

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 911**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 1/14 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 16/16 (2006.01)

A23L 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2003 E 11177678 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2409711**

54 Título: **Tratamiento enzimático de alimentos para celíacos**

30 Prioridad:

14.02.2002 US 357238 P

14.05.2002 US 380761 P

28.06.2002 US 392782 P

31.10.2002 US 422933 P

20.11.2002 US 428033 P

20.12.2002 US 435881 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2019

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel Building 170, 3rd
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**HAUSCH, FELIX;
GRAY, GARY;
SHAN, LU y
KHOSLA, CHAITAN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 706 911 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento enzimático de alimentos para celíacos

5 **Antecedentes de la invención**

En 1953, se reconoció por primera vez que la ingestión de gluten, una proteína dietética común presente en el trigo, la cebada y el centeno, causa enfermedades en individuos sensibles. El gluten es una mezcla compleja de moléculas de glutenina y prolamina ricas en glutamina y prolina, que se cree que es responsable de la inducción de la enfermedad. La ingestión de tales proteínas por individuos sensibles produce un aplanamiento del revestimiento epitelial, normalmente lujoso, similar a una alfombra del intestino delgado, que se sabe es responsable de la digestión terminal eficiente y extensa de péptidos y otros nutrientes. Los síntomas clínicos de la celiaquía incluyen fatiga, diarrea crónica, malabsorción de nutrientes, pérdida de peso, distensión abdominal, anemia, así como un riesgo considerablemente mayor de desarrollar osteoporosis y tumores malignos intestinales (linfoma y carcinoma). La enfermedad tiene una incidencia de aproximadamente 1 en 200 en las poblaciones europeas.

Una enfermedad relacionada es la dermatitis herpetiforme, que es una erupción crónica caracterizada por agrupaciones de vesículas pruriginosas intensas, pápulas y lesiones similares a la 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 a 90 % de los pacientes y en algunos de sus familiares. El inicio suele ser gradual. La picazón y el ardor son severos, y el rascado a menudo oculta las lesiones primarias con la ecematización de la piel cercana, lo que lleva a un diagnóstico erróneo de eccema. La estricta adherencia a una dieta libre de gluten durante períodos prolongados puede controlar la enfermedad en algunos pacientes, evitando o reduciendo el requisito de la terapia con medicamentos. La dapsona, la sulfapiridina y las colchicinas a veces se recetan para aliviar la picazón.

La celiaquía se considera generalmente como una enfermedad autoinmune y los anticuerpos que se encuentran en el suero de los pacientes apoyan una teoría de la naturaleza inmunológica de la enfermedad. Anticuerpos contra la transglutaminasa tisular (tTG) y gliadina aparecen en casi el 100 % de los pacientes con celiaquía activa, y la presencia de tales anticuerpos, particularmente de la clase IgA, se ha utilizado en el diagnóstico de la enfermedad.

La gran mayoría de los pacientes expresan las moléculas HLA-DQ2 [DQ (a1 * 0501, b1 * 02)] y / o DQ8 [DQ (a1 * 0301, b1 * 0302)]. Se cree que el daño intestinal es causado por interacciones entre los oligopéptidos de gliadina específicos y el antígeno HLA-DQ2 o DQ8, que a su vez induce la proliferación de linfocitos T en las capas subepiteliales. Las células T colaboradoras 1 y las citocinas aparentemente desempeñan un papel importante en un proceso inflamatorio local que conduce a la atrofia de las vellosidades del intestino delgado.

En la actualidad, no existe una buena terapia para la enfermedad, excepto para evitar por completo todos los alimentos que contienen gluten. Si bien la abstinencia de gluten ha transformado el pronóstico para los niños y lo ha mejorado sustancialmente en los adultos, algunas personas todavía mueren a causa de la enfermedad, principalmente adultos que tenían una enfermedad grave al principio. Una causa importante de muerte es la enfermedad linforreticular (especialmente el linfoma intestinal). No se sabe si una dieta sin gluten disminuye este riesgo. La remisión clínica aparente a menudo se asocia con una recaída histológica que se detecta solo mediante biopsias de revisión o por un aumento de los títulos de EMA.

El gluten es tan ampliamente utilizado, por ejemplo en sopas comerciales, salsas, helados, perros calientes y otros alimentos, que los pacientes necesitan listas detalladas de alimentos para evitar un consejo experto de un dietista familiarizado con la celiaquía. Ingerir incluso pequeñas cantidades de gluten puede prevenir la remisión o inducir una recaída. Dependiendo de la deficiencia, también se pueden requerir vitaminas, minerales y hematínicos suplementarios. Unos pocos pacientes responden mal o no responden a la abstinencia de gluten, ya sea porque el diagnóstico es incorrecto o porque la enfermedad es refractaria. En este último caso, los corticosteroides orales (por ejemplo prednisona de 10 a 20 mg dos veces al día) pueden inducir la respuesta.

En vista de la naturaleza seria y extendida de La celiaquía, se necesitan métodos mejorados para tratar o mejorar los efectos de la enfermedad. La presente invención aborda tales necesidades.

Messer et al, Gut, Aug 1964, vol 5; 295-303, se refiere a estudios sobre el mecanismo de destrucción de la acción tóxica del gluten de trigo en la celiaquía por la papaína cruda.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una preparación que comprende una prolil endopeptidasa (PEP) que es capaz de atenuar la toxicidad del gluten, para su uso en un método para mejorar la digestión del gluten y reducir los efectos nocivos de un péptido largo del gluten, incluido el conjunto de oligopéptidos en la SEQ ID NO 12 en un sujeto que no se sabe que tenga celiaquía por la administración de dicha preparación a dicho sujeto.

La invención también proporciona un método *in vitro* para mejorar la digestión del gluten y reducir los efectos

nocivos de un péptido largo del gluten que incluye el oligopéptido establecido en la SEQ ID NO: 12 en un sujeto que no se sabe que tenga celiaquía, dicho método comprende poner dicho producto alimentario que contiene gluten en contacto con un protil endopeptidasa, en donde dicha protil endopeptidasa es enzimáticamente activa durante la ingestión por dicho sujeto, y en donde los péptidos de gluten inmunogénicos en el producto alimentario que contiene gluten se escinden en fragmentos no tóxicos.

La presente divulgación también establece ("proporciona" o similar) una serie de otros productos y métodos como se describe a continuación en el presente documento que pueden facilitar la comprensión de la presente invención, que se define en las reivindicaciones.

En el presente documento se describen métodos para tratar los síntomas de la celiaquía y / o la dermatitis herpetiforme al disminuir los niveles de oligopéptidos tóxicos del gluten en los productos alimenticios, antes o después de la ingestión por parte de un paciente. La presente invención se refiere al descubrimiento de que ciertos oligopéptidos de gluten resistentes a la escisión por enzimas gástricas y pancreáticas, que la presencia de tales péptidos produce efectos tóxicos, y que el tratamiento enzimático puede eliminar dichos péptidos y sus efectos tóxicos. Mediante la digestión con glutenasas, estos oligopéptidos tóxicos se dividen en fragmentos, lo que evita o alivia sus efectos tóxicos en pacientes con celiaquía o dermatitis herpetiforme. En un aspecto de la invención, un producto alimentario se trata con una glutenasa antes de ser consumida por el paciente. En otro aspecto de la invención, se administra una glutenasa a un paciente y actúa internamente para destruir los oligopéptidos tóxicos. En otro aspecto de la invención, un organismo recombinante que produce una glutenasa se administra a un paciente. En otro aspecto de la invención, la terapia génica se usa para proporcionar al paciente un gen que expresa una glutenasa que destruye los oligopéptidos tóxicos.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para la administración de formulaciones entéricas de una o más glutenasas, cada una de las cuales puede estar presente como un agente único o una combinación de agentes activos. En otro aspecto de la presente descripción, se administran al paciente formas estabilizadas de glutenasas, cuyas formas estabilizadas son resistentes a la digestión en el estómago. por ejemplo A condiciones ácidas. Los métodos alternativos de administración incluyen la modificación genética de las células del paciente, por ejemplo enterocitos, para expresar niveles elevados de peptidasas capaces de escindir oligopéptidos inmunogénicos de gliadina; pretratamiento de alimentos con glutenasas; la introducción de microorganismos que expresan tales peptidasas para colonizar transitoria o permanentemente el tracto intestinal del paciente; y similares.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas que contienen una o más glutenasas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas formulaciones incluyen formulaciones en las que la glutenasa está contenida dentro de un recubrimiento entérico que permite el suministro del agente activo al intestino y formulaciones en las que los agentes activos se estabilizan para resistir la digestión en condiciones estomacales ácidas. La formulación puede comprender una o más glutenasas o una mezcla o "cóctel" de agentes que tienen diferentes actividades.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona alimentos derivados de alimentos que contienen gluten que se han tratado para eliminar o reducir a niveles no tóxicos los oligopéptidos derivados del gluten que son tóxicos para los pacientes con celiaquía, y métodos para tratar alimentos para hidrolizarlos. oligopéptidos de gluten. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona microorganismos recombinantes útiles para hidrolizar los oligopéptidos derivados del gluten que son tóxicos para los pacientes con celiaquía de los productos alimenticios; métodos para producir glutenasas que digieren los oligopéptidos derivados del gluten que son tóxicos para las patentes de celiaquía; preparaciones purificadas de las glutenasas que digieren los oligopéptidos derivados del gluten que son tóxicos para las patentes de celiaquía; y vectores recombinantes que codifican la expresión de glutenasas que digieren los oligopéptidos derivados del gluten que son tóxicos para las patentes de celiaquía.

Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se describen con más detalle a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1B. La membrana del borde en cepillo catalizó la digestión del péptido gliadina inmunodominante. Figura 1A: trazas de péptidos LC-MS como se muestra, después de la digestión con 27 ng / μ l de proteína de membrana de borde en cepillo de rata (BBM) durante el tiempo indicado. Los productos de reacción se separaron mediante HPLC de fase inversa y se detectaron mediante espectroscopia de masas (recuentos de iones $m/z = 300-2000$ g / mol). Los fragmentos de péptidos indicados se confirmaron mediante patrones de fragmentación de MS en tándem característicos. El pico de SEQ ID NO: 2 piroLQPFPPQPQLPY corresponde a una especie piroglutaminada en el extremo N, que se genera durante la purificación por HPLC del material de partida sintético. Fig. 1B: Abundancia de productos de digestión individuales en función del tiempo. Los fragmentos peptídicos en la Figura 1A se cuantificaron integrando el área del pico de MS correspondiente ($m/z = 300-2000$ g / mol). Las intensidades de MS resultantes se representan gráficamente en función del tiempo de digestión (solo con BBM). El experimento de digestión se repitió en presencia de DPP IV exógena de *Aspergillus fumigatus* (Chemicon International, CA, 0,28 μ U de DPP IV / ng de proteína BBM) y se analiza como se muestra arriba (barras abiertas). La abundancia relativa de diferentes productos intermedios podría estimarse a partir trazas de UV₂₈₀ y experimentos de control utilizando

patrones auténticos. El esquema insertado muestra un diagrama interpretativo de las vías de digestión de SEQ ID NO: 1) QLQPFQQLPY y sus intermedios, las peptidasas BBM involucradas en cada paso y los residuos de aminoácidos que se liberan. La ruta de desglose preferida se indica en negrita. APN = aminopeptidasa N, CPP = carboxipeptidasa P, DPP IV = dipeptidil dipeptidasa IV.

5
 10
 15
 20

Figura 2A-2B. Digestión C-terminal del péptido gliadina inmunodominante por membrana de borde en cepillo. Figura 2A: (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY se digirió con 27 ng / μ l de preparaciones de proteínas de membrana de borde en cepillo (BBM) durante el tiempo indicado y se analizó como en la Figura 1A. La identidad del material de partida y el producto (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP se corroboró mediante la fragmentación de MSMS. Las intensidades de masa intrínseca de los dos péptidos fueron idénticas, y la radiación UV₂₈₀ El coeficiente de extinción de (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP era la mitad del material de partida de acuerdo con la pérdida de una tirosina. Todos los demás intermedios fueron ≤ 1 %. El siguiente esquema muestra la vía de digestión BBM propuesta (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY sin procesamiento N-terminal observado (flecha cruzada) y la eliminación de la tirosina C-terminal por la carboxipeptidasa P (CPP) en negrita. El procesamiento C-terminal adicional por dipeptidilcarboxipeptidasa (DCP) fue demasiado lento para permitir el análisis de las etapas de digestión subsiguientes (flechas punteadas). Fig. 2B: Influencia de dipeptidilcarboxipeptidasa en la digestión C-terminal. (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY en solución salina tamponada con fosfato: La solución salina tamponada con Tris = 9: 1 se digirió con BBM solo o con la adición de DCP de pulmón de conejo exógeno (Cortex Biochemicals, CA) o captopril. Después de la incubación durante la noche, la fracción de SEQ ID NO: 4 acumulada PQPQLPYPQPQLP (en comparación con las cantidades iniciales de (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY en t = 0 min) se analizó como en la Figura 2A, pero con un gradiente de acetonitrilo de 20 -65 % en 6-35 minutos.

25
 30

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

Figura 4. Productos de la digestión mediada por proteasa gástrica y pancreática de α 2-gliadina en condiciones fisiológicas. El análisis se realizó por LC-MS. Los péptidos más largos se resaltan con flechas y también en la secuencia de α 2-gliadina (recuadro).

35

Figura 5. Digestión de péptidos en la membrana del borde en cepillo *in vivo*. Trazas de LC-UV₂₁₅ de 25 μ M de (SEQ ID NO: 12) LQLQPFQQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQLP antes de la perfusión y después de la perfusión (tiempo de residencia = 20 min). Trazas de LC-UV₂₁₅ de 50 μ M de SEQ ID NO: 1 QLQPFQQLPY antes de la perfusión y después de la perfusión (tiempo de residencia = 20 min).

40

Figura 6. Alineación de péptidos de gluten y no gluten representativos homólogos de (SEQ ID NO: 12) LQLQPFQQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQLP.

45

Figura 7. Degradación y desintoxicación del péptido gliadina de 33 unidades con PEP. Incubación *in vitro* de PEP (540 mU / ml) con el péptido gliadina de 33 unidades (100 μ M) durante el tiempo indicado. La digestión *in vivo* del péptido gliadina de 33 unidades (25 μ M) con PEP (25 mU / ml) y el intestino de rata (tiempo de residencia = 20 min).

Descripción detallada de las realizaciones

50

La celiacía y / o la dermatitis herpetiforme se tratan mediante la digestión de oligopéptidos de gluten contenidos en los productos alimenticios consumidos por personas que padecen una o ambas afecciones. Los oligopéptidos de gluten son altamente resistentes a la escisión por peptidasas gástricas y pancreáticas tales como pepsina, tripsina, quimotripsina y similares. Al proporcionar la digestión de oligopéptidos de gluten con glutenasa, los oligopéptidos se dividen en fragmentos, evitando así la toxicidad causante de la enfermedad.

55
 60
 65

Se proporcionan métodos y composiciones para la administración de uno o más inhibidores de glutenasas a un paciente que sufre de celiacía y / o dermatitis herpetiforme. En algunos pacientes, estos métodos y composiciones permitirán que el paciente ingiera glúteos sin consecuencias graves para la salud, al igual que las personas que no padecen ninguna de estas afecciones. En algunas realizaciones, las formulaciones de la presente divulgación comprenden una glutenasa contenida en un recubrimiento entérico que permite el suministro del (de los) agente (s) activo (s) al intestino; en otras realizaciones, el (los) agente (s) activo (s) se estabiliza para resistir la digestión en condiciones estomacales ácidas. En algunos casos, el (los) agente (s) activo (s) tienen actividad hidrolítica en condiciones de pH ácido y, por lo tanto, pueden iniciar el proceso proteolítico en secuencias de gluten tóxicas en el estómago. Los métodos alternativos de administración proporcionados por la presente divulgación incluyen la modificación genética de las células del paciente, por ejemplo enterocitos, para expresar niveles elevados de glutenasas; y la introducción de microorganismos que expresan tales glutenasas para colonizar transitoria o permanentemente el tracto intestinal del paciente. Dichas células del paciente modificadas (que incluyen células que

no se derivan del paciente pero que no se rechazan inmunológicamente cuando se administran al paciente) y los microorganismos de la presente divulgación se formulan, en algunas realizaciones, en un excipiente farmacéuticamente aceptable o se introducen en alimentos. . En otra realización, la presente divulgación proporciona alimentos pretratados o combinados con una glutenasa y métodos para tratar alimentos para eliminar los oligopéptidos tóxicos del gluten.

Los métodos de la invención se pueden usar para fines profilácticos y terapéuticos. Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere tanto a la prevención de la enfermedad como al tratamiento de una enfermedad o una condición preexistente. La invención proporciona un avance significativo en el tratamiento de la enfermedad en curso, para estabilizar o mejorar los síntomas clínicos del paciente. Dicho tratamiento se realiza de manera deseable antes de la pérdida de la función en los tejidos afectados, pero también puede ayudar a restaurar la función perdida o prevenir una pérdida adicional de la función. La evidencia del efecto terapéutico puede ser cualquier disminución en la severidad de la enfermedad, particularmente si se mide por la severidad de los síntomas como fatiga, diarrea crónica, malabsorción de nutrientes, pérdida de peso, distensión abdominal, anemia y otros síntomas de celiaquía. Otros indicios de enfermedad incluyen la presencia de anticuerpos específicos para los glúteos, la presencia de anticuerpos específicos para la transglutaminasa tisular, la presencia de células T proinflamatorias y citoquinas, daño a la estructura de las vellosidades del intestino delgado como lo demuestra el examen histológico u otro, mejorado permeabilidad intestinal, y similares.

Los pacientes que pueden beneficiarse de la presente invención pueden 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 prevenir el desarrollo inicial de la enfermedad. Los niños adecuados para la profilaxis pueden identificarse mediante pruebas genéticas de predisposición, por ejemplo escribiendo HLA; por historia familiar, por ensayo de células T, o por otros medios médicos. Como se conoce en la técnica, las dosis se pueden ajustar para su uso pediátrico.

Aunque la presente divulgación no está limitada por ninguna teoría de acción, se cree que el evento primario en La celiaquía requiere que ciertos oligopéptidos de gluten accedan a los sitios de unión al antígeno dentro de la región interior de la lámina propia a la capa epitelial intestinal de superficie relativamente impermeable. Por lo general, los productos finales oligopeptídicos del procesamiento de la proteasa pancreática se hidrolizan rápida y eficientemente en aminoácidos y / o dipéptidos o tripéptidos mediante peptidasas gástricas antes de ser transportados a través de la capa epitelial. Sin embargo, los glúteos son particularmente resistentes a la peptidasa, que pueden atribuirse al contenido generalmente alto de prolina de estas proteínas, un residuo que es inaccesible para la mayoría de las peptidasas gástricas.

La asimilación normal de las proteínas de la dieta por el intestino humano se puede dividir en tres fases principales: (i) iniciación de la proteólisis en el estómago por pepsina y escisión endo y C-terminal altamente eficiente en la cavidad superior del intestino delgado (duodeno) por secreción proteasas pancreáticas y carboxipeptidasas; (ii) procesamiento adicional de los fragmentos de oligopéptidos resultantes por exo y endopeptidasas ancladas en la membrana de la superficie del borde en cepillo del epitelio del intestino delgado superior (yeyuno); y (iii) facilitar el transporte de los aminoácidos, di y tripéptidos resultantes a través de las células epiteliales a la lámina propia, desde donde estos nutrientes entran en los capilares para su distribución en todo el cuerpo. Debido a que la mayoría de las proteasas y peptidasas normalmente presentes en el estómago humano y el intestino delgado no pueden hidrolizar los enlaces amida de los residuos de prolina, se muestra en el presente documento que la abundancia de residuos de prolina en las gliadinas y proteínas relacionadas del trigo, centeno y cebada puede constituir un obstáculo digestivo para las enzimas involucradas en las fases (i) y (ii) anteriores. Esto conduce a un aumento de la concentración de oligopéptidos derivados del gluten relativamente estables en el intestino. Además, debido a que la actividad de aminopeptidasa y especialmente carboxipeptidasa hacia oligopéptidos con residuos de prolina en los extremos N y C, respectivamente, es baja en el intestino delgado, la detoxificación de oligopéptidos de gluten en la fase (iii) anterior también es lenta. Al administrar peptidasas capaces de escindir dichos oligopéptidos de gluten de acuerdo con los métodos de la presente divulgación, la cantidad de péptidos tóxicos disminuye, lo que ralentiza o bloquea la progresión de la enfermedad.

La transglutaminasa tisular (tTGasa), una enzima que se encuentra en la superficie extracelular en muchos órganos, incluido el intestino, cataliza la formación de enlaces isopeptídicos entre los residuos de glutamina y lisina de diferentes polipéptidos, lo que conduce a enlaces cruzados proteína-proteína en la matriz extracelular. La enzima tTGasa es el foco principal de la respuesta de autoanticuerpos en la celiaquía. Las gliadinas, secalinas y hordeínas contienen varias secuencias ricas en residuos de Pro-Gln que son sustratos de alta afinidad para tTGasa; la desamidación catalizada por tTGasa de al menos algunas de estas secuencias aumenta dramáticamente su afinidad por HLA-DQ2, el alelo MHC de clase II presente en > 90 % de pacientes con celiaquía. La presentación de estos epítopos desamidados por células presentadoras de antígeno DQ2 positivo estimula efectivamente la proliferación de células T específicas de gliadina a partir de biopsias intestinales de la mayoría de los pacientes con celiaquía. Los efectos tóxicos del gluten incluyen la inmunogenicidad de los oligopéptidos del gluten, que conducen a la inflamación; la teoría de la lectina predice que los péptidos gliadina también pueden unirse directamente a los receptores de superficie.

La presente divulgación se refiere en general a métodos y reactivos útiles en el tratamiento de productos alimenticios que contienen gluten con enzimas que digieren los oligopéptidos tóxicos para los pacientes con celiaquía. Aunque se ilustran enzimas específicas en el presente documento, cualquiera de una serie de enzimas alternativas y métodos evidentes para los expertos en la técnica al contemplar esta descripción son igualmente aplicables y adecuados para su uso. Los métodos de la divulgación, así como las pruebas para determinar su eficacia en un paciente o aplicación en particular, pueden llevarse a cabo de acuerdo con las enseñanzas del presente documento utilizando procedimientos estándar en la técnica. Por lo tanto, la práctica puede emplear técnicas convencionales de biología molecular (incluidas las técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología dentro del alcance de los expertos en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, tales como, "Clonación molecular: un manual de laboratorio", segunda edición (Sambrook et al., 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 et al., eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis et al., eds., 1994); and "Current Protocols in Immunology" (J.E. Coligan et al., eds., 1991); así como ediciones actualizadas o revisadas de todo lo anterior.

Como se usa en el presente documento, el término "glutenasa" se refiere a una enzima útil en los métodos de la presente divulgación que es capaz, sola o en combinación con enzimas endógenas o añadidas exógenamente, de escindir oligopéptidos tóxicos de proteínas de gluten de trigo, cebada, avena y Centeno en fragmentos no tóxicos. El gluten es la fracción proteica en la masa de cereal, que se puede subdividir en gluteninas y prolaminas, que se subclasifican como gliadinas, secalinas, hordeínas y aveninas de trigo, centeno, cebada y avena, respectivamente. Para mayor información sobre las proteínas del gluten, vea la revisión de Wieser (1996) Acta Paediatr Suppl. 412: 3-9.

En una realización, el término "glutenasa", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteasa o una enzima peptidasa que cumple uno o más de los criterios proporcionados en el presente documento. Usando estos criterios, un experto en la técnica puede determinar la idoneidad de una enzima candidata para su uso en los métodos de la divulgación. Muchas enzimas cumplirán con múltiples criterios, incluidos dos, tres, cuatro o más de los criterios, y algunas enzimas cumplirán todos los criterios. Los términos "proteasa" o "peptidasa" pueden referirse a una glutenasa y, como se usa en el presente documento, describen una proteína o fragmento de la misma con la capacidad de dividir enlaces peptídicos, donde el enlace peptídico escindible puede ser terminal o interno en oligopéptidos o proteínas más grandes. Las peptidasas específicas de proilil son glutenasas útiles en la práctica de la presente divulgación.

Las glutenasas de la divulgación incluyen enzimas proteasas y peptidasas que tienen al menos aproximadamente 20 % de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos, más usualmente al menos aproximadamente 40 % de identidad de secuencia, y preferentemente al menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con una de las siguientes peptidasas: proilil endopeptidasa (PEP) de *F. meningosepticum* (número de acceso en Genbank D10980), PEP de *A. hydrophila* (número de acceso en Genbank D14005), forma PEP de *S. capsulata* (número de acceso en Genbank AB010298), DCP I de conejo (número de acceso en Genbank X62551), DPP IV de *Aspergillus fumigatus* (número de acceso en Genbank U87950) o cisteína proteinasa B de *Hordeum vulgare* (número de acceso en Genbank JQ1110).

En la presente invención, la glutenasa es una PEP. La identificación basada en homología (por ejemplo mediante un análisis de secuencia de PILEUP) de proilil endopeptidasas puede ser realizada rutinariamente por los expertos en la técnica al contemplar esta descripción para identificar PEP adecuadas para su uso en los métodos de la presente invención. Las PEP se producen en microorganismos, plantas y animales. Las PEP pertenecen a la superfamilia de enzimas de la serina proteasa y tienen una tríada catalítica conservada compuesta de residuos de Ser, His y Asp. Algunos de estos homólogos han sido caracterizados, v.g. las enzimas de *F. Meningosepticum*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas punctata*, *Novosphingobium capsulatum*, *Pyrococcus furiosus* y de fuentes de mamíferos son PEP caracterizadas bioquímicamente. Otras, tales como las enzimas *Nostoc* y *Arabidopsis*, es probable que sean PEP, pero no se han caracterizado completamente hasta la fecha. Sin embargo, otros, como las enzimas de *E. coli* y *M. xanthus* pueden no ser PEP, pero son miembros homólogos de la superfamilia de la serina proteasa, y pueden ser materiales de partida útiles en la ingeniería de proteínas para hacer que una PEP sea útil en la práctica de la presente invención. Relativo a la enzima de *F. meningosepticum*, la identidad de secuencia en pares de esta familia de enzimas se encuentra en el intervalo de 30-60 %. En consecuencia, las PEP incluyen enzimas que tienen > 30 % de identidad con la enzima de *F. meningosepticum* (como en las enzimas de *Pirococ*), o que tienen > 40 % de identidad (como las enzimas de *Novosphingobiu*), o que tienen > 50 % de identidad (como las enzimas de *Aeromona*) a la enzima de *F. meningosepticum*.

Una glutenasa de la invención incluye una peptidasa o proteasa que tiene una actividad específica de al menos 2,5 U / mg, preferentemente 25 U / mg y más preferentemente 250 U / mg para la escisión de un péptido que comprende uno o más de los siguientes motivos: Gly-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA (donde Z es un grupo benciloxicarbonilo), y Hip-His-Leu, donde "Cadera" es ácido hipúrico, pNA es para-nitroanilida y 1 U es la cantidad de enzima requerido para catalizar la rotación de 1 μmol de sustrato por minuto.

- en alcohol del gluten de trigo. Las gliadinas son típicamente ricas en glutamina y prolina, particularmente en la parte N-terminal. por ejemplo los primeros 100 aminoácidos de las gliadinas α y γ contienen un 35 % y un 20 % de los residuos de glutamina y prolina, respectivamente. Muchas gliadinas de trigo se han caracterizado, 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 contrapartes naturales al tener proteínas de gliadina que contienen un contenido reducido de residuos de glutamina y prolina.
- Los ejemplos de secuencias de gliadina incluyen, pero no se limitan a, secuencias de alfa gliadina de trigo, por ejemplo 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. Una secuencia de omega gliadina de trigo se establece en el número de acceso en Genbank AF280605.
- Para los fines de la presente descripción, los oligopéptidos de gliadina tóxicos son péptidos derivados durante la digestión humana normal de gliadinas y proteínas de almacenamiento relacionadas como se ha descrito anteriormente, de cereales dietéticos, por ejemplo Trigo, centeno, cebada y similares. Se cree que dichos oligopéptidos actúan como antígenos para las células T en celiacía. Para la unión a proteínas MHC de clase II, los péptidos inmunogénicos suelen tener una longitud de aproximadamente 8 a 20 aminoácidos, más generalmente 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 técnica.
- Como se demuestra en el presente documento, durante la digestión, los oligopéptidos resistentes a la peptidasa permanecen después de la exposición de los glúteos, por ejemplo Gliadina, a las enzimas digestivas normales. Se proporcionan ejemplos de oligopéptidos resistentes a la peptidasa, por ejemplo como se indica en la SEQ ID N.º: 5, 6, 7 y 10. Otros ejemplos de oligopéptidos de gliadina inmunogénicos se describen en Wieser (1995) Baillieres Clin Gastroenterol 9 (2): 191-207.
- La determinación de si una enzima candidata digiere un oligopéptido de gluten tóxico, como se discutió anteriormente, se puede determinar empíricamente. por ejemplo un candidato puede combinarse con un oligopéptido que comprende uno o más Gly-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA, Hip-His-Leu, Abz-QLP-Tyr (NO₂) -PQ, Abz-PYPQPQ-Tyr (NO₂), PQP-Lys (Abz) -LP-Tyr (NO₂) -PQPQLP, PQPQLP-Tyr (NO₂) -PQP-Lys (Abz) -LP motivos; con uno o más de los oligopéptidos (SEQ ID NO: 1) QLQPFPPQPQLPY, (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY, (SEQ ID NO: 13) QPQQSFPQQ, (SEQ ID NO: 14) QLQPFPPQPELPY, (SEQ ID NO: 15) PQPELPYPQPELPY, (SEQ ID NO: 16) QPQQSFPEQQ o (SEQ ID NO: 12) LQLQPFPPQPQLPYQPQLPYPQPQLPYQPQPFF; o con un sustrato pretratado que comprende una o más de las proteínas gliadina, hordeína, secalina o avenina que se han tratado con cantidades fisiológicas de proteasas gástricas y pancreáticas. En cada caso, se determina que el candidato es una glutenasa de la divulgación si es capaz de romper el oligopéptido. Las glutenasas que tienen una baja toxicidad para las células humanas y son activas en las condiciones fisiológicas presentes en el borde en cepillo intestinal son las preferidas para su uso en algunas aplicaciones de la divulgación, y por lo tanto, puede ser útil detectar dichas propiedades en las glutenasas candidatas.
- Los sustratos de oligopéptidos o proteínas para tales ensayos pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales, tales como síntesis, técnicas recombinantes, aislamiento de fuentes naturales, o similares. por ejemplo la síntesis de péptidos en fase sólida implica la adición sucesiva de aminoácidos para crear una cadena peptídica lineal (véase Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154). La tecnología de ADN recombinante también se puede utilizar para producir el péptido.
- Las glutenasas candidatas para su uso en la práctica de la presente divulgación se pueden obtener a partir de una amplia variedad de fuentes, incluidas bibliotecas de proteínas naturales y sintéticas. por ejemplo existen numerosos medios para la mutación aleatoria y dirigida de proteínas. Como alternativa, las bibliotecas de proteínas naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Los extractos de trigo en germinación y otras hierbas son de interés como fuente de enzimas candidatas. Las bibliotecas y los compuestos producidos de forma natural o sintética se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y dichos medios se pueden usar para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación y amidificación, para producir análogos estructurales de proteínas.
- En general, una variedad de mezclas de ensayo se ejecutan en paralelo con diferentes concentraciones de peptidasa para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Típicamente, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir a concentración cero o por debajo del nivel de detección. Se puede incluir una variedad de otros reactivos en un ensayo de selección. Estos incluyen reactivos como sales, detergentes y similares que se utilizan para facilitar la actividad óptima y / o reducir las interacciones no específicas o de fondo. Se pueden usar reactivos que mejoran la eficiencia del ensayo. La mezcla de componentes se añade en cualquier orden que proporcione la actividad requerida. Las incubaciones se realizan a cualquier temperatura

adecuada, típicamente entre 4 y 40 °C. Los períodos de incubación se seleccionan para una actividad óptima, pero también pueden optimizarse para facilitar el cribado rápido de alto rendimiento u otros propósitos. Típicamente, entre 0,1 y 1 horas será suficiente.

5 El nivel de digestión del oligopéptido tóxico se puede comparar con un valor de referencia. La desaparición del material de partida y / o la presencia de productos de digestión pueden controlarse mediante métodos convencionales. por ejemplo un marcador detectable se puede conjugar con un péptido, y luego se determina el cambio en el peso molecular asociado con el marcador, por ejemplo precipitación ácida, exclusión de peso molecular, y similares. El valor de referencia puede ser un valor para una muestra de control o un valor estadístico que sea representativo de una población de control. Se pueden realizar varios controles para garantizar que una actividad observada sea auténtica, incluidas reacciones paralelas, controles positivos y negativos, respuesta a la dosis y similares.

15 Las glutenasas activas identificadas por los métodos de cribado descritos en el presente documento pueden servir como compuestos líderes para la síntesis de compuestos análogos para identificar glutenasas con propiedades mejoradas. La identificación de compuestos análogos se puede realizar mediante el uso de técnicas como el análisis de campo autoconsistente (SCF), el análisis de interacción de configuración (CI) y el análisis de la dinámica en modo normal.

20 En la presente invención, la glutenasa es una prolil endopeptidasa (PEP, EC 3.4.21.26). Las prolil endopeptidasas están ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales, y se han clonado a partir de *Flavobacterium meningosepticum*, (Yoshimoto et al. (1991) J. Biochem. 110, 873-8); *Aeromonas hydrophyla* (Kanatani et al. (1993) J. Biochem. 113, 790-6); *Sphingomonas capsulata* (Kabashima et al. (1998) Arco. Biochem. Biofis 358, 141-148), *Pirococo furioso* (Robinson et al. (1995) Gene 152, 103-6.); cerdo (Rennex et al. (1991) Biochemistry 30, 2195-2030); y similares. La idoneidad de una enzima particular se determina fácilmente mediante los ensayos descritos anteriormente, mediante ensayos clínicos, determinación de estabilidad en formulaciones y similares. Otras fuentes de PEP incluyen *Lactobacilos* (Habibi-Najafi et al. (1994) J. Dairy Sci. 77, 385-392), desde donde el gen de interés se puede clonar fácilmente en función de la homología de secuencia con los PEP anteriores o mediante procedimientos genéticos inversos estándar que involucran la purificación, la secuenciación de aminoácidos, la traducción inversa y la clonación del gen que codifica la enzima extracelular diana.

En el presente documento también se describen glutenasas que son peptidasas presentes en el borde en cepillo, que se complementan. Las formulaciones de interés pueden comprender dichas enzimas en combinación con otras peptidasas. Las peptidasas presentes en el borde en cepillo incluyen dipeptidil peptidasa IV (DPP IV, EC 3.4.14.5), y dipeptidil carboxipeptidasa (DCP, EC 3.4.15.1). Se puede usar la forma humana de estas proteínas, o se pueden aislar formas modificadas de otras fuentes adecuadas. Ejemplo de enzimas DPP IV incluyen *Aspergillus* spp. (por ejemplo Byun et al. (2001) J. Agric. Food Chem. 49, 2061-2063), bacterias rumiantes tales como *Prevotella albensis* M384 (base de datos de proteínas NCBI Locus # CAC42932), bacterias dentales como *Porphyromonas gingivalis* W83 (Kumugai et al. (2000) Infect. Immun. 68, 716-724), lactobacilos tales como *Lactobacillus helveticus* (por ejemplo Vesanto, et al, (1995) Microbiol. 141, 3067-3075), y *Lactococcus lactis* (Mayo et al., (1991) Appl. Reinar. Microbiol. 57, 38-44). Se pueden reconocer fácilmente otros candidatos a DPP IV basándose en la homología con las enzimas anteriores, preferentemente > 30 % de identidad de secuencia. De forma similar, las dipeptidilcarboxipeptidasas secretadas que escinden las secuencias X-Pro C-terminales se encuentran en muchas fuentes microbianas, incluyendo *Pseudomonas* spp (por ejemplo Ogasawara et al, (1997) Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 858-863), *Streptomyces* spp. (por ejemplo Miyoshi et al., (1992) J. Biochem. 112, 253-257) y *Aspergilli* spp. (por ejemplo Ichishima et al., (1977) J. Biochem. 81, 1733-1737). De particular interés es la enzima de *Aspergillus saitoi* (Ichishima), debido a su alta actividad a valores de pH ácidos. Aunque los genes que codifican muchas de estas enzimas aún no se han clonado, se pueden clonar fácilmente mediante procedimientos genéticos inversos estándar. Las enzimas DCP I pueden purificarse a partir del medio extracelular en función de su capacidad para hidrolizarse (SEQ ID NO: 19) Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro, Z-Gly-Pro o Hip-Gly-Pro. Como alternativa, los genes DCP I putativos pueden identificarse según la homología con la enzima de *E. coli* (base de datos de proteínas NCBI Locus CAA41014).

También se describen en el presente documento glutenasas que son endoproteasas encontradas en el desarrollo de granos de cereales tóxicos tales como trigo, cebada y centeno. por ejemplo Domínguez y Cejudo (Plant Physiol. 112, 1211-1217, 1996) han demostrado que el endospermo de trigo (es decir, la parte del grano que contiene gliadina y glutenina) contiene una variedad de proteasas neutras y ácidas. Aunque estas proteasas no se han caracterizado individualmente, se espera que sean una fuente especialmente rica de glutenasas. Además, aunque los genes que codifican estas proteasas aún no se han clonado, Domínguez y Cejudo han establecido un conveniente ensayo SDS-PAGE para la identificación y separación de estas proteasas. Después de la escisión de las bandas de proteínas correspondientes del gel, se puede obtener una información de secuencia limitada. El ADNc que codifica estas proteasas, por lo tanto, se puede clonar fácilmente a partir de esta información utilizando procedimientos genéticos inversos establecidos, y expresarse en huéspedes bacterianos o fúngicos heterólogos. De particular interés son las proteasas que hidrolizan la α 2-gliadina dentro de la secuencia de aminoácidos de 33 unidades identificadas en el Ejemplo 2 a continuación. De mayor interés es el subconjunto de estas proteasas que retienen la actividad a valores de pH ácido (pH 2-5) encontrados en el estómago.

- La secuencia de aminoácidos de una glutenasa, p. una glutenasa de origen natural, puede alterarse de diversas maneras conocidas en la técnica para generar cambios dirigidos en la secuencia y enzimas de glutenasa adicionales útiles en las formulaciones y composiciones de la divulgación. Tales variantes serán típicamente variantes conservadas funcionalmente, que difieren, generalmente en secuencia, de la proteína nativa o madre correspondiente, pero que aún conservan la actividad biológica deseada. Las variantes también incluyen fragmentos de una glutenasa que retienen la actividad enzimática. Se pueden usar varios métodos conocidos en la técnica para generar cambios dirigidos, por ejemplo visualización de fagos en combinación con mutaciones aleatorias y dirigidas, introducción de mutaciones de escaneo y similares.
- 5
- 10 Una variante puede ser sustancialmente similar a una secuencia nativa, es decir que difieren en al menos un aminoácido, y pueden diferir en al menos dos, pero generalmente no más de aproximadamente diez aminoácidos (el número de diferencias depende del tamaño de la secuencia nativa). Los cambios de secuencia pueden ser sustituciones, inserciones o eliminaciones. Las mutaciones de exploración que introducen sistemáticamente alanina u otros residuos pueden usarse para determinar los aminoácidos clave. Las sustituciones de aminoácidos conservativas suelen incluir sustituciones dentro de los siguientes grupos: (glicina, alanina); (valina, isoleucina, leucina); (ácido aspártico, ácido glutámico); (asparagina, glutamina); (serina, treonina); (lisina, arginina); y (fenilalanina, tirosina).
- 15
- 20 Los fragmentos de glutenasas de interés incluyen fragmentos de al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, más usualmente al menos aproximadamente 50 aminoácidos contiguos, y pueden comprender 100 o más aminoácidos, hasta la proteína completa, y pueden extenderse más para comprender secuencias adicionales. En cada caso, el criterio clave es si el fragmento conserva la capacidad de digerir los oligopéptidos tóxicos que contribuyen a los síntomas de la celiaquía.
- 25 Las modificaciones de interés que no alteran la secuencia primaria incluyen la derivación química de proteínas, por ejemplo acetilación o carboxilación. También se incluyen modificaciones de la glicosilación, por ej. aquellas hechas modificando los patrones de glicosilación de una proteína durante su síntesis y procesamiento o en etapas adicionales de procesamiento; por ejemplo al exponer la proteína a enzimas que afectan la glicosilación, como las enzimas de glicosilación o desglicosilación de mamíferos. También se incluyen secuencias que tienen residuos de aminoácidos fosforilados, p. Fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.
- 30
- También son útiles en la práctica de la presente divulgación las proteínas que se han modificado utilizando técnicas de biología molecular y / o química para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica y / o a condiciones ácidas como las que se encuentran en el estómago, y para optimizar la solubilidad. Propiedades o para hacerlas más adecuadas como agente terapéutico. por ejemplo la columna vertebral de la peptidasa se puede ciclar para mejorar la estabilidad (véase Friedler et al. (2000) J. Biol. Chem. 275: 23783-23789). Los análogos de tales proteínas incluyen aquellos que contienen residuos distintos de los L-aminoácidos naturales, por ejemplo D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos no naturales.
- 35
- 40 Las proteínas de la glutenasa de la presente divulgación se pueden preparar por *in vitro* Síntesis, utilizando métodos convencionales como se conoce en la técnica. Varios aparatos sintéticos comerciales están disponibles, por ejemplo sintetizadores automáticos de Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Beckman y otros fabricantes. Usando sintetizadores, uno puede sustituir fácilmente por los aminoácidos naturales uno o más aminoácidos no naturales. La secuencia particular y la forma de preparación se determinarán por conveniencia, economía, pureza requerida y similares. Si se desea, se pueden introducir varios grupos en la proteína durante la síntesis que permitan la vinculación con otras moléculas o con una superficie. por ejemplo las cisteínas se pueden usar para hacer tioéteres, las histidinas se pueden usar para unirse a un complejo de ion metálico, los grupos carboxilo se pueden usar para formar amidas o ésteres, los grupos amino se pueden usar para formar amidas y similares.
- 45
- 50 Las proteínas de la glutenasa útiles en la práctica de la presente divulgación también pueden aislarse y purificarse de acuerdo con métodos convencionales de sistemas de producción recombinantes y de fuentes naturales. Se puede preparar un lisado a partir del huésped de expresión y purificar el lisado usando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad y / u otras técnicas de purificación. Típicamente, las composiciones usadas en la práctica de la divulgación comprenderán al menos el 20 % en peso del producto deseado, más generalmente al menos aproximadamente el 75 % en peso, preferentemente al menos aproximadamente el 95 % en peso, y con fines terapéuticos, usualmente en al menos aproximadamente el 99,5 % en peso, en relación con los contaminantes relacionados con el método de preparación del producto y su purificación. Generalmente, los porcentajes se basarán en la proteína total.
- 55
- 60 En un aspecto, la presente divulgación proporciona una preparación purificada de una glutenasa. Antes de la presente descripción, no había necesidad de una glutenasa que pudiera ser ingerida por un ser humano o mezclada con un producto alimenticio. Por lo tanto, antes de la presente divulgación, la mayoría de las glutenasas no existían en una forma libre de contaminantes que pudieran ser perjudiciales para un ser humano si se ingerían. La presente divulgación crea la necesidad de tales preparaciones de glutenasa y las proporciona y los métodos para prepararlas.
- 65 En una realización relacionada, la presente divulgación proporciona nuevos productos alimenticios que se derivan de productos alimenticios que contienen gluten, pero que se han tratado para reducir la concentración y la cantidad de

oligopéptidos y secuencias de oligopéptidos descubiertos como tóxicos para los pacientes con celiacía. Si bien se han fabricado alimentos sin gluten o con un contenido reducido de gluten, los productos alimenticios de la presente divulgación difieren de dichos productos alimenticios no solo por la forma en que se preparan, por el tratamiento de los productos alimenticios con una glutenasa, sino también por su contenido. como los métodos de la técnica anterior dan como resultado la alteración de los componentes no tóxicos (para pacientes de celiacía) del producto alimenticio, dando como resultado un sabor y una composición diferentes. Los alimentos de la técnica anterior incluyen, por ejemplo el almidón de trigo Codex Alimentarius, que está disponible en Europa y tiene <100 ppm de gluten. El almidón generalmente se prepara mediante procesos que aprovechan el hecho de que el gluten es insoluble en agua, mientras que el almidón es soluble.

Como se describe en el presente documento, un paciente con celiacía, además de recibir una glutenasa o un alimento tratado de acuerdo con los presentes métodos, proporciona un inhibidor de la transglutaminasa tisular, un agente antiinflamatorio, un agente antiulceroso, un mastocito. agentes estabilizantes, y / o agentes antialérgicos. Los ejemplos de tales agentes incluyen inhibidores de la HMG-CoA reductasa con propiedades antiinflamatorias tales como compactina, lovastatina, simvastatina, pravastatina y atorvastatina; antagonistas anti-alérgicos del receptor H1 de histamina, como acrivastina, cetirizina, desloratadina, ebastina, fexofenadina, levocetirizina, loratadina y mizolastina; antagonistas de los receptores de leucotrienos, tales como montelukast y zafirlukast; Inhibidores de la COX2 como celecoxib y rofecoxib; inhibidores de p38 MAP quinasa tales como BIRB-796; y agentes estabilizadores de mastocitos tales como cromoglicato de sodio (cromolina), pemirolast, proxicromil, repirinast, doxantrazol, amlexanox nedocromil y probicromil.

Como se usa en el presente documento, los compuestos que están "disponibles comercialmente" se pueden obtener de fuentes comerciales que incluyen, entre otras, Acros Organics (Pittsburgh PA), Aldrich Chemical (Milwaukee WI, incluyendo Sigma Chemical y Fluka), Apin Chemicals Ltd. (Milton Park, Reino Unido.), Avocado Research (Lancashire UK), BDH Inc. (Toronto, Canadá), Bionet (Cornwall, Reino Unido), 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 UK), Lancaster Synthesis (Windham NH), Maybridge Chemical Co. Ltd. (Cornwall UK), Parish Chemical Co. (Orem UT), Pfaltz & Bauer, Inc. (Waterbury CN), Polyorganix (Houston TX), Pierce Chemical Co. (Rockford IL), Riedel de Haen AG (Hannover, Alemania), Spectrum Quality Product, Inc. (Nuevo Brunswick, NJ), TCI America (Portland OR), Trans World Chemicals, Inc. (Rockville MD), Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond VA), Novabiochem y Argonaut Technology.

Los compuestos útiles para la administración conjunta con las glutenasas y los productos alimenticios tratados también pueden prepararse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Como se usa en el presente documento, los "métodos conocidos por un experto en la técnica" pueden identificarse a través de varios libros de referencia y bases de datos. Los libros y tratados de referencia adecuados que detallan la síntesis de reactivos útiles en la preparación de compuestos de la presente divulgación, o proporcionan referencias a artículos que describen la preparación, incluyen, por ejemplo "Synthetic Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Inc., New York; S. R. Sandler et al., "Organic Functional Group Preparations," 2ª Ed., Academic Press, New York, 1983; H. O. House, "Modern Synthetic Reactions", 2ª Ed., W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, Calif. 1972; T. L. Gilchrist, "Heterocyclic Chemistry", 2ª Ed., John Wiley & Sons, New York, 1992; J. March, "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure", 4ª Ed., Wiley-Interscience, New York, 1992. Los reactivos específicos y análogos también pueden identificarse a través de los índices de productos químicos conocidos preparados por Chemical Abstract Service de la American Chemical Society, que están disponibles en la mayoría de las bibliotecas públicas y universitarias, así como a través de bases de datos en línea (la American Chemical Society, Se puede contactar a Washington, DC, www.acs.org para obtener más detalles). Los químicos conocidos pero no disponibles comercialmente en catálogos pueden ser preparados por empresas de síntesis química a medida, donde muchas de las casas de suministro de químicos estándar (por ejemplo las enumeradas anteriormente) proporcionan servicios de síntesis a medida.

Las proteínas de la glutenasa de la divulgación y / o los compuestos administrados con la misma se incorporan en una variedad de formulaciones para administración terapéutica. En un aspecto, los agentes se formulan en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y se formulan en preparaciones en forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa, como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Como tal, la administración de la glutenasa y / u otros compuestos se puede lograr de varias maneras, usualmente por administración oral. La glutenasa y / u otros compuestos pueden ser sistémicos después de la administración o pueden localizarse en virtud de la formulación, o mediante el uso de un implante que actúa para retener la dosis activa en el sitio de implantación.

En formas de dosificación farmacéutica, la glutenasa y / u otros compuestos pueden administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, o también pueden usarse solos o en asociación apropiada, así como en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los agentes pueden combinarse, como se ha descrito anteriormente, para proporcionar un cóctel de actividades. Los siguientes métodos y excipientes son de ejemplo.

Para preparaciones orales, los agentes pueden usarse solos o en combinación con aditivos apropiados para hacer tabletas, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo con aditivos convencionales, 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 disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, como el talco o el estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes y agentes aromatizantes.

Las formulaciones orales comprenden recubrimientos entéricos, de modo que el agente activo se administra al tracto intestinal. Las formulaciones entéricas se usan a menudo para proteger un ingrediente activo de los contenidos fuertemente ácidos del estómago. Estas formulaciones se crean al recubrir una forma de dosificación sólida con una película de un polímero que es insoluble en ambientes ácidos y soluble en ambientes básicos. Las películas ejemplares son ftalato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de polivinilo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de metacrilato y ftalato de acetato de celulosa.

Otras formulaciones entéricas comprenden microesferas de polímero de ingeniería hechas de polímeros erosionables biológicamente, que muestran fuertes interacciones adhesivas con el moco gastrointestinal y los revestimientos celulares y pueden atravesar tanto el epitelio absorbente de la mucosa como el epitelio asociado al folículo que cubre el tejido linfóide de los parches de Peyer. Los polímeros mantienen el contacto con el epitelio intestinal durante largos períodos de tiempo y realmente lo penetran, a través y entre las células. Véase, por ejemplo Mathiowitz et al. (1997) *Nature* 386 (6623): 410-414. Los sistemas de administración de medicamentos también pueden utilizar un núcleo de hidrogeles superporosos (SPH) y SPH composite (SPHC), según lo descrito por Dorkoosh et al. (2001) *J Control Release* 71 (3): 307-18.

En otra realización, un microorganismo, por ejemplo un cultivo bacteriano o de levadura, capaz de producir glutenasa se administra a un paciente. Dicho cultivo puede formularse como una cápsula entérica; por ejemplo ver Patente de Estados Unidos No. 6,008,027. Como alternativa, los microorganismos estables a la acidez estomacal pueden administrarse en una cápsula, o mezclarse con preparaciones alimenticias.

En otra realización, la glutenasa se mezcla con alimentos, o se usa para tratar previamente los productos alimenticios que contienen glúteos. La glutenasa presente en los alimentos puede ser enzimáticamente activa antes o durante la ingestión, y puede ser encapsulada o tratada de otra manera para controlar el momento de la actividad. Como alternativa, la glutenasa se puede encapsular para lograr una liberación programada después de la ingestión, por ejemplo en el tracto intestinal.

Las formulaciones se proporcionan típicamente en una forma de dosificación unitaria, donde el término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de glutenasa en una cantidad calculada suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria dependen del complejo particular empleado y del efecto a lograr, y de la farmacodinámica asociada con cada complejo en el huésped.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, vehículos o diluyentes, están disponibles comercialmente. Además, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste de pH y tampones, agentes de ajuste de tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares, están disponibles comercialmente. Cualquier compuesto útil en los métodos y composiciones de la divulgación 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 conservan la efectividad biológica y las propiedades de los ácidos libres, que no son biológicamente o de otra manera indeseables. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, 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 no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas naturales sustituidas, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitlohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaina, hidrazamina, colina, betaina, etinoglicina, otras partes de esta especie, otras partes de la red, y otras partes de la maquinaria. similares. Las bases orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitlohexilamina, colina y cafeína.

Dependiendo del paciente y de la afección que se esté tratando y de la vía de administración, la glutenasa se puede administrar en dosis de 0,01 mg a 500 mg / kg de peso corporal por día, por ej. alrededor de 20 mg / día para una persona promedio. Una dosis típica de glutenasa en pacientes estará en al menos aproximadamente 1 mg / adulto, más generalmente al menos aproximadamente 10 mg; y preferentemente al menos aproximadamente 50 mg; por lo general no más de aproximadamente 5 g, más generalmente no más de aproximadamente 1 g, y preferentemente no más de aproximadamente 500 mg. Las dosis se ajustarán adecuadamente para la formulación pediátrica. En niños, la dosis efectiva puede ser más baja, por ejemplo al menos aproximadamente 0,1 mg o 0,5 mg. En terapia de

combinación que involucre, por ejemplo una PEP + DPP IV o PEP + DCP I, se puede administrar una dosis comparable de las dos enzimas; sin embargo, la relación será influenciada por la estabilidad relativa de las dos enzimas hacia la inactivación gástrica y duodenal.

5 Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función de la enzima específica, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Algunas de las glutenasas son más potentes que otras. Las dosis preferidas para una enzima dada se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica por una variedad de medios. Un medio preferido es medir la potencia fisiológica de un compuesto dado.

10 Otras formulaciones de interés incluyen formulaciones de ADN que codifican glutenasas de interés, a fin de dirigirse a las células intestinales para la modificación genética. por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos n.º 6.258.789, que describe la alteración genética de las células epiteliales intestinales.

15 Los métodos de la invención se utilizan para tratar los alimentos que se consumen o que consumen los individuos que sufren de celiaquía y / o dermatitis herpetiforme al administrar una dosis efectiva de glutenasa. Si la glutenasa se administra directamente a un ser humano, entonces el (los) agente (s) activo (s) están contenidos en una formulación farmacéutica. Como alternativa, los efectos deseados se pueden obtener incorporando glutenasa en productos alimenticios o administrando organismos vivos que expresan glutenasa, y similares. El diagnóstico de pacientes adecuados puede utilizar una variedad de criterios conocidos por los expertos en la técnica. Un aumento cuantitativo en anticuerpos específicos para gliadina y / o transglutaminasa tisular es indicativo de la enfermedad. Las historias familiares y la presencia de los alelos HLA HLA-DQ2 [DQ (a1 * 0501, b1 * 02)] y / o DQ8 [DQ (a1 * 0301, b1 * 0302)] son indicativos de una susceptibilidad a la enfermedad.

25 El efecto terapéutico puede medirse en términos de resultados clínicos o puede determinarse mediante pruebas inmunológicas o bioquímicas. La supresión de la actividad de las células T deletérea se puede medir mediante la enumeración de células Th1 reactivas, cuantificando la liberación de citocinas en los sitios de las lesiones, o utilizando otros ensayos para detectar la presencia de células T autoinmunes conocidas en la técnica. Como alternativa, uno puede buscar una reducción en los síntomas de una enfermedad.

30 Se pueden emplear diversos métodos de administración, preferentemente usando administración oral, por ejemplo con comidas. La dosificación de la formulación terapéutica variará ampliamente, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de administración, la forma de administración, la depuración del agente del huésped y similares. La dosis inicial puede ser mayor, seguida de dosis de mantenimiento más pequeñas. La dosis puede administrarse con poca frecuencia como semanalmente o cada dos semanas, o más a menudo se fracciona en dosis más pequeñas y se administra diariamente, con comidas, semanal o de otra manera, según sea necesario para mantener un nivel de dosificación eficaz.

40 Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo realizar y utilizar la presente divulgación, y no pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo cantidades, temperatura y similares), pero pueden estar presentes algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión está en o cerca de la atmósfera.

Ejemplo 1

Detección de péptidos inmunodominantes de gliadina y enzimas que los degradan

50 Los siguientes ejemplos describen el descubrimiento y la caracterización de un pequeño número de péptidos inmunodominantes de la gliadina, que representan la mayor parte de la actividad estimuladora del gluten en la dieta de los linfocitos T intestinales y periféricos encontrados en pacientes con celiaquía. La cinética proteolítica de estos péptidos inmunodominantes se analizó en la superficie del intestino delgado. Se usaron vesículas de membrana de borde en cepillo del intestino de rata adulta para mostrar que estos péptidos ricos en prolina-glutamina son excepcionalmente resistentes al procesamiento enzimático, y que la dipeptidil peptidasa IV y la dipeptidilcarboxipeptidasa son las enzimas limitantes de la velocidad en su digestión. La suplementación de la membrana del borde en cepillo con cantidades traza de una protil endopeptidasa bacteriana conduce a la rápida destrucción de estos péptidos de gliadina. Estos resultados proporcionan la base para las terapias mediadas por enzimas para el tratamiento de alimentos para los pacientes con celiaquía, y para el tratamiento de dichos pacientes que ofrecen claras ventajas sobre la única opción terapéutica actual, que es la exclusión estricta de los alimentos que contienen gluten.

65 Para investigar la digestión del gluten, se utilizó el análisis de espectroscopia de masas acoplado por cromatografía líquida (LC-MS-MS) para investigar las vías y la cinética asociada de hidrólisis de péptidos de gliadina inmunodominantes tratados con preparaciones de BBM de rata. Debido a que el roedor es un excelente modelo

animal pequeño para la estructura y función intestinal humana, se eligió BBM de rata como un sistema modelo adecuado para estos estudios.

5 Las fracciones de BBM se prepararon a partir de mucosa del intestino delgado de rata como se describe en Ahnen et al. (1982) J. Biol. Chem. 257, 12129-35. Se determinó que las actividades específicas de las peptidasas de BB conocidas son 127 $\mu\text{U} / \mu\text{g}$ para la aminopeptidasa N (APN, EC 3.4.11.2), 60 $\mu\text{U} / \mu\text{g}$ para la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV, EC 3.4.14.5) y 41 $\mu\text{U} / \mu\text{g}$ para dipeptidilcarboxipeptidasa (DCP, EC 3.4.15.1) utilizando ensayos estándar. No se detectó actividad aminopeptidasa de prolina (EC 3.4.11.5) o prolil endopeptidasa (PEP, EC 3.4.21.26) ($<5 \mu\text{U} / \mu\text{g}$). La fosfatasa alcalina y la sucrasa se utilizaron como enzimas BBM de control con actividades de 66 $\mu\text{U} / \mu\text{g}$ y 350 $\mu\text{U} / \mu\text{g}$, respectivamente.

15 Las fracciones de BBM se purificaron parcialmente a partir de la mucosa del intestino delgado de ratas hembras adultas mantenidas en una dieta ad libitum de comida estándar para roedores basada en trigo. El contenido total de proteínas se determinó mediante un método modificado de Lowry con BSA como estándar. La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó con fosfato de nitrofenilo. La actividad de la sucrasa se midió utilizando un ensayo de glucosa acoplado. DPP IV, prolina aminopeptidasa y APN se analizaron continuamente a 30 °C en Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, que contenía 1 mM de las p-nitroanilidas ($\epsilon = 8,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) Gly-Pro-pNA, Pro-pNA o Leu-pNA, este último en DMSO al 1 % adicional para mejorar la solubilidad. La actividad de DCP se midió en una reacción de 100 μl como la liberación de ácido hipúrico de Hip-His-Leu. La actividad de PEP se determinó de forma continua con Z-Gly-Pro-pNA 0,4 mM en PBS: H₂O: dioxano (8:1,2: 0,8) a 30 °C. Una unidad es el consumo de 1 μmol de sustrato por minuto.

25 DPP IV y DCP están regulados por un alto contenido de prolina en la dieta. Sin embargo, se encontró que la actividad de APN que utiliza sustratos estándar es más alta que la DPP IV, incluso cuando se alimenta con dietas ricas en prolina extremas. Además, aunque se ha observado una mayor actividad de DCP frente a CPP con el péptido modelo Z-GLAP en concentraciones de saturación, una diferencia en los valores de Km podría explicar fácilmente la relación inversa medida. La cantidad de 100 μM se eligió como la concentración de péptido inicial, porque la cinética no saturante ($k_{\text{cat}} / k_{\text{M}}$) se consideraron fisiológicamente más relevantes que las tasas máximas de hidrólisis (k_{cat}).

30 La proteólisis con la preparación de BBM se investigó utilizando el péptido (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY, un producto de la digestión quimotriptica de la gliadina α -9 (Arentz-Hansen et al. (2000) J. Exp. Med. 191, 603-12). Se ha demostrado que este péptido estimula la proliferación de células T aisladas de la mayoría de los pacientes con celiaquía, por lo que se considera que posee un epítipo inmunodominante. Se sometió a digestión con BBM, seguido de un análisis LC-MS-MS. Una mezcla de digestión estándar de 50 μl contenía 100 μM de péptido sintético, triptófano 10 μM y Cbz-triptófano como estándares internos, y resuspendió las preparaciones de BBM con un contenido de proteína final de 27 ng / μl y proteínas exógenas, como se indica, en solución salina tamponada con fosfato. Después de la incubación a 37 °C durante el tiempo indicado, las enzimas se inactivaron calentando a 95 °C durante 3 minutos. Las mezclas de reacción se analizaron por LC-MS (SpectraSystem, ThermoFinnigan) utilizando una columna de fase inversa C18 (Vydac 218TP5215, 2.1x150 mm) con agua: acetonitrilo: ácido fórmico (0,1 %): ácido trifluoroacético (0,025 %) como fase móvil (flujo: 0,2 ml / min) y un gradiente de acetonitrilo al 10 % durante 3 minutos, 10-20 % durante 3 minutos, 20-25 % durante 21 minutos seguido de un lavado al 95 %. Los fragmentos de péptidos en el intervalo de masa de m / z = 300-2000 se detectaron mediante espectroscopia de masas de ionización por electropulverización utilizando una trampa de iones LCQ y sus identidades se confirmaron mediante patrones de fragmentación de MSMS.

45 Mientras que el péptido original (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY desapareció con una semivida aparente de 35 minutos, se observó que varios intermedios se acumulaban durante períodos prolongados (Fig. 1A). Las intensidades de MS (m / z = 300-2000 g / mol) y UV₂₈₀ se encontró que las absorbancias de los péptidos principales (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY y (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY dependían linealmente de la concentración en el intervalo de 6-100 μM . Los péptidos de referencia (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP, (SEQ ID NO: 5) QLQFPQPQLP, (SEQ ID NO: 6) QPQFPQPQLPY y (SEQ ID NO: 7) QPFPQPQLP se generaron individualmente por proteólisis limitada del progenitor p con 1010 / ml de carboxipeptidasa A (C-0261, Sigma) y / o 5,9 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de leucina aminopeptidasa (L-5006, Sigma) durante 160 minutos a 37 °C y analizada por LC-MS como en la figura 1.

60 De hecho, el procesamiento posterior del péptido se retrasó sustancialmente (Fig. 1B). Las identidades de los principales productos intermedios se confirmaron mediante EM en tándem, y sugirieron un grado de estabilidad inusualmente alto de la secuencia de PQPQLP (SEQ ID NO: 8), un motivo común en los péptidos estimulantes de células T. Sobre la base de estos datos y las preferencias de aminoácidos conocidas de las peptidasas BBM, se reconstruyó la descomposición digestiva de (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY, como se muestra en el inserto de la Figura 1B. La vía preferida implica la escisión en serie de los residuos de glutamina N-terminal y leucina por la aminopeptidasa N (APN), seguida de la eliminación de la tirosina C-terminal por la carboxipeptidasa P (CPP) y la hidrólisis del dipéptido QP N-terminal restante por DPP IV. Como se ve en la Figura 1B, el QPFPQPQLPY intermedio (SEQ ID NO: 6) (formado por el ataque de APN en los primeros dos residuos N-terminales) y sus derivados son cada vez más resistentes a la hidrólisis adicional. Debido a que el alto contenido de prolina parecía

ser la causa principal de esta resistencia proteolítica, la digestión se comparó con un péptido de control sin prolina disponible comercialmente (SEQ ID NO: 9) RRLIEDNEYTARG (Sigma, St. Louis, MO). La hidrólisis inicial fue mucho más rápida ($t_{1/2} = 10$ min). Más importante aún, los intermedios digestivos solo se observaron de forma transitoria y se eliminaron completamente en una hora, lo que refleja una alta especificidad continua de la BBM para los péptidos intermedios.

Debido a que los tres principales productos intermedios (SEQ ID NO: 10) QPFPQPQLPY, (SEQ ID NO: 7) QPFPQPQLP, (SEQ ID NO: 11) FPQPQLP observados durante la digestión mediada por BBM de (SEQ ID NO: 1) QLQPFQPQLPY son sustratos para DPP IV, el experimento se repitió en presencia de un exceso de actividad 6 veces superior de DPP IV fúngico exógeno. Mientras que la disminución relativamente rápida del péptido parental y los niveles intermedios de (SEQ ID NO: 5) QLQPFQPQLP se mantuvieron prácticamente sin cambios, la acumulación de sustratos de DPP IV se suprimió por completo y se observó una digestión completa dentro de las cuatro horas. (Figura 1B, barras abiertas).

Para investigar los pasos que limitan la velocidad en la digestión mediada por BBM de péptidos de gliadina del extremo C-terminal, se usó otro péptido inmunodominante conocido derivado de α -gliadina de trigo, (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY. Aunque es poco probable que se formen péptidos con residuos de prolina N-terminales en el intestino delgado (no se observó ninguno durante la digestión con BBM de (SEQ ID NO: 1) QLQPFQPQLPY, Fig. 1A), sirven como un modelo útil para el análisis de C- procesamiento terminal, debido a que el extremo N-terminal de este péptido puede considerarse proteolíticamente inaccesible debido a la actividad de aminopeptidasa de prolina mínima en la BBM. Como se muestra en la Figura 2, este péptido es incluso más estable que (SEQ ID NO: 1) QLQPFQPQLPY. En particular, la eliminación del residuo de tirosina C-terminal por la carboxipeptidasa P (CPP) es el primer evento en su descomposición y es más de cuatro veces más lenta que la actividad de APN en (SEQ ID NO: 1) QLQPFQPQLPY (Fig. 1B). El sustrato de DCP (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP emerge como un intermedio importante después de la catálisis con carboxipeptidasa P, y es altamente resistente a la digestión adicional, probablemente debido al bajo nivel de actividad de DCP endógena asociada naturalmente con la BBM. Para confirmar el papel de la DCP como enzima limitante de la velocidad en el procesamiento C-terminal de los péptidos de gliadina inmunodominantes, las mezclas de reacción se complementaron con DCP de pulmón de conejo. El DCP exógeno redujo significativamente la acumulación de (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP después de la incubación durante la noche de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, la cantidad de PQPQLPYPQPQLP acumulado (SEQ ID NO: 4) aumentó más de 2 veces en presencia de $10 \mu\text{M}$ de captopril, un inhibidor específico de la DCP, en comparación con la BBM no complementada.

Juntos, los resultados anteriores demuestran que (i) los péptidos gliadina inmunodominantes son excepcionalmente estables hacia la degradación catalizada por las peptidasas BBM, y (ii) la DPP IV y especialmente la DCP son pasos que limitan la velocidad en este proceso de descomposición en los extremos N y C terminales de los péptidos, respectivamente. Debido a que las exopeptidasas de BBM se restringen al procesamiento de Nor-C-terminal, se investigó si la generación de péptidos libres adicionales terminados por enzimas pancreáticas aceleraría la digestión. De las proteasas pancreáticas probadas, solo la elastasa en una concentración alta (no fisiológica) de $100 \text{ ng} / \mu\text{l}$ fue capaz de hidrolizarse (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY. No se detectó proteólisis con tripsina o quimotripsina.

Debido al alto contenido de prolina como un sello de la mayoría de los péptidos de gliadina inmunogénicos, se analizó una endopeptidasa específica de prolina para determinar la generación de nuevos extremos peptídicos libres. Una búsqueda bibliográfica sobre las proteasas disponibles llevó a la identificación de prolil endopeptidasa (PEP) de *Flavobacterium meningosepticum*, que es específica para la escisión C-terminal de las prolinas y fácilmente disponible de fuentes recombinantes (Yoshimoto et al. (1991) J. Biochem. 110, 873-8). El intermedio PQPQLPYPQPQLP estable (SEQ ID NO: 4) se digirió con BBM en presencia de PEP exógena. La Figura 3 muestra la aceleración dependiente de la dosis de (SEQ ID NO: 4) digestión con PQPQLPYPQPQLP al aumentar la concentración de PEP. Tan solo 3.5 pg de PEP / 27 ng proteína BBM fue suficiente para duplicar el grado de proteólisis de este fragmento de gliadina en comparación con la incubación con BBM solo. En comparación, otras proteasas habitualmente utilizadas como la papaína, la bromelaina o la elastasa porcina fueron mucho menos eficientes, requiriendo cantidades mayores de enzima 30 veces (papaína) o 3000 veces (bromelaina, elastasa) en comparación con PEP para obtener resultados similares. Su proteólisis se restringió a la escisión de la $\text{Gln}^4\text{-Leu}^5$ y / o $\text{Gln}^{11}\text{-Leu}^{12}$ cautiverio.

La prolil endopeptidasa (EC 3.4.21.26) tenía una preferencia por el enlace $\text{Pro}^8\text{-Gln}^9$ y en menor medida el enlace $\text{Pro}^6\text{-Tyr}^7$ del péptido (SEQ ID NO: 4) PQPQLP↓YP↓QPQLP. Se encontró una división preferencial similar para (SEQ ID NO: 1) QLQPFQPQLPY. Esto está de acuerdo con la preferencia de esta prolil endopeptidasa por una segunda prolina en la posición S2' (Bordusa y Jakubke (1998) Bioorg. Med. Chem. 6, 1775-80). Basado en este motivo P↓XP y en los datos actuales, se pueden predecir hasta 16 nuevos sitios de escisión principales en la secuencia α -gliadina, una fuente importante de epítomos inmunodominantes identificados hasta ahora en el tratamiento con PEP. Todos ellos se encuentran en la parte N-terminal crítica. Se puede esperar que la escisión interna por PEP genere sustratos adicionales (de otro modo inaccesibles) para DPP IV y DCP, complementando así el proceso de asimilación natural de gliadinas por parte de la BBM. Por lo tanto, la especificidad de la prolil endopeptidasa es ideal para la desintoxicación de péptidos de gliadina inactivo persistentes en celiaquía.

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

La adición de DPP IV y DCP exógenos puede compensar el procesamiento intrínsecamente lento de la prolina por parte de la BBM, aunque ambas enzimas se basan en la generación eficiente de los extremos N y C libres mediante escisión endoproteolítica. Se utiliza una prolil endopeptidasa bacteriana soluble (PEP), que demostró ser extremadamente eficiente para hidrolizar los fragmentos de gliadina ricos en prolina. Aunque la PEP se expresa en el cerebro, pulmón, riñón e intestino humanos, no se ha reportado tal actividad en el borde en cepillo.

La suplementación de la dieta La celiacía con PEP biodisponible (con o sin DPP IV y / o DCP), en virtud de facilitar la escisión del péptido gliadina a fragmentos no tóxicos y / o digeribles, es útil para atenuar o eliminar la respuesta inflamatoria al gluten. Dicho régimen de tratamiento es análogo al tratamiento de terapia enzimática utilizado para tratar la intolerancia a la lactosa, en el que la lactasa administrada por vía oral es eficaz para escindir y, por lo tanto, desintoxicar la lactosa en los productos lácteos. Las prolil endopeptidasas están ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales y se han clonado a partir de *Aeromonas hydrophyla* (Kanatani et al. (1993) J. Biochem. 113, 790-6); *Pirococo furioso* (Robinson et al. (1995) Gene 152, 103-6.) y del cerebro de cerdo (Rennex et al. (1991) Biochemistry 30, 2195-2030). Estas isozimas constituyen peptidasas desintoxicantes alternativas. Además, la prolil endopeptidasa utilizada en este estudio es fácilmente susceptible de ingeniería de proteínas por evolución dirigida. Por lo tanto, se puede lograr la optimización de la especificidad de PEP hacia péptidos de gliadina inmunogénicos.

Ejemplo 2

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

Desde hace tiempo se sabe que los principales componentes tóxicos del gluten de trigo son una familia de proteínas ricas en Pro-Gln estrechamente relacionadas, llamadas gliadinas. Los péptidos de un segmento corto de α -gliadina parecen explicar la mayor parte del reconocimiento específico de gluten por las células T CD4+ de pacientes con celiacía. Estos péptidos son sustratos de transglutaminasa tisular (tTGasa), el auto-antígeno primario en La celiacía, y los productos de esta reacción enzimática se unen a la molécula de HLA DQ2 de clase II. Este ejemplo describe una combinación de *in vitro* y *in vivo* estudios en animales y humanos utilizados para caracterizar esta región "inmunodominante" de la α -gliadina como parte de un producto proteolítico inusualmente largo generado por el proceso digestivo que: (a) es excepcionalmente resistente a la degradación por las proteasas del borde gástrico, pancreático e intestinal; (b) es el sustrato de mayor especificidad de la transglutaminasa tisular humana (tTGasa) descubierta hasta la fecha; (c) contiene al menos seis copias superpuestas de epítomos conocidos por las células T derivadas del paciente; (d) estimula los clones de células T representativos que reconocen estos epítomos con eficacia submicromolar; y (e) tiene homólogos en proteínas de todos los cereales tóxicos pero no homólogos en proteínas de grano alimenticio no tóxicas. En conjunto, estos hallazgos demuestran que el inicio de los síntomas tras la exposición al gluten en el paciente con celiacía puede remontarse a un pequeño segmento de α -gliadina. Finalmente, se muestra que este péptido largo "superantigénico" se puede desintoxicar *in vitro* e *in vivo* por tratamiento con prolil endopeptidasa bacteriana, proporcionando una terapia de peptidasa para celiacía.

Identificación de péptidos estables de la digestión catalizada por proteasa gástrica, proteasa pancreática y peptidasa de la membrana del borde en cepillo de α 2-gliadina recombinante: La proteína α 2-gliadina, una α -gliadina representativa (Arentz-Hansen et al. (2000) Gut 46:46), se expresó en forma recombinante y se purificó a partir de *E. coli*. El gen de la α 2-gliadina se clonó en el plásmido pET28a (Novagen) y se transformó en el huésped de expresión BL21 (DE3) (Novagen). Las células transformadas se cultivaron en cultivos de 1 litro de medio LB que contenían 50 μ g / ml de kanamicina a 37 °C hasta que se alcanzó la DO600 0,6-1. La expresión de la proteína α 2-gliadina se indujo con la adición de isopropil β -D-tiogalactósido 0,4 mM (Sigma) y los cultivos se incubaron adicionalmente a 37 °C durante 20 horas. Las células que expresan la α 2-gliadina recombinante se centrifugaron a 3600 rpm durante 30 minutos. El sedimento se resuspendió en 15 ml de tampón de interrupción (fosfato de sodio 200 mM; NaCl 200 mM; DTT 2,5 mM; benzamidina 1,5 mM; EDTA 2,5 mM; pepstatina 2 mg / L; leupeptina 2 mg / L; glicerol 30 % v / v) y se lisaron por sonicación (1 minuto; el control de salida se estableció en 6). Después de la centrifugación a 45000 g durante 45 min, el sobrenadante se desechó y el sedimento que contenía la proteína gliadina se resuspendió en 50 ml de urea 7 M en Tris 50 mM (pH = 8,0). La suspensión se centrifugó de nuevo a 45000 g durante 45 minutos y el sobrenadante se recogió para purificación. El sobrenadante que contiene α 2-gliadina se incubó con 1 ml de resina de ácido níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA; Qiagen) durante la noche y luego se cargó por lotes en una columna con 2 ml de Ni-NTA. La columna se lavó con urea 7 M en Tris 50 mM (pH = 8,0), y la α 2-gliadina se eluyó con imidazol 200 mM, urea 7 M en Tris 50 mM (pH = 4,5). Las fracciones que contenían α 2-gliadina se agruparon en una concentración final de solución de etanol al 70 % y se añadieron dos volúmenes de NaCl 1,5 M para precipitar la

Los adultos mayores de 17 años pueden ser elegibles para el estudio. Se reclutará tanto a hombres como a mujeres con celiaquía a través de organizaciones de apoyo para celíacos. Se puede reclutar a individuos de diversos grupos étnicos, incluidos asiáticos y afroamericanos, aunque la mayoría de los pacientes con celiaquía son caucásicos. Pueden participar Tanto hombres como mujeres; hay una proporción algo mayor de pacientes mujeres con celiaquía (~65 %). Los participantes tendrán acceso las 24 horas al equipo de gastroenterología, y un miembro del equipo de investigación estará disponible para su consulta. La eficacia será controlada por las respuestas comparativas de los participantes durante el período de control al ingerir la harina tratada con proteasa sin PEP en comparación con la misma harina que se ha tratado con PEP.

Las condiciones adecuadas para el empaquetado de la rPEP para lograr una digestión eficiente de los péptidos de gliadina *in vivo* se pueden determinar de la siguiente manera. Para desarrollar una preparación sabrosa de PEP para permitir la digestión *in vivo* de los péptidos tóxicos en los seres humanos puede ser útil formular PEP de modo que pueda pasar al intestino delgado sin que sea destruida por el ambiente ácido y duro del estómago. Además, esta formulación puede proporcionar una liberación rápida de PEP al entrar en el duodeno, donde las proteasas pancreáticas secretadas ejercen su acción máxima dentro del contenido luminal para escindir proteínas de la dieta. Hay varios ejemplos bien estudiados y ampliamente utilizados de tales sistemas de administración para otras sustancias. El desarrollo de una formulación optimizada para un fármaco PEP eficaz capaz de administrar cantidades farmacológicamente útiles de esta enzima en el intestino delgado superior como un suplemento digestivo se puede realizar de la siguiente manera. Para procesar los péptidos de gliadina resistentes a la digestión, se pueden usar estrategias de formulación seleccionadas que se han utilizado con éxito para el suministro de otros suplementos de enzimas. En particular, las formulaciones usadas previamente para proteasas pancreáticas y lactasa se evalúan mediante el uso de PEP recombinante de *Flavobacterium meningosepticum* y *Aeromonas hydrophila*. Estas enzimas se expresan y purifican según lo descrito por A. Kitazono *et al.* y A. Kanatani *et al.* Las enzimas pancreáticas se han utilizado durante los últimos setenta años para tratar la insuficiencia pancreática exocrina. Aunque los resultados clínicos tempranos fueron variables debido a la inactivación gástrica de las enzimas administradas de forma exógena, alrededor de 1960 se produjo un interés renovado en las ayudas digestivas que contienen enzimas con el desarrollo de recubrimientos entéricos estables al ácido (I.R. Wilding, S.S. Davis y D. T. O'Hagan, Targeting of drugs and vaccines to the gut. *Pharmac. Ther.* 62, 97-124, (1994)). De manera similar, los recubrimientos entéricos estables al ácido también se han utilizado para el suministro de lactasa en el duodeno de pacientes con deficiencia de lactasa. Las formulaciones de glutenasa pueden comprender una glutenasa en un recubrimiento entérico estable.

La PEP en partículas liofilizada mezclada con bicarbonato (como tampón) se recubre con Eudragit S100, L30D o L 100-44 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Rohm America). Como alternativa, se pueden usar ftalato de acetato de celulosa, metilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa como recubrimientos para la preparación de gránulos resistentes al ácido gástrico. Estos recubrimientos entéricos se usan habitualmente para la formulación de pancreatina (véase T. Sipos (1978), Preparation of enteric coated digestive enzyme compositions, patente de Estados Unidos N.º 4.079.125; y T. Sipos (1998), High buffer-containing enteric, coating digestive enzyme bile acid compositions and method of treating digestive disorders therewith, patente de Estados Unidos N.º 5.750.104).

Una estrategia alternativa útil en la preparación de formulaciones divulgadas en el presente documento, utilizada con éxito con lactasa (B.J. Langner (1999), Enteric polymer coated capsule containing dried bacterial culture for supplying lactase, patente de Estados Unidos 6.008.027), implica el llenado de cápsulas de gelatina con PEP liofilizada al 50-90 %, y la capacidad restante se llena con desecantes estabilizantes tales como óxido de silicio, dióxido de silicio o celulosa microcristalina y bicarbonato. Las cápsulas están recubiertas entéricamente con polímero Eudragit (Rohm America) o acetato de polivinilo y ftalato (Sureteric, Merck Frosst) y se secan al vacío antes de su uso. De forma similar, la diastasa se ha formulado con recubrimientos Eudragits RS100 y ftalato acetato de celulosa para su uso entérico (S.P. Vyas, P.J. Gogoi, S. Pande, y V.K. Dixit, Enteric spherules diastase in enzyme preparations. *J. Microencapsulation.* 8, 447-454, 1991). Para demostrar que estas u otras formulaciones aumentan la biodisponibilidad de la PEP en el intestino delgado, se pueden realizar los siguientes experimentos. Primero, se puede evaluar la capacidad de la actividad de PEP para soportar 0,5-2 h de tratamiento gástrico simulado (pepsina, en HCl, 0,1N a pH 2). Si se puede retener reproduciblemente la actividad > 10 %, la formulación se expone a condiciones simuladas en el duodeno (tampón de pH 6,5 que contiene tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa en una relación molar de 1:100 y elastasa en una relación de 1:500 a la supuesta α 2-gliadina). Idealmente, la liberación total de la actividad de PEP se lograría en 15 minutos. Las formulaciones que satisfacen los criterios anteriores se administran inicialmente a ratas adultas junto con comidas sin gluten enriquecidas con α 2-gliadina recombinante (cuyo comportamiento proteolítico en respuesta a las enzimas gástricas y pancreáticas + PEP se ha caracterizado bien). Se pueden evaluar dosis de PEP en el intervalo de 10-1000 unidades / kg de peso corporal. Se sacrifica a los animales dos horas después de las comidas, y los contenidos derivados del intestino delgado se analizan mediante LC-MS para determinar la actividad residual de PEP y la medida en que se ha proteolizado la gliadina. En particular, se estima la concentración del péptido gliadina resistente a la digestión del péptido de 33 unidades. Las formulaciones que producen una reducción de más del 90 % en la concentración de este péptido se evalúan más ampliamente por su potencial toxicidad, como se ha detallado anteriormente en los estudios iniciales de ratas con PEP soluble en agua.

Los procedimientos descritos en el presente documento se realizan según un protocolo aprobado para animales que

se describe a continuación. Ratas Sprague-Dawley macho, 250-300 g, (o ratas Fisher para estudios de intestino con deficiencia de DPP IV) se les permite el acceso al pienso de rata regular a base de trigo hasta el experimento. A las ratas solo se les permite agua durante 8 horas antes del experimento para asegurar la eliminación del alimento residual en el intestino delgado superior. Después de anestésiar a la rata con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (50 mg / kg), se abre la cavidad abdominal y se realiza una pequeña incisión en un segmento de yeyuno ubicado a 10 cm más allá del ligamento de Trietz. La canulación se realiza con un catéter de polietileno (3 mm ID, 4 mm OD) y se sutura 2 cm distal a la incisión. Una segunda cánula se coloca de manera similar a 10 cm distal de la primera con la cánula orientada en sentido proximal. Después de enjuagar el segmento de yeyuno aislado e intacto con solución de Ringer (NaCl 140 mM, KHCO₃ 10 mM, K₂HPO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgCl₂ 1,2 mM) a 37 °C para eliminar cualquier residuo intraluminal, el asa aislada del intestino se devuelve a la cavidad abdominal. La incisión se cubre con una envoltura de plástico transparente y la temperatura intraabdominal se mantiene a 37 °C colocando una vuelta incandescente de 30 vatios a ~ 30 cm del animal. Una solución 2 mM de un péptido gliadina de 7-14 residuos (purificado y caracterizado por HPLC-Espectrometría de masas) se perfunde en solución de Ringer que contiene [¹⁴C] inulina (un marcador de concentración-dilución) para establecer un estado estacionario de concentraciones de péptido residual y productos más pequeños en el sitio de recolección distal de la colección (estudios anteriores con otros péptidos y carbohidratos han revelado el estado estable que se alcanzará en 10-20 minutos). Las muestras recogidas en el sitio distal se recuperan y analizan mediante HPLC-MS para determinar el péptido residual y los productos peptídicos o aminoácidos más pequeños. Las muestras se recolectan durante 3 periodos sucesivos de 10 minutos después de alcanzar un estado estable, y se utilizan una serie de gliadinas y péptidos no gliadinas. Los animales generalmente se pueden mantener anestesiados durante un período de 3 a 6 horas mediante la adición de pequeños incrementos de pentobarbital (5 mg por 30-60 minutos). Al final del experimento, el segmento intestinal y un segmento de control adyacente se recuperan y se toman muestras de hígado, riñón y sangre para el análisis del péptido de prueba y sus productos. La eutanasia terminal se logra mediante una sobredosis de anestesia para producir apnea hasta que no haya contracción del corazón.

Aunque se pueden emplear otros métodos y reactivos, este ejemplo proporciona enzimas, formulaciones de enzimas y protocolos de pruebas clínicas y en animales para demostrar la eficacia de la terapia mediada por enzimas para celiaquía.

30 Ejemplo 4

Expresión heteróloga de PEP en *Lactobacilos*

En una realización de la divulgación, a un paciente con celiaquía se le proporciona un organismo recombinante modificado para expresar una PEP. El organismo recombinante se selecciona de los organismos que pueden colonizar la mucosa intestinal sin perjudicar al paciente, proporcionando así una fuente endógena de PEP al paciente. Como ejemplo, los *Lactobacilos*, tal como *L. casei* y *L. plantarium*, pueden colonizar la mucosa intestinal y secretar enzimas PEP localmente. Debido a su uso generalizado en el procesamiento de alimentos, también pueden usarse como fuente eficiente de PEP para su uso industrial (para tratar alimentos) y médico (para preparar PEP para formulación farmacéutica). Las PEP se pueden expresar en tales *lactobacilos* utilizando tecnologías estándar de ADN recombinante. Por ejemplo Shaw *et al.* (Shaw, DM, Gaerthe, B; Leer, RJ, Van der Stap, JGMM, Smittenaar, C.; Den Bak-Glashouwer, Heijne, MJ, Thole, JER, Tielens FJ, Pouwels, PH, Havenith, CEG (2000) Immunology 100, 510-518) han diseñado especies de *lactobacilos* para que expresen la toxina tetánica intracelular y unida a la superficie. Los genes de PEP intactos (incluidas las secuencias líder para la secreción bacteriana eficiente) pueden clonarse en vectores de expresión lanzadera como pLP401 o pLP503 bajo el control del promotor de amilasa (regulable) o del promotor de la lactato deshidrogenasa (constitutivo), respectivamente. Como alternativa, se pueden generar cepas de lactobacilos de calidad alimentaria recombinante mediante tecnología de recombinación específica del sitio (por ejemplo, véase Martin MC, Alonso, JC, Suárez JE, y Álvarez MA Appl. Env. Microbiol. 66, 2599-2604, 2000). Las condiciones de cultivo estándar se utilizan para fermentación de *Lactobacilos*, tales como las descritas por Martin *et al.*

50 Ejemplo 5

Expresión heteróloga de PEP en levaduras

Tanto las células como los organismos naturales y recombinantes pueden usarse para producir las glutenasas útiles. Las glutenasas y células productoras preferidas incluyen las de organismos que se sabe que son considerados generalmente seguros, como *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Sphingomonas*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Xanthomonas*, *Pyrococcus*, *Bacillus* y *Streptomyces*. Las enzimas glutenasas extracelulares pueden obtenerse de microorganismos tales como *Aspergillus oryzae* y *Lactobacillus casei*. Las células preferidas incluyen aquellas que ya se utilizan en la preparación de productos alimentarios pero que se han modificado para que expresen una glutenasa útil. Como ejemplo, las cepas de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae* son útiles para la expresión de alto nivel de proteínas heterólogas secretadas. Los genes que codifican cualquiera de las PEP descritas anteriormente (solo proteínas maduras) se pueden clonar en plásmidos de expresión diseñados para la producción óptima de proteínas secretadas. Un ejemplo de una estrategia de expresión heteróloga de este tipo se describe en Parekh, R.N. y Wittrup, K.D. (Biotechnol. Prog. 13, 117-122, 1997). Se pueden usar vectores autorreplicantes (por ejemplo, 2

micrones) o de integración (por ejemplo, pAUR101). El promotor GAL1-10 es un ejemplo de promotor inducible, mientras que el promotor ADH2 es un ejemplo de promotor constitutivo. El ADNc que codifica la PEP madura se fusiona aguas abajo de una secuencia líder que contiene una región pre-pro sintética que incluye un sitio de escisión de la señal y un sitio de escisión Kex2p. Se puede usar *S. cerevisiae* BJ5464 como huésped para la producción de la peptidasa. Parekh y Wittrup describen las condiciones de fermentación en matraz de agitación en la referencia citada anteriormente. Como alternativa, se pueden utilizar cultivos discontinuos de alta densidad celular para la producción a gran escala de las peptidasas; un procedimiento representativo para este propósito 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).

10 Ejemplo 6

Formulación de cápsulas entéricas de prolil endopeptidasa

Se cargan cápsulas de gelatina con 100 mg de prolil endopeptidasa y 10 mg de dióxido de silicio. Las cápsulas se recubren entéricamente con polímero Eudragit y se introducen en una cámara de vacío durante 72 horas. A continuación, las cápsulas se mantienen en un intervalo de temperatura de 10 °C a 37 °C y con un nivel de humedad controlado de 35-40 %.

20 Ejemplo 7

Estudios de formulación de cápsulas entéricas de prolil endopeptidasa

Se realiza un estudio en el que los pacientes con celiaquía se inscriben en un estudio de dos semanas de duración. Se utilizan cápsulas de gelatina que contienen 90 % de prolil endopeptidasa mezclada con 10 % de dióxido de silicio. Las cápsulas se llenan a mano con la mezcla, se envuelven en bandas y se recubren con un 10 % de recubrimiento entérico Sureteric (un polímero de poli (acetato de vinilo de vinilo) desarrollado por la filial canadiense de Merck & Company). Las muestras se someten a pruebas de ácido exponiendo el recubrimiento a HCl 1N durante una hora para simular el ambiente ácido del estómago. Las cápsulas se colocan en una cámara de vacío durante 72 horas.

Se administran dos cápsulas de 100 mg a cada paciente antes de cada comida. Se instruye a los pacientes para que coman todo tipo de alimentos sin abstenerse de aquellos que se sabe que causan molestias, por ejemplo meteorismo, diarrea y calambres.

35 Ejemplo 8

Formulación de pastilla entérica de prolil endopeptidasa

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

Ejemplo 9

50 Métodos de diagnóstico

El péptido de 33 unidades ((SEQ ID NO: 12) LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLP YPQPQPF) y sus derivados desamidados formados por la acción de la transglutaminasa tisular son reactivos de diagnóstico útiles para la detección de la celiaquía. La enzima tTGasa desamida el péptido de 33 unidades al menos en las posiciones subrayadas que se muestran en la siguiente secuencia: (SEQ ID NO: 12) LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF, y los homólogos desamidados del péptido de 33 unidades son reactivos importantes de la presente divulgación. Dichos homólogos desamidados pueden comprender uno, dos o más restos de glutamina (Q) desamidada.

También se incluyen los análogos oligopeptídicos de los oligopéptidos descritos por la secuencia de aminoácidos en el presente documento. Tales análogos contienen al menos una diferencia en la secuencia de aminoácidos entre el análogo y el péptido antigénico nativo. Un L-aminoácido del péptido nativo se puede alterar en cualquiera de los 20 L-aminoácidos que se encuentran habitualmente en las proteínas, cualquiera de los D-aminoácidos correspondientes, aminoácidos raros, como la 4-hidroxiprolina y la hidroxilisina, o un aminoácido no proteico, como la β-alanina y la homoserina. También se describen en el presente documento los aminoácidos que se han alterado por medios químicos, tal como metilación (por ejemplo α-metilvalina), desamidación, amidación del aminoácido C-

- terminal por una alquilamina, como etilamina, etanolamina y etilendiamina, y acilación o metilación de la función de la cadena lateral de un aminoácido (por ejemplo acilación del grupo épsilon-amino de la lisina), desaminación de arginina en citrulina, isoaspartilación o fosforilación en restos de serina, treonina, tirosina o histidina. Los análogos de los oligopéptidos candidatos pueden seleccionarse para determinar su utilidad en un método de diagnóstico de la invención mediante un ensayo que mide la unión competitiva a anticuerpos, receptor de células T, etc. Los análogos que inhiben la unión de los péptidos nativos son reactivos de diagnóstico útiles. Los oligopéptidos y los análogos de oligopéptidos pueden sintetizarse mediante técnicas de química estándar, incluida la síntesis mediante un procedimiento automatizado.
- Se describen anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con este péptido y sus derivados desamidados. Los métodos para producir anticuerpos se conocen en la técnica. Los anticuerpos policlonales se generan mediante un protocolo estándar, por ejemplo inyectando a un animal de producción una composición antigénica, formulada como se ha descrito anteriormente. Véase, por ejemplo Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Cuando se utiliza un inmunógeno peptídico, es ventajoso conjugar el péptido con una molécula más grande para formar un conjugado inmunoestimulador. Las proteínas conjugadas utilizadas habitualmente que están disponibles comercialmente para tal uso incluyen seroalbúmina bovina (BSA) y hemocianina de lapa californiana (KLH). Los anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido pueden luego purificarse a partir de tales antiseros mediante, por ejemplo cromatografía de afinidad utilizando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado. Como alternativa, para anticuerpos monoclonales, pueden formarse hibridomas aislando las células inmunitarias estimuladas, tales como las del bazo del animal inoculado. A continuación, estas células se fusionan con células inmortalizadas, como las células de mieloma o células transformadas, que son capaces de replicarse indefinidamente en cultivos celulares, produciendo así una línea celular inmortal, secretora de inmunoglobulina. Muchas de estas líneas celulares (como los mielomas) son conocidas por los expertos en la materia. Además, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden producirse mediante ingeniería genética. En esta técnica, al igual que con el procedimiento de hibridoma estándar, las células productoras de anticuerpos se sensibilizan al antígeno o inmunógeno deseado. El ARN mensajero aislado de las células inmunitarias del bazo o los hibridomas se usa como molde para fabricar ADNc utilizando amplificación por PCR. Se produce una biblioteca de vectores, cada uno de los cuales contiene un gen de cadena pesada y un gen de cadena ligera que conserva la especificidad de antígeno inicial, mediante la inserción de secciones apropiadas del ADNc de inmunoglobulina amplificada en los vectores de expresión. Se construye una biblioteca combinatoria combinando la biblioteca de genes de la cadena pesada con la biblioteca de genes de la cadena ligera. Esto da como resultado una biblioteca de clones que coexpresan una cadena pesada y ligera (que se parece al fragmento Fab o al fragmento de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo). Los vectores que llevan estos genes se cotransfectan en un huésped (por ejemplo bacterias, células de insectos, células de mamíferos u otras células huésped adecuadas para la producción de proteínas). Cuando se induce la síntesis génica de anticuerpos en el huésped transfectado, las proteínas de las cadenas pesada y ligera se autoensamblan para producir anticuerpos activos que pueden detectarse mediante detección selectiva con el antígeno o inmunógeno.
- El péptido de 33 unidades es excepcionalmente resistente a la proteólisis gastrointestinal, lo que permite que el péptido persista mientras viaja a través del tracto intestinal. Además, este péptido incluye múltiples copias de epítomos inmunogénicos de gliadina que son reconocidos por los anticuerpos en la mayoría de los pacientes celíacos. Debido a que se sabe que los epítomos multivalentes provocan una respuesta inmunitaria especialmente energética (por ejemplo Boniface et al., 1998, *Immunity* 9: 459), el péptido de 33 unidades y sus derivados desamidados tienen propiedades inflamatorias en el intestino celíaco, incluso en dosis bajas. Además, como se sabe que la tTGasa se une transitoriamente a su sustrato, en el presente documento se describen proteínas de fusión en las que toda o una parte de la tTGasa de mamífero, incluyendo, pero sin limitaciones, tTGasa humana, bovina, equina y porcina, está unida, normalmente de forma covalente, al péptido de 33 unidades de la divulgación, en el que el sitio de unión está en un sitio para una eventual desamidación. Esta proteína de fusión es un estimulador altamente potente de las células T de los pacientes con celiaquía, ya que la proteína de fusión imita exactamente los complejos formados en los pacientes con celiaquía y es reconocida por los anticuerpos anti-tTGasa y por las células T en esos pacientes.
- En el presente documento se describe un diagnóstico de celiaquía que es un análisis de orina. Es bien sabido que la permeabilidad del intestino delgado aumenta durante la celiaquía activa y se reduce de nuevo cuando se sigue una dieta estricta sin gluten (por ejemplo Johnston et al., 2001, *Lancet* 358: 259). A medida que el péptido de 33 unidades atraviesa el intestino delgado, una pequeña cantidad del péptido derivado de una comida de prueba inducirá fugas y, a su vez, se transportará a través de la capa epitelial y se pasará a la orina. Dada su resistencia proteolítica, este péptido surgirá en la orina y se puede detectar mediante procedimientos analíticos estándar, como espectrometría de masas en tándem-LC o una prueba de diagnóstico basada en anticuerpos. La presencia del péptido en la orina es diagnóstica para celiaquía. La sensibilidad de este procedimiento de diagnóstico podría incrementarse mediante el uso de ¹³C u otro péptido marcado. Además, en la práctica actual, un individuo sospechoso de tener celiaquía se le administra una dieta libre de gluten y luego se le expone al gluten algunas semanas después para ver si reaparecen los síntomas. Las pruebas de diagnóstico descritas se pueden utilizar ante la primera sospecha del médico de que una persona sufre celiaquía, evitando así los efectos nocivos de volver a administrar a esa persona una dieta con gluten y volver a inducir los síntomas de la enfermedad.

También se describe un diagnóstico para celiacía que es un análisis de sangre. Como se ha mencionado anteriormente, el péptido de 33 unidades también puede detectarse en muestras de sangre periférica, cuando es ingerido en pequeñas cantidades por individuos con celiacía o en el momento de un análisis inicial en la consulta de un médico.

5 En el presente documento se describe un diagnóstico para celiacía que se basa en la tinción de biopsia intestinal. Las formas marcadas del péptido de 33 unidades proporcionadas por la presente invención (por ejemplo un péptido conjugado con un marcador fluorescente u otro) pueden usarse para teñir muestras de biopsia intestinal de
10 antígeno y, a su vez, las células T inflamatorias, tales péptidos pueden usarse para detectar la presencia de células inmunitarias específicas de la enfermedad en tejido de biopsia. De particular relevancia es el uso de tales ensayos para identificar pacientes cuya enfermedad está en remisión como resultado de una dieta sin gluten. Como se ha señalado anteriormente, las prácticas clínicas actuales no pueden diagnosticar a un paciente cuando está en una
15 dieta sin gluten, y requieren que el paciente sea sometido a la incomodidad de una dieta que contiene gluten durante un período de tiempo significativo.

También se describe un diagnóstico para celiacía en el que se usan formas marcadas del péptido de 33 unidades para detectar células inmunitarias específicas de la enfermedad en la sangre periférica.

20 Además, la presente divulgación proporciona un diagnóstico para celiacía que se basa en una exposición de la mucosa oral. Los péptidos inflamatorios del gluten se pueden usar para detectar la celiacía por exposición local en la mucosa oral de los pacientes (véase Lahteenoja et al., 2000, Am. J. Gastroenterol. 95: 2880). Dada la resistencia proteolítica y la inmunogenicidad del péptido de 33 unidades, el péptido de 33 unidades puede ser especialmente útil en un procedimiento de diagnóstico en el que el péptido se pone en contacto con la mucosa oral de un individuo, y
25 se hace un diagnóstico de celiacía si se produce una inflamación. Una vez más, una ventaja particular de tal prueba sería su sensibilidad para detectar a un paciente cuya enfermedad está en remisión debido a una dieta sin gluten.

30 El diagnóstico implica detectar la presencia de células T reactivas con el péptido de 33 unidades o un homólogo desamidado del mismo, o un homólogo del mismo unida a tTGasa en un tejido, líquido corporal o heces de un individuo. Las células T también pueden detectarse por proliferación en respuesta a la exposición a un antígeno y presentarse por células presentadoras de antígenos alógenas autógenas o adecuadas. La presencia de tales células T reactivas indica la presencia de una respuesta inmunitaria en curso. El antígeno utilizado en los ensayos puede ser el homólogo desamidado completo de 33 unidades o un homólogo ligado a tTGasa; o péptidos derivados de
35 ellos, normalmente tales péptidos tendrán una longitud de al menos aproximadamente 12 aminoácidos. Se puede preparar un subconjunto de péptidos, o una mezcla que abarque la secuencia completa. Se pueden generar péptidos superpuestos, en los que cada péptido está enmarcado de 1 a 5 aminoácidos, generando así un conjunto de epitopos.

40 La cuantificación de las células T se puede realizar determinando la unión análoga del receptor de células T presente en una célula, a un complejo MHC / péptido, por ejemplo utilizando tetrámeros de MHC de Clase I o de Clase II (véase Altman et al. Science (1996) 274: 94-96.; McMichael y O'Callaghan J Exp Med. (1998) 187: 1367-1371). Los tetrámeros de MHC son complejos de los fragmentos solubles de cuatro moléculas del MHC, que están asociados con un péptido específico. El tetrámero puede estar unido a un fluorocromos u otro marcador detectable.
45 (véase Ogg et al. (1998) Curr Opin Immunol. 10: 393-396). El tetrámero puede comprender un fragmento soluble de la molécula de HLA-DQ2 [DQ (a1 * 0501, b1 * 02)] y / o DQ8 [DQ (a1 * 0301, b1 * 0302)] u otros tipos de MHC apropiados para el individuo que se está analizando.

50 El diagnóstico puede determinar el nivel de reactividad, por ejemplo basado en el número de células T reactivas encontradas en una muestra, en comparación con un control negativo de un huésped ingenuo, o estandarizado a una curva de datos obtenida de uno o más controles positivos. Además de detectar la presencia cualitativa y cuantitativa de células T reactivas al antígeno, las células T pueden tipificarse en cuanto a la expresión de citoquinas que se sabe que aumentan o suprimen las respuestas inflamatorias. Si bien no es necesario para fines de diagnóstico, también puede ser deseable escribir la especificidad epitópica de las células T reactivas, en particular
55 para su uso en la administración terapéutica de péptidos.

60 En otra realización, el diagnóstico implica detectar la presencia de un anticuerpo, reactivo con el péptido de 33 unidades o un homólogo del mismo desamidado, o un homólogo del mismo unida a tTGasa en un tejido, fluido corporal o heces de un individuo. Un anticuerpo se detecta, por ejemplo mediante un ensayo de aglutinación utilizando un antígeno. Las muestras se pueden obtener del tejido del paciente, que puede ser un tejido de la mucosa, que incluye, entre otros, el tejido de la mucosa oral, nasal, pulmonar e intestinal, un fluido corporal. por ejemplo Sangre, esputo, orina, flema, linfa y lágrimas. También se incluyen en el término los derivados y fracciones de dichos fluidos. Las muestras de sangre y sus derivados son de particular interés. Una ventaja es que los antígenos proporcionados son antígenos tan potentes que los métodos de diagnóstico pueden emplearse con
65 muestras (tejido, líquido corporal o heces) en las cuales un anticuerpo de diagnóstico, péptido o célula T de celiacía está presente en una abundancia muy baja. Esto permite que los métodos en el presente documento descritos se

practiquen de una manera mucho menos invasiva, menos costosa y menos dañina para el individuo con celiaquía.

La medición de la concentración de anticuerpos específicos en una muestra o fracción de la misma se puede lograr mediante diversos ensayos específicos, como se conoce en la técnica. En general, el ensayo medirá la reactividad entre una muestra de paciente, generalmente derivada de sangre, generalmente en forma de plasma o suero. La muestra del paciente se puede usar directamente, o diluirse según corresponda, generalmente aproximadamente a 1:10 y generalmente no más de aproximadamente 1:10.000. Los inmunoensayos se pueden realizar en cualquier tampón fisiológico, por ejemplo PBS, solución salina normal, HBSS, dPBS, etc.

En una realización, se usa un ensayo de tipo sándwich convencional. Un ensayo de tipo sándwich se realiza uniendo primero el péptido a una superficie o soporte insoluble. El péptido puede unirse a la superficie por cualquier medio conveniente, dependiendo de la naturaleza de la superficie, ya sea directamente o a través de anticuerpos específicos. La forma particular de unión no es crucial mientras sea compatible con los reactivos y los métodos generales descritos en el presente documento. Pueden unirse a las placas de forma covalente o no covalente, preferentemente de forma no covalente.

En algunos casos, se utilizará un ensayo competitivo. Además de la muestra del paciente, se añade un competidor de los anticuerpos a la mezcla de reacción. El competidor y los anticuerpos compiten por unirse al péptido antigénico. Generalmente, la molécula competidora se marcará y detectará como se ha descrito anteriormente, donde la cantidad de unión del competidor será proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes. La concentración de la molécula competidora será de aproximadamente 10 veces la concentración máxima anticipada de anticuerpos a aproximadamente la misma concentración para lograr el intervalo de detección más sensible y lineal.

Un protocolo alternativo es proporcionar anticuerpos frente al paciente unidos a la superficie insoluble. Después de añadir la muestra y lavar las proteínas unidas no específicamente, se añaden uno o una combinación de los antígenos de prueba, donde los antígenos se marcan, para no interferir con la unión a los anticuerpos. Convenientemente, pueden emplearse proteínas fusionadas, donde la secuencia peptídica se fusiona con una secuencia enzimática, por ejemplo β -galactosidasa.

Los métodos en cuestión son útiles no solo para diagnosticar individuos con celiaquía, sino también para determinar la eficacia de los métodos profilácticos o terapéuticos para la celiaquía, así como la eficacia de los métodos de preparación o tratamiento de alimentos destinados a eliminar el gluten o sustancias similares de fuentes alimenticias. Por lo tanto, un individuo con celiaquía tratada eficazmente con un fármaco profiláctico o terapéutico u otra terapia para celiaquía se analiza más como un individuo sin celiaquía con los métodos descritos. Del mismo modo, los anticuerpos o respondedores de células T, por ejemplo Las líneas de células T que detectan los oligopéptidos del gluten tóxicos, son útiles para detectar el gluten y sustancias similares al gluten en los alimentos y, por lo tanto, pueden usarse para determinar si un alimento tratado para eliminar dichas sustancias se ha tratado de manera eficaz.

Estos y otros métodos de diagnóstico pueden practicarse utilizando los nuevos péptidos y anticuerpos descritos.

Otros aspectos de la presente divulgación son:

1. Un método para tratar la celiaquía y / o la dermatitis herpetiforme, que comprende: administrar a un paciente una dosis efectiva de una glutenasa; en la dicha glutenasa atenúa la toxicidad del gluten en dicho paciente.

2. El método de acuerdo con la realización 1, en el que dicha glutenasa es una enzima capaz de escindir un sustrato pretratado, en el que dicho sustrato pretratado comprende una o más proteínas gliadina, hordeína, secalina o avenina después del pretratamiento con cantidades fisiológicas de proteasas gástricas y pancreáticas, y en el que la glutenasa, cuando se añade a una mezcla de reacción que comprende dicho sustrato pretratado, aumenta la concentración del extremo NH_2 libre en al menos aproximadamente el 25 % y / o reduce la concentración molar residual de oligopéptidos mayor que aproximadamente 1.000 Da en al menos aproximadamente 2 veces, y / o reduce la potencia por la cual dicho sustrato pretratado antagoniza la unión de (SEQ ID NO : 17) PQLPQLPQLP a HLA-DQ2.

3. El método de acuerdo con la realización 1, en el que dicha glutenasa es una enzima que tiene al menos aproximadamente un 20 % de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos con una de: prolil endopeptidasa de *F. meningosepticum*, DCP I de *E. coli* y DPP IV de *Aspergillus fumigatus* (número de acceso en Genbank U87950).

4. El método de acuerdo con la realización 1, en el que dicha glutenasa tiene una actividad específica de al menos 2,5 U / mg para la escisión de un péptido que comprende uno o más motivos seleccionados del grupo que consiste en Gly-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA y Hip-His-Leu y / o una k_{cat} / K_m de al menos aproximadamente 2,5 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ para la escisión de un péptido seleccionado del grupo que consiste en (SEQ ID NO: 1)

ES 2 706 911 T3

QLQPFPPQLPY, (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY, (SEQ ID NO: 13) QPQQFFFPQQQ, (SEQ ID NO: 15) PQPELPYPQPELPY, y (SEQ ID NO: 16) QPQQSFPEQQ.

- 5 El método de acuerdo con la realización 1, en el que dicha glutenasa es una enzima que pertenece al grupo de clasificación EC 3.4.21.26, EC 3.4.14.5, o EC 3.4.15.1.
- 6 El método de acuerdo con la realización 1, en el que dicha glutenasa se formula con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 7. El método de acuerdo con la realización 1, en el que dicha glutenasa se mezcla con el alimento.
- 8 El método de acuerdo con la realización 1, en el que dicha glutenasa es estable a condiciones ácidas.
- 15 9. El método de acuerdo con la realización 1, en el que dicha glutenasa se administra por vía oral.
- 10 El método de acuerdo con la realización 9, en el que dicha glutenasa está contenida en una formulación que comprende un recubrimiento entérico.
- 20 11. Una formulación para su uso en el tratamiento de la celiaquía y / o la dermatitis herpetiforme, que comprende: una dosis efectiva de glutenasa y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 12. La formulación de acuerdo con la realización 11, en la que dicha glutenasa es una enzima capaz de escindir un sustrato pretratado, en el que dicho sustrato pretratado comprende una o más proteínas gliadina, hordeína, secalina o avenina después del pretratamiento con cantidades fisiológicas de proteasas gástricas y pancreáticas, en el que dicha glutenasa cuando se añade a una mezcla de reacción que comprende dicho sustrato pretratado, aumenta la concentración del extremo de NH₂ libre en al menos aproximadamente el 25 %, y / o reduce la concentración molar residual de oligopéptidos mayores que aproximadamente 1.000 Da en al menos aproximadamente 2 veces, y / o reduce la potencia por la cual dicho sustrato pretratado antagoniza la unión de (SEQ ID NO : 17) PQPELPYPQPQLP a HLA-DQ2.
- 30 13. La formulación de acuerdo con la realización 12, en la que dicha glutenasa es una enzima que tiene al menos aproximadamente un 20 % de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos con una de: prolil endopeptidasa de *F. meningosepticum*, DCP I de conejo y DPP IV de *Aspergillus fumigatus* (Número de acceso en Genbank U87950).
- 35 14. La formulación de acuerdo con la realización 12, en la que dicha glutenasa tiene una actividad específica de al menos 2,5 U / mg para la escisión de un péptido que comprende uno o más motivos seleccionados del grupo que consiste en Gly-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA y Hip-His-Leu y / o kcat / Km de al menos aproximadamente 2,5 s⁻¹ M⁻¹ para la escisión de un péptido seleccionado del grupo que consiste en (SEQ ID NO: 1) QLQPFPPQLPY, (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY, (SEQ ID NO: 13) QPQQFFFPQQQ, (SEQ ID NO: 15) PQPELPYPQPELPY, y (SEQ ID NO: 16) QPQQSFPEQQ.
- 40 15. La formulación de acuerdo con la realización 12, en la que dicha glutenasa es una enzima que pertenece al grupo de clasificación EC 3.4.21.26, EC 3.4.14.5, o EC 3.4.15.1.
- 45 16. La formulación de acuerdo con la realización 12, en la que dicha glutenasa es estable a condiciones ácidas.
- 50 17. La formulación de acuerdo con la realización 12, en la que dicha formulación es adecuada para administración oral.
- 55 18. La formulación de acuerdo con la realización 12, en la que dicha formulación comprende un recubrimiento entérico.
19. Un método para tratar un producto alimentario para hacer que dicho producto alimentario sea menos tóxico para un paciente con celiaquía, comprendiendo dicho método poner en contacto dicho producto alimentario con una glutenasa.
20. El método de la realización 19, en el que dicha glutenasa es prolil endopeptidasa.
- 60 21. Un oligopéptido purificado seleccionado del grupo que consiste en (SEQ ID NO: 12) LQLQPFPPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF, un oligonucleótido homólogo desamidado, un oligopéptido análogo y un conjugado de transglutaminasa tisular y un oligonucleótido homólogo.
- 65 22. Un método para diagnosticar la celiaquía en un individuo, comprendiendo dicho método la determinación de la presencia de células T en dicho individuo que son reactivas hacia el oligopéptido de la realización 21.

23. Un método para diagnosticar la celiarquía en un individuo, comprendiendo dicho método la determinación de la presencia en dicho individuo de anticuerpos específicos para el oligopéptido de la realización 21, o un derivado o conjugado del mismo.

5 24. Un método para diagnosticar celiarquía que comprende detectar la presencia de un oligopéptido de la realización 21 en un tejido, líquido corporal o heces de un individuo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

<211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Triticum aestivum
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (1)..(1)
 <223> ÁCIDO CARBOXÍLICO DE LA PIRROLIDONA
 15 <400> 2
 Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
 1 5 10
 20 <210> 3
 <211> 14
 25 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 <400> 3
 30 Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
 1 5 10
 <210> 4
 35 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 40 <400> 4
 Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro
 1 5 10
 45 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 50 <213> Triticum aestivum
 <400> 5
 Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro
 55 1 5 10
 <210> 6
 <211> 11
 60 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 6

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

5 <210> 7

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Triticum aestivum

<400> 7

Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro
 1 5

15 <210> 8

<211> 6

20 <212> PRT

<213> Triticum aestivum

25 <400> 8

Pro Gln Pro Gln Leu Pro
 1 5

30 <210> 9

<211> 13

<212> PRT

35 <213> Triticum aestivum

<400> 9

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

40 <210> 10

<211> 10

45 <212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 10

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

<210> 11

55 <211> 7

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

60 <400> 11

ES 2 706 911 T3

Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro
1 5
 5 <210> 12
 <211> 33
 <212> PRT
 10 <213> triticum aestivum
 <400> 12
Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5 10 15
Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro
20 25 30
 15 **Phe**
 <210> 13
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 <400> 13
 25 **Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Gln Gln Gln**
1 5 10
 <210> 14
 30 <211> 12
 <212> PRT
 <213> triticum aestivum
 35 <400> 14
Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr
1 5 10
 40 <210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 45 <213> Triticum aestivum
 <400> 15
Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr
1 5 10
 50 <210> 16
 <211> 10
 55 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

ES 2 706 911 T3

<400> 16
Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Gln
1 5 10
5 <210> 17
<211> 13
<212> PRT
10 <213> Triticum aestivum
<400> 17
Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro
15 1 5 10
<210> 18
<211> 14
20 <212> PRT
<213> Triticum aestivum
25 <400> 18
Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Leu Pro
1 5 10
30 <210> 19
<211> 5
<212> PRT
35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Motivo peptídico
40 <400> 19
Gly Pro Leu Gly Pro
1 5
45 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
50 <213> Secuencia Artificial
<220>
55 <223> Epítipo de células T
<400> 20
Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
60 1 5
<210> 21

<211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Epítopo de células T
 10 <400> 21
 Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln
 1 5
 15 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Epítopo de células T
 <400> 22
 Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
 1 5
 30 <210> 23
 <211> 8
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Producto de digestión
 <400> 23
 Trp Gln Ile Pro Glu Gln Ser Arg
 1 5
 <210> 24
 <211> 34
 50 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 <400> 24
 Gln Pro Gln Pro Phe Pro Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Thr Gln Pro
 1 5 10 15
 Phe Pro Pro Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Gln Tyr Pro Gln
 20 25 30
 Pro Gln
 <210> 25
 60

<211> 35

<212> PRT

5 <213> Triticum aestivum

<400> 25

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

10 <210> 26

<211> 30

15 <212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 26

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

<210> 27

25 <211> 30

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

30 <400> 27

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

35 <210> 28

<211> 7

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Sustratos sintéticos

<220>

<221> VARIANTE

50 <222> (1)...(1)

<223> Glutamina modificada con Abz

55 <220>

<221> VARIANTE
 <222> (6) ... (6)
 5 <223> Tirosina modificada con NO₂
 <400> 28
Gln Pro Gln Gln Pro Tyr Asp
1 5
 10 <210> 29
 <211> 6
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Sustratos sintéticos
 <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(1)
 <223> Glutamina modificada con Abz
 30 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (4)...(4)
 <223> Tirosina modificada con NO₂
 <400> 29
 40 **Gln Leu Pro Tyr Pro Gln**
1 5
 <210> 30
 45 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Sustratos sintéticos
 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(1)
 60 <223> Prolina modificada con Abz
 <220>

<221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 5 <223> Tirosina modificada con NO₂
 <400> 30
 Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Tyr
 1 5
 10 <210> 31
 <211> 13
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Sustratos sintéticos
 <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> lisina modificada con Abz
 30 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (7)...(7)
 <223> Tirosina modificada con NO₂
 <400> 31
 40 Pro Gln Pro Lys Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro
 1 5 10
 <210> 32
 45 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Sustratos sintéticos
 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 60 <223> Tirosina modificada con NO₂
 <220>

ES 2 706 911 T3

<221> VARIANTE

<222> (11)...(11)

5 <223> Lisina modificada con Abz

<400> 32

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

10 <210> 33

<211> 30

15 <212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 33

20 Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Trp Gln Pro Gln Gln
1 5 10 15

Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln
20 25 30

<210> 34

25 <211> 30

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

30 <400> 34

Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Thr Phe Pro Gln Gln Pro Gln Leu
1 5 10 15

Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln
20 25 30

35 <210> 35

<211> 30

<212> PRT

40 <213> Secale cereale

<400> 35

Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Thr Pro Ile Gln Pro Gln Gln
1 5 10 15

Pro Phe Pro Gln Arg Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln
20 25 30

45 <210> 36

<211> 29

50 <212> PRT

<213> Bordetella bronchiseptica

ES 2 706 911 T3

<400> 36

Gln Pro Gly Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro
1 5 10 15

Gln Pro Gln Pro Gln Pro Glu Ala Pro Ala Pro Gln Pro
20 25

5 <210> 37

<211> 30

<212> PRT

10

<213> Rattus norvegicus

<400> 37

Gln Leu Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Pro Pro
1 5 10 15

15 Gln Pro
20 25 30

<210> 38

<211> 37

20

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

25 <400> 38

Met Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5 10 15

Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Phe Arg Pro Gln Gln Ser Tyr
20 25 30

Pro Gln Pro Gln Pro
35

30 <210> 39

<211> 36

<212> PRT

35 <213> Triticum aestivum

<400> 39

Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Arg Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5 10 15

Gln Pro Phe Arg Pro Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Gln Tyr
20 25 30

Ser Gln Pro Gln
35

40

<210> 40

<211> 36

45 <212> PRT

ES 2 706 911 T3

<213> Triticum aestivum

<400> 40

Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Ser Gln Pro
1 5 10 15

Gln Pro Phe Arg Pro Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Gln Tyr
20 25 30

Ser Gln Pro Gln
35

5

<210> 41

<211> 35

10

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

15

<400> 41

Gln Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Ile Pro Gln Gln Pro Gln Pro
1 5 10 15

Tyr Pro Gln Gln Pro Gln Pro Tyr Pro Gln Gln Pro Phe Pro Pro Gln
20 25 30

Gln Pro Phe
35

<210> 42

20

<211> 290

<212> PRT

25

<213> Triticum aestivum

<400> 42

30

35

40

45

50

ES 2 706 911 T3

1 Met Val Arg Val Pro Val Pro Gln Leu Gln Pro Gln Asn Pro Ser Gln
 5 Gln Gln Pro Gln Glu Gln Val Pro Leu Val Gln Gln Gln Gln Phe Pro
 10 Gly Gln Gln Gln Pro Phe Pro Pro Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro Gln
 15 Pro Phe Pro Ser Gln Gln Pro Tyr Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln
 20 Gln Ser Gln Pro Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Gln Pro Ile Ser Gln Gln
 25 Gln Lys Gln Gln Gln Gln
 30 Arg Asp Val Val Leu Gln Gln His Ser Ile Ala Tyr Gly Ser Ser Gln
 35 Val Leu Gln Gln Ser Thr Tyr Gln Leu Val Gln Gln Leu Cys Cys Gln
 40 Gln Leu Trp Gln Ile Pro Glu Gln Ser Arg Cys Gln Ala Ile His Asn
 45 Val Val His Ala Ile Ile Leu His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 50 Gln Gln Gln Gln Pro Leu Ser Gln Val Ser Phe Gln Gln Pro Gln Gln
 55 Gln Tyr Pro Ser Gly Gln Gly Ser Phe Gln Pro Ser Gln Gln Asn Pro
 60 Gln Ala Gln Gly Ser Val Gln Pro Gln Gln Leu Pro Gln Phe Glu Glu
 65 Ile Arg Asn Leu Ala Leu Glu Thr Leu Pro Ala Met Cys Asn Val Tyr
 70 Ile Pro Pro Tyr Cys Thr Ile Ala Pro Val Gly Ile Phe Gly Thr Asn
 75 Tyr Arg
 80

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación que comprende una prolil endopeptidasa (PEP) que es capaz de atenuar la toxicidad del gluten, para usar en un método para mejorar la digestión del gluten y reducir los efectos nocivos de un péptido largo del gluten, incluido el oligopéptido establecido en la SEQ ID NO: 12 en un sujeto que no sabe que tiene celiaquía mediante la administración de dicha preparación a dicho sujeto.
- 10 2. Una preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha preparación es para administración con una comida.
3. Una preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha preparación es para administración mediante la incorporación de dicha preparación en un producto alimentario.
- 15 4. Una preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha PEP es un miembro de la superfamilia de serina proteasa y tiene una tríada catalítica conservada compuesta por los restos de Ser, His y Asp.
- 20 5. Una preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha PEP tiene una k_{cat} / K_m de al menos $250 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ en condiciones fisiológicas para escindir un péptido seleccionado del grupo que consiste en QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO: 1), PQPQLPYPQPQLPY (SEQ ID NO: 3), QPQQSFPQQ en caso de que sea necesario, en caso de que sea necesario. (SEQ ID NO: 15) y QPQQSFPEQQ (SEQ ID NO: 16) en fragmentos no tóxicos para un paciente con celiaquía.
- 25 6. Una preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha k_{cat} / K_m es de al menos $25.000 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$.
- 30 7. Una preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha PEP tiene una actividad específica de al menos $2,5 \text{ U} / \text{mg}$ para la escisión de un péptido que comprende Z-Gly-Pro-pNA, en la que Z es un grupo benciloxycarbonilo, pNA es para-nitroanilida, y 1 U es la cantidad de enzima requerida para catalizar la rotación de $1 \mu\text{mol}$ de sustrato por minuto.
- 35 8. Una preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha PEP es una forma purificada o recombinante de una prolil endopeptidasa natural.
9. Una preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha PEP es de un organismo seleccionado de entre *Flavobacterium meningosepticum*, *Aeromonas hydrophila*, *Sphingomonas capsulata*, *Aeromonas punctata*, *Novosphingobium capsulatum*, y *Pyrococcus furiosus*.
- 40 10. Una preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una o más glutenasas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 11. Una preparación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que es una forma estabilizada resistente a condiciones ácidas.
12. Una preparación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que dicha PEP está en el grupo de clasificación EC 3.4.21.26.
- 50 13. La preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, formulada con un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.
- 55 14. La preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dicha formulación farmacéutica es adecuada para administración oral.
- 60 15. La preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicha formulación farmacéutica está contenida en un recubrimiento entérico.
- 65 16. Un método *in vitro* para mejorar la digestión del gluten y reducir los efectos nocivos de un péptido largo del gluten que incluye el oligopéptido establecido en la SEQ ID NO: 12 en un sujeto que no se sabe que tiene celiaquía, comprendiendo dicho método poner dicho producto alimentario que contiene gluten en contacto con una prolil endopeptidasa, en la que dicha prolil endopeptidasa es enzimáticamente activa durante la ingestión por dicho sujeto, y en la que los péptidos de gluten inmunogénicos en el producto alimentario que contiene gluten se escinden en fragmentos no tóxicos.
17. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el producto alimentario comprende trigo, avena o centeno.
18. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el producto alimentario es harina de trigo que

ES 2 706 911 T3

contiene gluten y la eficacia del método se prueba mediante la determinación de la escisión de los péptidos de gliadina por LC-MS.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1A

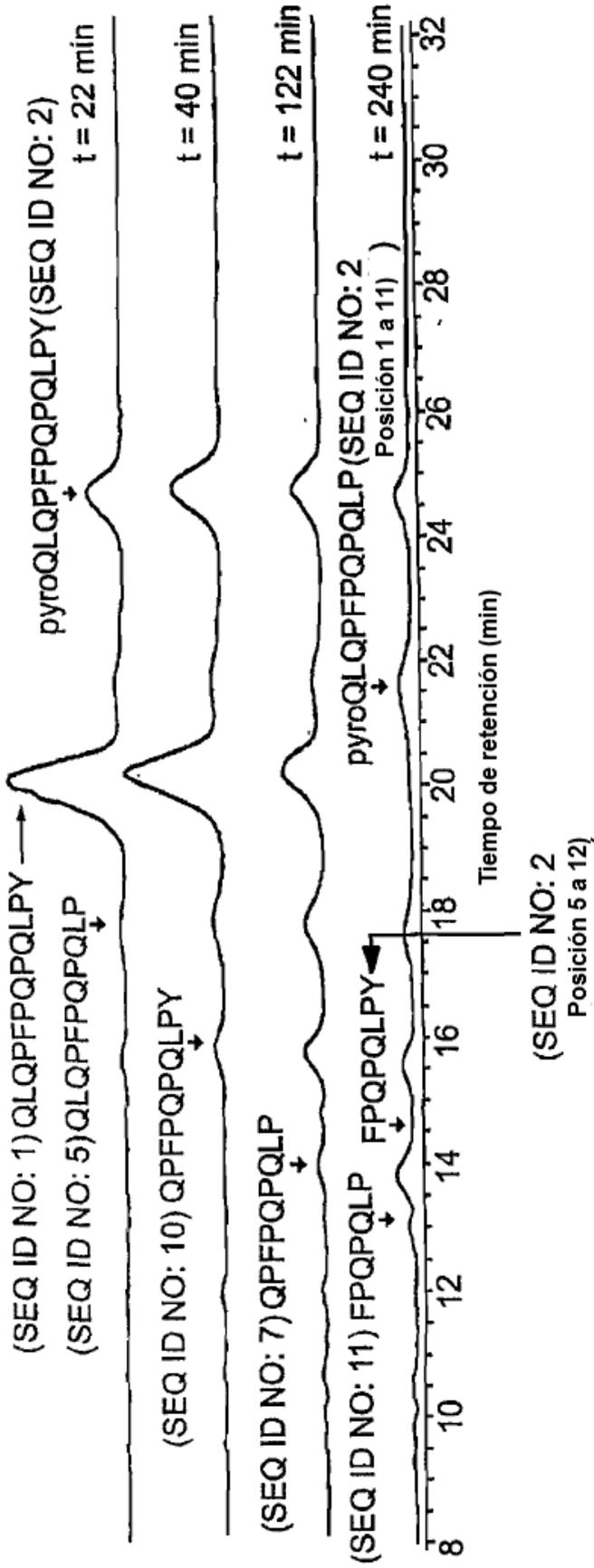


FIG. 1B

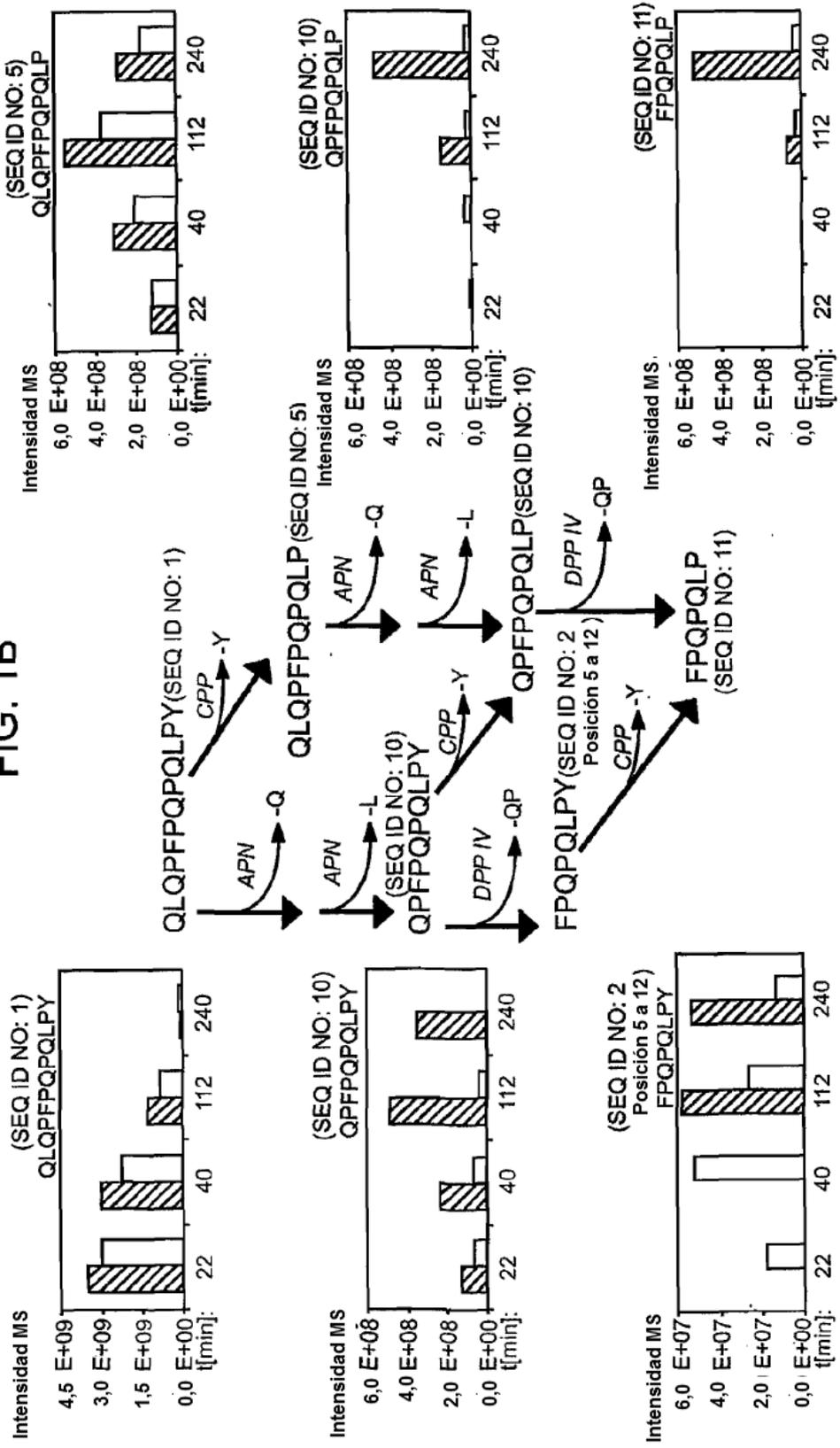


FIG. 2A

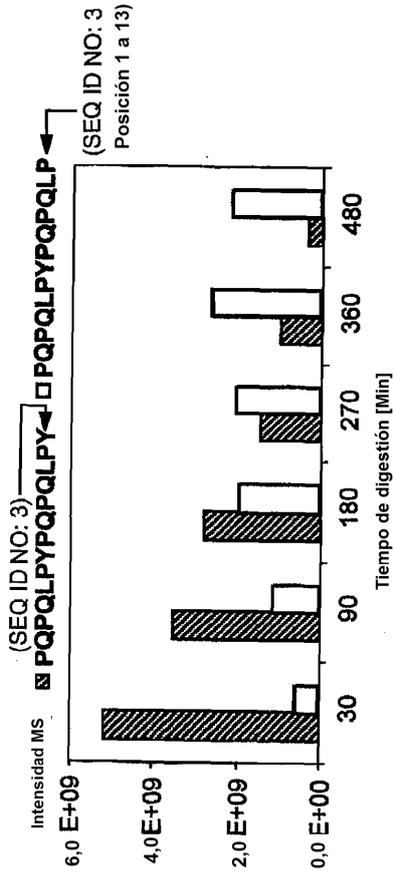
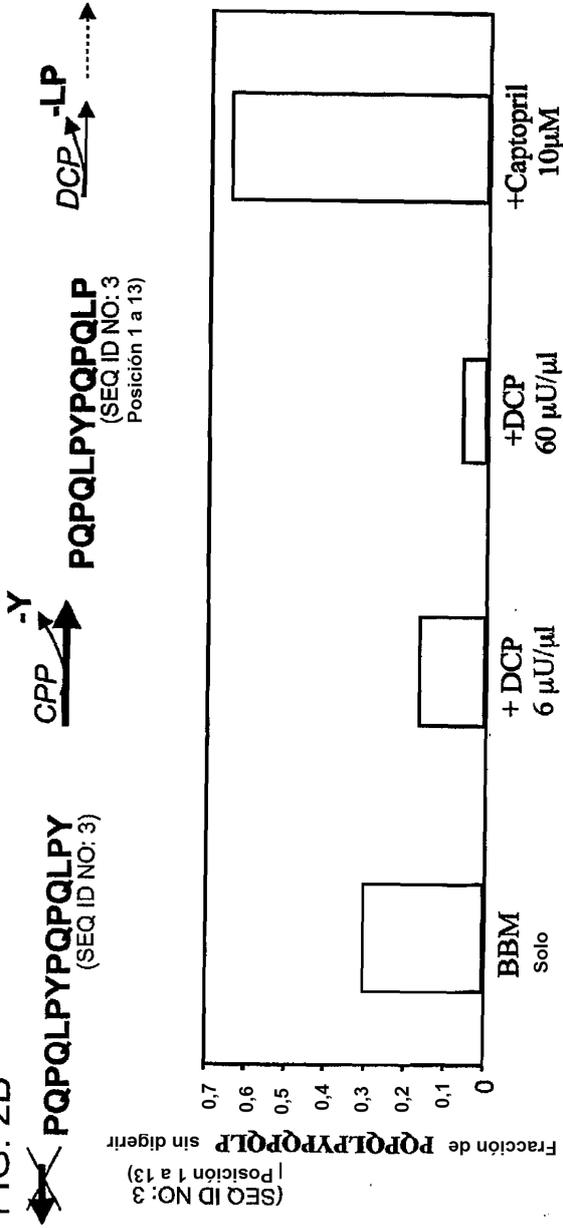
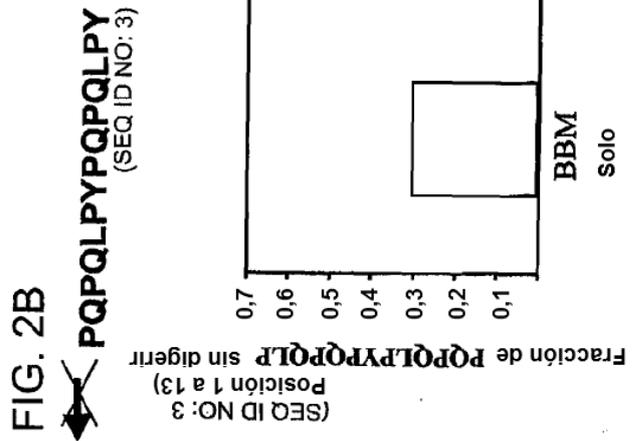
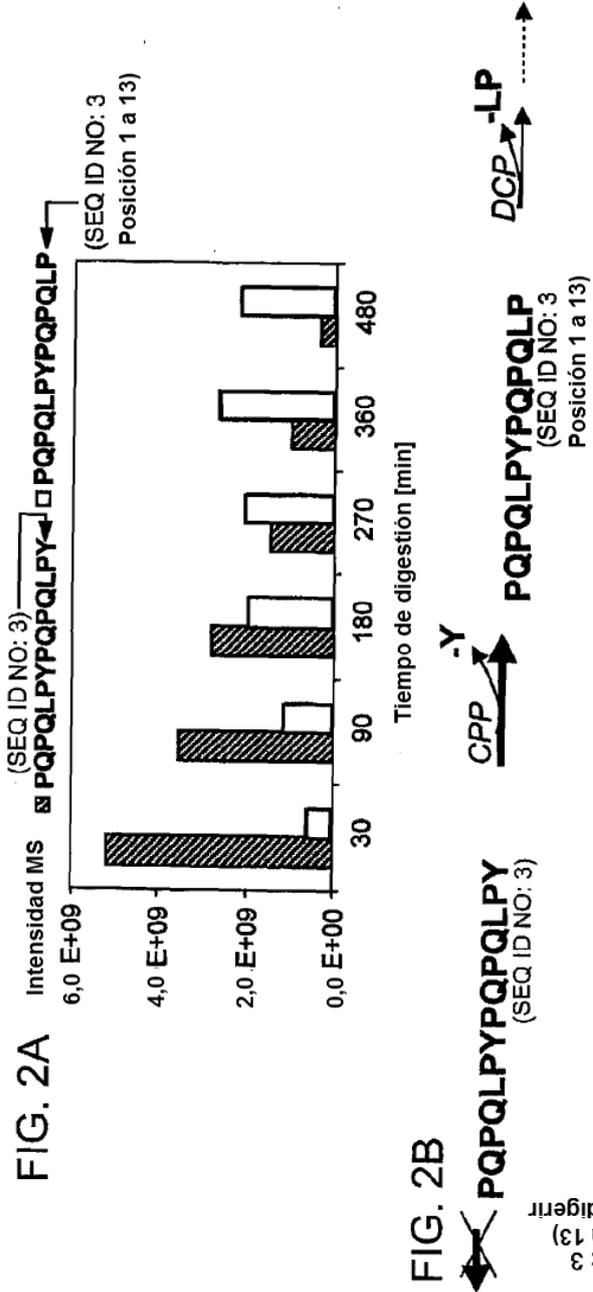


FIG. 2B





Posición 1 a 13)

Fración de P_QP_QL_PY_PQ_PL_P sin digerir (SEQ ID NO: 3)

FIG. 3

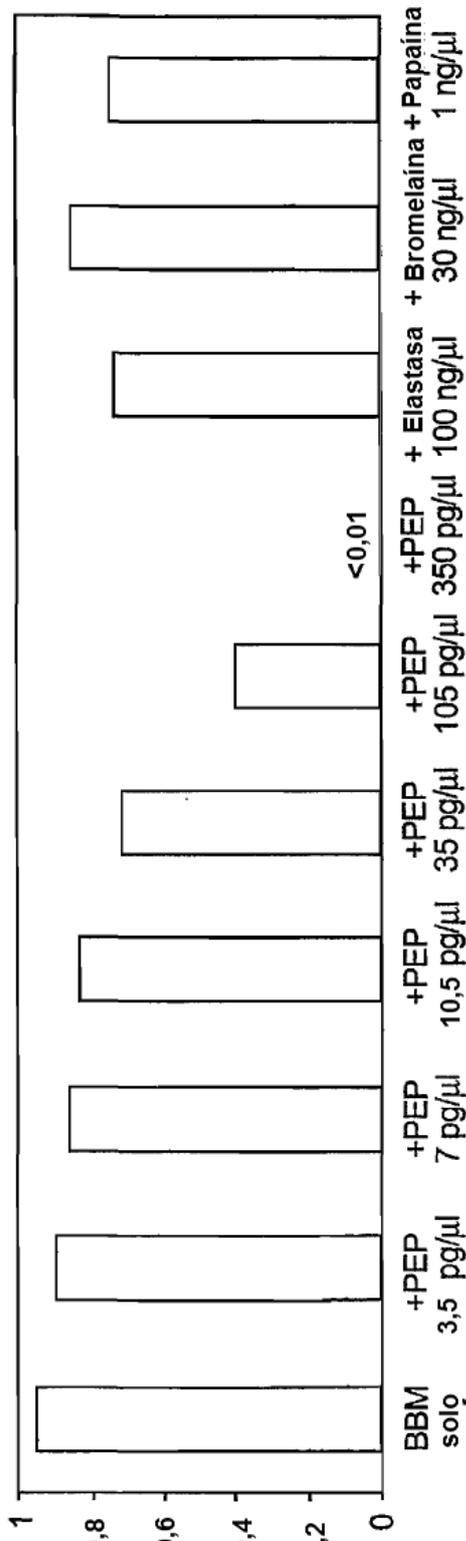


FIG. 4

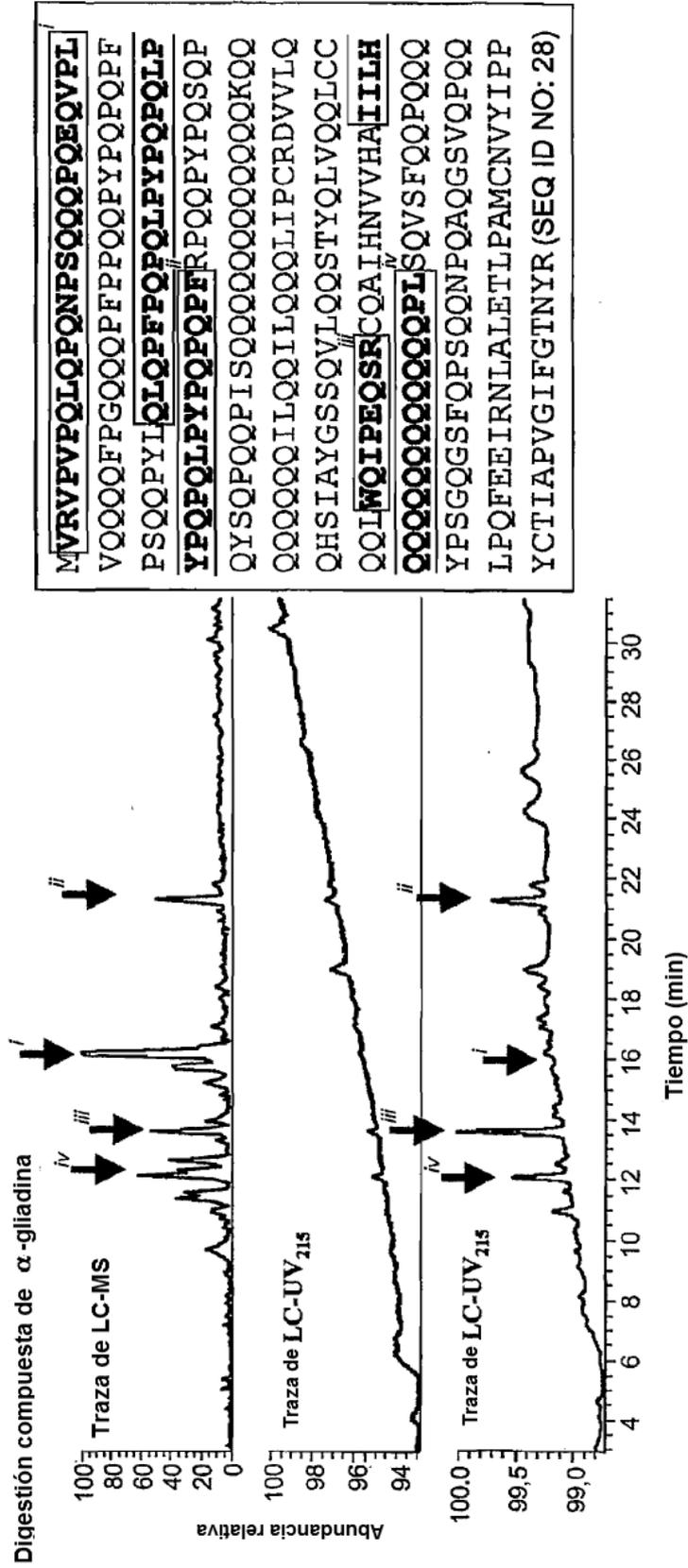


FIG. 5

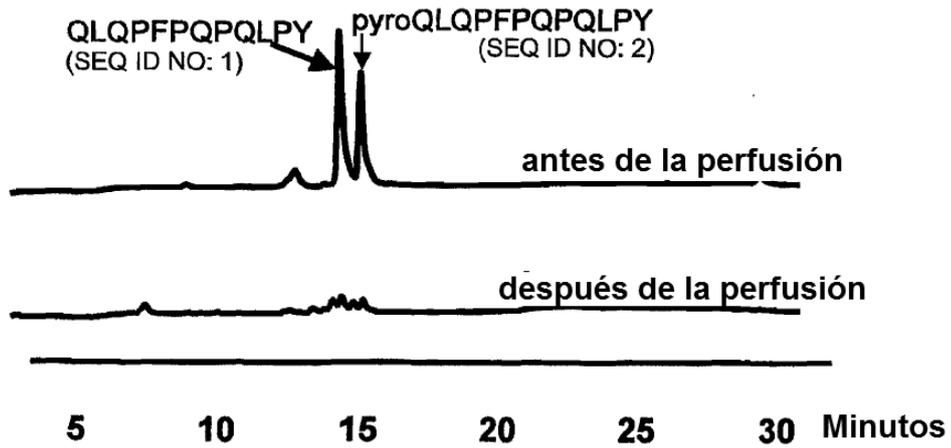
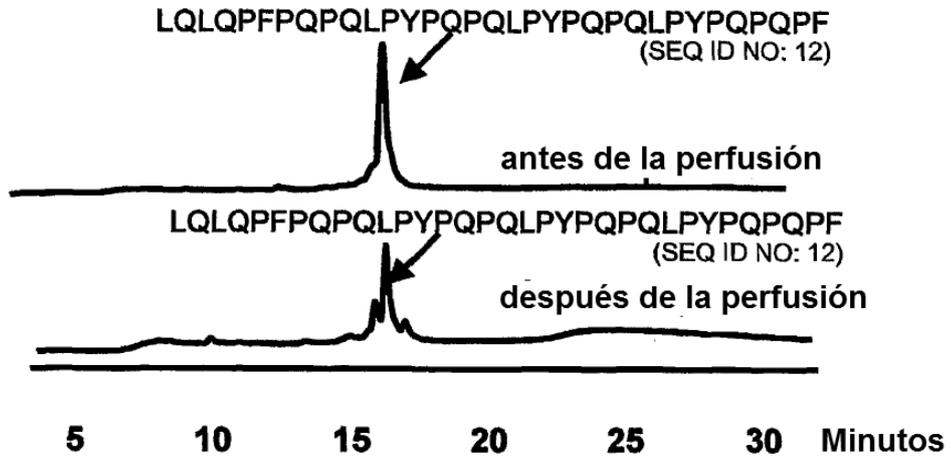


FIG. 6

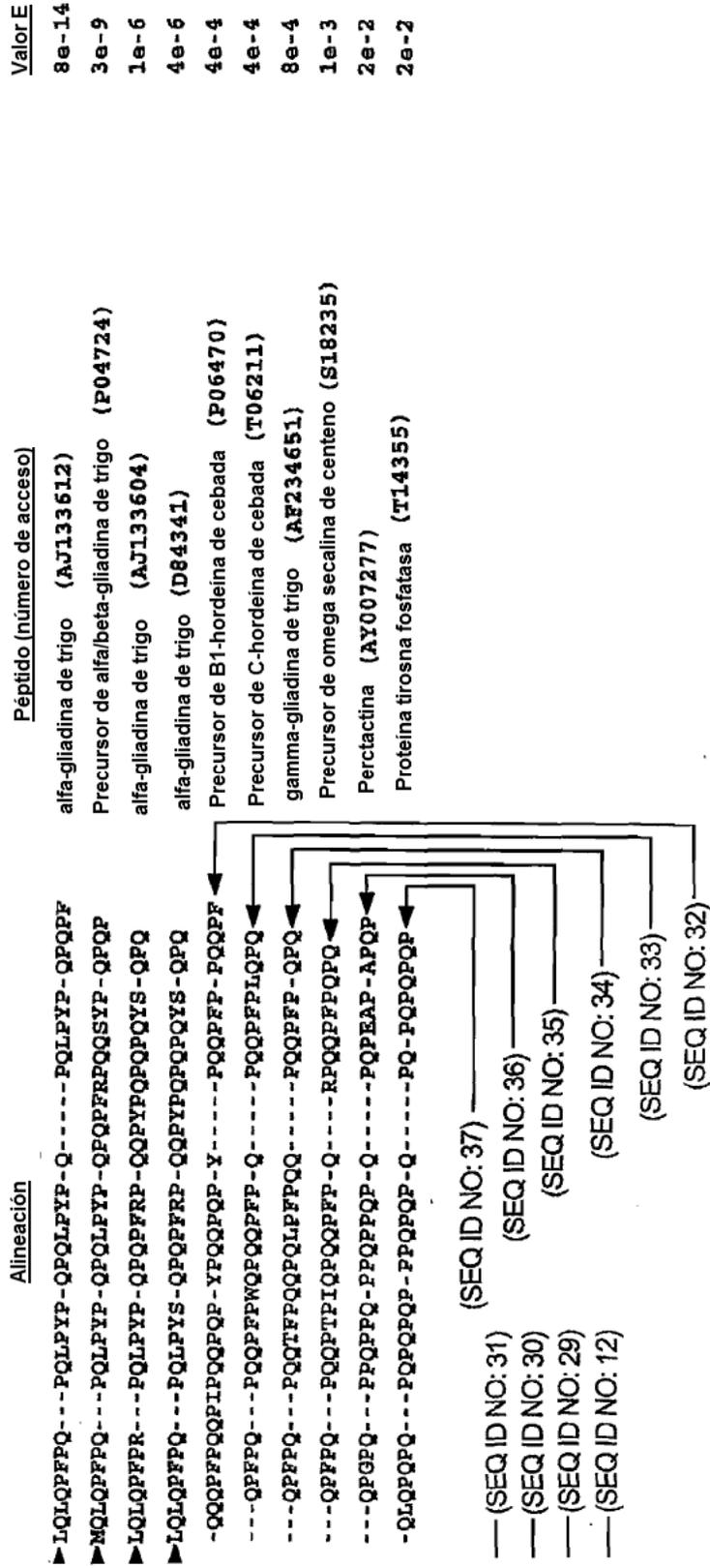


FIG. 7

