

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 569**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2005 E 05714080 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 1740197**

54 Título: **Profil endopeptidasa (PEP) y glutamina endoproteasa para el tratamiento de la celiaquía**

30 Prioridad:

26.04.2004 US 565668 P
19.10.2004 US 969314

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.01.2014

73 Titular/es:

ALVINE PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
75 Shoreway Road Suite B
San Carlos CA 94070, US y
THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

SHAN, LU;
BETHUNE, MICHAEL;
KHOSLA, CHAITAN y
GASS, JONATHAN

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 437 569 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

Prolil endopeptidasa (PEP) y glutamina endoproteasa para el tratamiento de la celiacía

5 **[0001]** En 1953 se reconoció por primera vez que la ingestión de gluten, una proteína alimenticia común presente en trigo, cebada y centeno, producía una enfermedad en individuos sensibles. El gluten es una mezcla compleja de
 10 glutenina rica en glutamina y prolina y moléculas de prolina, 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. Los síntomas clínicos de la celiacía incluyen fatiga, diarrea crónica, intolerancia de nutrientes, pérdida de peso, distensión abdominal, anemia, además de un riesgo sustancialmente aumentado del desarrollo de osteoporosis y tumores malignos intestinales (linfoma y carcinoma). La enfermedad tiene una incidencia de aproximadamente 1 de cada 200 en poblaciones europeas

15 **[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
 20 piel cercana, conduciendo a un diagnóstico erróneo de eczema. El estricto cumplimiento 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.

25 **[0003]** Generalmente se considera que la celiacía es una enfermedad autoinmunitaria y los anticuerpos encontrados en el suero de los pacientes apoyan la 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 inducen la proliferación de linfocitos T en las capas subepiteliales. Los linfocitos auxiliares T1 y las citocinas desempeñan aparentemente una función principal 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 una recaída histológica que sólo se detecta por biopsias de revisión o por un aumento de los títulos de EMA

40 **[0006]** El gluten se usa 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 dietista familiarizado 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
 50 tratamiento. En el último caso, los corticosteroides orales (por ejemplo, prednisona 10 a 20 mg dos veces al día) pueden inducir respuesta

[0007] WO 03/068170 se refiere a la administración de una dosis eficaz de glutenasa a un paciente celíaco o con dermatitis herpetiforme para reducir los niveles de oligopéptidos de gluten tóxicos, atenuando o eliminando así los efectos dañinos del gluten.

[0008] 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.

60 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCÓN

[0009] La presente invención proporciona una formulación para utilizar en el tratamiento de la celiacía, que comprende una prolil endopeptidasa (PEP) y una glutamina endoproteasa, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. La PEP puede ser PEP de *Flavobacterium meningosepticum*, PEP de *Myxococcus xanthus*, PEP de *Sphingomonas capsulata*, o *Penicillium citrinum*. La glutamina endoproteasa puede ser cisteína proteasa B de *Hordeum vulgare*.

[0010] Aspectos adicionales de la invención se establecen en las reivindicaciones que se acompañan.

[0011] En el presente documento se describe PEP de *Myxococcus xanthus* purificado, fragmentos biológicamente activos o derivados de los mismos; y formulaciones farmacéuticas de los mismos. La enzima se puede expresar en una célula huésped heteróloga, por ejemplo, una bacteria heteróloga y purificarse mediante cromatografía de afinidad. Se observa que la enzima se puede purificar, liofilizar y formular en dosis unitarias, tales como comprimidos, cápsulas con recubrimiento entérico, etc., a la vez que mantiene sustancialmente la actividad biológica. Las formulaciones de interés incluyen formulaciones en las que la enzima está contenida en un recubrimiento entérico que permite la liberación del agente activo al intestino y formulaciones en las que los agentes activos se estabilizan para resistir la digestión en las condiciones ácidas del estómago. La formulación puede comprender una o más enzimas o una mezcla o "cóctel" de agentes que tienen actividades diferentes.

[0012] La presente invención se describe a continuación con mayor detalle.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0013] Figura 1. Efecto del pH en los números de recambio (kcat) de PEP de FM, PEP de MX y PEP de SC.

[0014] Figura 2. Resistencia de la PEP de FM y la PEP de MX a la inactivación por las enzimas gástricas y pancreáticas. La estabilidad de las enzimas pancreáticas se evaluó mediante el tratamiento de 5 U/ml de la PEP de FM y la PEP de MX con 1 mg/ml de tripsina, 1 mg/ml de quimiotripsina, 0,2 mg/ml de elastasa y 0,2 mg/ml de carboxipeptidasa A (fosfato 40 mM, pH=6,5). La estabilidad de pepsina se evaluó mediante el tratamiento de la PEP de FM y la PEP de MX (5 U/ml) con 1 mg/ml de pepsina (pH=2, HCl 20 mM).

[0015] Figura 3. Especificidad de sitio de la hidrólisis de PQPQLPYPQPQLP por PEP individuales. Se muestran las trazas de HPLC-UV (215 nm) para cada mezcla de reacción. Los fragmentos de la separación inicial (100 μ M (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYPQPQLP, enzima 0,1 mM, t = 5 min) se identificaron mediante espectrometría de masas en tándem. En las trazas se indican el material de partida (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP y los fragmentos de separación A: (SEQ ID NO:11, aa. 1-8) PQPQLPYP, B: (SEQ ID NO:11, aa 7-13) YPQPQLP, C: (SEQ ID NO:12, aa 1-6) PQPQLP, D: (SEQ ID NO:11, aa 2-6) QPQLP).

[0016] Figuras 4A-4C. Hidrólisis de (SEQ ID NO:12) LQLQFPQPQLPYPQPQLPYP QPQLPYPQPQPF por PEP de FM, PEP de MX y PEP de SC. (A) Dependencia con el tiempo de la hidrólisis en presencia de sustrato 10 μ M y enzima 0,1 μ M. El sustrato aparece como un doblete a un tiempo de retención de aproximadamente 18 minutos debido a la presencia de cantidades iguales del sustrato de 32 unidades del que se elimina la Leu N-terminal; la presencia de este contaminante no afecta al análisis. A partir de las áreas de pico residuales, las velocidades de desaparición de sustrato (33 unidades + 32 unidades) se calcularon como 2,3 μ M/min (PEP de FM), 0,43 μ M/min (PEP de MX) y 0,07 μ M/min (PEP de SC). (B) Fragmentos de la separación inicial observados debido a la hidrólisis por PEP de FM (t = 1 min) y PEP de MX (t = 5 min). (C) Resumen de los fragmentos de la separación inicial de la hidrólisis catalizada por PEP de FM y PEP de MX del sustrato de 33 unidades.

[0017] Figuras 5A-5C. Proteólisis competitiva de (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP y (SEQ ID NO:12) LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF por cada PEP. Se incubaron 10 μ M del péptido más largo y 50 μ M del péptido más corto con 0,1 μ M de (A) PEP de FM; (B) PEP de MX; (C) PEP de SC.

[0018] Figuras 6A-6B. Proteólisis competitiva de (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP (50 mM) y (SEQ ID NO:12) LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (10 μ M) en presencia de 30 mg/ml de gluten tratado con pepsina. Esta mezcla compleja de sustratos se trató en condiciones fisiológicas con una mezcla de enzimas pancreáticas (tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa, elastasa), enzimas de membrana del borde en cepillo (derivadas de intestino delgado de rata) y (A) PEP DE FM o (B) PEP DE MX.

[0019] Figura 7. (SEQ ID NO:12) Proteólisis de LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (5 μ M) sometidos perfusión simultánea con PEP del individuo (0,1 μ M) en el lumen del intestino delgado de una rata anestesiada. Cada mezcla de enzima-sustrato se introdujo a través de un catéter en un segmento de 5-20 cm del yeyuno superior. Las muestras se recogieron al otro extremo del segmento y se analizaron mediante UV-HPLC (215 nm). El control sin PEP se muestra en la traza superior.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

[0020] Las enzimas glutenasas y las formulaciones de enzimas son útiles en el tratamiento de la intolerancia al gluten. Las enzimas disminuyen los niveles de oligopéptidos tóxicos del gluten en alimentos, antes o después de la ingestión por un paciente. Las enzimas de interés incluyen prolil endopeptidasas (PEP), por ejemplo la PEP de *Myxococcus xanthus*; y endoproteasas, por ejemplo, *Hordeum vulgare* subespecie, vulgare EPB2. Ciertos oligopéptidos del gluten conocidos por ser resistentes a la escisión por enzimas gástricas y pancreáticas se digieren

por dichas enzimas, evitando o aliviando así sus efectos tóxicos en pacientes. La intolerancia al gluten está asociada principalmente con la celiaquía y la dermatitis herpetiforme, aunque también se sabe en la técnica que se encuentra en otros pacientes, por ejemplo, asociados con autismo. Dichos pacientes también se pueden tratar con los procedimientos descritos aquí.

5 [0021] En algunos pacientes, estos procedimientos y composiciones permitirán que el paciente ingiera glútenes sin consecuencias graves para la salud muy similarmente a individuos que no padecen ninguna de estas afecciones. En algunas realizaciones, las formulaciones de la invención comprenden una glutenasa contenida en un recubrimiento entérico que permite la administración del agente o agentes activos al intestino; en otras realizaciones, el agente o agentes activos se estabilizan para resistir a la digestión en condiciones ácidas del estómago. En algunos casos, el agente o agentes activos tienen actividad hidrolítica bajo condiciones de pH ácido y, por tanto, pueden iniciar el procedimiento proteolítico sobre las secuencias tóxicas del gluten en el propio estómago. Entre los procedimientos alternativos de administración proporcionados por la invención se incluyen la modificación genética de células de pacientes, por ejemplo, enterocitos, para expresar niveles aumentados de glutenasas; y la introducción de microorganismos que expresan tales glutenasas para colonizar transitoria o permanentemente el tracto intestinal del paciente. Dichas células de pacientes modificadas (que incluyen células que no se derivan del paciente, pero que no son inmunológicamente rechazadas cuando se administran al paciente) y microorganismos se formulan, en algunas realizaciones, en un excipiente farmacéuticamente aceptable, o se introducen en alimentos. También se describen en el presente documento alimentos pretratados o combinados con una glutenasa y procedimientos para tratar alimentos para eliminar los oligopéptidos tóxicos del gluten.

25 [0022] Las composiciones de la invención pueden usarse para fines profilácticos, además de terapéuticos. Como se usa en este documento, el término "tratar" se refiere tanto a la prevención de la enfermedad como al tratamiento de una enfermedad o una afección preexistente. La invención proporciona un avance significativo en el tratamiento de la enfermedad activa, para estabilizar o mejorar los síntomas clínicos del paciente. Dicho tratamiento se realiza deseablemente antes de la pérdida de función en los tejidos afectados, pero también puede ayudar a restaurar la función perdida o a evitar la pérdida adicional de función. Pruebas del efecto terapéutico pueden ser cualquier disminución en la gravedad de la enfermedad, particularmente mediada mediante la gravedad de síntomas tales como fatiga, diarrea crónica, intolerancia de nutrientes, pérdida de peso, distensión abdominal, anemia y otros síntomas de celiaquía. Otros indicios de enfermedad incluyen la presencia de anticuerpos específicos para glútenes, la presencia de anticuerpos específicos para transglutaminasa de tejido, la presencia de linfocitos T proinflamatorios y citocinas, daño en la estructura vellositaria del intestino delgado como se demuestra por examen histológico u otro examen, permeabilidad intestinal aumentada, y similares.

35 [0023] Los pacientes que se pueden tratar con las composiciones de la presente invención incluyen los diagnosticados con celiaquía a través de una o más pruebas serológicas, por ejemplo, anticuerpos anti-gliadina, anticuerpos anti-transglutaminasa, anticuerpos anti-endomisio; evaluación endoscópica, por ejemplo para identificar lesiones celíacas; valoración histológica de la mucosa del intestino delgado, por ejemplo, para detectar la atrofia vellositaria, hiperplasia críptica, infiltración de linfocitos intraepiteliales; y cualquier síntoma de GI dependiente de la inclusión de gluten en la dieta.

45 [0024] Dada la seguridad de las proteasas orales, también se encuentra un uso profiláctico en las poblaciones de alto riesgo, tales como los diabéticos tipo I, miembros de la familia de pacientes celíacos diagnosticados, individuos positivos en HLA-DQ2, y/o pacientes con síntomas asociados al gluten que aún no se han sometido a un diagnóstico formal. Dichos pacientes se pueden tratar con una dosis regular o una dosis baja (10%-50% de la dosis regular) de enzima. De forma similar, el uso de dosis elevadas temporales de dicho agente también está anticipada para pacientes que se recuperan de una enteropatía mediada por gluten en los que la función intestinal aún no ha vuelto al estado normal, por ejemplo, según los ensayos de excreción de grasa fecal.

50 [0025] Los pacientes que pueden beneficiarse de la presente invención puede ser de cualquier edad e incluyen adultos y niños. Los niños en particular se benefician del tratamiento profiláctico, ya que la prevención de la exposición temprana a péptidos tóxicos del gluten puede evitar el desarrollo inicial de la enfermedad. Los niños adecuados para la profilaxis pueden identificarse por pruebas genéticas para la predisposición, por ejemplo, por tipado de HLA; por antecedentes familiares, por ensayo con células T o por otros medios médicos. Como se conoce en la técnica, las dosificaciones pueden ajustarse para uso pediátrico.

60 [0026] La invención, 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 técnica. Por tanto, la práctica de la presente invención 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. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, 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 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 enzima útil en los procedimientos de la presente invención que es capaz, sola o en combinación con enzimas endógenas o añadidas exógenamente, de escindir oligopéptidos tóxicos de proteínas del gluten de trigo, cebada, avena y centeno en 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.

ENZIMAS

[0028] La identificación basada en homología (por ejemplo, por un análisis de secuencias PILEUP) de proli endopeptidasas se puede realizar de forma rutinaria por los 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 PEP, pero no se han caracterizado completamente hasta la fecha. Los homólogos de enzimas de interés se pueden hallar en bases de datos de secuencias públicas y los procedimientos de la invención incluyen dichos homólogos. Las enzimas candidatas se expresan utilizando tecnologías de expresión heteróloga estándar, y se evalúan sus propiedades utilizando los ensayos descritos en el presente documento.

[0029] En una realización de la invención, la glutenasa es PEP de *Flavobacterium meningosepticum* (Genbank ID # D10980). En relación a la enzima de *F. meningosepticum*, la identidad en la secuencia por parejas de esta familia de enzimas está en el intervalo de 30-60%. Por consiguiente, las PEP incluyen enzimas que tienen más del 30% de identidad con la enzima de *F. meningosepticum* (como en las enzimas de *Pyrococcus*), o que tiene más del 40% de identidad (como en las enzimas de *Novosphingobium*), o que tienen más del 50% de identidad (como en las enzimas de *Aeromonas*) con la enzima de *F. meningosepticum*. Con un conjunto de ensayos se ha verificado la utilidad terapéutica de esta PEP. In vitro, se ha observado que esta enzima escinde rápidamente varios péptidos del gluten tóxicos, incluyendo el sustrato de 33 unidades altamente inflamatorio, (SEQ ID NO:12) LQLQFPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF. In vivo, actúa de forma sinérgica con las peptidasas de la membrana del borde en cepillo intestinal para detoxificar rápidamente estos péptidos, así como el gluten que se ha pretratado con proteasas gástricas y pancreáticas. Presenta una amplia especificidad de longitud de cadena, haciéndola especialmente adecuada para la rotura de péptidos largos ricos en prolina en el duodeno desde el estómago. La enzima tiene un pH óptimo alrededor de pH 7 y tiene una actividad elevada en condiciones que mimetizan el medio ligeramente ácido del intestino delgado superior. La PEP de *Flavobacterium* puede escindir todos los epítomos de células T en gluten que se han analizado hasta la fecha. Tiene particular preferencia por los epítomos inmunodominantes hallados en alfa-gliadina. Cuando el gluten de supermercado se trata con esta PEP, se puede observar un rápido incremento en su antigenicidad, tal como se analiza mediante análisis de LC-MS y análisis contra líneas de células T policlonales derivadas de biopsias de intestino delgado de pacientes con celiaquía. La proteína desnaturalizada no es alérgica para roedores, conejos y humanos. Es relativamente estable a la destrucción por proteasas pancreáticas, una característica importante ya que en condiciones fisiológicas se esperará que actúe junto con estas enzimas.

[0030] Otra enzima de interés es la PEP de *Sphingomonas capsulata* PEP (Genbank ID# AB010298). Esta enzima es comparable con la enzima de *Flavobacterium* y *Myxococcus*. Presenta una especificidad de secuencia más amplia que la PEP de *Flavobacterium* o *Myxococcus*, y por tanto puede ser capaz de destruir el rango más amplio de epítomos antigénicos. Como la enzima de *Myxococcus*, también se expresa en *E. coli*.

[0031] Otra enzima de interés es la PEP de *Penicillium citrinum* (Genbank ID# D25535). Se ha observado que esta enzima posee actividad de PEP basada en su capacidad de separar de manera eficaz una serie de enlaces Pro-Xaa en péptidos, tales como la dinorfina A y la sustancia P. La posible metaloproteasa tiene las ventajas de tamaño pequeño y un perfil de pH que la hace adecuada para trabajar conjuntamente con las enzimas pancreáticas en el duodeno. Por tanto, es un buen candidato para el tratamiento de la celiaquía.

[0032] Otra enzima de interés es la PEP de *Lactobacillus helveticus* (Genbank ID# 321529). A diferencia de las PEP anteriores, esta PEP es una enzima de zinc. Puede proteolizar de manera eficaz sustratos peptídicos largos, tales como los péptidos de la caseína YQEPVLGVPVRGPFPIIV y RPKHPIKHQ. La proteólisis puede tener lugar en todos los subsitios PV y PI, sugiriendo que la PEP prefiere los residuos hidrofóbicos en la posición S1', como se halla frecuentemente en el gluten. Dado que la cepa productora de *L. helveticus* CNRZ32 se utiliza habitualmente en la producción de queso, esta enzima presenta propiedades deseables como enzima de grado alimenticio.

[0033] Otra enzima de interés es la PEP de *Myxococcus xanthus* (Genbank ID# AF127082). Esta enzima posee muchas de las ventajas de la PEP de *Flavobacterium*. Puede escindir el sustrato de 33 unidades en péptidos pequeños no tóxicos. Mientras que la enzima de *Flavobacterium* parece tener una preferencia relativamente estricta por enlaces PQ en péptidos de gliadina, la enzima de *Myxococcus* puede escindir en los enlaces PQ, PY y PF, una característica que permite proteolizar un rango más amplio de epítomos de gluten. En comparación con la enzima de *Flavobacterium*, presenta una estabilidad equivalente a las proteasas pancreáticas y una estabilidad superior a los medios ácidos. La enzima de *Myxococcus* se expresa bien en *E. coli*, haciéndola factible para producir esta enzima económicamente.

[0034] Los fragmentos de la enzima glutenasa de interés incluyen fragmentos de por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, más normalmente por lo menos aproximadamente 50 aminoácidos contiguos, y pueden comprender 100 o más aminoácidos, hasta la proteína completa, y se pueden extender adicionalmente para comprender secuencias adicionales. En cada caso, el criterio clave es si el fragmento mantiene la capacidad de digerir los oligopéptidos tóxicos que contribuyen a los síntomas de la celiaquía.

[0035] Las modificaciones d interés que no alteran la secuencia primaria incluyen la derivatización química de proteínas, incluyendo, por ejemplo, acilación, por ejemplo, grupos laurilo, estearilo, miristilo, decilo, etc., PEGilación, esterificación o amidación. Dichas modificaciones se pueden utilizar para incrementar la resistencia de la enzima a la proteólisis, por ejemplo, mediante la unión de cadenas laterales de PEG o grupos laurilo a lisinas de la superficie. También se incluyen modificaciones de glicosilación, por ejemplo, las realizadas por la modificación de los patrones de glicosilación de una proteína durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento posteriores; por ejemplo, mediante la exposición de la proteína a enzimas que afectan a la glicosilación, tales como enzimas glicosilantes o desglicosilantes de mamíferos. También se comprenden secuencias que tienen residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

[0036] La secuencia de aminoácidos de una glutenasa, por ejemplo, una glutenasa natural, se puede alterar de varias maneras conocidas en la técnica para generar cambios dirigidos en la secuencia y enzimas de glutenasas adicionales útiles en las formulaciones y composiciones de la invención. Dichas variantes serán habitualmente variantes que conservan la funcionalidad, que difieren, normalmente en la secuencia, de la correspondiente proteína nativa o parental, pero que aún mantiene la actividad biológica deseada. Las variantes también incluyen fragmentos de una glutenasa que mantiene la actividad enzimática. Se pueden utilizar varios procedimientos conocidos en la técnica para generar cambios dirigidos, por ejemplo, expresión en fagos en combinación con mutaciones aleatorias y dirigidas, introducción de mutaciones por rastreo, y similares.

[0037] Una variante puede ser sustancialmente similar a una secuencia nativa, es decir, que difiere en por lo menos un aminoácido y puede diferir por lo menos en dos, pero normalmente no más de aproximadamente diez aminoácidos (el número de diferencias dependen del tamaño de la secuencia nativa). Los cambios en las secuencias pueden ser sustituciones, inserciones o deleciones. Se pueden utilizar las mutaciones por rastreo, que introducen sistemáticamente alanina u otros residuos, para determinar los aminoácidos claves. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen habitualmente las sustituciones en los siguientes grupos: (glicina, alanina); (valina, isoleucina, leucina); (ácido aspártico, ácido glutámico); (asparagina, glutamina); (serina, treonina); (lisina, arginina); y (fenilalanina, tirosina).

[0038] Se pueden realizar varias modificaciones en la secuencia de la enzima. La PEP de MX tiene una estructura similar a la del músculo o cerebro porcino. La enzima consiste en un dominio catalítico con un pliegue de hidrolasa α/β típico, que está unido covalentemente a un dominio de hélice en forma de barril cilíndrico. El dominio catalítico está formado de los residuos 1-67 N-terminales y los residuos 410-678 C-terminales; el dominio de hélice incluye los residuos 71-406. Dos cadenas lineales formadas por los residuos 67-70 y 407-409 unen covalentemente los dos dominios. Este análisis de la PEP de *M. xanthus* es útil en el diseño de enzimas modificadas. Habitualmente dichas enzimas modificadas mantendrán la triada catalítica (Ser 533, Asp 616 y His 651), así como los residuos Arg 618 conservados, todos ellos se cree que son importantes para la actividad. Los residuos Asn534, Tyr453 y Arg618 se conservan en la familia de proil endopeptidasas, y dichos residuos también se pueden conservar en el diseño de enzimas modificadas. En una realización, la región extendida del dominio de hélice se sustituye por un enlazador flexible corto, por ejemplo, que comprende 5-10 residuos de Gly, truncando así la proteína y reduciendo su susceptibilidad proteolítica a la pepsina.

[0039] Por ejemplo, se han realizado mutaciones con V458 y G532, que están próximos a la Ser533 catalítica en el bolsillo de unión. Sus mutantes mantienen la actividad de tipo natural hacia Suc-Ala-Pro-pNA, pero muestran una actividad reducida hacia el sustrato de 13 unidades. Otros mutantes, R572A/Q, 1575A y F229Y tienen una especificidad incrementada para un sustrato más largo.

[0040] Las enzimas modificadas para proporcionar una característica específica de interés se puede modificar adicionalmente, por ejemplo, mediante mutagénesis, barajado de exones, etc., tal como se conoce en la técnica, seguido de cribado o selección, para optimizar o restaurar la actividad de la enzima, por ejemplo, hasta niveles de tipo natural.

5 [0041] También útiles en la práctica de la presente invención son proteínas que se han modificado utilizando técnicas de biología molecular y/o química para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica y/o a las condiciones ácidas, tales como las halladas en el estómago, y para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlas más adecuadas como agente terapéutico. Por ejemplo, el esqueleto de la peptidasa se puede ciclar para aumentar la estabilidad (véase Friedler et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:23783-23789). Los análogos de dichas proteínas incluyen los que contienen residuos diferentes de L-aminoácidos naturales, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos no naturales.

10 [0042] Las proteínas glutenasa útiles en la práctica de la presente invención también se pueden aislar y purificar según los métodos convencionales de los sistemas de producción recombinantes y de fuentes naturales. La producción de proteasas se puede conseguir utilizando sistemas huésped-vector establecidos en organismos, tales como *E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Aspergillus*. Se pueden utilizar vectores integradores o autoreplicantes para este objetivo. En algunos de estos huéspedes, la proteasa se expresa como una proteína intracelular y posteriormente se purifica, mientras que en otros huéspedes la enzima se secreta en el medio extracelular. La purificación de la proteína se puede realizar mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad de Ni (o algún procedimiento cromatográfico alternativo), cromatografía de interacción hidrofóbica y/u otras técnicas de purificación. Habitualmente, las composiciones utilizadas en la práctica de la invención comprenderán por lo menos el 20% en peso del producto deseado, más habitualmente por lo menos aproximadamente el 50% en peso, preferiblemente por lo menos aproximadamente el 85% en peso, por lo menos aproximadamente el 90%, y para fines terapéuticos, puede ser por lo menos aproximadamente el 95% en peso, en relación con los contaminantes relacionados al método de preparación del producto y su purificación. Habitualmente, los porcentajes se basarán en la proteína total. Las proteínas en dichas composiciones pueden estar presentes en una concentración de por lo menos aproximadamente 500 mg/ml; por lo menos aproximadamente 1 mg/mg; por lo menos aproximadamente 5 mg/ml; por lo menos aproximadamente 10 mg/ml, o más.

25 [0043] También se describe en el presente documento una preparación purificada de una glutenasa. Dichas enzimas se pueden producir mediante procedimientos recombinantes. En una realización, dichos métodos utilizan un huésped bacteriano para la expresión, aunque los sistemas fúngicos y eucariotas son útiles para algunos objetivos. Las secuencias de codificación que contienen una secuencia señal o que se modifican para contener una secuencia señal se pueden secretar en el espacio periplásmico de un huésped bacteriano. A continuación, se puede utilizar un protocolo de choque osmótico para liberar las proteínas periplásmicas en el sobrenadante.

30 [0044] Cuando la enzima es una enzima citoplasmática, se puede introducir una secuencia señal para la secreción periplásmica, o la enzima se puede aislar de un lisado citoplasmático. Los procedimientos para la purificación incluyen purificación por afinidad con Ni-NTA, por ejemplo, en combinación con la introducción de una etiqueta de histidina; y procedimientos de cromatografía conocidos en la técnica, por ejemplo, de intercambio catiónico, intercambio aniónico, filtración de gel, HPLC, FPLC y similares.

35 [0045] Para diversos objetivos, tales como un almacenamiento estable, se puede liofilizar la enzima. La liofilización se realiza preferiblemente sobre una preparación inicialmente concentrada, por ejemplo, de por lo menos aproximadamente 1 mg/ml. Se puede añadir Peg para mejorar la estabilidad de la enzima. Se ha observado que la PEP de X se puede liofilizar sin pérdida de actividad específica. La enzima liofilizada y los excipientes son útiles en la producción de cápsulas o comprimidos recubiertos entéricamente, por ejemplo, una única cápsula o comprimido puede contener por lo menos aproximadamente 1 mg de PEP, habitualmente por lo menos aproximadamente 10 mg de PEP, y puede contener por lo menos 100 mg de PEP, por lo menos aproximadamente 500 mg PEP, o más. Tal como se describe en detalle aquí, se pueden aplicar recubrimientos entéricos, donde se mantiene una fracción sustancial de la actividad, y es estable durante por lo menos aproximadamente 1 mes a 4°C. También se ha observado que la PEP de MX mantiene la actividad en una formulación de comprimido.

40 [0046] Antes de la presente invención, no se percibía la necesidad de una glutenasa que se pudiera digerir por un humano o mezclada con un alimento. De este modo, antes de la presente invención, la mayoría de glutenasas no existían en forma libre de contaminantes que pudieran ser perjudiciales para un ser humano si se ingerían. La presente invención crea la necesidad de dichas preparaciones de glutenasas y las proporciona junto con métodos para su preparación. En una realización relacionada, la presente invención proporciona nuevos alimentos que derivan de alimentos que contienen gluten, pero que han sido tratados para reducir la concentración y la cantidad de los oligopéptidos y secuencias de oligopéptidos descubiertos como tóxicos para paciente con celiaquía. Aunque se han fabricado alimentos con un contenido en gluten reducido o libre de gluten, los alimentos para utilizar en la presente invención difieren de dichos alimentos no sólo en la manera en que se prepararon, mediante un tratamiento del alimento con una glutenasa, sino también en su contenido, ya que los métodos de la técnica anterior dan lugar a una alternación de los componentes no tóxicos (para pacientes con celiaquía) del alimento, dando lugar a un sabor y composición diferentes. Los alimentos de la técnica anterior incluyen, por ejemplo, almidón de trigo Codex Alimentarius, que está disponible en Europa y tiene menos de 100 ppm de gluten. El almidón se prepara normalmente mediante procesos que aprovechan el hecho de que el gluten es insoluble en agua, mientras que el almidón es soluble.

65

[0047] En una realización, el término “glutenasa”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una enzima proteasa o peptidasa que cumple con uno o más de los criterios aquí indicados. Dichos criterios son útiles en la evaluación de las modificaciones de las enzimas, por ejemplo, como una herramienta de cribado después de la generación de la modificación. En algunas realizaciones, las modificaciones a la secuencia de aminoácidos PEP de MX o modificaciones no peptídicas se valoran utilizando dichos ensayos. Utilizando estos criterios, un experto en la materia puede determinar la adecuación de una enzima candidata o modificación de enzima para utilizar en los métodos de la presente invención. Muchas enzimas cumplirán múltiples criterios, incluyendo, dos, tres, cuatro o más de los criterios, y algunas enzimas cumplirán todos los criterios. Los términos “proteasa” o “peptidasa” se pueden referir a una glutenasa y, tal como se utiliza aquí, describen una proteína o un fragmentos de la misma con la capacidad de escindir enlaces peptídicos, cuando el enlace peptídico escindible puede ser terminal o interno en oligopéptidos o proteínas más grandes. Las peptidasas específicas de prolina son glutenasas útiles en la práctica de la presente invención.

[0048] Las glutenasas incluyen enzimas proteasas y peptidasas que tienen por lo menos aproximadamente el 20% de identidad en la secuencia a nivel de aminoácido, más habitualmente por lo menos aproximadamente el 40% de identidad en la secuencia, y preferiblemente por lo menos aproximadamente el 70% de identidad en la secuencia con una de las siguientes peptidasas: prolina endopeptidasa (PEP) de *F. meningosepticum* (Número de acceso de GenBank D10980), PEP de *A. hydrophila* (Número de acceso de GenBank D14005), PEP de *S. capsulata* (Número de acceso de GenBank AB010298), DCP I de conejo (Número de acceso de GenBank X62551), DPP IV de *Aspergillus fumigatus* (Número de acceso de GenBank U87950), carboxipeptidasa de *Aspergillus saitoi* (GenBank ID# D25288), PEP de *Lactobacillus helveticus* (Genbank ID# 321529) o cisteína proteinasa B de *Hordeum vulgare* (Número de acceso de GenBank JQ11110).

[0049] Cada una de las proteasas anteriores descritas en el presente documento se pueden modificar para mejorar las propiedades deseadas, tales como la especificidad mejorada a las secuencias de gliadina tóxica, tolerancia mejorada para sustratos más largos, estabilidad en ácido, resistencia a pepsina, resistencia a proteólisis mediante las enzimas pancreáticas y mejora del tiempo de vida útil. La propiedad deseada se puede modificar a través de procedimientos estándar de modificación de proteínas.

[0050] Además de prolina, los residuos de glutamina también son muy prevalentes en las proteínas del gluten. La toxicidad del gluten en la celiaquía se ha correlacionado directamente con la presencia de residuos específicos de Gln. Por lo tanto, las proteasas específicas de glutamina también son beneficiosas para el tratamiento de la celiaquía. Dado que la avena contiene proteínas que son ricas en glutamina, pero no especialmente ricas en residuos de prolina, un beneficio adicional de una proteasa específica de glutamina es la mejora de la tolerancia a la avena en los pacientes celíacos que muestran intolerancia suave a la avena. Un ejemplo de dicha proteasa es la cisteína endoproteínasa del gluten mencionada anteriormente. Esta enzima escinde las proteínas del gluten rápidamente con una preferencia distinta para la posterior escisión de Gln. También es de interés la endoproteasa de *Hordeum vulgare* (Genbank acceso U19384), que se ha observado que digiere de manera eficaz la α 2-gliadina. La enzima es activa en condiciones ácidas y es útil como un suplemento dietético administrado por vía oral. Una dieta que contiene gluten se puede complementar con proEPB2 administrada por vía oral, dando lugar a una degradación eficaz de péptidos de gluten inmunogénicos en el estómago ácido, antes de que estos péptidos entren en el intestino y se presenten en el sistema inmunitario. Las proteínas con una similitud de secuencia elevada con esta enzima también son interesantes. Una ventaja de estas enzimas es que se consideran seguras para el consumo oral humano, debido a su presencia en gluten dietético de cebada.

[0051] La dipeptidil peptidasa IV y la dipeptidil carboxipeptidasa I intestinales son enzimas limitantes de la velocidad en la rotura de péptidos de gliadina tóxicos del gluten. Estos péptidos son un cuello de botella en la digestión del gluten en el intestino delgado de mamíferos porque (i) su actividad específica es relativamente baja en comparación con otras aminopeptidasas y carboxipeptidasas en el borde en cepillo intestinal; y (ii) debido a su fuerte sensibilidad a la longitud de cadena del sustrato, escinden péptidos inmunotóxicos largos, tales como los péptidos de 33 unidades extremadamente lentas. Ambos problemas se pueden mejorar a través de la administración de aminopeptidasas específicas de prolina y carboxipeptidasas de otros orígenes. Por ejemplo, la X-Pro dipeptidasa de *Aspergillus oryzae* (GenBank ID# BD191984) y la carboxipeptidasa de *Aspergillus saitoi* (GenBank ID# D25288) pueden mejorar la digestión del gluten en el intestino celíaco.

[0052] Una glutenasa incluye una peptidasa o proteasa que tiene una actividad específica de por lo menos 2,5 U/mg, preferiblemente 25 U/mg y más preferiblemente 250 U/mg para la escisión de un péptido que comprende uno o más de los siguientes motivos: Gly-PropNA, Z-Gly-PropNA (donde Z es un grupo benciloxicarbonilo), y Hip-His-Leu, donde "Hip" es ácido hippúrico, pNA es para-nitroanilida, y 1 U es la cantidad de enzima requerida para catalizar el recambio de un 1 mmol de sustrato por minuto. Se pueden utilizar sustratos cromogénicos en el cribado, por ejemplo, sustratos, tales como Cbz-Gly-Pro-pNA o Suc-Ala-Pro-pNA, que permiten la identificación de proteasas específicas de prolina. También se pueden utilizar sustratos similares para identificar proteasas específicas de glutamina. Estos ensayos se pueden monitorizar mediante métodos espectrofotométricos UV-VIS.

[0053] Una glutenasa incluye una enzima que pertenece a cualquiera de las siguientes clasificaciones de enzimas: EC 3.4.21.26, EC 3.4.14.5, o EC 3.4.15.1.

[0054] Una glutenasa incluye una enzima que tiene una k_{cat}/K_m de por lo menos aproximadamente $2,5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, normalmente por lo menos aproximadamente $250 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y preferiblemente por lo menos aproximadamente $25000 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para la escisión de cualquiera de los siguientes péptidos, incluyendo epítomos conocidos de células T en gluten, en condiciones óptimas: (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY o PFPQPQLPY, (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY o PQPQLPYPQ, (SEQ ID NO: 13) QPQQSFPQQQ o PQQSFPQQQ, (SEQ ID NO: 14) QLQFPQPQLPY, (SEQ ID NO: 15) PQPELPYPQPELPY, (SEQ ID NO: 16) QPQQSFPEQQ; (SEQ ID NO: 30) IQPQQPAQL; (SEQ ID NO: 31) QQPQQPYPQ; (SEQ ID NO: 32) SQPQG7QFPQ; (SEQ ID NO: 33) QQPFPQPPQ; o (SEQ ID NO: 34) PFSQQQPQV. También se puede evaluar la escisión de péptidos más largos generados fisiológicamente que contienen uno o más de los epítomos anteriores, por ejemplo, la escisión del péptido de 33 unidades de alfa-gliadina, (SEQ ID NO: 12) LQLQPF (PQPQLPY)3PQPQPF, y el tramo de 26 unidades de gamma-gliadina, (SEQ ID NO: 35) FLQPQQPFPQPQPYPQPQQPFPQ. Una glutenasa de la invención incluye la peptidasa o proteasa que tiene una especificidad $k_{cat}/K_m > 2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para el sustrato fluorogénico inhibido (SEQ ID NO: 36) Abz-OPQQP-Tyr (NO2)- D. Estos ensayos se pueden monitorizar mediante HPLC o espectroscopía de fluorescencia. Para estos últimos ensayos, se pueden unir fluoróforos adecuados a los extremos amino terminales o carboxi terminales de los péptidos.

[0055] Una glutenasa útil en la práctica de la presente invención se puede identificar por su capacidad de escindir un sustrato pretratado para eliminar oligopéptidos tóxicos de gluten, donde un "sustrato pretratado" es una proteína gliadina, hordeína, secalina o avenina que se ha tratado con cantidades fisiológicas de proteasas gástricas y pancreáticas, que incluyen pepsina (proporción en masa 1:100), tripsina (1: 00), quimiotripsina (1:100), elastasa (1: 500), y carboxipeptidasas A y B (1:100) . La digestión con pepsina se puede realizar a pH 2 durante 20 minutos para mimetizar la digestión gástrica, seguido de un tratamiento adicional de la mezcla de reacción con tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa a pH 7 durante 1 hora para mimetizar la digestión duodenal por enzimas pancreáticas secretadas. El sustrato pretratado comprende oligopéptidos resistentes a la digestión, por ejemplo, en condiciones fisiológicas. Una glutenasa puede catalizar el gluten tratado con pepsina-tripsina-quimiotripsina-elastasa-carboxipeptidasa (PTCEC), de manera que menos del 10% de los productos son más largos que (SEQ ID NO: 3, aa 1- 9) PQPQLPYPQ (de acuerdo con tiempos de retención más largos en una columna de HPLC C18 de fase inversa monitorizada a A_{215}) .

[0056] La capacidad de una peptidasa o proteasa de escindir un sustrato pretratado se puede determinar midiendo la capacidad de una enzima para incrementar la concentración de los extremos NH_2 libres en una mezcla de reacción que contiene 1 mg/ml de sustrato pretratado y 10 mg/ml de la peptidasa o proteasa, incubada a 37°C durante 1 hora. Una glutenasa útil en la práctica de la presente invención incrementará la concentración de los extremos amino libres en dichas condiciones, normalmente en por lo menos aproximadamente el 25%, más habitualmente en por lo menos aproximadamente el 50%, y preferiblemente en por lo menos aproximadamente el 100%. Una glutenasa incluye una enzima capaz de reducir la concentración molar residual de oligopéptidos en más de aproximadamente 1000 Da en un "sustrato pretratado" de 1 mg/ml después de 1 hora de incubación con 10 mg/ml de la enzima en por lo menos aproximadamente 2 veces, normalmente en por lo menos aproximadamente 5 veces y preferiblemente en por lo menos aproximadamente 10 veces. La concentración de dichos oligopéptidos se puede estimar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, y similares.

[0057] Una glutenasa incluye una enzima capaz de la detoxificación del gluten completo, monitorizada mediante líneas de células T policlonales derivadas de biopsias intestinales de pacientes celíacos; detoxificación del gluten completo monitorizada mediante LC-MS-MS; y/o detoxificación del gluten completo monitorizada mediante ensayos ELISA utilizando anticuerpos monoclonales capaces de reconocer secuencias específicas a gliadina.

[0058] Por ejemplo, una glutenasa puede reducir la potencia por la que un "sustrato pretratado" puede antagonizar la unión de (SEQ ID NO:17) PQPELPYPQPQLP a HLA-DQ2. La capacidad de un sustrato para unirse a HLA-DQ es indicativa de su toxicidad; los fragmentos más pequeños de aproximadamente 8 aminoácidos en general se unen de manera no estable a MHC de Clase II. El tratamiento con una glutenasa que digiere oligopéptidos tóxicos mediante la reducción de la concentración de oligopéptidos tóxicos evita que una mezcla que los contiene compita con un péptido de prueba por la unión a MHC. Para analizar si una glutenasa candidata se puede utilizar para los objetivos de la presente invención, se puede incubar primero una solución de 1 mg/ml de "sustrato pretratado" con $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ de la glutenasa candidata, y a continuación se puede cuantificar la capacidad de la solución resultante para sustituir la secuencia (SEQ ID NO:18) PQPELPYPQPQLP radioactiva preunida a moléculas HLA-DQ2, con una reducción de la sustitución, en relación con el control no tratado, indicativo de la utilidad en los métodos de la presente invención.

[0059] Una glutenasa incluye una enzima que reduce la respuesta del anticuerpo anti-tTG a una "dieta estimulante de gluten" en un paciente celíaco en por lo menos aproximadamente 2 veces, más normalmente en por lo menos aproximadamente 5 veces, y preferiblemente en por lo menos aproximadamente 10 veces. Una "dieta estimulante de gluten" se define como la ingestión de 100 g de pan por día durante 3 días por un paciente celíaco adulto previamente en una dieta sin gluten. La respuesta del anticuerpo anti-tTG se puede medir en sangre periférica utilizando procedimientos de diagnóstico clínico estándar, tal como se conoce en la técnica.

[0060] Las siguientes peptidasas se excluyen del término "glutenasa": pepsina humana, tripsina humana, quimiotripsina humana, elastasa humana, papaína de papaya, y bromelina de piña, y normalmente se excluyen las enzimas que tienen una identidad de secuencia superior al 98% a nivel de aminoácido con dichas peptidasas, más normalmente se excluyen las enzimas que tienen una identidad de secuencia superior al 90% a nivel de aminoácido con dichas peptidasas, y preferiblemente se excluyen las enzimas que tienen una identidad de secuencia superior al 70% a nivel de aminoácido con dichas peptidasas.

[0061] Entre las proteínas del gluten con un potencial efecto perjudicial para los pacientes con celiaquía se incluyen las proteínas de almacenamiento de trigo, especies que incluyen *Triticum aestivum*; *Triticum aethiopicum*; *Triticum baeoticum*; *Triticum militinae*; *Triticum monococcum*; *Triticum sinskajae*; *Triticum timopheevii*; *Triticum turgidum*; *Triticum urartu*, *Triticum vavilovii*, *Triticum zhukovskyi*; etc. En Colot (1990) Genet Eng (N Y) 12:225-41 se puede encontrar una revisión de los genes que codifican proteínas de almacenamiento de trigo. La gliadina es la fracción de proteína soluble en alcohol del gluten de trigo. Las gliadinas son habitualmente ricas en glutamina y prolina, particularmente en la parte N-terminal. Por ejemplo, los primeros 100 aminoácidos de las α -gliadinas y las γ -gliadinas contienen ~35% y ~20% de residuos de glutamina y prolina, respectivamente. Se han caracterizado muchas gliadinas de trigo y como existen muchas cepas de trigo y otros cereales, se anticipa que se identificarán muchas más secuencias utilizando métodos de rutina de biología molecular. En un aspecto de la presente descripción, se proporcionan plantas modificadas genéticamente que difieren de sus homólogos naturales por tener proteínas gliadina que contienen un contenido reducido de residuos de glutamina y prolina.

[0062] Los ejemplos de secuencias de gliadina incluyen, pero sin limitación secuencias de alfa gliadina de trigo, por ejemplo, tal como se proporciona en Genbank, números de acceso AJ133612; AJ133611; AJ133610; AJ133609; AJ133608; AJ133607; AJ133606; AJ133605; AJ133604; AJ133603; AJ133602; D84341.1; U51307; U51306; U51304; U51303; U50984; y U08287. Se establece una secuencia de omega gliadina de trigo en el Número de acceso de GenBank AF280605.

[0063] Para los objetivos de la presente invención, los oligopéptidos de gliadina tóxicos son péptido derivados durante la digestión humana normal de gliadinas y proteínas de almacenamiento relacionadas descritas anteriormente, de cereales de la dieta, por ejemplo, trigo, centeno, cebada, y similares. Se cree que dichos oligopéptidos actúan como antígenos para células T en la celiaquía. Para unirse a las proteínas MHC de Clase II, los péptidos inmunogénicos tienen habitualmente de aproximadamente 8 a 20 aminoácidos de longitud, más habitualmente de aproximadamente 10 a 18 aminoácidos. Dichos péptidos pueden incluir motivos PXP, tales como el motivo PQPQLP (SEQ ID NO:8). La determinación de si un oligopéptido es inmunogénico para un paciente particular se determina fácilmente mediante la activación de células T estándar y otros ensayos conocidos por los expertos en la materia.

[0064] Tal como se demuestra en el presente documento, durante la digestión, los oligopéptidos resistentes a peptidasa permanecen después de la exposición de glútenes, por ejemplo, gliadina, a enzimas digestivas normales. Se proporcionan ejemplos de oligopéptidos resistentes a peptidasa, por ejemplo, tal como se establece en las SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 10. En Wieser (1995) Baillieres Clin Gastroenterol 9 (2) : 191- 207 se describen otros ejemplos de oligopéptidos de gliadina inmunogénicos.

[0065] La determinación de si una enzima candidata digerirá un oligopéptido de gluten tóxico, tal como se ha descrito anteriormente, se puede determinar empíricamente. Por ejemplo, se puede combinar un candidato 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), POP-Lys (Abz)-LP-Tyr (NO₂)-PQPQLP, PQPQLP-Tyr (NO₂)-PQP-Lys (Abz)-LP; con uno o más de los oligopéptidos (SEQ ID NO: 1) QLQFPFPQQLPY, (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYQPQLPY, (SEQ ID NO: 13) QPQSFPEQQ, (SEQ ID NO: 14) QLQFPFPQPELPY, (SEQ ID NO: 15) PQPELPYQPPELPY, (SEQ ID NO: 16) QPQSFPEQQ o (SEQ ID NO: 12) LQLQFPFPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF; o con un sustrato pretratado que comprende una o más de las proteínas gliadina, hordeína, secalina o avenina que s han tratado con cantidades fisiológicas de proteasas gástricas y pancreáticas. En cada caso, se determina que el candidato sea una glutenasa de la invención si es capaz de escindir el oligopéptido. Las glutenasas que presentan una toxicidad baja para las células humanas y son activas en las condiciones fisiológicas presentes en el borde en cepillo intestinal son preferidas para utilizar en algunas aplicaciones de la invención, y por tanto, pueden ser útiles para cribar dichas propiedades en glutenasas candidatas.

[0066] Los sustratos de oligopéptidos o proteínas para dichos ensayos se pueden preparar según técnicas convencionales, tales como la 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 lineal de péptido (véase, Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154). La tecnología de ADN recombinante también se puede utilizar para producir el péptido.

[0067] El nivel de digestión del oligopéptido tóxico se puede comparar con el valor de la línea base. La desaparición del material de partida y/o la presencia de productos de digestión se pueden monitorizar mediante métodos convencionales. Por ejemplo, se puede conjugar un marcador detectable a un péptido, y a continuación, se puede

determinar el cambio en el peso molecular asociado con el marcador, por ejemplo, precipitación ácida, exclusión por peso molecular, y similares. El valor de la línea base puede ser un valor para una muestra de control o un valor estadístico que es representativo de una población de control. Se pueden realizar varios controles para asegurar que una actividad observada es auténtica, incluyendo la realización de reacciones en paralelo, controles positivos y negativos, respuesta a una dosis, y similares.

[0068] Las glutenasas activas identificadas mediante métodos de cribado descritos en el presente documento pueden servir como compuestos candidatos para la síntesis de compuestos análogos para identificar glutenasas con propiedades mejoradas. La identificación de compuestos análogos se puede realizar a través de la utilización de técnicas, tales como el análisis de campo autoconsistente (SCF), análisis de interacción de configuración (CI) y análisis de dinámica de modo normal.

[0069] Una propiedad deseable en las glutenasas es la estabilidad frente a las condiciones gástricas (pH bajo y pepsina). Las glutenasas con una mayor estabilidad gástrica se pueden identificar mediante mutagénesis, seguido de la transferencia de colonias al cultivo líquido en formatos de cribado de alto rendimiento, tales como placas de 96 pocillos. Después del crecimiento, se puede lisar una fracción del cultivo celular y el lisado se incuba durante periodos variables bajo condiciones gástricas simuladas (pepsina, pH 2). A continuación, el lisado se puede analizar con un sustrato cromogénico (por ejemplo, Cbz-Succinil-Ala-Pro-pNA). Se revelará un color amarillo intenso en presencia de extractos con estabilidad gástrica aumentada.

FORMULACIONES

[0070] En una realización de la presente invención, a un paciente de celiaquía se le proporciona, además de una glutenasa o un alimento tratado según los presentes métodos, un inhibidor de transglutaminasa de tejido, un agente antiinflamatorio, un agente antiúlceras, agentes estabilizantes de mastocitos y/o un agente antialergia. Ejemplos de dichos agentes incluyen inhibidores de HMG-CoA reductasa con propiedades antiinflamatorias, tales como compactina, lovastatina, simvastatina, pravastatina y atorvastatina; antagonistas de receptor H1 de histamina antialérgicos, tales como acrivastina, cetirizina, desloratadina, ebastina, fexofenadina, levocetirizina, loratadina y mizolastina; antagonistas de receptores de leucotrienos, tales como montelukast y zafirlukast; inhibidores de COX2, tales como celecoxib y rofecoxib; inhibidores de MAP quinasa p38, tales como BIRB-796; y agentes estabilizantes de mastocitos, tales como cromoglicato de sodio (cromolina), pemirolast, proxicromil, repirinast, doxantrazol, amlexanox, nedocromil y probicromil.

[0071] Tal como se utiliza en el presente documento, los compuestos que están "disponibles comercialmente" se pueden obtener de fuentes comerciales que incluyen, pero sin limitación, Acros Organics (Pittsburgh PA), Aldrich Chemical (Milwaukee WI), including Sigma Chemical and Fluka), Apin Chemicals Ltd. (Milton Park UK), Avocado Research (Lancashire U.K.), BDH Inc. (Toronto, Canada), Bionet (Cornwall, U.K.), 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 UK), Frontier Scientific (Logan UT), ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa CA), Key Organics (Cornwall U.K.), Lancaster Synthesis (Windham NH), Maybridge Chemical Co. Ltd. (Cornwall U.K.), Parish Chemical Co. (Orem UT), Pfaltz & Bauer, Inc. (Waterbury CN), Polyorganix (Houston TX), Pierce Chemical Co. (Rockford IL), Riedel de Haen AG (Hannover, Germany), Spectrum Quality Product, Inc. (New Brunswick, NJ), TCI America (Portland OR), Trans World Chemicals, Inc. (Rockville MD), Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond VA), Novabiochem and Argonaut Technology.

[0072] Los compuestos útiles para la coadministración con las glutenasas y los alimentos tratados de la invención también se pueden fabricar mediante métodos conocidos por un experto en la materia. Tal como se utiliza aquí, los "métodos conocidos por un experto en la materia" se pueden identificar a través de varios libros de referencia y bases de datos. Los libros de referencia y tratados adecuados que detallan la síntesis de reactivos útiles en la preparación de compuestos de la presente invención, o proporcionan referencias a artículos que describen la preparación, incluyen, por ejemplo, "Synthetic Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Inc., New York; S. R. Sandler et al., "Organic Functional Group Preparations," 2nd Ed., Academic Press, New York, 1983; H. O. House, "Modern Synthetic Reactions". 2nd Ed., W. A. Benjamin, Inc. Menlo.Park, Calif. 1972; T. L. Gilchrist, "Heterocyclic Chemistry", 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1992; J. March, "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure", 4th Ed., Wiley-Interscience, New York, 1992. También se pueden identificar reactivos específicos y análogos a través de los índices de compuestos químicos conocidos mediante el servicio de Chemical Abstract de la American Chemical Society, que están disponibles en la mayoría de bibliotecas públicas y de universidades, así como a través de base de datos online (para más detalles se puede contactar la American Chemical Society, Washington, D.C., www.acs.org). Los compuestos químicos que son conocidos, pero no están disponibles comercialmente en catálogos, se pueden preparar por casas de síntesis química habituales, donde la mayoría de casas proveedoras de productos químicos estándar (por ejemplo, los indicados anteriormente) proporcionan servicios de síntesis habitual.

[0073] Las proteínas de glutenasa y/o los compuestos administrados con las mismas se incorporan en una variedad de formulaciones para la administración terapéutica. En un aspecto, los agentes se formulan en composiciones farmacéuticas mediante la combinación con portadores o diluyentes apropiados farmacéuticamente aceptables, y se

formulan en preparaciones en formas sólida, semisólida, líquida o gaseosa, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Por tanto, la glutenasa y/u otros compuestos se pueden conseguir de varias maneras, normalmente mediante administración oral. La glutenasa y/u otros compuestos pueden ser sistémicos después de la administración o se pueden localizar debido a la formulación, o mediante la utilización de un implante que actúan para retener la dosis activa en el punto de implantación.

[0074] En las formas de dosificación farmacéutica, la glutenasa y/u otros compuestos se pueden administrar en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, o se pueden utilizar también solos o en asociación apropiada, así como en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los agentes se pueden combinar, tal como se ha descrito previamente, para proporcionar un cóctel de actividades. Los siguientes métodos y excipientes son de ejemplo y no debe interpretarse que limitan la invención.

[0075] Para preparaciones orales, los agentes se pueden utilizar solos o en combinación con aditivos apropiados para producir 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, acacia, almidón de maíz o gelatinas; con desintegrantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes de tamponado, agentes humectantes, conservantes y agentes saborizantes.

[0076] En una realización de la invención, las formulaciones orales comprenden recubrimientos entéricos, de manera que el agente activo es liberado al tracto intestinal. Existen disponibles en la técnica un conjunto de métodos para la liberación eficaz de las proteínas con recubrimiento entérico en el lumen del intestino delgado. La mayoría de los métodos se basan en la liberación de proteína como resultado de la subida repentina de pH cuando el alimento se libera desde el estómago al duodeno, o tras la acción de las proteasas pancreáticas que se secretan en el duodeno cuando el alimento entra en el intestino delgado. Para la liberación intestinal de una PEP y/o una proteasa específica de glutamina, la enzima normalmente se liofiliza en presencia de tampones apropiados (por ejemplo, fosfato, histidina, imidazol) y excipientes (por ejemplo, crioprotectores, tales como sacarosa, lactosa, trehalosa). Las tortas de enzimas liofilizadas se mezclan con excipientes, a continuación se llenan en cápsulas, que están recubiertas entéricamente con un recubrimiento polimérico que protege a la proteína del entorno ácido del estómago, así como de la acción de la pepsina en el estómago. Alternativamente, las micropartículas de proteínas también se pueden recubrir con una capa protectora. Las películas de ejemplo son ftalatoacetato de celulosa, ftalatoacetato de polivinilo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y acetatosuccinato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de metacrilato, y ftalatoacetato de celulosa .

[0077] Otras formulaciones entéricas comprenden microesferas de polímero manipulado fabricadas de polímeros biológicamente erosionables, que muestran interacciones adhesivas fuertes con el moco gastrointestinal y recubrimientos celulares y pueden atravesar el epitelio de absorción de la mucosa y el epitelio asociado a folículos que cubre el tejido linfóide de las placas de Peyer. Los polímeros mantienen el contacto con el epitelio intestinal durante periodos de tiempo extensos y en realidad lo penetran a través de las células y entre las mismas. Véase, por ejemplo, Mathiowitz et al. (1997) Nature 386 (6623) : 410- 414. Los sistemas de liberación de fármacos también pueden utilizar un núcleo de hidrogeles superporosos (SPH) y compuesto de SPH (SPHC), tal como se describe por Dorkoosh et al. (2001) J Control Release 71 (3) : 307- 18.

[0078] La detoxificación del gluten para una persona sensible al gluten puede iniciarse al entrar el alimento en el estómago, ya que el medio ácido (-pH 2) del estómago favorece la solubilización del gluten. La introducción de una PEP estable en ácido o una proteasa específica de glutamina en el estómago tendrá un efecto sinérgico con la acción de la pepsina, conduciendo a una destrucción acelerada de péptidos tóxicos tras la entrada del gluten en el intestino delgado de pacientes celíacos. A diferencia con una PEP que actúa en el intestino delgado, las enzimas gástricas no necesitan formularse con recubrimientos entéricos. De hecho, varias proteasas (incluyendo la cisteína proteasa de cebada mencionada anteriormente) se autoactivan mediante la escisión de las correspondientes proproteínas en condiciones ácidas. En una realización de la invención, la formulación comprende una proenzima que se activa en el estómago.

[0079] En otra realización, se administra a un paciente un microorganismo, por ejemplo, un cultivo bacteriano o de levaduras, capaz de producir glutenasa. dicho cultivo se puede formular como una cápsula entérica; por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos No. 6.008.027. Alternativamente, se pueden administrar microorganismos estables a la acidez del estómago en una cápsula o mezclados con preparaciones de alimentos.

[0080] En otra realización, la glutenasa se mezcla con alimentos, o se utiliza para pretratar alimentos que contiene glútenes. La glutenasa presente en los alimentos se puede activar enzimáticamente antes o durante la ingestión y se puede encapsular o en cualquier caso tratar para controlar la evolución con el tiempo de la actividad. Alternativamente, la glutenasa se puede encapsular para conseguir una liberación regulada con el tiempo después de la ingestión, por ejemplo, en el tracto intestinal.

[0081] Las formulaciones se proporcionan habitualmente en una forma de dosificación unitaria, donde el término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de glutenasa en una cantidad suficiente calculada para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria de la presente invención dependen del complejo particular utilizado y el efecto a conseguir, y la farmacodinámica asociada con cada complejo en el huésped.

[0082] Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, están disponibles comercialmente. Además, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares, están disponibles comercialmente. Cualquier compuesto útil en los métodos y composiciones de la invención se puede proporcionar como una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable. "Sal de adición de base farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los ácidos libres, que no son biológicamente, o de otro modo, indeseables. Estas sales se preparan por adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero sin limitación, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Las bases orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitclohexilamina, colina y cafeína .

[0083] Dependiendo del paciente y la patología a tratar y la ruta de administración, la glutenasa se puede administrar en dosis de 0,01 mg a 500 mg/kg peso corporal por día, por ejemplo, aproximadamente 20 mg/día para una persona promedio. La proteólisis eficaz de gluten in vivo para un adulto puede requerir por lo menos aproximadamente 500 unidades de una enzima terapéuticamente eficaz, normalmente por lo menos aproximadamente 1000 unidades, más habitualmente por lo menos aproximadamente 2000 unidades, y no más de aproximadamente 50.000 unidades, normalmente no más de aproximadamente de 20.000 unidades, donde una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 mmol de Cbz-Gly-Pro-pNA (para PEP) o Cbz-Gly-Gln-pNA (para una proteasa específica de glutamina) por minuto en condiciones específicas. La mayoría de PEP tienen actividades específicas en el intervalo de 5-50 unidades/mg de proteína. Se entenderá por los expertos en la materia que la dosis se puede incrementar, pero que puede que no se obtengan ventajas adicionales al exceder la dosis útil. Las dosis se ajustarán apropiadamente para la formulación pediátrica. En los niños, la dosis eficaz puede ser inferior, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 0,1 mg, ó 0,5 mg. En la terapia de combinación, se puede administrar una dosis comparable de las dos enzimas; sin embargo, la proporción estará influenciada por la estabilidad relativa de las dos enzimas a la inactivación gástrica y duodenal.

[0084] El tratamiento enzimático de la celiaquía se espera que sea más eficaz cuando se administra antes o con las comidas. Sin embargo, dado que el alimento permanece en el estómago durante 0,5-2 horas y se espera que el sitio primario de acción sea en el intestino delgado, la enzima también podría administrarse 1 hora después de la comida.

[0085] La detoxificación óptima de gluten in vivo se puede conseguir también mediante la combinación de una proteasa gástrica apropiada con una PEP que actúa en los péptidos de gluten en el duodeno, conjuntamente con las enzimas pancreáticas. Esto se puede conseguir mediante la coadministración de dosis de dos enzimas, por ejemplo, dos cápsulas/comprimidos; a través de la formulación simultánea de las dos enzimas en cantidades apropiadas, etc. Las partículas o gránulos de PEP duodenales liofilizadas se pueden proteger mediante un recubrimiento entérico polimérico adecuado que induce la liberación de enzima sólo en el duodeno. En cambio, la liberación de la proteasa gástrica se iniciará inmediatamente después del consumo de la forma de dosificación. También se proporciona el tratamiento de combinación que implica una PEP y un agente terapéutico complementario, tal como un inhibidor de la enzima transglutaminasa de tejido.

[0086] En algunas realizaciones de la invención, las formulaciones comprenden un cóctel de proteasas seleccionadas. Dichas combinaciones pueden conseguir una mayor eficacia terapéutica. En una formulación de combinación, la PEP de *Flavobacterium* y PEP de *Myxococcus* se formulan y administran simultáneamente para permitir la destrucción de un rango más amplio de péptidos antigénicos al gluten. De manera similar, la terapia de combinación con una o dos PEP de la lista anterior con una PEP estable al ácido o una glutamina endoproteasa puede conducir a una proteólisis del gluten más eficaz en el estómago, simplificando así la tarea de asimilación del gluten en el intestino delgado superior.

[0087] En otra realización, la formulación o el protocolo de administración combinan un producto proteasa y un inhibidor de transglutaminasa 2 (TG2). Dichas formulaciones pueden tener una protección adicional de la enteropatía mediada por gluten, ya que se ha observado que la TG2 presenta un efecto proinflamatorio significativo en los

péptidos de gluten en abdomen celiaco. En particular, los inhibidores de TG2 que contienen grupos halo-dihidroisoxazol, diazometilcetona o dioxindol son útiles para este objetivo.

5 [0088] En otra realización, la proteasa o cóctel de proteasas se administra y/o formula con un agente antiinflamatorio, por ejemplo, una estatina, inhibidor de MAP quinasa p38; agente anti-TNF α ; etc.

10 [0089] Los expertos entenderán 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. Las dosis preferidas para una enzima determinada son fácilmente determinables por los expertos en la materia mediante una variedad de medios. Un medio preferido es medir la potencia fisiológica de un compuesto determinado.

15 [0090] Otras formulaciones de interés incluyen formulaciones de ADN que codifican las glutenasas de interés para reconocer células intestinales para la modificación genética. Por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos No. 6,258,789, que describe la alteración genética de células epiteliales intestinales.

MÉTODOS TERAPÉUTICOS

20 [0091] Los métodos de la invención se utilizan para tratar alimentos para el consumo o que son consumidos por personas que padecen celiaquía y/o dermatitis herpetiforme mediante la liberación de una dosis eficaz de glutenasa. Si la glutenasa se administra directamente a un humano, entonces el agente o agentes activos están contenidos en una formulación farmacéutica. Alternativamente, se pueden obtener los efectos deseados mediante la incorporación de glutenasa en los productos alimenticios o mediante la administración de organismos vivos que expresan glutenasa, y similares. El diagnóstico de pacientes adecuados puede utilizar una variedad de criterios conocidos por los expertos en la materia. El incremento cuantitativo en anticuerpos específicos para gliadina y/o transglutaminasa de tejido es indicativo de la enfermedad. El historial familiar 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 la susceptibilidad a la enfermedad.

30 [0092] El efecto terapéutico se puede medir en términos de resultado clínico o se puede determinar mediante pruebas inmunológicas o bioquímicas. La supresión de la actividad de células T perjudicial se puede medir mediante la enumeración de células Th1 reactivas mediante la cuantificación de la liberación de citoquinas en todos los puntos de las lesiones, o utilizando otros ensayos para la presencia de células T autoinmunes conocidas en la técnica. Alternativamente, se puede mirar una reducción en los síntomas de una enfermedad.

35 [0093] Se pueden utilizar varios métodos para la administración, preferiblemente utilizando la administración oral, por ejemplo, con comidas. La dosis de la formulación terapéutica variará ampliamente, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de la administración, la manera de la administración, la depuración del agente del huésped y similar. La dosis inicial puede ser mayor, seguido de dosis de mantenimiento más pequeñas. La dosis se puede administrar tan infrecuentemente como semanalmente o bisemanalmente, o más a menudo fraccionada en dosis más pequeñas y administrada diariamente, con comidas, semisemanalmente, o en cualquier caso según sea necesario para mantener un nivel de dosificación eficaz.

EJEMPLOS

45 [0094] Los siguientes ejemplos se establecen a continuación para proporcionar a los expertos en la materia un conocimiento y una descripción completa de cómo realizar y utilizar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención o representar que los siguientes experimentos son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura y similares), pero pueden estar presentes algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso, la temperatura en grados centígrados y la presión es la presión atmosférica o próxima a ella.

EJEMPLO 1

55 Comparación de las actividades de PEP

60 [0095] Para llegar a comprender las similitudes y diferencias entre proliil endopeptidasas naturales, se compararon sistemáticamente las propiedades de tres PEP homólogas de diferentes fuentes bacterianas. Nuestros estudios han utilizado dos PEP recombinantes conocidas de *Flavobacterium meningosepticum* (FM) y *Sphingomonas capsulata* (SC), respectivamente, y una nueva PEP de *Myxococcus xanthus* (MX) que se han expresado por primera vez como una proteína recombinante heteróloga. Las actividades enzimáticas de estas PEP se analizaron cuantitativamente frente a los sustratos modelo, así como dos péptidos derivados de gluten con potencial relevancia para la patogénesis de la celiaquía. En particular, se ha investigado la influencia de la longitud de cadena del sustrato, pH, proteasas pancreáticas y peptidasas del borde en cepillo intestinales en la actividad de cada PEP. Se realizaron experimentos in vivo y ex vivo como parte de estos estudios.

Procedimientos experimentales

5 **[0096] Clonación de los genes de PEP.** Los genes de PEP se amplificaron a partir de ADN genómico de las correspondientes cepas bacterianas (*F. meningosepticum*: ATCC 13253; *S. capsulata*: ATCC 14666; *M. xanthus*: ATCC 25232). La secuencia de la supuesta PEP de MX está disponible en la base de datos NCBI (Locus ID AAD31004). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR incluían: (SEQ ID NO:1) (1) Primera mitad de FM: 5'-AAC CAA TCA TAT GAA GTA CAA CAA ACT TTC TGT G (NdeI), (SEQ ID NO:2) 5'-GAT AAA AAC GGA AAG CTT GTA AGG GC (HindIII); segunda mitad de FM: (SEQ ID NO:3) 5'-GCC CTT ACA AGC TTT CCG TTT TTA TC (HindIII) y (SEQ ID NO:4) 5'- CCC TTA ATT TTC AAA TTT TAG CTC GAG TTT ATG ATT TAT A (SacI); (2) primera mitad de SC: (SEQ ID NO:5) 5'-AGG ATA TCC ATA TGA AGA ACC GCT TGT GG (NdeI), (SEQ ID NO:6) 5'- GAC AAC CTC GAA TCC GTC GGC ATT G (HinfI); segunda mitad de SC: (SEQ ID NO:7) 5'-CAA TGC CGA CGG ATT CGA GGT TGT C (HinfI), (SEQ ID NO:8) 5'-CGC GGG GAC CTC GAG TAG AAA CTG (SacI); (3) MX: (SEQ ID NO:9) 5'-CT CCC CAT ATG TCC TAC CCG GCG ACC (NdeI) y (SEQ ID NO:10) 5' - GTG GCG GCG CAG GGC CGC AAG CTT CCC AAG CG (HindIII). Los genes amplificados se clonaron en un plásmido pET28b (Novagen).

20 **[0097] Expresión y purificación de PEP.** Se introdujeron plásmidos de expresión a través de la transformación en células BL21(DE3). Los transformantes se desarrollaron a 37°C y se indujeron en presencia de 100 µM de IPTG a 22°C durante la noche. Se observó que la inducción a temperaturas bajas mejoraba el rendimiento de la enzima activa. Todas las etapas de purificación se realizaron a 4°C, a menos que se indique lo contrario. Dado que las enzimas de PEP de FM y de SC poseen de forma natural una secuencia señal, se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli*. Por lo tanto, se utilizó un protocolo de choque osmótico modificado (EMD Biosciences, CA) para obtener un lisado de proteínas enriquecido que contenía cualquiera de las PEP. Se resuspendieron los residuos celulares (4 l de cultivo) en 30 ml de Tris-HCl 30 mM, pH 8, sacarosa al 20% y EDTA 1 mM y se agitaron lentamente a temperatura ambiente durante 10 minutos. La suspensión se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos y el residuo celular se resuspendió en dH₂O enfriado en hielo y se agitó lentamente en hielo durante 10 minutos. A continuación, las células resultantes del choque se centrifugaron de nuevo a 40.000-50.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante que contenía las proteínas periplásmicas se trataron durante 1-2 horas con una solución de NaCl 1 M (hasta una concentración final de NaCl 300 mM), una solución de imidazol 1 M (hasta una concentración final de imidazol 5 mM) y 1 ml de resina Ni-NTA (Qiagen, CA). A continuación, la proteína cruda se cargó en una columna que contenía 1 ml adicional de resina de Ni-NTA. Después de intensas etapas de lavado utilizando tampón de lavado (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0) con imidazol 0-10 mM, la PEP se eluyó con imidazol 150 mM, fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8. La PEP de FM se purificó adicionalmente en un sistema FPLC (Amersham Pharmacia, NJ) a través de una columna de intercambio catiónico HiTrap-SP. Antes de la aplicación en la columna de HiTrap-SP, la proteína se intercambió en un tampón fosfato 20 mM (pH 7). Después de la inyección, se eluyó la PEP con un gradiente de sal de fosfato 20 mM, pH 7 (tampón A) hasta fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7 (tampón B) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La PEP de MX, una proteína citosólica, se purificó inicialmente del lisado de células completas a través de una cromatografía de afinidad de Ni-NTA (tal como se detalla a continuación). La proteína se purificó adicionalmente en una columna de filtración en gel Superdex 200 (Amersham) con un gradiente isocrático de HEPES 20 mM, DTT 2 mM, pH 7,0 a 1 ml/min.

45 **[0098] Ensayos de actividad.** Se midió la actividad después de la escisión de prolina utilizando Z-Gly-Pro-p-nitroanilida y succinil-Ala-Pro-p-nitroanilida (Bachem, CA). Se disolvió Z-Gly-Pro-pNA en una mezcla de ensayo PBS:agua:dioxano (8:1,2:0,8). La concentración de Z-Gly-Pro-pNA varió de 100 a 600 mM. Aunque el sustrato Z-Gly-Pro-pNA era eficaz en la detección de la actividad enzimática, su insolubilidad a concentraciones más elevadas descartaba mediciones cinéticas en condiciones saturadas de sustrato. En cambio, la succinil-Ala-Pro-pNA, presentaba la ventaja de una solubilidad en agua elevada a todos los valores de pH analizados y, por tanto, era un sustrato preferido para los estudios cinéticos. La hidrólisis de Suc-Ala-Pro-pNA por PEP de FM, SC y MX se monitorizó en una mezcla de reacción (300 µl) que consistía en 30 µl de 10X tampón PBS, una concentración final de enzima 0,01-0,02 µM, y Suc-Ala-Pro-pNA (concentración madre 5 mM) a concentraciones finales que variaban entre 100 µM y 4 mM. La liberación de la p-nitroanilida se detectó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 410 nm. La velocidad inicial de la reacción se determinó mediante el incremento en la absorbancia a 410 nm, que se utilizó para calcular la K_m y K_{cat} según la relación de Michaelis-Menten. Para la medición de la influencia del pH en la actividad de la enzima, se preparó una serie de soluciones tampón de pH utilizando ácido cítrico y fosfato de sodio para valores de pH de 3,0 a 6,0, y fosfato de sodio para valores de pH de 7,0 a 8,0. Las mezclas de reacción (300 µl) consistían en 30 µl de 10X tampón de pH, concentración final de 0,01 µM de enzima, y Suc-Ala-Pro-pNA hasta concentraciones finales entre 100 µM y 4 mM.

60 **[0099] Estabilidad del pH.** Se determinó la capacidad de mantener la actividad de la enzima después de la exposición a medios ácidos. Se mezclaron soluciones de ácido clorhídrico (10 µl) a valores de pH que variaban de 1,5 a 4,0 con 1 µl de enzima durante 10-20 min. Las mezclas ácidas se neutralizaron a continuación con 40 µl de una solución de 10X PBS, 60 µl de sustrato 5 mM hasta un volumen final de 300 µl. La actividad de enzima recuperada se midió espectrofotométricamente y se comparó con controles tratados sin ácido en condiciones idénticas.

65

[0100] *Estabilidad gástrica y pancreática de proteasas.* En una placa de base U de 96 pocillos, se colocaron 5 µl de 2x tampón de reacción (Na₂HPO₄ 40 mM, pH = 6,5 para enzimas pancreáticas o HCl 20 mM para pepsina) y se añadieron 1 µl de la enzima degradante (1 mg/ml de pepsina o un cóctel de 1 mg/ml tripsina, 1 mg/ml de quimiotripsina, 0,2 mg/ml de elastasa y 0,2 mg/ml de carboxipeptidasa A), seguido de 4 µl de PEP (5-10 U/ml). La placa se incubó a 37°C durante varias veces (por ejemplo, 0, 5, 10, 20 y 30 minutos), con 190 µl de solución de sustrato PEP (2 ml de Z-Gly-Pro-p-nitroanilida (16,8 mg/ml en dioxano), 14 µl dioxano, 24 µl de agua, 150 µl de tampón PBS 10 mM, pH = 7,5) añadidos a cada pocillo. La absorción se midió a 410 nm durante 1 a 2 minutos cada 10 segundos para analizar la actividad residual. Cada tampón también contenía 5 mg/ml de gluten. El gluten no tratado se utilizó para la pepsina, mientras que el gluten proteolizado previamente con pepsina (HCl 0,01 M, pH = 2,0, 1:50 p/p, 2 h, 37°C) se utilizó para todas las otras enzimas. Los pocillos que contenían ácido (pH = 2,0) se neutralizaron mediante la adición de 10 µl de NaOH 0,1 M antes de la adición del sustrato de PEP. Las actividades de enzima se expresan como el porcentaje de la actividad máxima, habitualmente observada en el punto de tiempo cero.

[0101] *Especificidad de sustrato.* Además de los sustratos de referencia anteriores, también se evaluó la especificidad de las enzimas utilizando dos péptidos inmunogénicos derivados de la secuencia de proteínas γ -gliadina en gluten. Ambos péptidos se sintetizaron utilizando síntesis de péptidos en fase sólida. El péptido (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYPQPQLP contiene el epítipo γ II inmunodominante, y es resistente a la proteólisis por pepsina o cualquier enzima pancreática. La especificidad de PEP hacia este sustrato se evaluó en un ensayo competitivo en el que se mezclaron (SEQ ID NO: 12) PQPQLPYPQPQLP 100 mM y Suc-Ala-Pro-pNA 100 µM y se hicieron reaccionar con PEP 0,02 µM a 25°C. La velocidad inicial de la escisión de Suc-Ala-Pro-pNA se midió espectrofotométricamente, mientras que la velocidad inicial de la hidrólisis de (SEQ ID NO: 13) PQPQLPYPQPQLP se determinó mediante HPLC. La especificidad aparente, k_{cat}/K_M , para la hidrólisis de (SEQ ID NO: 14) PQPQLPYPQPQLP se pudo determinar en base a la k_{cat}/K_M conocida de la enzima para Suc-Ala-Pro-pNA y las velocidades de reacción observadas de los dos sustratos. Además de PQPQLPYPQPQLP, también se evaluó la especificidad de PEP para el péptido más complejo pero fisiológicamente relevante (SEQ ID NO: 15) LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQP (33 unidades). Las reacciones de proteólisis se realizaron a 37°C en tampón PBS con péptido 5-100 µM y PEP 0,1 µM durante periodos de tiempo de 1 min - 4 horas.

[0102] La disminución en la concentración de sustrato, así como en la formación concomitante de intermedio y producto se monitorizó con análisis por HPLC. La RP-HPLC se realizó en un sistema que consistía en Beckman o Rainin Dynamax SD-200, un grupo de detectores Varian 340 UV a 215 nm y 280 nm. El disolvente A era H₂O con TFA al 0,1% y el disolvente B era acetonitrilo con TFA al 0,1%; gradiente utilizado: 0-5% B en 0-15 min, 5-30% B en 15-30', 30-100% B en 30-35 min, 100% B durante 5'; flujo 1 ml/min; la separación se realizó en una columna C18 de fase inversa de 4,6 x 150 mm (Vydac, Hesperia, CA, USA). Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 13.400 g, antes de la inyección de 10-100 µl. Tanto (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP como el péptido de 33 unidades presentan múltiples sitios endoproteolíticos después de prolina. De este modo, se acumulan múltiples péptidos durante el transcurso de la reacción, algunos de los cuales son en sí mismos sustratos de PEP secundarios. Se utilizó MS-MS de atrapamiento de iones por electrospray acoplado con UV-HPLC (LCQ Classic/Surveyor, ThermoFinnigan, CA) para identificar los sitios de escisión preferidos en (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP y el péptido de 33 unidades.

[0103] Para una evaluación adicional de la proteólisis del péptido de 33 unidades y (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP en el medio fisiológico apropiado, se suspendió gluten (30 g/L) en HCl 0,01 M (pH = 2,0) y se incubó en presencia de pepsina (600 mg/L) durante 2 horas a 37°C. La solución resultante se neutralizó utilizando NaOH 10 M y se diluyó a 10 g/L en un tampón fosfato (40 mM, pH 6,5). A continuación, 25 µl de esta suspensión se complementaron con el péptido de 33 unidades (0,1 mg/ml), (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP (0,08 mM), tripsina (0,1 mg/ml), quimiotripsina (0,1 mg/ml), elastasa (0,02 mg/ml), carboxipeptidasa A (0,02 mg/ml). Se añadieron prolil endopeptidasa (FM o MX; 1x: 500 mU/ml; 5x: 2.5 U/ml; 10x: 5 U/ml) y membranas de la superficie del borde en cepillo intestinales de rata (BB, 1x: 40 mU/ml, 2x: 80 mU/ml, actividad DPP IV) hasta un volumen total de 150 µl. La mezcla se incubó a 37°C y se tomaron alícuotas de 25 µl a 0, 5, 10, 30 y 60 minutos e inmediatamente se desactivaron mediante calor.

[0104] Para examinar la especificidad de la longitud de cadena de PEP individuales, se realizaron reacciones competitivas que contenían péptidos derivados de gluten, se sometió la mezcla de reacción a RP-HPLC, y se monitorizó la desaparición de cada sustrato en función del tiempo. Se integraron las áreas de los picos del péptido de 33 unidades (32,5 min) y (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP (27,5 min).

[0105] *Actividad de endopeptidasa in vivo.* Se anestesió una rata adulta (hembra o macho) y se mantuvo a 36-37°C durante todo el procedimiento quirúrgico. Se abrió la cavidad peritoneal y se realizó una pequeña incisión al inicio y al final de un segmento de yeyuno de 15-20 cm. Se insertaron catéteres de polietileno y se aseguraron en los dos extremos. El catéter de entrada se conectó con una jeringuilla inducida por una bomba con una solución. El segmento de yeyuno se perfundió inicialmente con tampón PBS para eliminar cualquier residuo celular residual a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. A continuación, las soluciones de péptido purificadas (concentración de péptido

varía de 25 a 100 μM) se perfundieron a 0,4 ml/min a través del segmento de yeyuno con un tiempo de residencia de 10-40 min. En el caso de perfusión simultánea, el catéter de entrada está conectado con dos jeringuillas simultáneas, una con una solución de péptido y la otra con la solución de prolil endopeptidasa (la concentración varía de 50 a 500 $\mu\text{U}/\mu\text{l}$). Se recogió el fluido del catéter de salida en tubos de centrifuga pequeños en hielo seco para el posterior análisis. Los productos digestivos recogidos se analizaron mediante HPLC en una columna C18.

Resultados

[0106] *Expresión de la proteína PEP.* Las PEP de FM y SC tienen sus propias secuencias señal y por tanto se expresaron como enzimas solubles secretadas en el espacio periplásmico de *E. coli*. Un simple procedimiento de lisis por congelación-descongelación condujo a la recuperación de la proteína periplásmica sin una contaminación significativa por las proteínas citoplasmáticas. En cambio, la PEP de MX carece de una secuencia señal nativa y, por tanto, se expresó como una proteína citoplasmática. La PEP se purificó de cada lisado mediante cromatografía de afinidad de Ni-NTA, seguido de una segunda etapa cromatográfica. La producción de las PEP activas de FM, SC y MX fueron de 1 mg/L, 60 mg/L y 30 mg/L, respectivamente. Se determinó que la pureza de las diversas PEP era superior al 90%.

[0107] *Análisis cinético con sustratos de referencia.* La actividad de cada PEP se evaluó inicialmente utilizando el sustrato cromogénico estándar succinil-Ala-Pro-pNA. La liberación de la p-nitroanilina se detectó a 410 nm, y los datos cinéticos se ajustaron a la relación de Michaelis-Menten. Se seleccionó succinil-Ala-Pro-pNA como sustrato de referencia en lugar del utilizado más habitualmente Z-Gly-Pro-pNA debido a la baja solubilidad de este último sustrato, el cual necesitaba el uso de codisolventes. Los valores calculados de k_{cat} y K_{M} de PEP de FM, MX y SC para la succinil-Ala-Pro-pNA están tabulados (Tabla 1). Mientras que estas enzimas mostraban todas una actividad de nivel comparable con la de la serina proteasa, la PEP de MX presenta una especificidad superior a la PEP de FM, mientras que la PEP de SC presenta un nivel intermedio de especificidad (tabla 2). La especificidad superior de MX se puede atribuir principalmente a su mayor afinidad para el sustrato, tal como se refleja en la K_{M} .

Tabla 1. Parámetros cinéticos para la hidrólisis de Succinil-Ala-Pro-p-nitroanilida por PEP de FM, PEP de MX y PEP de SC.

	k_{cat} (s^{-1})	K_{M} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$)
PEP de FM	33	0,91	37
PEP de MX	51	0,35	146
PEP de SC	144	2,1	67

Tabla 2. Especificidad de PEP de FM, PEP de MX y PEP de SC para el péptido de gliadina inmunogénica (SEQ ID NO:4) PQPQLPYQPQLP.

	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$)
PEP de FM	178
PEP de MX	548
PEP de SC	492

[0108] *Actividad enzimática vs. pH.* El medio luminal del duodeno está aproximadamente a pH 6. Por lo tanto, una PEP terapéuticamente útil debe retener una actividad específica elevada a ese pH. La velocidad de recambio en estado estacionario, k_{cat} , de cada PEP se valoró en varias condiciones de pH utilizando 100-4000 μM de succinil-Ala-Pro-pNA, mostrado en la figura 1. Tanto la PEP de FM como la PEP de MX mostraron el pKa del sitio activo a alrededor de pH 6, indicando la actividad óptima en el intervalo de pH 6-8. La actividad disminuida de ambas enzimas a pH 5 concuerda con el papel bien establecido de un residuo de histidina como base general en la triada catalítica de serina proteasa, pero alternativamente puede indicar un cambio desde la conformación de enzima activa a un estado inactivado. Dichos cambios conformacionales están implicados en el ciclo catalítico de la PEP de cerebro porcino caracterizado estructuralmente. De manera destacada, la PEP de SC, que tiene el perfil de pH más amplio, muestra un incremento destacado en la velocidad máxima en condiciones ligeramente básicas.

[0109] *Estabilidad de PEP.* Aunque se pueden formular proteínas terapéuticas administradas oralmente para protegerlas del medio ácido y proteolítico del estómago, es probable que la estabilidad intrínseca en ácido de una PEP sea una característica deseable en su utilización como agente terapéutico para la celiaquía. Por lo tanto, se evaluó el grado en que la actividad de cada PEP permanece intacta después de 10 minutos de incubación a los valores de pH seleccionados entre 1,6 y 3,9. En este intervalo de pH, la PEP de FM mantenía el 50-70% de su actividad original; la PEP de MX mantenía el 70-90% de la actividad; y la PEP de SC mantenía el 30-80% de la actividad. De este modo, aunque todas las PEP parecen ser moderadamente estables en ácido, la PEP de MX es la más versátil. Dado que la eficacia terapéutica requeriría que la PEP actúe en el gluten conjuntamente con proteasas pancreáticas que se secretan en el duodeno, se evaluó la resistencia de PEP de FM y PEP de MX hacia las enzimas gástricas y pancreáticas. Para esto se preincubaron las enzimas con cantidades fisiológicas de pepsina (a pH 2) o un cóctel que comprende tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa A (a pH 6,5). Tal como se observa en

la figura 2, las PEP de FM y MX eran muy susceptibles a la proteólisis catalizada por pepsina, mientras que parecían ser destacadamente estables a la destrucción en presencia de cantidades fisiológicas de las enzimas pancreáticas.

[0110] *Análisis cinético utilizando PQPQLPYPQPQLP como sustrato.* El péptido inmunogénico PQPQLPYPQPQLP es una secuencia recurrente en γ -gliadinas, y es resistente a la proteólisis por proteasas gástricas y pancreáticas. También es muy resistente a la digestión por peptidasas del borde en cepillo intestinales con sólo la dipeptidil carboxipeptidasa I (DCP1) capaz de actuar en él. El tratamiento de este péptido con PEP da lugar a una escisión en residuos internos de prolina, que a su vez genera nuevos sitios de reconocimiento para las aminopeptidasas del borde en cepillo. De este modo, (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYPQPQLP representa un buen sustrato de prueba para analizar la especificidad de la PEP.

[0111] Los valores de k_{cat}/K_M de cada PEP se determinaron en una mezcla de ensayo que contenía (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYPQPQLP, así como Suc-Ala-Pro-pNA como sustrato competitivo. Las velocidades de desaparición de ambos sustratos se determinaron mediante métodos de detección independientes. La velocidad inicial de desaparición de (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYPQPQLP se midió mediante HPLC, mientras que la velocidad de consumo de Suc-Ala-Pro-pNA se midió espectrofotométricamente. Las PEP de FM y MX presentaban una especificidad 5 veces superior para el péptido de gluten en comparación con el sustrato cromogénico, mientras que la PEP de SC mostraba un incremento de 7 veces en la especificidad para el péptido de gluten (Tabla 2). Este incremento en la especificidad sugiere que péptidos más largos pueden proporcionar anclajes adicionales en el sitio catalítico, una hipótesis que es consistente con la observación de que Ala-Pro-pNA (que carece de un grupo succinilo N-terminal o un grupo carboxibencilo) no reaccionaba con ninguna de las PEP.

[0112] Para analizar la regioespecificidad de la hidrólisis de (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP por las PEP individuales, se analizaron adicionalmente las muestras correspondientes a los puntos de tiempo iniciales mediante LC/MS/MS. Los resultados, mostrados en las figuras 3A-3D, revelan que cada PEP tiene preferencias de subsitio únicos. Aunque el sitio preferido de escisión por la PEP de FM estaba en la posición (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYP|QPQLP, la PEP de MX escindía preferencialmente el mismo péptido en la posición (SEQ ID NO:11) PQPQLP|YPQPQLP. SC presentaba una preferencia comparable para cualquiera de los puntos de la escisión. Todas las enzimas escindieron preferencialmente el péptido en una prolina localizada cerca del centro de la secuencia, destacando su diferencia funcional con respecto a las endopeptidasas específicas de prolino, tales como DDP IV.

[0113] *Tolerancia y selectividad de la longitud de cadena.* Se ha sugerido que las prolil endopeptidasas de la familia de serina proteasas están limitadas con respecto a las longitudes de cadena de los potenciales sustratos. Para probar esta hipótesis en el contexto de las tres PEP bacterianas estudiadas aquí, se compararon sus actividades hidrolíticas contra una secuencia de péptidos de 33 unidades fisiológicamente relevantes de gliadina de trigo, LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLP YPQPQPF (figura 4A). La PEP de FM (0,1 mM) era capaz de hidrolizar 10 mM del péptido de 33 unidades en aproximadamente 2-3 minutos, mientras que la PEP de SC requería más de 1 hora para conseguir un punto final comparable. En base a las velocidades iniciales, se estimó que la PEP de FM actuaba 5 veces más rápida en el péptido de 33 unidades que la PP de MX y más de 20 veces más rápida que la PP de SC. De este modo, la PEP de SC parece tener una restricción severa de la longitud de cadena severa para los sustratos de péptido largos.

[0114] Los intermedios y productos de la hidrólisis del péptido de 33 unidades por las PEP de FM y MX se analizaron mediante LC/MS/MS (Figura 4B-C). Vale la pena mencionar varias características. En primer lugar, incluso a puntos de tiempo relativamente tempranos, los productos digestivos de la PEP de FM eran predominantemente fragmentos pequeños, mientras que la digestión de PEP de MX produjo un grupo significativo de intermedios largos, tales como LQLQPFQPQLPYPQPQLP, LQLQPFQPQLPYP y LQLQPFQPQLP. De este modo, aunque ambas PEP son capaces de proteolizar de manera eficaz el péptido de 33 unidades, presentan diferentes patrones hidrolíticos en este sustrato complejo. En particular, la PEP de MX parece que se procesa (es decir, para cada molécula de sustrato de 33 unidades, escinde secuencialmente todos los sitios preferidos en la cadena antes de la liberación), o alternativamente la enzima tiene una fuerte tendencia hacia los sustratos de cadena más corta. También se podría indicar que los fragmentos C-terminales generados por las dos enzimas son diferentes (QPQPF para la PEP de FM, y YPQPQPF para la PEP de MX). Este hallazgo es consistente con la preferencia del subsitio observada en el caso de la digestión de (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP.

[0115] Para investigar directamente la selectividad de la longitud de la cadena de las tres enzimas, se coincubaron (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP y LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF con cada PEP (Figura 6A-C). Tanto la PEP de SC y la PEP de MX mostraron una preferencia clara por el péptido de 13 unidades, mientras que la PEP de FM mostró una selectividad comparable para ambos péptidos.

[0116] Para evaluar adicionalmente las preferencias de sustrato, se mezclaron (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYPQPQLP y el péptido de 33 unidades con gluten tratado con pepsina y se dejó reaccionar con enzimas pancreáticas en presencia de BBM y PEP de FM o PEP de MX. Tal como se observa en las trazas de HPLC (Figura 6A-B), el péptido de 33 unidades presentaba el tiempo de retención más largo, mientras que (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP y otros péptidos de gluten de longitud media se eluyeron antes. Aquí también la PEP de FM

proteolizó (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYPQPQLP, el péptido de 33 unidades y otros péptidos de gluten a velocidades comparables (Figura 6A). En la digestión de PEP de MX, el péptido PQPQLPYPQPQLP y otros péptidos más pequeños se rompieron rápidamente (en 10 minutos), mientras que la hidrólisis del péptido de 33 unidades tuvo lugar a una velocidad más lenta (Figura 6B).

[0117] *Hidrólisis in vivo*. Para validar las implicaciones de las observaciones bioquímicas anteriores para la digestión de péptidos en el intestino delgado intacto, cada PP se perfundió simultáneamente en el yeyuno de rata con el sustrato peptídico de 33 unidades y se analizó el efluente recogido a una distancia de 15-20 cm del punto de perfusión. En este modelo de animal vivo, se valora el impacto de la acción concertada de la PEP perfundida (luminal) y las peptidasas del borde del cepillo (superficie). Tal como se muestra por los resultados in vitro anteriores, mientras que las enzimas BBM son insuficientes para procesar el péptido de 33 unidades, la PEP de FM inducía una rotura más completa del péptido de 33 unidades que la PEP de MX y de SC (figura 7). En un intervalo de dosificación de PEP de 50-500 mU/ml, el grado de hidrólisis del péptido de 33 unidades se incrementó con la dosis de PEP, demostrando que a dosis más elevadas de PEP se podía acelerar la rotura de gluten en el abdomen del mamífero.

[0118] De acuerdo con los recientes hallazgos que relacionaban la fuerte antigenicidad de péptidos de gliadina con su excepcional resistencia digestiva, se identificaron las prolil endopeptidasas como una familia potencialmente interesante de enzimas para terapia oral de la celiacía. El entendimiento de las propiedades enzimológicas de estas enzimas es un requisito esencial para dicho uso. En el estudio anterior, se seleccionaron las prolil endopeptidasas de tres fuentes bacterianas y se expresaron en *E. coli* como proteínas recombinantes, y posteriormente se purificaron y caracterizaron. Dos de estas enzimas (de *F. meningosepticum* y *S. capsulata*) se han descrito anteriormente, mientras que la tercera enzima (de *M. xanthus*) representa un nuevo miembro de la familia de prolil endopeptidasas.

[0119] A efectos de examinar las propiedades endoproteolíticas de estas enzimas, es importante utilizar sustratos peptídicos con sitios de escisión internos. Aunque se han utilizado frecuentemente sustratos modelo, tales como Z-Gly-Pro-pNA o Suc-Ala-Pro-pNA, para identificar y caracterizar prolil endopeptidasas, estos sustratos solos no proporcionan un conocimiento adecuado para diferenciar endopeptidasas entre sí o de aminopeptidasas específicas de prolina (tales como, dipeptidil peptidasa IV (DPP IV)). En el contexto de la celiacía, se han reconocido dos péptidos (PQPQLPYPQPQLP y LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) como sondas útiles para estudiar las propiedades fundamentales de las prolil endopeptidasas, así como por su potencial para la detoxificación de gluten. El péptido PQPQLPYPQPQLP contiene un epítipo hallado en γ -gliadinas que se ha observado que juega un papel inmunodominante en la respuesta mediada por células T al gluten en el abdomen de celíacos. No se puede escindir por proteasas gástricas o pancreáticas y es también muy resistente a la digestión por las peptidasas de membranas de borde en cepillo (BBM) intestinales, con sólo la dipeptidil carboxipeptidasa I siendo capaz de actuar sobre el mismo a una velocidad muy limitada. De este modo, se puede esperar que la eficacia del metabolismo intestinal de este péptido mejore en presencia de una prolil endopeptidasa exógena, tal como se ha verificado en este estudio. El tratamiento de este péptido con PEP da lugar a la escisión en un residuo de prolina interna, que a su vez genera un nuevo sitio de reconocimiento para las aminopeptidasas del borde en cepillo. De este modo, PQPQLPYPQPQLP representa una buena sonda para la especificidad de PEP.

[0120] Se seleccionó el péptido de gliadina de 33 unidades LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF como una sonda complementaria para estos estudios porque es un producto estable fisiológicamente derivado de la digestión gástrica y pancreática de γ -gliadina y estimula fuertemente la proliferación de células T reactivas a gluten de prácticamente todos los pacientes con celiacía analizados hasta ahora. Por lo tanto, la rotura endoproteolítica de este péptido de 33 unidades representa un objetivo especialmente desafiante para una PEP exógena. Como la mayoría de otros péptidos de gluten antigénicos, el péptido de 33 unidades contiene múltiples residuos de prolina, y se puede esperar que presenten más de un sitio de escisión a una PEP. Al mismo tiempo, su carácter multivalente sugiere que la acción de PEP sola es improbable que elimine toda la antigenicidad residual de este péptido. Consecuentemente, es necesaria la acción combinada de una PEP y las peptidasas endógenas de la membrana del borde en cepillo intestinal para la neutralización inmunológica y la asimilación dietética de este péptido largo rico en prolina.

[0121] Las investigaciones en las características de reconocimiento molecular de las tres PEP bacterianas para dos péptidos de gliadina han revelado por lo menos dos características interesantes y potencialmente importantes de estas enzimas. En primer lugar, aunque las tres PEP analizadas aquí mostraron una actividad específica elevada contra los sustratos cromogénicos de referencia (tabla 1), mostraron diferencias destacables en la especificidad de la longitud de la cadena (figura 3A-C). Mientras que la PEP de SC y la PEP de MX presentaban una especificidad más elevada para PQPQLPYPQPQLP que PEP de FM (Tabla 2), lo inverso fue cierto para el péptido de gliadina de 33 unidades más largo (figura 4A), especialmente en el caso de PEP de SC, que presentaba una actividad extremadamente escasa contra el péptido de 33 unidades.

[0122] El análisis estructural y bioquímico condujo a la proposición de que la actividad de las PEP está limitada a sustratos que contienen menos de 30 residuos de aminoácidos. En este aspecto, la buena actividad de la PEP de MX y especialmente la PEP de FM frente al péptido de 33 unidades es sorprendente. La amplia tolerancia de la

longitud de cadena de PEP de FM se demuestra claramente en ensayos in vitro e in vivo competitivos, en los que la PEP de FM era capaz de procesar sustratos más largos y más cortos a velocidades comparables. En segundo lugar, el análisis de secuencia de los principales productos proteolíticos derivados de ambos sustratos de gliadina demostró que las PEP presentaban una especificidad de subsitio distinta, así como una regioespecificidad en el contexto de la secuencia repetitiva más larga. Por ejemplo, la PEP de FM se escindían preferiblemente en PQPQLPYP|QPQLP, mientras que la PEP de MX prefería el sitio PQPQLP|YPQPQLP, y la PEP de SC presentaba una actividad comparable hacia cualquiera de los sitios.

[0123] De manera similar, el análisis de secuencia de los productos hidrolíticos iniciales del péptido de 33 unidades enfatiza las diferencias regioquímicas entre la PEP de FM y la PEP de MX. Mientras que el tratamiento con PEP de MX generaba fragmentos mayoritariamente de 4-5 residuos (presumiblemente procesados secuencialmente a partir de ambos extremos), la PEP de FM produjo intermedios más largos (presumiblemente como resultado de una escisión preferencial cerca del centro del péptido). De este modo, los sitios activos de estas enzimas son claramente diferentes que, a su vez, tienen potenciales implicaciones para la utilización de estas enzimas que detoxifican el gluten para un paciente celíaco.

[0124] Además de analizar la especificidad de sustrato, también se investigaron otras propiedades terapéuticamente relevantes del grupo de tres PP. Se incluyen la dependencia con el pH de la actividad enzimática, la tolerancia al ácido de la proteína y la resistencia a la inactivación por proteasas/peptidasas gástricas, pancreáticas e intestinales. Todas las enzimas presentan un perfil de actividad con el pH que concuerda con el medio moderadamente ácido del intestino delgado superior (pH 6-6,5). También parecen ser moderadamente estables a la exposición a ácido, así como a la acción de proteasas pancreáticas (pero no pepsina), siendo la PEP de MX la más estable. Las enzimas también mantienen la actividad en el lumen del intestino delgado intacto de una rata, que es indicativo de su estabilidad a las secreciones intestinales y las peptidasas de las membranas de borde en cepillo. Finalmente, los niveles de expresión de estas enzimas varían significativamente en *E. Coli* recombinante. Específicamente, en comparación con la PEP de FM, los niveles de expresión de PEP de SC y de MX fueron sustancialmente superiores.

[0125] La PEP de cerebro porcino presenta una arquitectura de didominio, que incluye un dominio de hélice β inusual que aparece para regular la proteólisis. Las alineaciones de secuencia por parejas entre esta PEP caracterizada estructuralmente de y la PEP de FM, MX y SC revelan una identidad (Similitud) del 39% (49%), 36% (45%) y 40% (48%), respectivamente. Estas alineaciones también sugieren que las PEP bacterianas están comprendidas de un dominio catalítico y un dominio de hélice β . Dado que se prevé que sus sitios activos se encuentren cerca de la interfase entre los dos dominios, la mutagénesis en la interfase entre dominios podría alterar la dinámica de la proteína y, a su vez, afectar en la tolerancia y especificidad de sustrato.

[0126] Los resultados anteriores proporcionan una base para hacer esfuerzos en la manipulación de proteínas de enzimas PEP. Esta familia de serina proteasas incluye numerosos supuestos homólogos, cuyos ADNc se han secuenciado, pero cuyos productos génicos están por caracterizar. A la luz de las propiedades favorables del PEP de MX, que se expresó y caracterizó por primera vez como parte de este estudio, será útil para cribar enzimas naturales adicionales.

Ejemplo 2

Expresión heteróloga de PEP en *Lactobacillus*

[0127] En una realización de la presente invención, se proporciona un paciente celíaco con un organismo recombinante modificado para expresar una PEP de la invención. El organismo recombinante se selecciona entre los organismos que pueden colonizar la mucosa intestinal sin perjudicar al paciente, proporcionando así una fuente endógena de PEP al paciente. Como ejemplo, los *Lactobacillus*, tales como, *L. casei* y *L. Plantarium*, pueden colonizar la mucosa intestinal y secretar las enzimas PEP de forma local. Dado el uso extendido en el procesamiento de alimentos, también se pueden utilizar como una fuente eficiente de PEP para uso industrial (para tratar alimentos) y médico (para preparar PEP para formulación farmacéutica). Las PEP se expresan en dichos *Lactobacillus* utilizando tecnologías de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, Shaw et al. (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 diseñado especies de *Lactobacillus* para expresar la toxina del tétanos intracelular y unida a superficie. Los genes de PEP intactos (incluyendo las secuencias líder para la secreción bacteriana eficaz) se clonan en vectores de expresión lanzadera, tales como pLP401 o pLP503, bajo el control del promotor de amilasa (regulable) o el promotor de lactato deshidrogenasa (constitutivo), respectivamente. Alternativamente, las cepas de *Lactobacillus* de grado alimenticio recombinante se generan mediante tecnología de recombinación específica de sitio (por ejemplo, véase Martin MC, Alonso, JC, Suarez JE, y Alvarez MA *Appl. Env. Microbiol.* 66, 2599-2604, 2000). Se utilizan condiciones de cultivo estándar para la fermentación de *Lactobacillus*, tales como los descritos por Martin et al.

Ejemplo 3

Expresión heteróloga de PEP en levaduras

[0128] Se utilizan células y organismos naturales y recombinantes para producir glutenasas útiles en la práctica de la presente invención. Las glutenasas preferidas y células productoras incluyen aquellas de organismos conocidos por ser considerados en general como seguros, tales como *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Sphingomonas*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Xanthomonas*, *Pyrococcus*, *Bacillus* y *Streptomyces*. Las enzimas glutenasas extracelulares se pueden obtener de microorganismos, tales como *Aspergillus oryzae* y *Lactobacillus casei*. Las células preferidas incluyen aquellas que ya se utilizan en la preparación de alimentos, porque se han modificado para expresar una glutenasa útil en la práctica de la presente invención. Como ejemplo, son útiles cepas de levadura, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, para la expresión a nivel elevado de proteínas heterólogas secretadas. Los genes que codifican cualquiera de las PEP descritas anteriormente (sólo proteína madura) se clonan en plásmidos de expresión diseñados para la producción óptima de proteínas secretadas. Un ejemplo de dicha estrategia de expresión heteróloga se describe en Parekh, R.N. y Wittrup, K.D. (Biotechnol. Prog. 13, 117-122, 1997). Se pueden utilizar vectores de autoreplicación (por ejemplo, 2 micras) o de integración (por ejemplo, pAUR101). El promotor GAL1-10 es un ejemplo de un promotor inducible, mientras que el promotor ADH2 es un ejemplo de un promotor constitutivo. El ADNc que codifica la PEP madura está fusionado en dirección 3' de una secuencia líder que contiene una región pre-pro sintética que incluye un sitio de escisión de sitio y un sitio de escisión Kex2p. Se puede utilizar *S. cerevisiae* BJ5464 como huésped para la producción de la peptidasa. Las condiciones de fermentación en un matraz de agitación se describen por Parekh y Wittrup en la referencia citada anteriormente. Alternativamente, se pueden utilizar cultivos de alimentación por lotes de alta densidad celular para la producción a gran escala de las peptidasas; un procedimiento representativo para este objetivo se describe en Calado, C.R.C, Mannesse, M., Egmond, M., Cabral, J.M.S. y Fonseca, L.P. (Biotechnol. Bioeng. 78, 692-698, 2002).

Ejemplo 4

25 Formulación de cápsulas entéricas de prolil endopeptidasa

[0129] Las cápsulas de gelatina se rellenan con 100 mg de prolil endopeptidasa de *Myxococcus xanthus* y 10 mg de dióxido de silicio. Las cápsulas se recubren entéricamente con polímero Eudragit y se ponen en una cámara de vacío durante 72 horas. A continuación, las cápsulas se mantienen a un intervalo de temperaturas de 10°C a 37°C y un nivel de humedad controlada de 35-40%.

Ejemplo 5

35 Estudios de la formulación de cápsulas entéricas de prolil endopeptidasa

[0130] Se realiza un estudio en el que pacientes con celiaquía se apuntan a un estudio de dos semanas. Se utilizan cápsulas de gelatina que contenían 90% de prolil endopeptidasa de *Myxococcus xanthus* mezclada con dióxido de silicio. Las cápsulas se rellenan manualmente con la mezcla, se ligan y se recubren con un recubrimiento entérico de Sureteric al 10% (un polímero de polivinilacetatoftalato desarrollado por la subsidiaria canadiense de Merck & Company). Las muestras se prueba en ácido mediante la exposición del recubrimiento a HCl 1 N durante una hora a efectos de estimular el medio ácido del estómago. A continuación, las cápsulas se ponen en una cámara al vacío durante 72 horas.

[0131] Se administran dos cápsulas de 100 mg a cada paciente antes de cada comida. A los pacientes se les instruye para comer todo tipo de alimentos sin abstenerse de aquellos que se saben que causan sufrimiento, por ejemplo, hinchazón, diarrea y calambres.

Ejemplo 6

50 Formulación de pastilla entérica de prolil endopeptidasa

[0132] Se disuelven 400 mg de ácido L-tartárico y 40 mg de polietilenglicol-aceite de ricino hidrogenado (HCO-60) en 5 ml de metanol. Esta solución se coloca en un mortero previamente calentado hasta 30°C. A la solución se añaden 100 mg de prolil endopeptidasa de *Myxococcus xanthus*. Inmediatamente después de la adición de PEP, la mezcla se agita con una mano de mortero bajo una corriente de aire caliente (40°C) y a continuación se coloca en un desecador al vacío durante la noche para eliminar el disolvente. La masa sólida resultante se pulveriza con una mano de mortero y se amasa con 30 mg de bicarbonato de sodio y una pequeña cantidad de etanol al 70%. A continuación, la mezcla se divide y se conforma en pastillas de aproximadamente 2 mm de tamaño y se secan intensamente. Las pastillas secas se proporcionan como un recubrimiento de ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HP-55) para obtener una formulación entérica.

Ejemplo 7

65 Actividad de endoproteasa

[0133] Se subclonó el gen para una endoproteasa (EPB2; PubMed número de acceso U19384, nt 94-1963) de cebada (*Hordeum vulgare* subespecie vulgare) en un vector pET28b (Invitrogen) utilizando los sitios de inserción BamH1 y EcoR1; el plásmido resultante se designó como pMTB1. Se expresó la forma proproteína de EPB2 de 43 kDa inactiva a partir de pMTB1 en el citoplasma de células E. Coli BL21. La proproteína se solubilizó a partir de cuerpos de inclusión utilizando urea 7M. La proteína solubilizada se purificó en una columna Ni-NTA. Se consiguió la autoactivación de proEPB2 en su forma activa madura mediante la adición de tampón de citrato-fosfato, pH 3 (preparado mediante la mezcla de citrato de sodio 0,1 M y fosfato de sodio 0,2 M). En dichas condiciones ácidas, la proEPB2 se convierte rápidamente en una forma madura con un peso molecular de 30 kDa (Figura 2). Antes de 72 horas, la EPB2 madura experimenta autólisis. La secuenciación N-terminal produjo una secuencia N-terminal empezando con VSDLP.

[0134] En condiciones ácidas, la forma madura de EPB2 digiere de manera eficaz la α 2-gliadina purificada, una fuente de péptidos que son inmunogénicos a personas que sufren celiaquía. El inhibidor de cisteína proteinasas, leupeptina, inhibe esta actividad, confirmando su mecanismo como cisteína proteasa. El pH óptimo de activación de proEPB2 y la digestión de α 2-gliadina es 2,4-3,5, que por tanto puede proporcionar un tratamiento para la celiaquía que consiste en la administración oral de proEPB2.

Ejemplo 8

Formulación y análisis de eficacia de PEP de *M. xanthus*

[0135] La liofilización de PEP de *M. xanthus* se realizó de la siguiente manera. Se purificó la PEP tal como se describe en el ejemplo 1 y se concentró hasta una concentración inicial de 7,7 mg/ml mediante filtración de flujo tangencial (TFF) utilizando una membrana de difiltración 10K MWCO Pellicon (Millipore, PLCGC10, 50 cm, Cat. No. PXC010C50) . Se realizó una TFF (utilizando una TFF de escala laboratorio de Millipore, Cat. No. 29751) durante aproximadamente 12 horas (presión de 50 psi (fracción retenida)/30 psi (fracción permeante)), con adición periódica al recipiente de fosfato de sodio 50 mM, sacarosa al 3% pH 7,5. A continuación, se añadió PEG- 4000 con una concentración objetivo de 1%. La concentración final de proteína fue de 70-100 mg/ml. Este material se centrifugó y a continuación de liofilizó. La liofilización se realizó en placas de petri cuadradas (Falcon Cat. No. 35-1112) en un liofilizador DuraStop utilizando los parámetros indicados en la tabla siguiente. Habitualmente, estaban presentes 0,7-0,85 mg de PEP por mg de material liofilizado. No se observó pérdida de actividad específica de la PEP tras la liofilización.

Etapa	Temperatura	Presión	Duración	Ritmo de la rampa
Congelación 1	-50°C	Atmosférica	2 horas	0,3°C/minuto
Hibridación	-35°C	Atmosférica	3 horas	0,3°C/minuto
Congelación 2	-50°C	Atmosférica	2 horas	0,3°C/minuto
1 ^{er} secado	-20°C	100 mTorr	16,9 horas	0,5°C/minuto
2 ^o secado	+25°C	100 mTorr	8,0 horas	0,2°C/minuto

*Temp. P. = Temperatura promedio del producto al final de la etapa. **1^o = Secado primario. ***2^o = Secado secundario

[0136] La mezcla de PEP de *M. xanthus* se realizó de la siguiente manera. Las tortas liofilizadas se pulverizaron hasta un polvo ligero. Todas las muestras se pesaron para su recuperación y almacenamiento en viales cónicos de 50 ml sellados a 4°C. Se preparó una mezcla tal como se muestra a continuación. Se seleccionaron los excipientes para proporcionar propiedades de flujo y disgregación adecuadas para la mezcla mezclada.

Orden de adición	Excipiente	Porcentaje
1	Torta/polvo de enzima liofilizada	63%
2	Silicato de calcio	12%
3	Talco	5%
4	Crospovidona	5%
5	Avicel	25%

[0137] La enzima liofilizada y los excipientes se mezclaron en un mezclador V durante varias horas. A continuación, el material se utilizó para producir cápsulas o comprimidos recubiertos entéricamente. Se pudieron cargar 100-150 mg de PEP de *M. xanthus* en una única cápsula de gelatina dura, tamaño 00 (Capsugel). Alternativamente, también se pueden utilizar cápsulas de vegetal Vcap (tamaño 00, Capsugel) sin impacto en la actividad de la enzima.

[0138] Para el recubrimiento entérico de las cápsulas, se preparó una solución de recubrimiento entérico tal como se muestra a continuación:

Orden de adición	Excipiente	Porcentaje
1	Agua RODI	49,5 ml
2	Talco	8,1 g

3	Eudragit L50 D-55	111,0 ml
4	Citrato de trietilo	1,62 ml

[0139] El recubrimiento entérico se mezcló vigorosamente en un vaso de precipitados sobre una placa de agitación. A continuación, se decantó la solución en una botella de pulverización. Se extendieron cápsulas de rata con cuidado sobre toallitas de papel en grupos de 20 y la solución de recubrimiento entérico se pulverizó sobre las cápsulas. Se utilizó aire caliente para secar parcialmente las cápsulas antes de moverlas a una toallita de papel seca donde se secaron al aire durante 30 minutos antes de aplicar la siguiente capa. Se aplicaron un total de 3 capas de recubrimiento a efectos de cubrir todos los lados de las cápsulas. Se secaron al aire varias horas antes de transferirse a un recipiente de almacenamiento. Aunque parte de la actividad de la PEP se pierde como resultado del recubrimiento entérico, se mantiene una fracción sustancial de la actividad y es estable durante por lo menos un mes almacenado a 4°C.

[0140] Un método alternativo para formular la enzima para la liberación intestinal es un comprimido con recubrimiento entérico. Los comprimidos presentan la ventaja de una disolución más rápida en el medio ligeramente ácido del intestino delgado superior. Otra ventaja de la formulación en comprimidos es que se puede compactar más enzima en un volumen más pequeño que para una cápsula. Su fiabilidad principal es que las proteínas se desnaturalizan frecuentemente a altas presiones. En un método de preparación de comprimidos de PEP de *M. xanthus*, se utilizó la misma mezcla liofilizada que antes. Se prepararon los comprimidos a una fuerza del golpe de 3000 psi mantenida durante 15 segundos. No se perdió actividad en el proceso, demostrando la viabilidad de las formulaciones en comprimidos de esta enzima.

[0141] Para analizar la eficacia de la formulación de cápsulas orales recubiertas entéricamente descritas anteriormente, se realizaron dos tipos de pruebas. Se realizaron pruebas de disolución *in vitro* en un Analizador de disoluciones Hanson SR8-Plus utilizando fluido gástrico simulado (SGF; 2 g/L NaCl, pH 1,2, ajustado utilizando HCl 6N) y fluido intestinal simulado (SIF; 6 g/L de fosfato de potasio monobásico con o sin pancreatina 10 g/L, pH 6,8, ajustado utilizando NaOH 5 N). Las cápsulas recubiertas entéricamente se analizaron por primera vez por la resistencia a la disolución en SGF durante hasta 2 horas a 37°C. No se observó liberación de proteína. Posteriormente, las cápsulas se sometieron a pruebas de disolución similares en SIF a 37°C. Se liberó una fracción sustancial del material encapsulado en 15 minutos. En 30 minutos el material se había liberado completamente.

[0142] Las pruebas *in vivo* de las cápsulas se realizaron en ratas utilizando cápsulas de gelatina dura más pequeñas (cápsulas de tamaño 9, Torpac). Se encapsularon aproximadamente 16 mg de la mezcla de formulación liofilizada en cada cápsula recubierta entéricamente, correspondiente a ≈ 7 mg de PEP. A las ratas puestas en ayunas durante la noche se les administró mediante una sonda oral una cápsula de PEP o placebo junto con una cantidad medida (300 mg de gluten/kg de peso corporal) de jarabe de gluten preparado de la siguiente manera. Se añadieron 300 g de harina de trigo con gluten disponible comercialmente (Bob's Red Mill, Milwaukie OR) a 10 L de una solución de HCl 0,01 M para conseguir un pH 2,0. Se añadió pepsina (6,0 g, American Laboratories). Después de la incubación a 37°C durante 1 hora, se ajustó el pH hasta 2,0 mediante la adición de 35 ml de HCl 1 M. Después de mantenerse durante 2 horas adicionales a 37°C, la solución se neutralizó mediante la adición de 35 g de Na₂HPO₄, y el pH se ajustó a 7,9 con NaOH 10 M (32,5 ml). A continuación, se añadió polvo de tripsina/quimiotripsina (3,75 g) (Enzyme Development Corp; 1000 USP/mg en tripsina, 1000 USP/mg en quimiotripsina), la reacción se mantuvo a 37°C durante 2 horas, pH 7,9 (reajuste del pH a 7,9 después de 1 hora, con NaOH 10 M) y se calentó a 100°C durante 15 minutos para desactivar las enzimas. La solución final de gluten se filtró a través de una estopilla para eliminar las partículas grandes residuales. Se sacrificaron un animal alimentado con cápsula con PEP y un animal alimentado con cápsula con placebo después de 45 minutos y 90 minutos cada uno, y el contenido del intestino delgado se analizó por el contenido de gluten a través de HPLC de fase inversa con C18. Los cromatogramas se normalizaron para el contenido total de proteína en cada muestra. Parte superior = 45 minutos, parte inferior = 90 minutos (verde = placebo, azul = cápsula con PEP).

[0143] Los péptidos derivados del gluten se eluyen en la región de 20-30 min. A los 45 minutos, así como a los 90 minutos, el gluten tratado con pepsina-tripsina-quimiotripsina se metabolizó mínimamente en los animales alimentados con placebo, mientras que parecía que se metabolizó de manera extensa. Juntos, estos resultados indican que las cápsulas de PEP con recubrimiento entérico pueden sobrevivir al medio gástrico del estómago y catalizar la proteólisis de los péptidos de la dieta en el intestino delgado.

[0144] La presente invención se ha descrito en términos de realizaciones particulares halladas o propuestas por el inventor para comprender los modos preferidos para la práctica de la invención. Se entenderá por los expertos en la materia que, a la luz de la presente descripción, se pueden realizar numerosas modificaciones y cambios en las realizaciones particulares ejemplificadas sin salir del alcance pretendido de la invención. Además, debido a consideraciones de equivalencia funcional biológica, los cambios pueden ser en métodos, estructuras y compuestos sin afectar a la acción biológica en el tipo o cantidad.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulaci3n para utilizar en el tratamiento de la celiaci3a que comprende una prolil endopeptidasa (PEP) y una glutamina endoproteasa, junto con un excipiente farmac3uticamente aceptable.
2. Formulaci3n para utilizar seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicha PEP es PEP de *flavobacterium meningosepticum*, PEP de *Myxococcus xanthus*, PEP de *Sphingomonas capsulata*, o *Penicillium citrinum*.
- 10 3. Formulaci3n para utilizar, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicha prolil endopeptidasa es PEP de *Sphingomonas capsulata*.
4. Formulaci3n para utilizar, seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha glutamina endoproteasa es ciste3na proteasa B de *Hordeum vulgare*.
- 15 5. Formulaci3n para utilizar, seg3n la reivindicaci3n 4, en la que dicha ciste3na proteasa B est3 en una forma proenzima que se activa en condiciones 3cidas.
6. Formulaci3n para utilizar, seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dicha formulaci3n es adecuada para la administraci3n oral.
- 20 7. Formulaci3n para utilizar, seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-6, en la que dicha formulaci3n est3 contenida en un recubrimiento ent3rico.
8. Formulaci3n para utilizar, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicha PEP se purifica mediante cromatograf3a de afinidad.
- 25 9. Formulaci3n para utilizar, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicha PEP est3 liofilizada.
10. Formulaci3n para utilizar, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicha PEP est3 formulada en una forma de dosificaci3n unitaria farmacol3gica.
- 30 11. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 9 y 10 para utilizar en un m3todo de tratamiento de intolerancia al gluten en un paciente.
- 35 12. Formulaci3n para utilizar, seg3n la reivindicaci3n 11, en la que dicha formulaci3n se mezcla con alimento.
13. Formulaci3n para utilizar, seg3n la reivindicaci3n 11 3 12, en la que dicha intolerancia al gluten est3 asociada con celiaci3a.
- 40 14. Formulaci3n para utilizar, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que la PEP y la glutamina endoproteasa son para la administraci3n en forma de dos dosis enzim3ticas, una dosis que contiene la PEP y la otra dosis que contiene la glutamina endoproteasa.

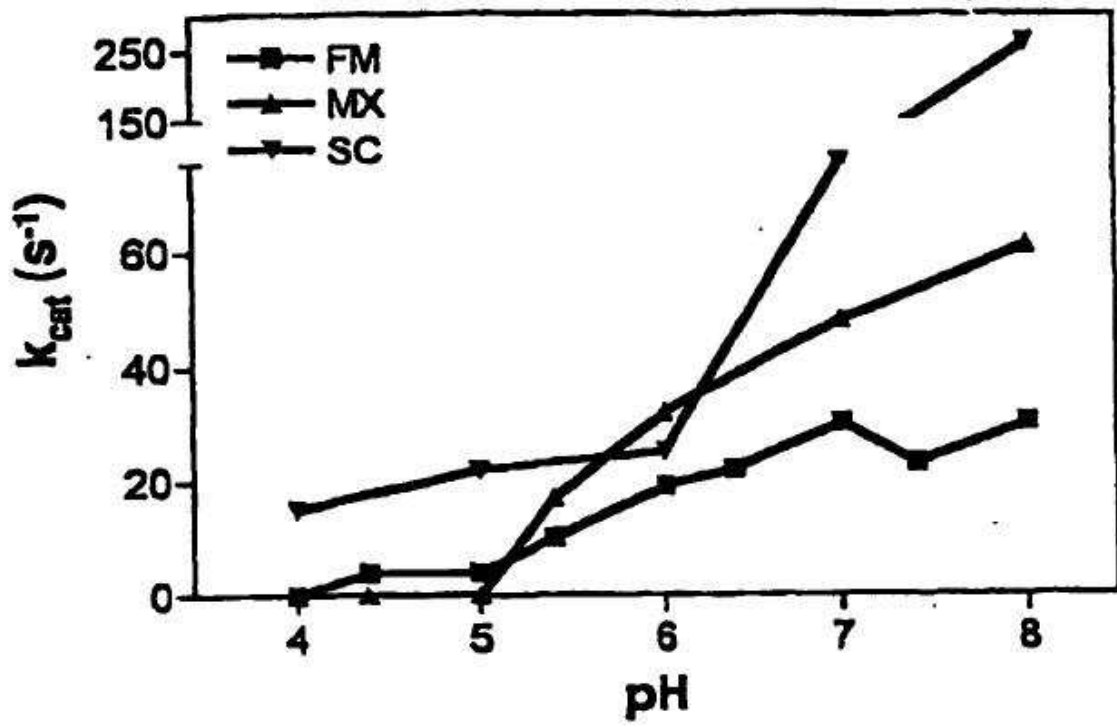


Figura 1

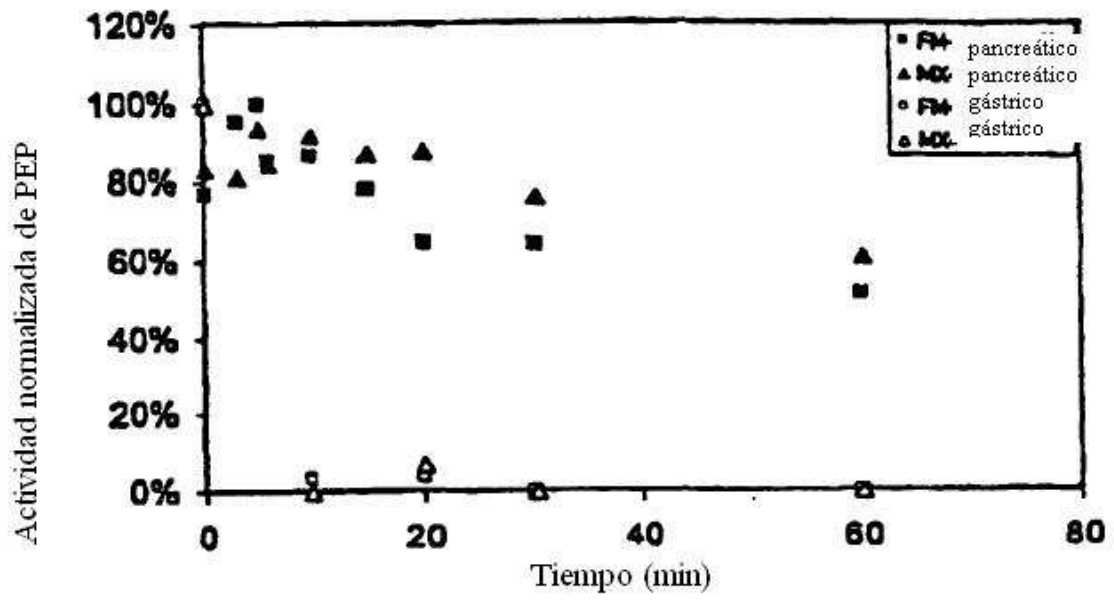


Figura 2

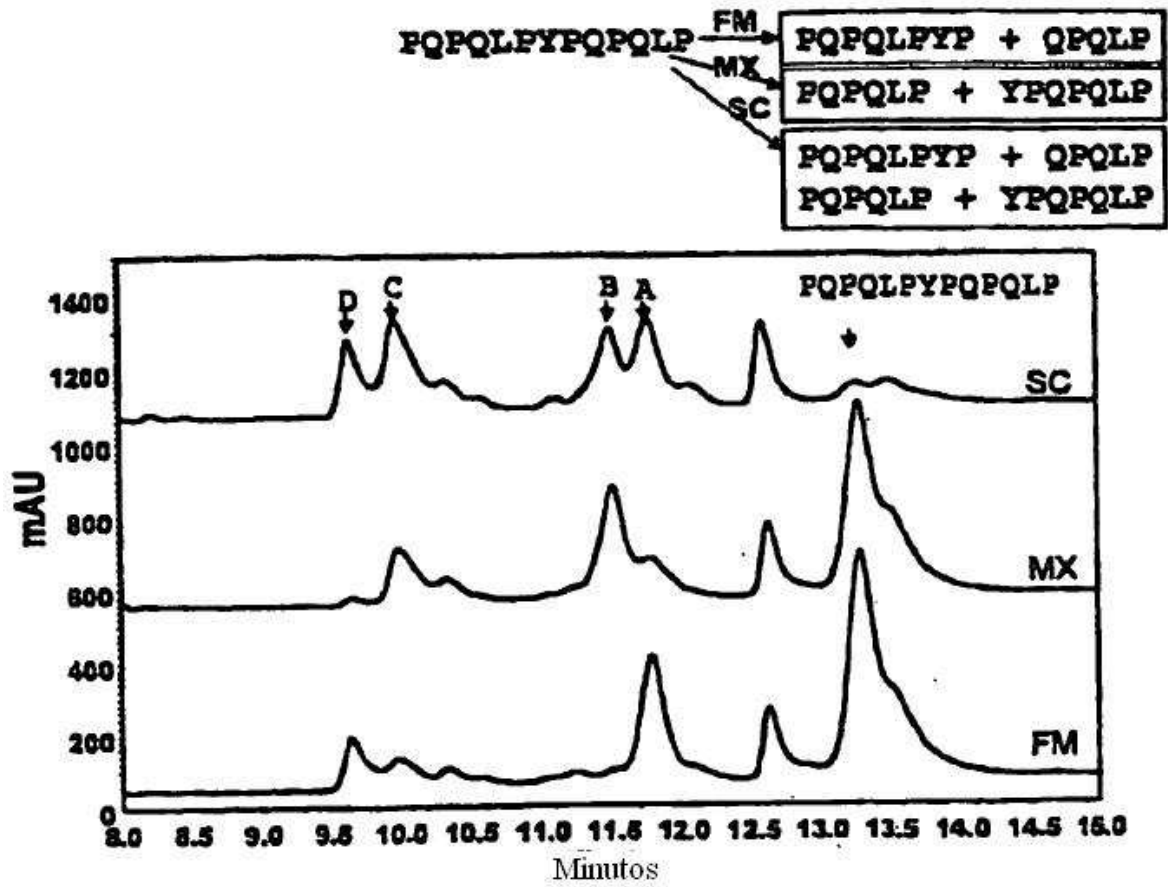


Figura 3

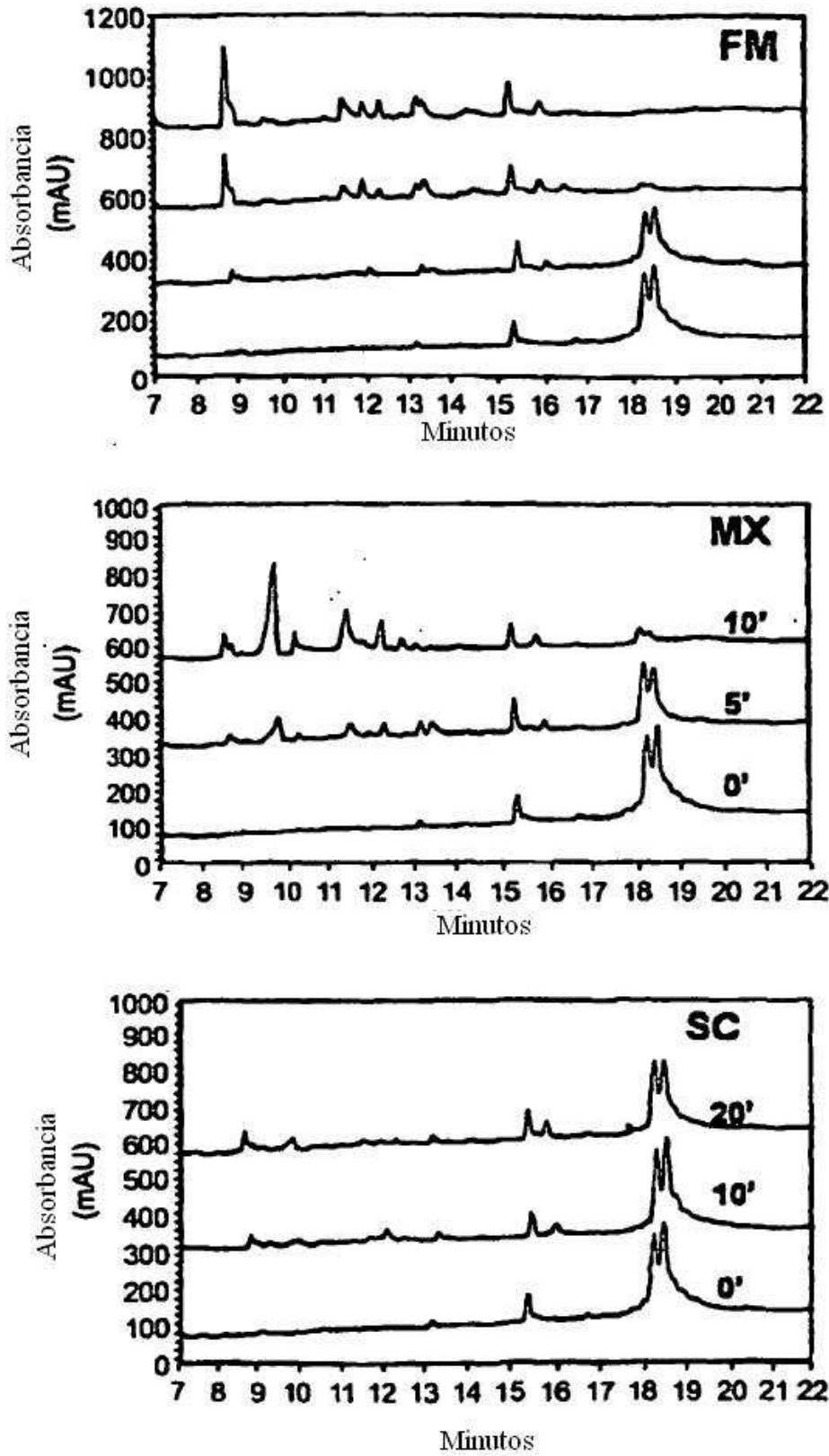


Figura 4A

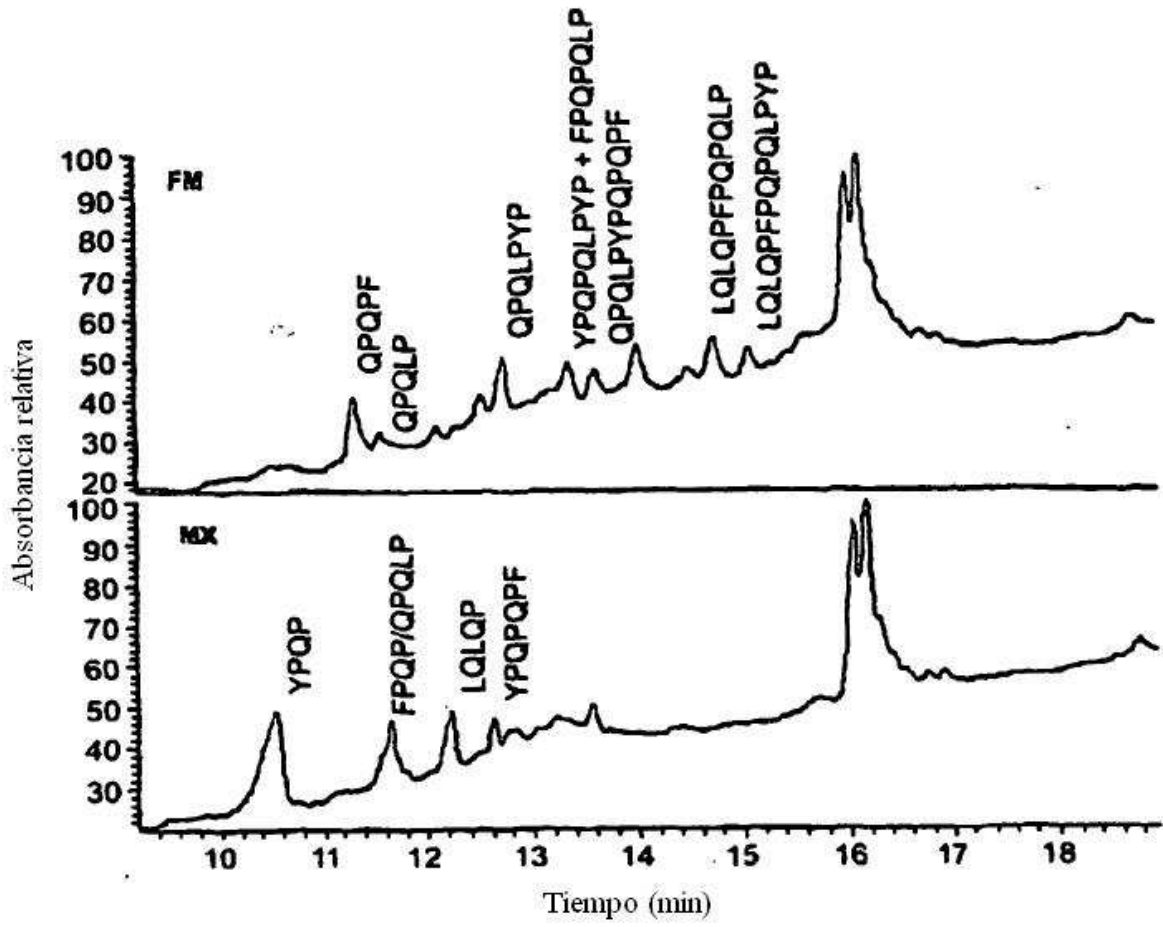


Figura 4B

LQLQPF	QPOLPY	QPOLPY	QPOLPY	QPOLPY	QPOLPY	MW (EM)
					QPOLPY	616.3
	QPOLP	QPOLP	QPOLP			582.2
		YPOLPY				1102.5
			YPOLPY			
				QPOLPY		842.4
				QPOLPY	QPOLPY	1439.7
LQLQPF						842.3
LQLQPF	QPOLP					1405.6
LQLQPF	QPOLPY					1665.7
LQLQPF	QPOLPY	QPOLP				2231.0

LQLQPF	QPOLPY	QPOLPY	QPOLPY	QPOLPY	QPOLPY	MW (MX)
					YPOLPY	876.4
					QPOLPY	616.3
	QPOLP	QPOLP	QPOLP			582.2
LQLQ						598.2
	FPOL					488.2
		YPOL	YPOL	YPOL		504.2

Figura 4C

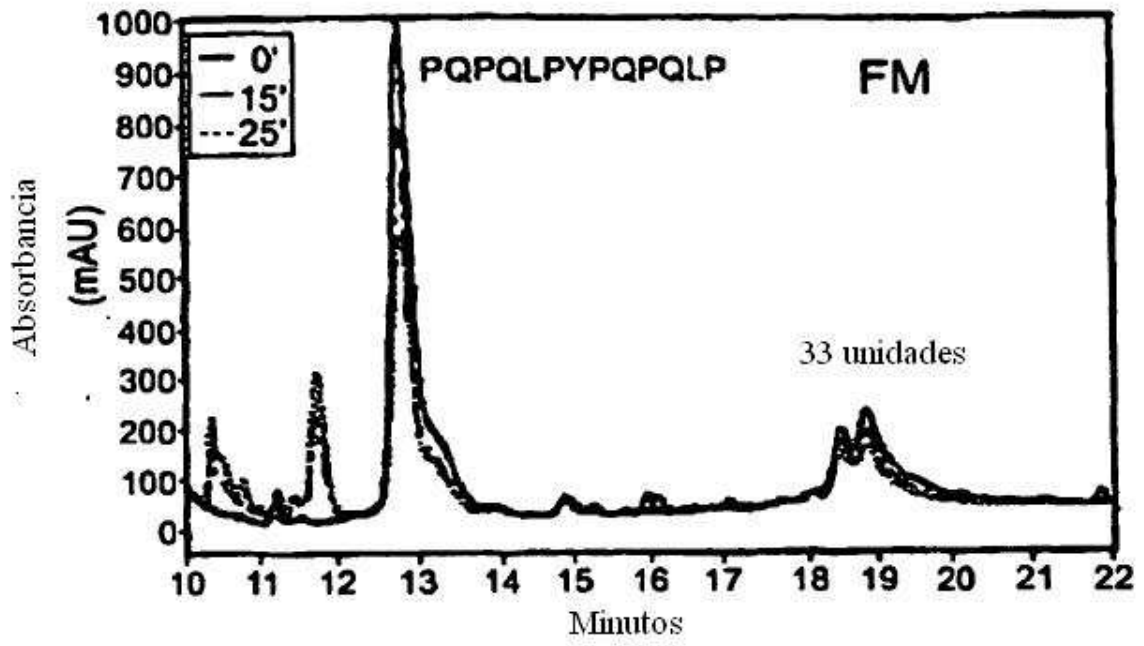


Figura 5A

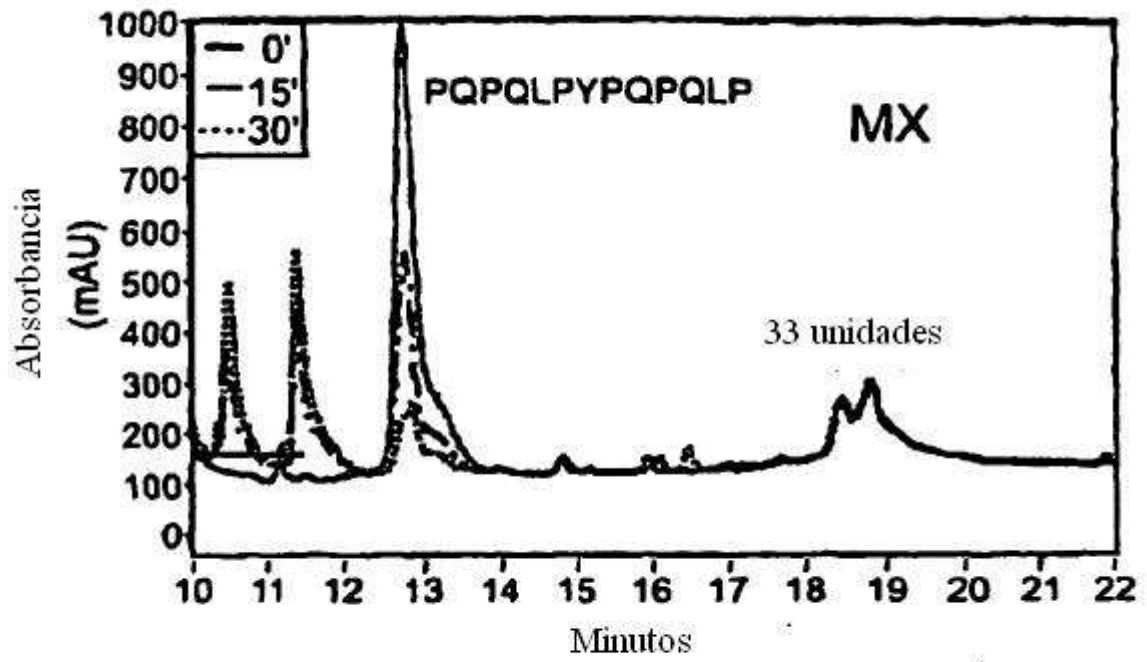


Figura 5B

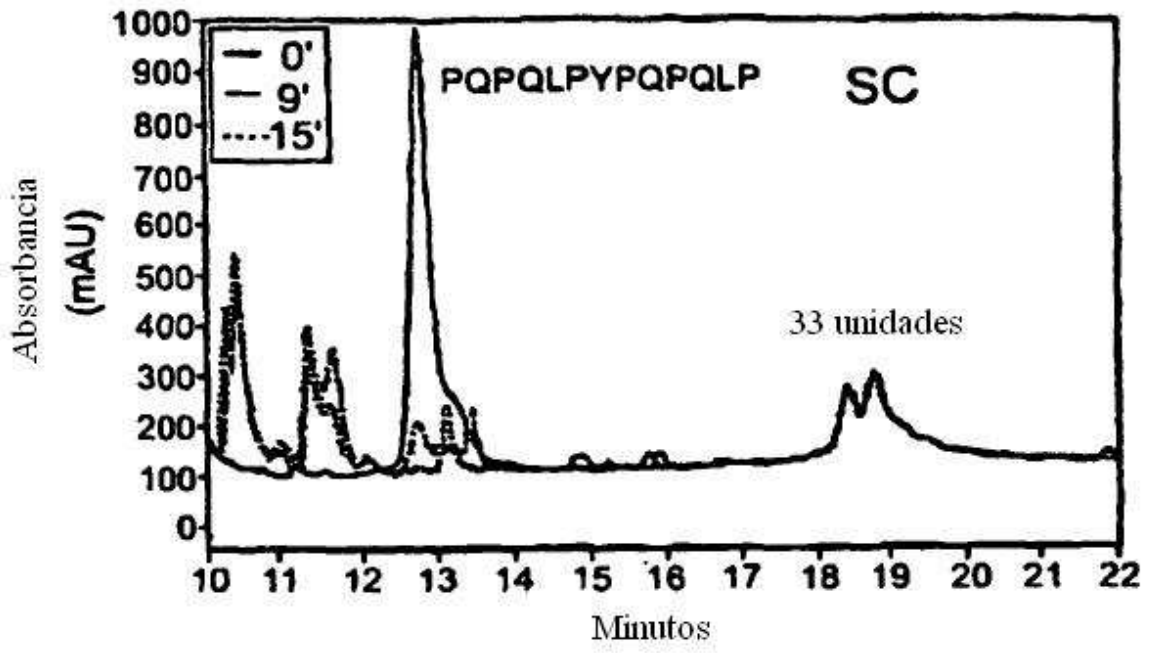
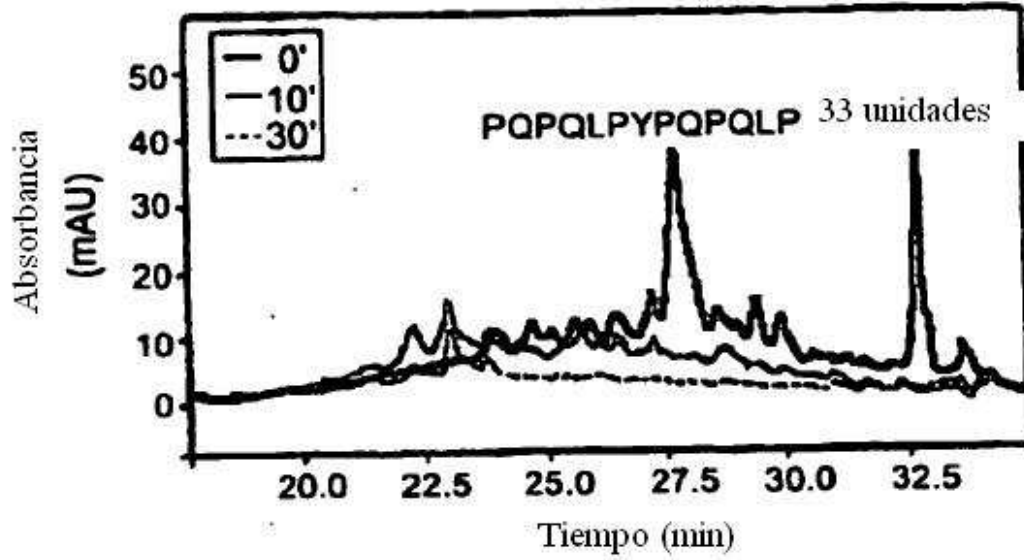


Figura 5C

A.



B.

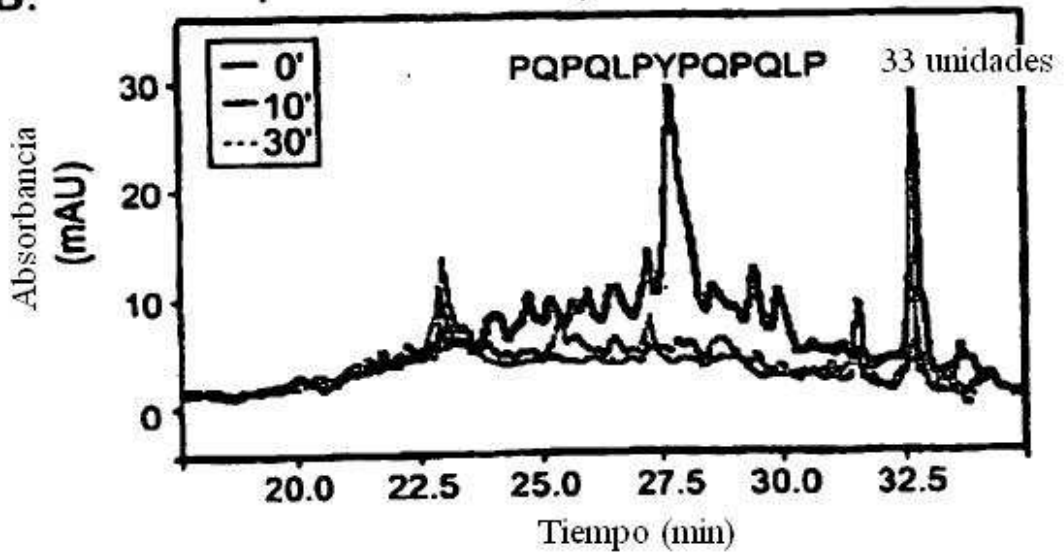


Figura 6

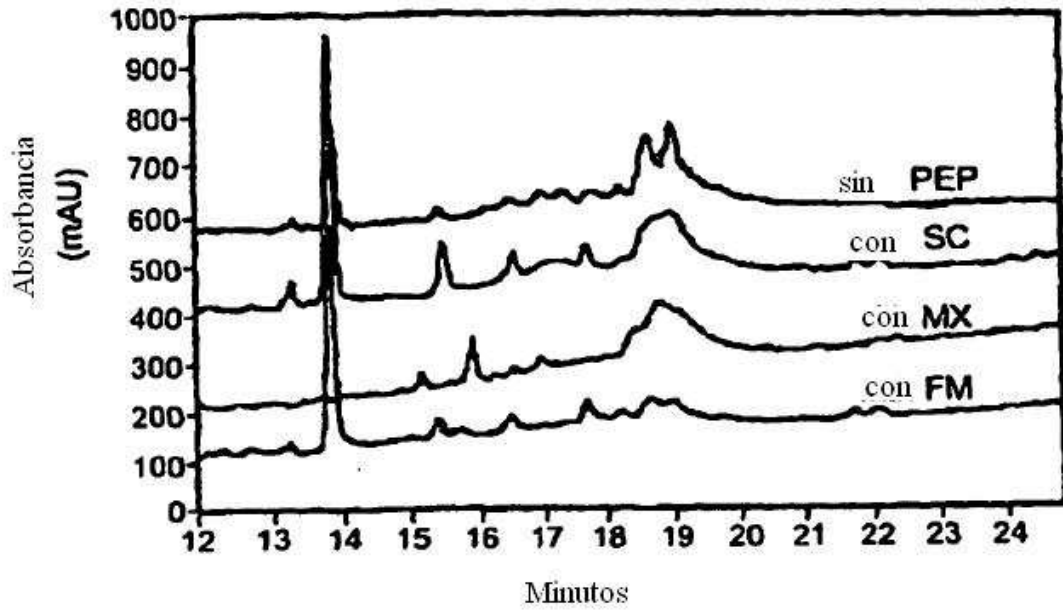


Figura 7