar la presencia de un anticuerpo reactivo con el 33-mero o un homólogo desaminado del mismo, o un homólogo ligado a tTGasa del mismo en un tejido, fluido corporal o heces de un individuo. Un anticuerpo se detecta, por ejemplo, por un ensayo de aglutinación usando un antígeno. Las muestras pueden obtenerse de tejido de paciente, que puede ser un tejido de la mucosa que incluye, pero no se limita a, tejido de la mucosa bucal, nasal, pulmonar e intestinal, un fluido corporal, por ejemplo, sangre, esputo, orina, flema, linfa y lágrimas. En el término también están incluidos derivados y fracciones de tales fluidos. Muestras de sangre y derivados de las mismas son de particular interés. Una ventaja es que los antígenos proporcionados son antígenos tan potentes que los procedimientos de diagnóstico pueden emplearse con muestras (tejido, fluido corporal o heces) en las que un anticuerpo, péptido, o linfocitos T de diagnóstico de celiacía está presente en muy poca abundancia. Esto permite que los procedimientos aquí descritos sean prácticos en vías que son muchos menos invasivas, mucho menos caras y mucho menos perjudiciales para el individuo con celiacía.
- [0141]** La medición de la concentración de anticuerpos específicos en una muestra o fracción de la misma puede llevarse a cabo mediante una variedad de ensayos específicos como se conocen en la técnica. En general, el ensayo medirá la reactividad entre una muestra de paciente, normalmente sangre derivada, generalmente en forma de plasma o suero. La muestra de paciente puede usarse directamente, o diluirse según convenga, normalmente aproximadamente 1:10 y normalmente no más de aproximadamente 1:10.000. Pueden realizarse inmunoensayos en cualquier tampón fisiológico, por ejemplo, PBS, solución salina normal, HBSS, dPBS, etc.
- [0142]** En una realización se usa un ensayo de tipo sándwich convencional. Un ensayo de tipo sándwich se realiza uniendo primero el péptido a una superficie o soporte insoluble. El péptido puede unirse a la superficie mediante cualquier medio conveniente, que depende de la naturaleza de la superficie, tanto directamente como mediante anticuerpos específicos. El modo particular de unión no es decisivo mientras que sea compatible con los

reactivos y el procedimiento global aquí descrito. Pueden unirse a las placas covalentemente o no covalentemente, preferentemente no covalentemente.

[0143] En algunos casos se usará un ensayo competitivo. Además de la muestra de paciente, a la mezcla de reacción se añade un competidor por los anticuerpos. El competidor y los anticuerpos compiten por la unión al péptido antigénico. Normalmente, la molécula de competidor se marcará y se detectará como se describe previamente, siendo la cantidad de unión del competidor proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes. La concentración de la molécula de competidor será de aproximadamente 10 veces la concentración máxima de anticuerpos anticipados a aproximadamente la misma concentración con el fin hacer el intervalo de detección más sensible y lineal.

[0144] Un protocolo alternativo es proporcionar anticuerpos anti-paciente unidos a la superficie insoluble. Después de añadir la muestra y lavar las proteínas no específicamente unidas se añade uno o una combinación de los antígenos de prueba, en el que los antígenos se marcan de forma que no interfieran con la unión a los anticuerpos. Convenientemente pueden emplearse proteínas fusionadas en las que la secuencia de péptidos está fusionada a una secuencia de enzimas, por ejemplo, β -galactosidasa.

[0145] Los procedimientos objeto son útiles no sólo para diagnosticar individuos con celiaquía, sino también para determinar la eficacia de procedimientos profilácticos o terapéuticos para celiaquía, además de la eficacia de la preparación de alimentos o procedimientos de tratamiento que tienen como objetivo eliminar glútenes o sustancias similares de fuentes de alimentos. Por tanto, un individuo con celiaquía tratado eficazmente con un fármaco profiláctico o terapéutico u otra terapia para celiaquía prueba más bien un individuo sin celiaquía con los procedimientos descritos. Asimismo, los anticuerpos o respondedores con linfocitos T, por ejemplo, líneas de linfocitos T, que detectan los oligopéptidos tóxicos del gluten son útiles en la detección del gluten y sustancias similares a gluten en alimento y, por tanto, pueden usarse para determinar si un alimento tratado para eliminar tales sustancias ha sido eficazmente tratado.

[0146] Estos y otros procedimientos de diagnóstico pueden ponerse en práctica usando los novedosos péptidos y anticuerpos descritos.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

[0147]

35 <110> Felix Hausch
Gary Gray
Lu Shan
Chaitan Khosla
<120> TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS PARA CELIAQUÍA
40 <130> STAN-258WO
<140> Sin asignar
<141> 14/02/2003
<150> 60/357.238
<151> 14/02/2002
45 <150> 60/380.761
<151> 14/05/2002
<150> 60/392.782
<151> 28/06/2002
<150> 60/422.933
50 <151> 31/01/2002
<150> 60/428.033
<151> 20/01/2002
<150> 60/435.881
<151> 20/12/2002
55 <160> 27
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
<210> 1
<211> 12
<212> PRT

<213> Triticum aestivum
<400> 1

Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
1 5 10

<210> 2

5 <211> 12

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<220>

<221> CAR DE PIRROLIDONA

10 <222> (1) ... (1)

<223> Piroglutaminato del extremo N

<400> 2

Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
1 5 10

<210> 3

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 3

Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
1 5 10

20 <210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 4

Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro
1 5 10

25 <210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

30 <400> 5

Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro
1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

35 <213> Triticum aestivum

<400> 6

Gln Pro Gln Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
1 5 10

<210> 7

<211> 9

40 <212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 7

Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro
 1 5

<210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Triticum aestivum
 <400> 8

Pro Gln Pro Gln Leu Pro
 1 5

<210> 9
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 <400> 9

Arg Arg Leu Ile Glu Asp Asn Glu Tyr Thr Ala Arg Gly
 1 5 10

<210> 10
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 <400> 10

Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
 1 5 10

20 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 <400> 11

Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro
 1 5

25 <210> 12
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 30 <400> 12

Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
 1 5 10 15
 Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro
 20 25 30

Phe

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Triticum aestivum
 <400> 13

Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Gln Gln Gln
 1 5 10

<210> 14
 <211> 12
 40 <212> PRT

<213> Triticum aestivum
<400> 14

Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr
1 5 10

<210> 15
5 <211> 14
<212> PRT
<213> Triticum aestivum
<400> 15

Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr
1 5 10

10 <210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Triticum aestivum
<400> 16

Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Gln
1 5 10

15 <210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Triticum aestivum
20 <400> 17

Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro
1 5 10

<210> 18
<211> 14
<212> PRT
25 <213> Triticum aestivum
<400> 18

Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 19
<211> 5
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Motivo de péptido
<400> 19

Gly Pro Leu Gly Pro
1 5

35 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
40 <220>
<223> Epitope de linfocitos T
<400> 20

Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Epitope de linfocitos T
 <400> 21

Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln
 1 5

<210> 22
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Epitope de linfocitos T
 15 <400> 22

Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
 1 5

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Producto de digestión
 <400> 23

Trp Gln Ile Pro Glu Gln Ser Arg
 1 5

25 <210> 24
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 <400> 24

Gln Pro Gln Pro Phe Pro Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Thr Gln Pro
 1 5 10 15
 Phe Pro Pro Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Gln Tyr Pro Gln
 20 25 30
 Pro Gln

30 <210> 25
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 35 <400> 25

Gln Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Ile Pro Gln Gln Pro Gln Pro
 1 5 10 15
 Tyr Pro Gln Gln Pro Gln Pro Tyr Pro Gln Gln Pro Phe Pro Pro Gln
 20 25 30
 Gln Pro Phe
 35

<210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 40 <213> Triticum aestivum

<400> 26

Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Gln	Gln	Thr	Phe	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Leu
1				5					10					15	
Pro	Phe	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Gln		
			20					25					30		

<210> 27

<211> 30

5 <212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 27

Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Gln	Gln	Pro	Thr	Pro	Ile	Gln	Pro	Gln	Gln
1				5					10					15	
Pro	Phe	Pro	Gln	Arg	Pro	Gln	Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Gln		
			20					25					30		

REIVINDICACIONES

1. Una preparación que comprende una glutenasa que puede atenuar la toxicidad del gluten para uso en un procedimiento de reducción de los síntomas de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme en un sujeto mediante 5 administración de dicha preparación a dicho sujeto, en la que dicha glutenasa es una prolil-endopeptidasa (PEP).
2. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un procedimiento de reducción de los síntomas de celiaquía.
- 10 3. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha preparación es para administración con una comida.
4. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha preparación es para administración mediante incorporación de dicha preparación en un producto alimentario.
- 15 5. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha PEP es un miembro de la superfamilia de las serina-proteasas y tiene una tríada catalítica conservada compuesta por los residuos Ser, His y Asp.
- 20 6. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha PEP tiene una k_{cat}/K_m de al menos $250 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ bajo condiciones fisiológicas para escindir un péptido seleccionado del grupo que consiste en QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO: 1), PQPQLPYPQPQLPY (SEQ ID NO: 3), QPQSFPPQQ (SEQ ID NO: 13), QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO: 14), PQPELPYPQPELPY (SEQ ID NO: 15) y QPQSFPEQQ (SEQ ID NO: 16) en fragmentos no tóxicos para un paciente con celiaquía.
- 25 7. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha k_{cat}/K_m es al menos $25.000 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$.
8. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha PEP tiene una actividad específica de al menos 2,5 U/mg para la escisión de un péptido que comprende Z-Gly-Pro-pNA, en la Z es un grupo benciloxicarbonilo, pNA es para-nitroanilida y 1 U es la cantidad de enzima requerida para catalizar la reposición de 1 μmol de sustrato por minuto.
- 30 9. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha PEP es una forma purificada o recombinante de una prolil-endopeptidasa que se produce naturalmente.
- 35 10. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha PEP es de un organismo seleccionado del grupo *Flavobacterium meningosepticum*, *Aeromonas hydrophila*, *Sphingomonas capsulata*, *Aeromonas punctata*, *Novosphingobium capsulatum* y *Pyrococcus furiosus*.
- 40 11. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además una o varias glutenasas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Una preparación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que es una 45 forma estabilizada resistente a condiciones ácidas.
13. Una preparación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que dicha PEP está en el grupo de clasificación EC 3.4.21.26.
- 50 14. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 1, formulada con un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.
15. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicha formulación farmacéutica es adecuada para administración por vía oral.
- 55 16. Una preparación para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicha formulación farmacéutica está contenida en un recubrimiento entérico.
17. Un procedimiento *in vitro* para hacer que un producto alimenticio que contiene gluten sea menos

tóxico para un individuo que padece celiacía, comprendiendo dicho procedimiento poner dicho producto alimenticio que contiene gluten en contacto con una proil-endopeptidasa, en el que los péptidos del gluten inmunogénicos en el producto alimenticio que contiene gluten se escinden en fragmentos no tóxicos.

5 18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el producto alimenticio es harina de trigo que contiene gluten y la eficacia del procedimiento se prueba por la determinación de la escisión de péptidos de gliadina por EM-CL.

19. Un producto alimenticio preparado mediante el procedimiento de la reivindicación 17 ó 18,
10 comprendiendo dicho producto alimenticio oligopéptidos tóxicos del gluten escindidos en fragmentos no tóxicos.

FIG. 1A

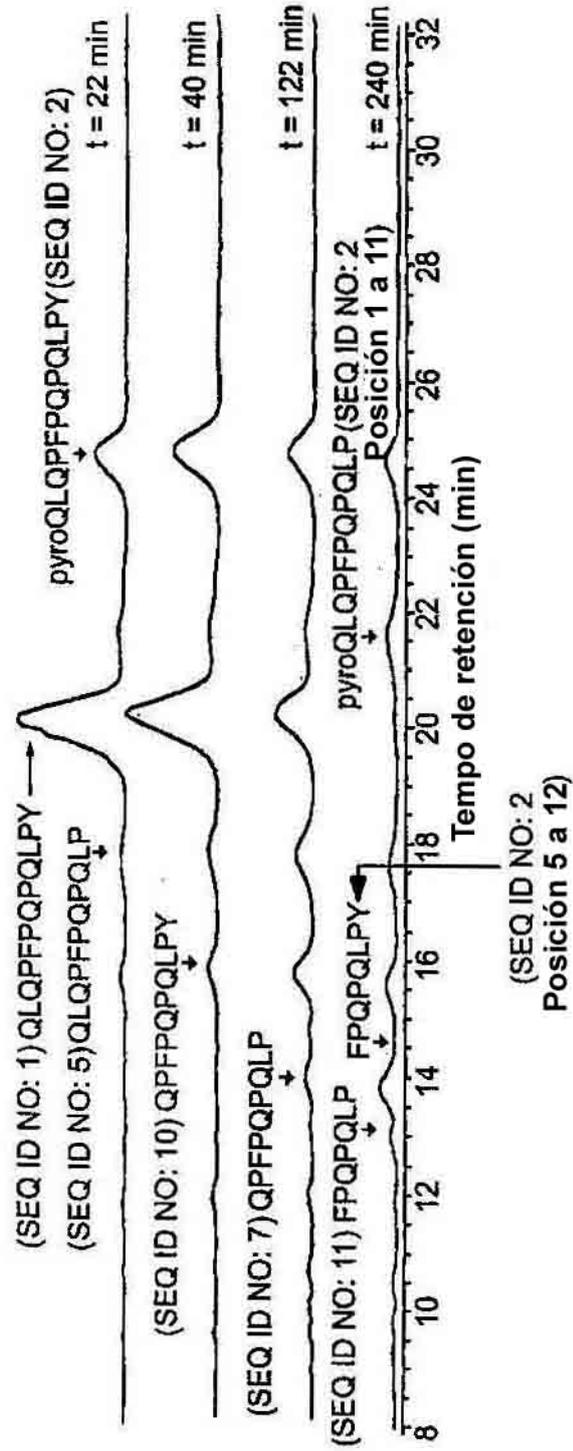
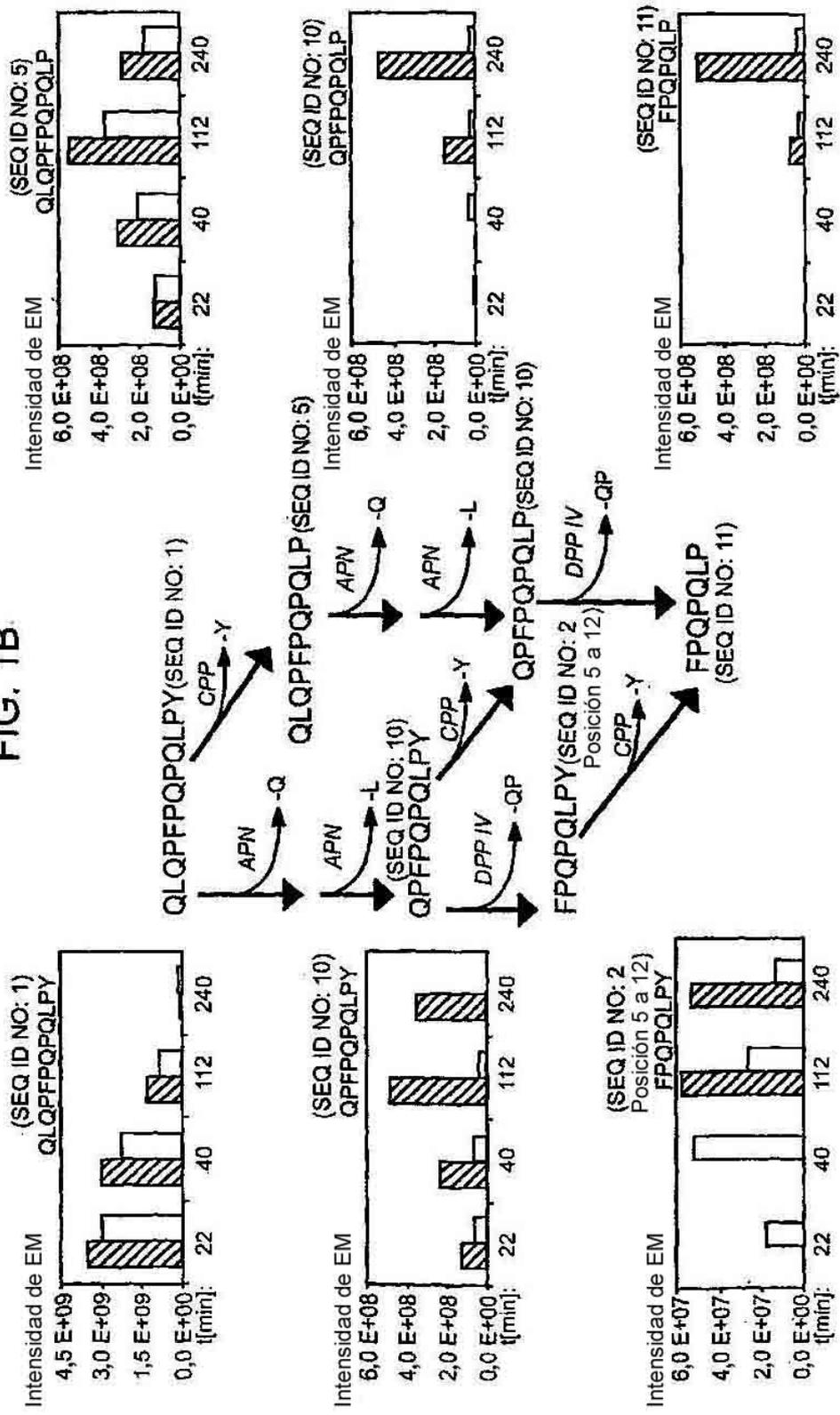


FIG. 1B



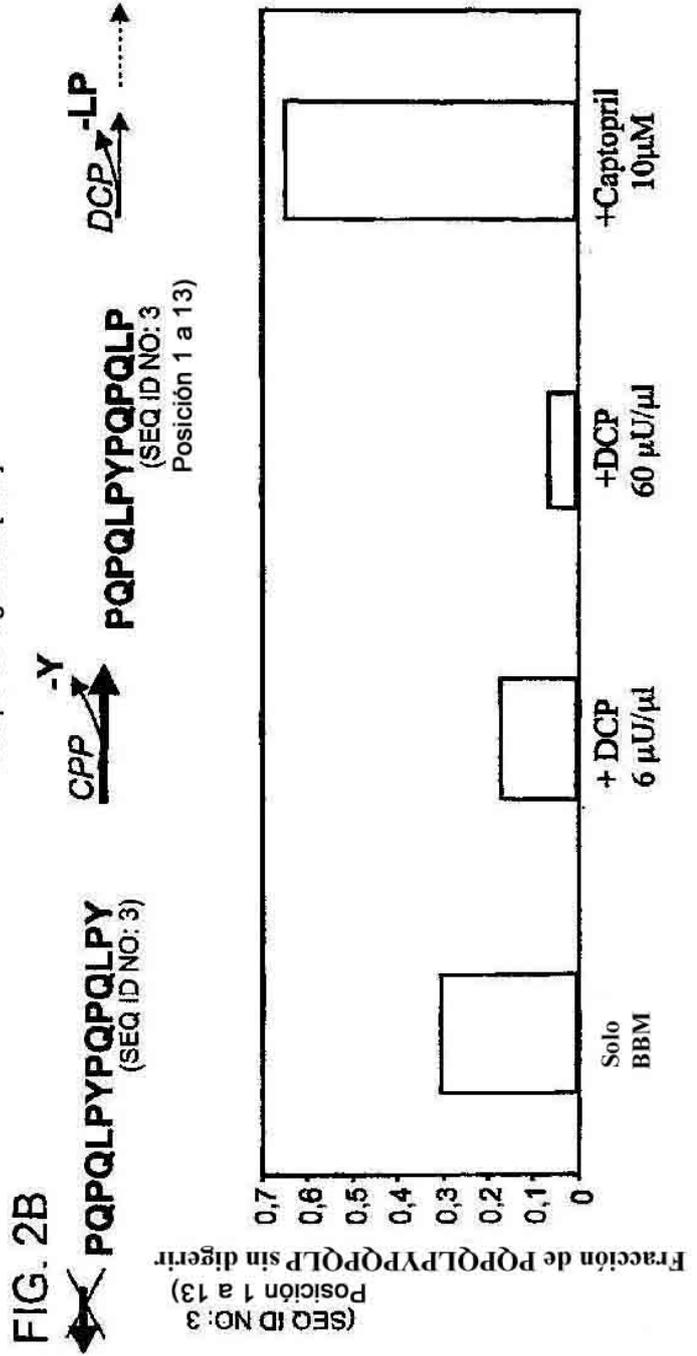
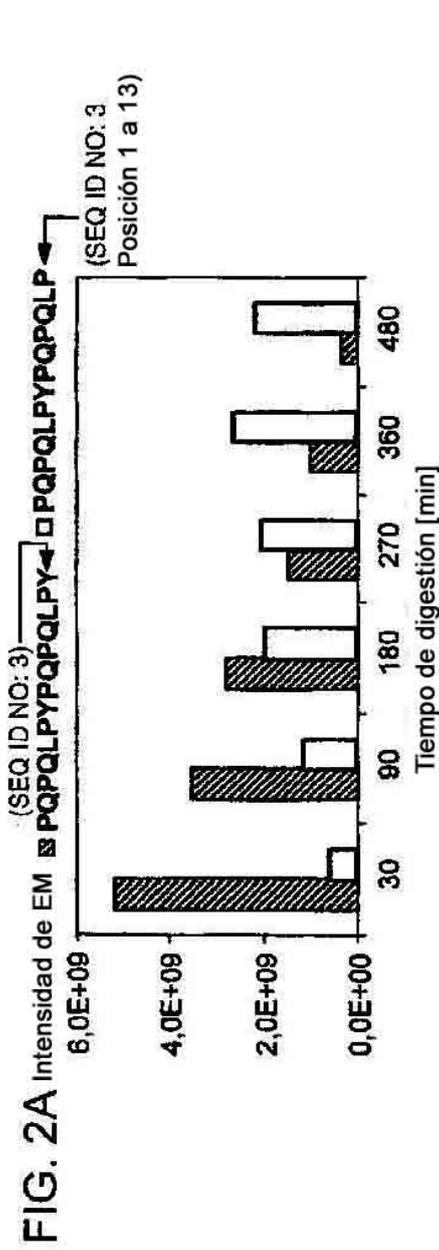


FIG. 3

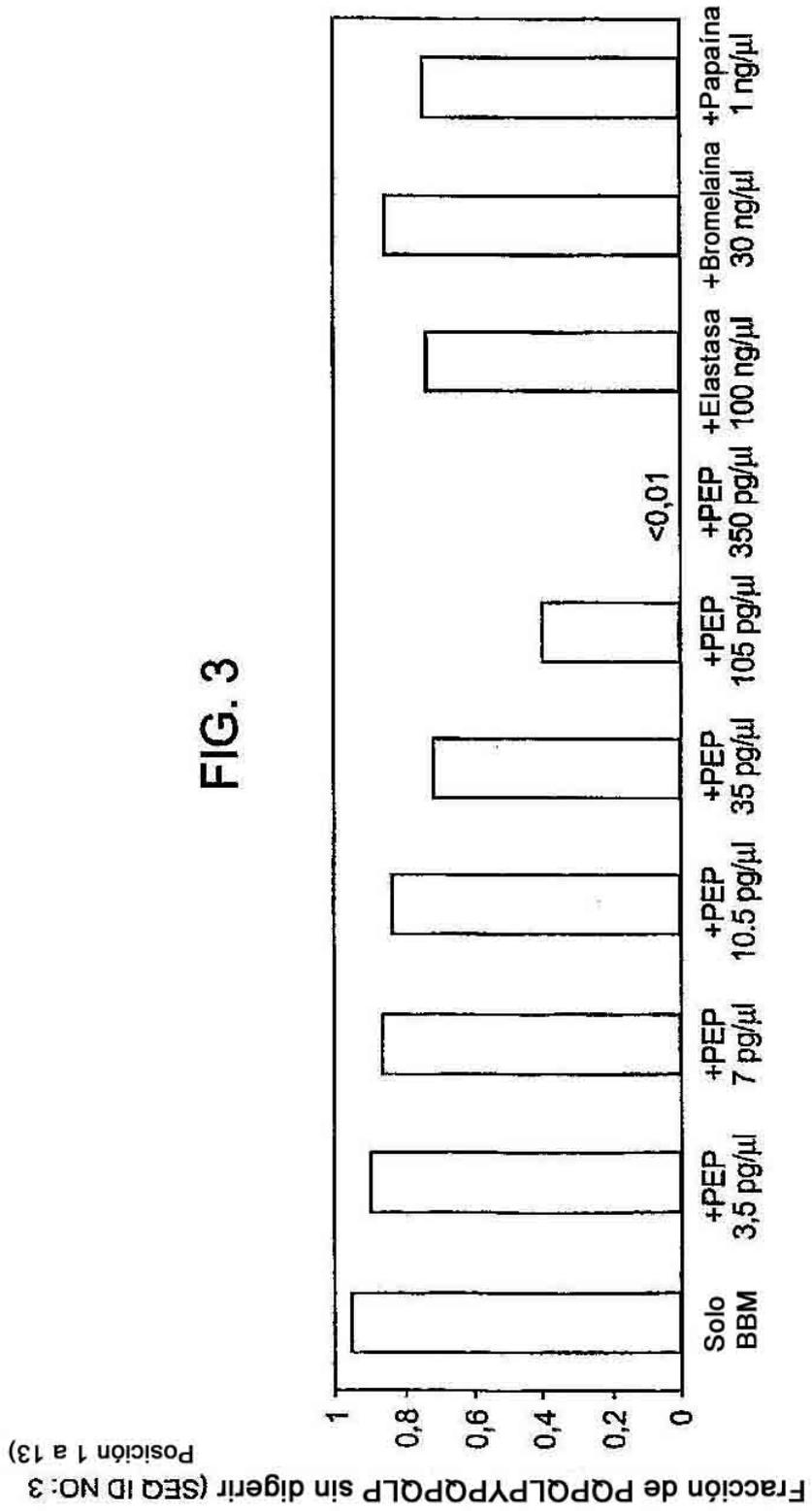


FIG. 4

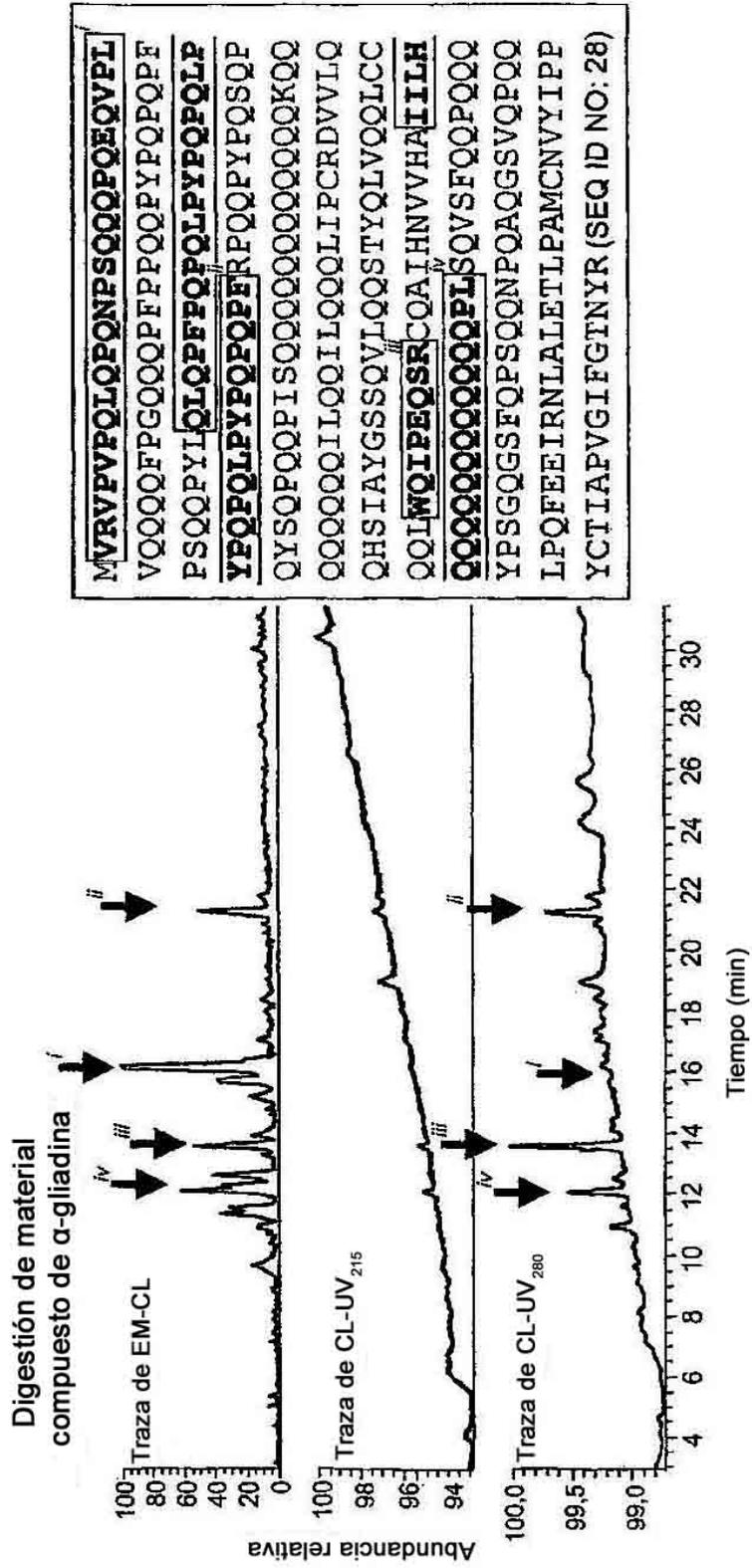


FIG. 5

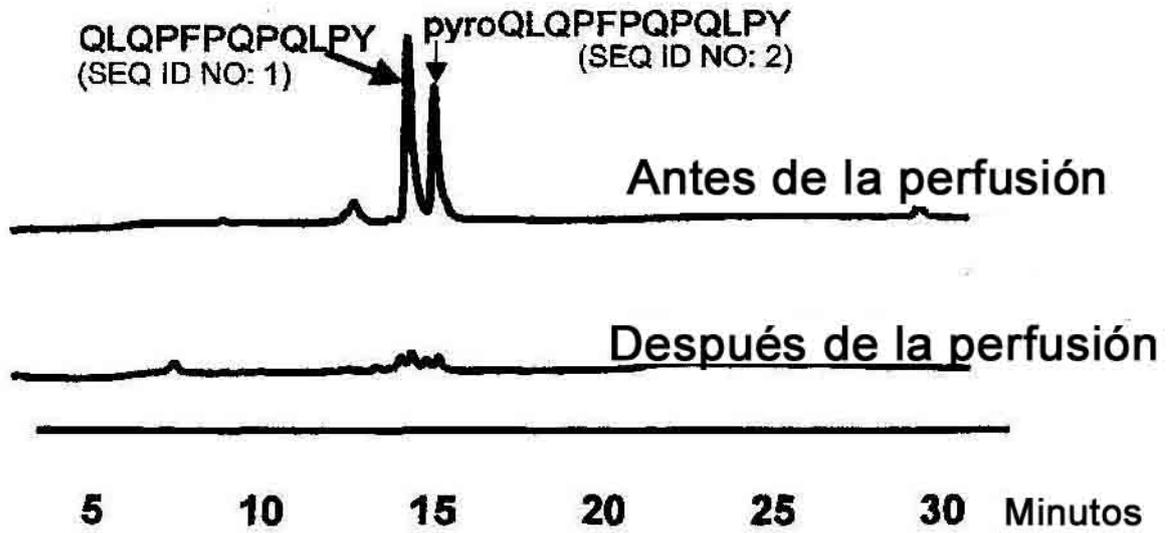
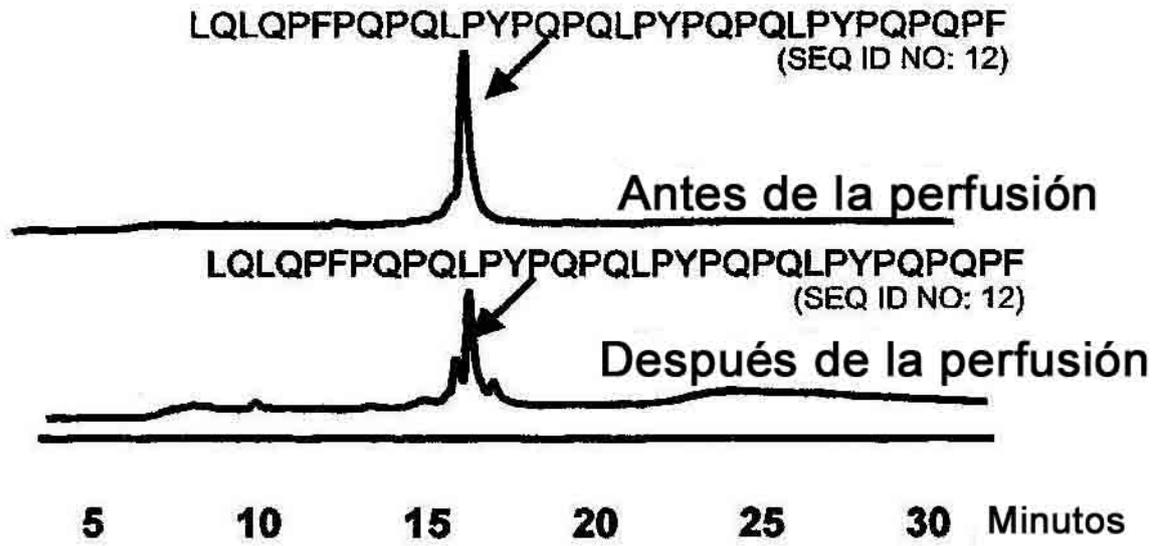


FIG. 6

