(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 746 173**

(51) Int. CI.:

A61K 38/48 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2004 PCT/EP2004/010782**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2005 WO05027953**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2004 E 04765616 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 1663298**

(54) Título: **Uso de endoproteasas específicas para prolina para hidrolizar péptidos y proteínas**

(30) Prioridad:

23.09.2003 EP 03078012
06.11.2003 EP 03078496

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2020

(73) Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

(72) Inventor/es:

EDENS, LUPPO;
VAN DER HOEVEN, ROBERTUS, ANTONIUS, MIJNDERT;
DE ROOS, ANDRE, LEONARDUS y
HARVEY, MELISSA

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Uso de endoproteasas específicas para prolina para hidrolizar péptidos y proteínas

Campo

La presente invención se refiere a la hidrólisis proteolítica de un péptido o polipéptido.

Antecedentes

Proteínas dietéticas ricas en prolina, tales como las caseínas en la leche bovina o gluten en los cereales, son conocidos por resistir la degradación proteolítica en el tracto gastrointestinal humano. Como resultado, los péptidos ricos en prolina pueden acumularse y pueden conducir a efectos no deseados en grupos específicos de individuos. Algunos de estos efectos se han atribuido al hecho de que los péptidos ricos en prolina actúan como opioides que se unen a receptores en los tejidos periféricos y el sistema nervioso central. Por ejemplo, los síndromes mostrados por pacientes autistas y esquizofrénicos se han relacionado con el consumo de proteínas dietéticas ricas en prolina. Otros efectos son el resultado de una intolerancia a los péptidos ricos en prolina. Por ejemplo, secuencias específicas ricas en prolina son responsables de la toxicidad observada del gluten en la enfermedad celíaca. La enfermedad celíaca es una enfermedad autoinmune del intestino delgado ampliamente prevalente que solo puede ser tratada con una dieta sin gluten de por vida. En ocasiones, la enfermedad celíaca también va acompañada de síntomas psiquiátricos y neurológicos que ilustran las consecuencias de largo alcance que puede tener un metabolismo alterado de péptidos ricos en prolina.

Las proteínas de la leche bovina se asocian con el crecimiento y la salud y forman un ingrediente importante en la dieta humana. La caseína constituye aproximadamente el 80% de la proteína total en la leche bovina y es una fuente importante de aminoácidos, calcio y fosfato. La caseína consiste en aproximadamente el 50% de alfa-caseínas, 35% de beta-caseínas, 13% de kappa-caseínas y 3% de gamma-caseínas. En la leche humana, la fracción de alfa-caseína generalmente está ausente.

Se sabe que tras la metabolización de la caseína se forma un cierto número de nuevos péptidos bioactivos. A partir de las fracciones de alfa- y beta-caseína, se han identificado y aislado péptidos opioides denominados alfa-casomorfinas y beta-casomorfinas, respectivamente. Los efectos farmacológicos de especialmente las beta-casomorfinas han sido ampliamente estudiados. La beta-casomorfina con la secuencia Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile es el péptido opioide principal en la leche bovina y se denomina BCM-7 (beta-casomorfina (1-7); Chang *et al.* (1985) Journal of Biological Chemistry, 260, 9706-9712). Aparte de este fragmento BCM-7 en las posiciones de aminoácidos 60-66 de la molécula de beta-caseína, fragmentos más pequeños de BCM-7, tales como Tyr-Pro-Phe-Pro (beta-casomorfina (1-4)) y Tyr-Pro- Phe-Pro-Gly (beta-casomorfina (1-5)) en las posiciones de aminoácidos 60-63 y 60-64, respectivamente, así como todos los péptidos más grandes relacionados con BCM-7 de hasta una longitud de cadena de 11 aminoácidos (en las posiciones de aminoácidos 60-70) muestran al menos algún grado de actividad opioide. El tripéptido N-terminal de BCM-7, es decir, la secuencia Tyr-Pro-Phe en la posición 60-62, no tiene actividad opioide. Se afirma que una variante genética de beta-caseína denominada A1 (que tiene una histidina en lugar del residuo de prolina de beta-caseína A2 en la posición de aminoácido 67) conduce a la formación de niveles incrementados de la molécula de BCM-7.

La razón básica para la generación de las diversas beta-casomorfinas es que su secuencia de aminoácidos es relativamente rica en residuos de prolina. Debido a que los enlaces peptídicos que implican residuos de prolina resisten la descomposición proteolítica, las secuencias de beta-casomorfina tienden a sobrevivir a la exposición a las proteasas gastrointestinales en el estómago y la luz intestinal. Por la misma razón, se puede suponer que estas secuencias de beta-casomorfina tienden a sobrevivir a las incubaciones con otras proteasas, por ejemplo, aquellas proteasas comúnmente utilizadas en la producción industrial de hidrolizados de proteínas. Esta suposición implica que los hidrolizados de proteínas comúnmente disponibles o los productos que contienen estos hidrolizados de proteínas contienen todos la BCM-7 o péptidos estrechamente relacionados. Como el fragmento de péptido BCM-7 y sus moléculas relacionadas se han relacionado con determinadas enfermedades, la presencia de tales moléculas en los hidrolizados de proteínas, utilizados bastante a menudo en la dieta de grupos vulnerables, tales como bebés, ancianos y pacientes, es una situación indeseable. Los resultados de los ensayos de unión a receptores de opiáceos de beta-casomorfinas humanas y bovinas indican que los fragmentos con actividad opioide se unen con receptores de opiáceos en la membrana del cerebro de la rata. Se ha demostrado que las beta-caseínas son más selectivas hacia los ligandos mu con poca afinidad por los subtipos de receptores delta y kappa. De acuerdo con estos y otros estudios, se reivindica que las beta-casomorfinas tienen diversos efectos gastrointestinales, analgésicos, respiratorios, cardiovasculares, endocrinos e inmunomoduladores. Una característica estructural común de los péptidos opioides que incorporan un residuo de prolina es el motivo Tyr-Pro-Phe/Trp (Okada et al, Vitamins and Hormones 2002, 65, 257-279).

A pesar de que en los individuos normales las peptidasas en la capa epitelial del intestino y en la sangre pueden hacer frente a las beta-casomorfinas, este no parece ser siempre el caso para los pacientes que padecen esquizofrenia, autismo, TDAH u otros trastornos del estado de ánimo. Por ejemplo, alteraciones genéticas en la actividad enzimática de la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) en plasma que conducen a una descomposición incompleta de los péptidos ricos en prolina se han relacionado con la aparición de estas enfermedades. Además, se encuentra regularmente hiperpeptiduria, es decir, un aumento de la concentración de caseína o péptidos derivados del gluten en la orina (Reichelt, W. H. et al; (1997) Dev. Brain Dysfunct; 10: 44-55). La bibliografía científica reciente proporciona evidencia convincente de que una degradación incompleta de péptidos ricos en prolina puede contribuir al desarrollo y la gravedad de enfermedades de este tipo. Aparte del fragmento de BCM-7 derivado de caseína, también se han mencionado péptidos resistentes a la proteasa derivados del gluten a este respecto. Ya en 1979 Panksepp (Trends in Neuroscience 1979;2:174-177) propuso la teoría del exceso de opioides en la que sugirió que un metabolismo opioide alterado es parte de la patogénesis en el autismo. Hoy en día entendemos que muchos péptidos ricos en prolina son altamente resistentes a la escisión por peptidasas gástricas y pancreáticas, tales como pepsina, tripsina, quimotripsina y similares, y que solo las enzimas específicas, como las presentes en otras, son la capa epitelial del borde en cepillo del tracto gastrointestinal, son capaces de hidrolizar enlaces peptídicos que implican prolina.

El gluten es la fracción de proteína insoluble de cereales tales como el trigo, centeno, avena, cebada, maíz y arroz que queda después del lavado para separar los componentes de almidón e hidrosolubles. El gluten se puede subdividir en 4 fracciones principales de solubilidad, es decir, albúmina, globulina, prolamina y glutelina. Entre éstas, especialmente las fracciones de prolamina y glutelina de trigo, maíz, cebada y avena se caracterizan por contenidos relativamente altos de los aminoácidos prolina y glutamina. La evidencia reciente ha implicado las secuencias de gluten ricas en prolina como un factor importante en el desarrollo de la enfermedad celíaca. La enfermedad celíaca, también conocida como esprúe celiaco es una enfermedad autoinmunitaria del intestino delgado provocada por la ingesta de proteínas de gluten. Habitualmente aparece en la primera infancia con síntomas graves, tales como diarrea crónica y distensión abdominal; más adelante en la vida, los síntomas incluyen fatiga, pérdida de peso debido a malabsorción y síntomas neurológicos. Entre las fracciones ricas en prolina de los diversos cereales, la alfa-gliadina del trigo, la hordeína de la cebada, la secalina del centeno y la avenina de la avena parecen ser las más tóxicas (Schuppan, D.; Gastroenterology 2000;119:234-242). Una dieta sin gluten de por vida es el único tratamiento efectivo para pacientes con enfermedad celíaca. Entre los pacientes celíacos se ha observado una alta prevalencia de diversos trastornos autoinmunes, especialmente diabetes tipo 1, dermatitis herpetiforme, tiroiditis autoinmune, enfermedades del colágeno, alopecia autoinmune y hepatitis autoinmune. Esto indica que, por mecanismos desconocidos, la enfermedad celíaca no tratada predispone a la autoinmunidad a otros órganos (Schuppan, D. 2000 Gasteroenterology 119:234-242). Además, hay indicios de que una forma leve de enfermedad celíaca está presente en un grupo de personas que padecen el síndrome del intestino irritable (IBS, por sus siglas en inglés). El IBS es un trastorno que interfiere con las funciones normales del intestino grueso y se caracteriza por dolor abdominal con calambres, estreñimiento y diarrea. El IBS comienza generalmente alrededor de los 20 años y provoca mucho malestar y angustia. El consumo de trigo, cebada, centeno o productos lácteos se ha asociado con un empeoramiento de los síntomas del IBS.

Recientemente, Shan et al (Science; vol 297, 27 de septiembre de 2002:2275-2279) identificó un péptido de 33 aminoácidos de longitud, derivado de gliadina y rico en prolina, que se pensó que era la fuente de un conjunto de epítopos principales de células T específicos para pacientes celiacos. Mientras que un extracto enzimático preparado a partir de células del borde en cepillo del intestino delgado fue incapaz de hidrolizar este 33-mero, la complementación con una prolil oligopeptidasa bacteriana de *Flavobacterium meningosepticum* condujo a una digestión rápida con una estimulación concomitante fuertemente disminuida de un clon de células T relevante. En imitación de trabajos anteriores sobre la administración oral de papaína (Messer, M. y Baume, P.E.; Lancet 1976;2:1022), el artículo indica el potencial de la prolil oligopeptidasa como enzima dietética en la desintoxicación del gluten mediante terapia enzimática.

Prolil oligopeptidasas (EC 3.4.21.26) tienen la posibilidad única de escindir preferentemente péptidos en el lado carboxilo de residuos de prolina. En las prolil oligopeptidasas aisladas de fuentes de mamíferos, así como en la prolil oligopeptidasa aislada de *Flavobacterium meningosepticum,* se ha identificado un dominio de peptidasa único que excluye las proteínas estructuradas grandes del sitio activo de la enzima. De hecho, estas enzimas son incapaces de degradar las proteínas que contienen más de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos, de modo que a estas enzimas se las alude ahora como "prolil *oligopeptidasas"* (Fulop et al: Cell, Vol. 94, 161-170, 24 de julio de 1998). Todas las prolil oligopeptidasas conocidas son enzimas citosólicas que exhiben un pH óptimo cercano a la neutralidad y se caracterizan por el hecho de que no pueden degradar eficientemente las moléculas que contienen más de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos. El hecho de que estas enzimas exhiban un pH óptimo que se corresponde con los valores de pH que prevalecen en la parte más distal del tracto gastrointestinal, los hace idealmente adecuados como complementos dietéticos que apoyan el proceso de digestión intestinal del gluten dietético.

Otra enzima que puede tener un beneficio en la inactivación de los péptidos ricos en prolina tóxica, es la enzima dipeptidil peptidasa IV (documento US2002/0041871A). Dipeptidilpeptidasa IV, también denominada Xaa-Pro-dipeptidil-aminopeptidasa (EC 3.4.14.5) cataliza la liberación de un dipéptido N-terminal, Xaa-Xbb de un péptido con la secuencia N-terminal Xaa-Xbb-Xcc-, preferiblemente cuando Xbb es prolina y siempre que Xcc no sea prolina. La dipeptidil-peptidasa IV se ha aislado de un gran número de fuentes de mamíferos, por ejemplo, las membranas del borde en cepillo intestinal forman una rica fuente de la enzima. Además, la enzima ha sido aislada de fuentes microbianas, tales como los microorganismos de calidad alimentaria Saccharomyces, Lactococcus y Aspergillus. Al igual que las prolil oligopeptidasas, todas las dipeptidil-peptidasas IV conocidas son enzimas con un pH óptimo casi neutro y, por lo tanto, adecuadas para apoyar el proceso de digestión intestinal.

Debido a las posibles implicaciones de la oligopeptidasa específica para prolina y de la dipeptidil-peptidasa IV en el tratamiento de la enfermedad celíaca o la esquizofrenia, el autismo u otros trastornos del estado de ánimo, estos datos han dado como resultado un cierto número de solicitudes de patente que tratan de diversos aspectos de este asunto. Por ejemplo, los documentos US 6.447.772 y WO 01/24816 describen composiciones que contienen dipeptidil peptidasa IV, el documento WO 03/068170 describe composiciones que contienen oligopeptidasas específicas para prolina combinadas opcionalmente con dipeptidil-peptidasa IV, el documento WO 02/45523 describe hidrolizados de proteínas con bajo contenido de alérgenos preparados con endoproteasas específicas para prolina y el documento WO 03/028745 describe composiciones que comprenden cepas bacterianas que pueden disminuir la concentración de péptidos ricos en prolina tóxica intestinal. El documento WO 03/28745 no describe una endoproteasa específica para prolina que sea activa a pH bajo y en presencia de pepsina. El documento WO 96/36239 describe las ventajas de productos derivados del ganado, sustancialmente libres del alelo beta-caseína A1.

Sumario

La presente descripción se refiere a un procedimiento para la hidrólisis proteolítica de un péptido o un polipéptido, comprendiendo dicho péptido o polipéptido de 4 a 40, preferiblemente de 5 a 35, residuos de aminoácidos, y dicho péptido o polipéptido no es hidrolizable por subtilisina, por lo que dicho péptido o polipéptido es hidrolizado por una endoproteasa específica para prolina a un pH de 6,5 o inferior, preferiblemente 5,5 o inferior y más preferiblemente 5,0 o inferior para hidrolizar dicho péptido o polipéptido. Preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, y lo más preferiblemente al menos 90% del péptido o polipéptido se hidroliza en este procedimiento.

El procedimiento de la descripción se refiere a un procedimiento para la hidrólisis proteolítica de un péptido o un polipéptido, comprendiendo dicho péptido o polipéptido de 4 a 40, preferiblemente de 5 a 35, residuos de aminoácidos y comprende el motivo tripéptido Glu-Xxx-Pro, Gln-Xxx-Pro, Tyr-Pro-Phe o Tyr-Pro-Trp, con lo que dicho péptido o polipéptido es hidrolizado por una endoproteasa específica para prolina a un pH de 6,5 o inferior, preferiblemente 5,5 o inferior y más preferiblemente 5,0 o inferior para hidrolizar dicho péptido o polipéptido. Preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, y lo más preferiblemente al menos 90% del péptido o polipéptido se hidroliza en este procedimiento.

Además, la presente descripción proporciona un procedimiento para la hidrólisis proteolítica de un péptido o un polipéptido, comprendiendo dicho péptido o polipéptido de 4 a 40, preferiblemente de 5 a 35 residuos de aminoácidos, y en el que los residuos de aminoácidos del péptido o polipéptido comprende para al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, residuos de prolina y/o glutamina, mediante los cuales dicho péptido o polipéptido es hidrolizado por una endoproteasa específica para prolina a un pH de 6,5 o inferior, preferiblemente 5,5 o inferior y más preferiblemente 5,0 o inferior para hidrolizar dicho péptido o polipéptido, con la condición de que el péptido o polipéptido comprenda al menos 10% de residuos de prolina. Preferiblemente, al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, y lo más preferiblemente al menos 90% del péptido o polipéptido es hidrolizado en este procedimiento.

Preferiblemente, el péptido o polipéptido en el procedimiento de la descripción comprende el motivo Gln-Xxx-Pro o Glu-Xxx-Pro y contiene 9 o más residuos de aminoácidos. Este péptido o polipéptido se hidroliza ventajosamente en un péptido que contiene 8 o menos residuos de aminoácidos. En el caso de que el péptido o polipéptido tenga el motivo Tyr-Pro-Phe o Tyr-Pro-Trp, preferiblemente el enlace entre Pro y Phe o Pro y Trp se hidroliza.

La endoproteasa específica para endoprolina preferida utilizada es preferiblemente una endoproteasa específica para prolina derivada de *Aspergillus* o perteneciente a la familia S28 de serina proteasas. Esta enzima tiene preferiblemente un pH óptimo por debajo de 6,5, preferiblemente por debajo de 5,5, más preferiblemente por debajo de 5,0 para hidrolizar un péptido o polipéptido que comprende de 4 a 40, preferiblemente de 5 a 35 residuos de aminoácidos que no se pueden hidrolizar por subtilisina.

La presente invención se refiere a la endoproteasa específica para prolina que comprende un polipéptido que tiene identidad de al menos 90% con los aminoácidos 1 a 526 de SEQ ID NO: 2 que tiene un pH óptimo por debajo de 6,5, preferiblemente por debajo de 5,5, más preferiblemente por debajo de 5,0, que es capaz de escindir epítopos de gluten a valores de pH inferiores a 5 y en presencia de pepsina, para uso como un medicamento o para uso en la fabricación de un medicamento.

La endoproteasa específica para prolina se puede utilizar para hidrolizar a pH por debajo de 5,5, los péptidos ricos en prolina que se ponen en relación con trastornos psiquiátricos incluyendo el autismo, esquizofrenia, ADHD, trastorno bipolar del estado del ánimo y la depresión y trastornos ligados a la enfermedad celíaca que son trastornos autoinmunes, especialmente diabetes tipo 1, dermatitis herpetiforme, tiroiditis autoinmune, enfermedades del colágeno, alopecia autoinmune y hepatitis autoinmune e IBS.

Ventajosamente, esta enzima se utiliza para producir alimentos, por ejemplo cerveza o pan que está desprovisto de epítopos relacionados celíacos, preferiblemente epítopos de gluten, más preferiblemente epítopos de trigo o de cebada.

La presente invención también se refiere a endoproteasa específica para prolina para uso como un medicamento o para uso en la fabricación de un medicamento, que es preferiblemente un Aspergillus, más preferiblemente una enzima de Aspergillus niger.

De acuerdo con otra realización de la invención, una endoproteasa específica para prolina se utiliza para la fabricación de un complemento dietético o un medicamento para el tratamiento o la prevención de trastornos psiquiátricos, incluyendo autismo, esquizofrenia, ADHD, trastorno bipolar del estado del ánimo y depresión y trastornos ligados a la enfermedad celíaca que son trastornos autoinmunes, especialmente diabetes tipo 1, dermatitis herpetiforme, tiroiditis autoinmune, enfermedades del colágeno, alopecia autoinmune y hepatitis autoinmune e IBS.

Ventajosamente, se utiliza una endoproteasa específica para prolina para la fabricación de un complemento dietético o un medicamento para individuos menores de 25 años.

De acuerdo con la presente invención, una endoproteasa específica para prolina, que tiene identidad de al menos 90% con los aminoácidos 1 a 526 de la SEQ ID NO: 2 que tienen un pH óptimo por debajo de 6,5, preferiblemente por debajo de 5,5, más preferiblemente por debajo de 5,0, que es capaz de escindir epítopos de gluten a valores de pH inferiores a 5 y en presencia de pepsina se utiliza para la fabricación de un complemento dietético o un medicamento para el tratamiento o la prevención de trastornos psiquiátricos que incluyen autismo, esquizofrenia, ADHD, trastorno bipolar del estado de ánimo y depresión y trastornos vinculados a la enfermedad celíaca que son trastornos autoinmunes, especialmente diabetes tipo 1, dermatitis herpetiforme, tiroiditis autoinmune, enfermedades del colágeno, alopecia autoinmune y hepatitis autoinmune e IBS.

Además, la presente descripción se refiere al uso de endoproteasa específica para prolina para hidrolizar proteínas o péptidos que tienen más de 30 residuos de aminoácidos. En los usos de acuerdo con la invención, preferiblemente se emplea endoproteasa específica para prolina *de Aspergillus,* más preferiblemente de *A. niger*.

La presente descripción también se refiere al uso de una proteasa específica para prolina que es activa a un pH de 5 o por debajo de 5 en presencia de pepsina.

La presente descripción se refiere a un procedimiento para la hidrólisis proteolítica de dichos péptidos o proteínas presentes en las proteínas de la leche obtenida de ganado vacuno que llevan el alelo de beta-caseína A1 o de beta-caseína A2.

La proteína también se puede utilizar en el procedimiento de la descripción. Primero, la proteína tiene que hidrolizarse en péptidos que comprenden de 4 a 40 residuos de aminoácidos. La hidrólisis de proteínas se puede realizar antes o simultáneamente con el procedimiento de la presente descripción.

Además, la presente descripción se refiere al uso de una endoproteasa específica para prolina que tiene un óptimo de pH por debajo de 6,5, preferiblemente por debajo de 5,5, más preferiblemente por debajo de 5,0 como un complemento dietético, como un medicamento, para la producción de un complemento dietético, para la producción de medicamentos o para la producción de piensos, incluidos piensos para mascotas, destinados a un animal no humano, preferiblemente un mamífero.

Descripción detallada

En general, la técnica anterior tiene como objetivo la separación de los péptidos ricos en prolina tóxicos de los alimentos antes de su consumo o en el suministro oral de enzimas correctoras para compensar un proceso de digestión intestinal inadecuado. En un proceso normal de digestión gastrointestinal, se entiende que la proteólisis en el estómago por la enzima pepsina es el primer paso en la descomposición de las proteínas de la dieta. El segundo paso tiene lugar en el intestino delgado, es decir, el duodeno y el yeyuno, ubicados inmediatamente aguas abajo del estómago. En el duodeno, el pH ácido del contenido del estómago se eleva mediante la adición de jugos pancreáticos que también contienen una diversidad de endopeptidasas y carboxipeptidasas. Catalizado por estas últimas enzimas, se logra una descomposición adicional de la proteína dietética degradada con pepsina en la luz del duodeno y el yeyuno a valores de pH superiores a 5. Antes del transporte sobre la pared intestinal, un tercer paso implica una hidrólisis de péptidos adicional en la membrana de la superficie del borde en cepillo del epitelio intestinal. El último paso se logra mediante un cierto número de proteasas que incluyen DPP IV que se localizan en las membranas de estas células epiteliales. La técnica anterior sugiere que en el intestino de individuos que padecen algunas de las enfermedades que se pretende con la presente descripción, algunas de estas enzimas epiteliales y especialmente DPP IV están parcialmente inactivas o ni siquiera están presentes. En pacientes celíacos, los niveles de estas enzimas epiteliales son probablemente normales, pero dentro de este grupo de individuos, incluso niveles bajos de determinados péptidos ricos en prolina pueden provocar una fuerte respuesta inflamatoria de células T. La solución presentada en la técnica anterior es que las enzimas correctivas por vía oral se introducen en el intestino humano con el fin de minimizar los niveles de péptidos tóxicos ricos en prolina presentes en la luz del intestino. En este enfoque, la técnica anterior ha seleccionado enzimas que imitan las enzimas humanas naturales tanto como sea posible, es decir, las enzimas son activas en el intestino en condiciones superiores a pH 5. Estas enzimas de la técnica anterior no son activas en condiciones ácidas o las formas de presentación oral que contienen estas enzimas de la técnica anterior están recubiertas adecuadamente para evitar su actividad en condiciones ácidas.

Los autores de la presente invención han encontrado que una enzima que despliega su actividad principal en condiciones ácidas en el estómago ofrece una solución superior para el problema de los péptidos ricos en prolina insuficientemente digeridos. Este enfoque es nuevo y abre la posibilidad de utilizar otras enzimas que las mencionadas en la bibliografía para resolver el problema.

Como se comentó anteriormente, varias publicaciones apuntan hacia las posibilidades de utilizar enzimas tales como dipeptidil peptidasa IV y prolil oligopeptidasa en la prevención de un metabolismo opioide perturbado. Para ello, se seleccionan las dipeptidil peptidasa IV, así como las enzimas prolil oligopeptidasa que típicamente son activas en condiciones de pH casi neutro. La implicación es que estas enzimas solo hidrolizarán eficientemente proteínas ricas en prolina en condiciones superiores a pH 5. Teniendo en cuenta el perfil de pH del tracto gastrointestinal humano, estas enzimas de la técnica anterior no se activarán antes de llegar a la parte distal del duodeno, es decir, bien más allá del estómago. Sin embargo, la parte distal del duodeno es un sitio importante para la absorción de proteínas y también se sabe que está afectada en pacientes con enfermedad celíaca. Entonces, de hecho, estas enzimas de la técnica anterior comenzarán a funcionar donde se hace parte del daño.

Además, las enzimas de la técnica anterior se activan sólo después de una degradación previa significativa de proteínas ricas en prolina. El tiempo requerido para lograr esta degradación previa por enzimas pancreáticas limita aún más el período disponible para que las enzimas aplicadas por vía oral logren una hidrólisis completa de secuencias ricas en prolina. De acuerdo con la presente descripción, se utiliza una enzima que puede degradar la mayoría de las secuencias proteicas ricas en prolina y/o glutamina antes de que el alimento ingrese en el intestino delgado. El tiempo normal de permanencia de los alimentos en el estómago proporciona el período de tiempo requerido para una hidrólisis adecuada de proteínas ricas en prolina o glutamina. Además, de acuerdo con la presente descripción, se utiliza preferiblemente una enzima que es capaz de escindir péptidos en el lado carboxilo de los residuos de prolina y también es capaz de escindir proteínas intactas en el lado carboxilo de los residuos de prolina e incluso en presencia de pepsina. Enzimas de la técnica anterior se hidrolizarán en condiciones de pH bajo del estómago y si se exponen a la enzima proteolítica pepsina que se secreta en el estómago. Sin embargo, hasta ahora, el uso de dicha enzima estable ácido/pepsina no se conoce en el presente procedimiento. El enfoque actual dará como resultado la descomposición sustancial de péptidos, polipéptidos y proteínas ricos en prolina antes de alcanzar el intestino en lugar del enfoque de la técnica anterior que sugiere imitar el proceso natural de hidrolizar péptidos ricos en prolina en el intestino. La enzima preferida utilizada en el procedimiento de la descripción es una enzima que es activa a valores de pH inferiores a 5 en presencia de pepsina y es capaz de descomponer proteínas o polipéptidos de la dieta, así como péptidos. Las soluciones de la técnica anterior siempre necesitan una coenzima que pre-hidrolice la proteína de la dieta en péptidos y solo después las enzimas específicas de prolina adicionales pueden comenzar a desplegar su actividad.

Un "péptido" u "oligopéptido" se define en esta memoria como una cadena de dos a treinta residuos de aminoácidos que están enlazados a través de enlaces peptídicos. Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran

sinónimos (como se reconoce comúnmente) y cada uno de los términos se puede utilizar indistintamente según lo requiera el contexto. Un "polipéptido" se define en esta memoria como una cadena que contiene más de 30 residuos de aminoácidos.

Los péptidos o polipéptidos que tienen de cuatro a cuarenta residuos de aminoácidos que no son hidrolizables por la subtilisina (EC 3.4.21.62), preferiblemente subtilisina Carlsberg se entiende que son péptidos o polipéptidos que después de una incubación de 2 horas a pH 8,0 y 60 grados C en una suspensión o solución que contiene 20 g/l de proteína y una relación enzima/sustrato de 0,12 AU-A (Unidades Anson Alcalasa) Las Unidades de Proteasa por gramo de proteína permanecen intactas. La Unidad de Proteasa AU-A se define como se especifica en el Método Analítico LUNA nº 2003-32153-01 emitido por Novozymes (Dinamarca). Intactas significa que después de la incubación, el péptido o polipéptido original forma más del 80%, preferiblemente más del 90%, más preferiblemente más del 95% de los productos de reacción enzimáticos resultantes. En la práctica, la digestión enzimática se lleva a cabo en las condiciones indicadas y utilizando 40 microlitros de Alcalasa por gramo de proteína sustrato presente. Ejemplos de dicho péptido no hidrolizable es el péptido VYPFPGPIPN resultante de la hidrólisis de beta-caseína descrita en el Ejemplo 4. Otro ejemplo de dicho polipéptido no hidrolizable es el 33-mero descrito en el Ejemplo 6.

Una oligopeptidasa es una enzima clasificada como EC 3.4.21.26 y perteneciente a la familia de serina proteasas del clan SC, familia S9.

Todas las fórmulas o secuencias de (oligo)péptidos y polipéptidos de esta memoria se escriben de izquierda a derecha en la dirección desde el extremo amino al extremo carboxi, de acuerdo con la práctica común. El código de una letra de los aminoácidos utilizados en esta memoria se conoce comúnmente en la técnica y se puede encontrar en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). El aminoácido Xxx, Xaa, Xbb o Xcc está destinado a ser cualquier aminoácido. Por motivo se quiere dar a entender una secuencia de aminoácidos, que forma parte de un péptido, polipéptido o una proteína. En esta memoria, la glutamina (Q o Gln) se entiende que es glutamina o glutamato (E o Glu). Por ejemplo, en el gluten químico desamidado, una gran parte de los residuos naturales de glutamina presentes se convierte en glutamato. Entonces el motivo Gln-Xxx-Pro también comprende el motivo Glu-Xxx-Pro. También en otro péptido, polipéptido u otra proteína, glumina puede convertirse en glutamato, por ejemplo debido a las condiciones de pH, temperatura o por conversión enzimática, por ejemplo, por transglutaminasa.

Por un péptido o polipéptido rico en prolina se quiere dar a entender un péptido o polipéptido que comprende de 4 a 40 residuos de aminoácidos, mediante el cual los residuos de aminoácidos del péptido o polipéptido comprenden por lo menos 30%, preferiblemente al menos 40% de los residuos de prolina y/o glutamina, con la condición de que el péptido o polipéptido comprenda al menos 10% de residuos de prolina. Un complemento dietético está de acuerdo con la definición adaptada de DSHEA, un producto (que no sea tabaco) que está destinado a complementar la dieta que porta o contiene uno o más de los siguientes ingredientes dietéticos: una proteína que incluye una enzima, un polipéptido, un péptido, una vitamina, un mineral, una hierba u otro producto botánico, un aminoácido, una sustancia dietética para uso humano para complementar la dieta aumentando la ingesta total, o un concentrado, metabolito, constituyente, extracto o combinaciones de estos ingredientes . Además, un complemento dietético
- está destinado a la ingestión en forma de píldora, cápsula, tableta o líquido.
- no está representado para su uso como un alimento convencional o como el único elemento de una comida o dieta.
- es, en general, etiquetado como un "complemento dietético".
- incluye productos como un nuevo fármaco aprobado, antibiótico certificado o producto biológico con licencia que se comercializó como un complemento dietético de alimentos antes de su aprobación, certificación o licencia (a menos que el Secretario de Salud y Servicios Humanos renuncie a esta disposición).

Péptidos o polipéptidos ricos en prolina tóxica son péptidos o polipéptidos implicados en la unión a receptores opioides o en el desarrollo o la gravedad de trastornos psiquiátricos o celíacos.

Trastornos psiquiátricos incluyen autismo, esquizofrenia, ADHD, trastorno bipolar del estado del ánimo, así como depresión.

Trastornos relacionados con la enfermedad celíaca son trastornos autoinmunes, especialmente diabetes tipo 1, dermatitis herpetiforme, tiroiditis autoinmune, enfermedades del colágeno, alopecia autoinmune y hepatitis autoinmune.

Los esquemas internacionalmente reconocidos para la clasificación y la nomenclatura de todas las enzimas de IUMB incluyen proteasas. El texto actualizado de IUMB para los números de proteasa EC se puede encontrar en el sitio de Internet: http://www.chem.qmw/ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/11/. En este sistema, las enzimas se definen por el hecho de que catalizan un solo reactivo. El sistema clasifica las proteasas en endoproteasas y exoproteasas. Las endoproteasas son aquellas enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos internos, las exoproteasas hidrolizan enlaces

peptídicos adyacentes a un grupo α-amino terminal ("aminopeptidasas"), o un enlace peptídico entre el grupo carboxilo terminal y el penúltimo aminoácido ("carboxipeptidasas"). Las endoproteasas se dividen en subclases en función del mecanismo catalítico. Hay subclases de endoproteasas de serina (EC 3.4.21), endoproteasas de cisteína (EC 3.4.22), endoproteasas aspárticas (EC 3.4.23), metaloendoproteasas (EC 3.4.24) y endoproteasas de treonina (EC 3.4.25).

El documento WO 02/45524 describe una endoproteasa específica para prolina, obtenible de *Aspergillus niger.* Sorprendentemente, los autores de la invención han encontrado ahora que esta enzima de *Aspergillus* se utiliza ventajosamente en el presente procedimiento en condiciones ácidas en el estómago y puede hidrolizar proteínas dietéticas intactas, polipéptidos, así como moléculas de péptidos más pequeñas también en estas condiciones. Además, esta enzima sobrevive a la presencia de la enzima pepsina en condiciones ácidas, y es probable que continúe su actividad en todo el duodeno. Los autores de la invención demuestran que la endoproteasa específica para prolina derivada de A. niger es bastante diferente de las proteasas específicas para prolina conocidas, así como de las glutenasas especificadas en el documento WO 03/068170, tanto desde el punto de vista de la actividad como desde el punto de vista evolutivo. Esta última característica se demuestra ampliamente por el hecho de que las homologías de la secuencia de aminoácidos entre las glutenasas especificadas en el documento WO 03/068170 y la enzima derivada de A. niger son típicamente inferiores al 20% utilizando un análisis de algoritmo de alineamiento global. Este resultado está de acuerdo con el punto de vista actual de que las prolil oligopeptidasas no se producen en hongos tales como Aspergillus niger de los cuales se aísla la endoproteasa específica para prolina de acuerdo con la presente descripción (Venäläinen, J.I. et al, Eur J Biochem 271, 2705-2715 (2004)).

Por endoproteasa específica para prolina de acuerdo con la descripción o utilizada de acuerdo con la invención se entiende, por ejemplo, el polipéptido como se menciona en las reivindicaciones 1-5, 11 y 13 del documento WO 02/45524. Por lo tanto, esta endoproteasa específica para prolina es un polipéptido que tiene actividad endoproteolítica específica para prolina, seleccionada del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 40% de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 526 de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma;

(b) un polipéptido que es codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de baja rigurosidad con (i) la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma que es al menos 80% o 90% idéntico a 60, preferiblemente a 100 nucleótidos, más preferiblemente al menos 90% idénticos a 200 nucleótidos, o (ii) una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 tal como se muestran en el documento WO 02/45524. Preferiblemente el polipéptido está en forma aislada.

El polipéptido preferido tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, preferiblemente al menos 65%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95%, e incluso lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 97% de identidad con los aminoácidos 1 a 526 de la SEQ ID NO: 2 o que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Preferiblemente, el polipéptido es codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de baja rigurosidad, las condiciones de rigurosidad más preferiblemente medianas, y más preferiblemente condiciones de rigurosidad alta, con (i) la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma, o (ii) una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1.

La expresión "capaz de hibridar" significa que el polinucleótido diana de la descripción puede hibridar con el ácido nucleico utilizado como una sonda (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos recogida en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma, o el complemento de la SEQ ID NO: 1) a un nivel significativamente superior al del fondo. La descripción también incluye los polinucleótidos que codifican la endoproteasa específica para prolina de la descripción, así como secuencias de nucleótidos que son complementarias a la misma. La secuencia de nucleótidos puede ser ARN o ADN, incluyendo ADN genómico, ADN sintético o ADNc. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos es ADN y lo más preferiblemente, una secuencia de ADN genómico. Típicamente, un polinucleótido de la descripción comprende una secuencia contigua de nucleótidos que es capaz de hibridarse en condiciones selectivas con la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1. Nucleótidos de este tipo pueden sintetizarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Un polinucleótido de la descripción se puede hibridar a la secuencia codificante o al complemento de la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1 a un nivel significativamente por encima del fondo. La hibridación del fondo puede ocurrir, por ejemplo, debido a otros ADNc presentes en una colección de ADNc. El nivel de señal generado por la interacción entre un polinucleótido de la descripción y la secuencia de codificación o complemento de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: 1 es típicamente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 20 veces, más preferiblemente al menos 50 veces, e incluso más preferiblemente al menos 100 veces, tan intensas como las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1. La intensidad de la

interacción se puede medir, por ejemplo, radiomarcando la sonda, por ejemplo con ^{32}P. La hibridación selectiva típicamente se puede lograr utilizando condiciones de baja rigurosidad (cloruro de sodio 0,3 M y citrato de sodio 0,03 M a aproximadamente 40°C), rigurosidad media (por ejemplo, cloruro de sodio 0,3 M y citrato de sodio 0,03 M a aproximadamente 50°C) o alta rigurosidad (por ejemplo, cloruro de sodio 0,3 M y citrato de sodio 0,03 M a aproximadamente 60°C).

El paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede utilizarse para calcular la identidad (por ejemplo utilizado en su configuración por defecto).

Los algoritmos PILEUP y BLAST N también se pueden utilizar para calcular la identidad de secuencia o para alinear secuencias (tal como identificar secuencias equivalentes o correspondientes, por ejemplo en sus ajustes por defecto).

El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo implica primero identificar un par de secuencias de alta puntuación (HSPs) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen alguna puntuación de umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. A T se le alude como el umbral de puntuación de palabras vecinas. Estas coincidencias iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs que las contengan. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las secuencias hasta que se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulativa. Las extensiones para las coincidencias de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa cae en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa va a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, los alineamientos de matriz de puntuación BLOSUM62 (B) de 50, la expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia, si la probabilidad de suma más pequeña en comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menor que aproximadamente 1, preferiblemente menor que aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0,001.

La enzima de acuerdo con la invención se obtiene preferiblemente de un hongo, preferiblemente un *Aspergillus,* más preferiblemente de *Aspergillus niger.* Por lo tanto, se encuentra que la enzima derivada de *Aspergillus* es una endoproteasa verdadera que es estable frente a los ácidos y preferiblemente no se ve afectada por la presencia de pepsina en condiciones de pH que prevalecen en el estómago. Oligopeptidasas específicas para prolina en general, incluida la enzima que se puede obtener de *Flavobacterium meningosepticum*, casi no tienen actividad a pH 5 y por debajo, y se inactivan por la combinación de un pH bajo y la presencia de la enzima pepsina. Además, las proteasas específicas para prolina en general son incapaces de degradar proteínas intactas y se encontró que hidrolizan eficientemente péptidos más pequeños solamente, es decir, péptidos de hasta una longitud de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos.

La presente descripción proporciona composiciones económicas de calidad alimentaria para aplazar o para minimizar los fenómenos de péptidos ricos en prolina tóxicos o de un metabolismo opioide perturbado. Las composiciones incluyen formulaciones de enzimas orales adecuadas para uso alimentario, farmacéutico y veterinario, así como formulaciones de enzimas adecuadas para la producción de hidrolizados de proteínas y productos alimenticios con niveles significativamente reducidos de péptidos ricos en prolina opioides o tóxicos.

La presente descripción describe métodos para hidrolizar péptidos o polipéptidos ricos en prolina que se ponen en relación con el desarrollo de trastornos psiquiátricos o la enfermedad celíaca o de un metabolismo perturbado de opioides. La presente descripción también describe métodos para producir alimentos que pueden prevenir o retrasar el desarrollo de este tipo de trastornos en bebés o, en general, para personas menores de 25 años. También se pueden preparar alimentos que son mejor tolerados por personas que padecen enfermedad celíaca y síntomas abdominales asociados con el IBS. Una realización de la presente descripción está relacionada con la descomposición de estos péptidos o polipéptidos ricos en prolina antes del consumo, evitando o minimizando con ello la exposición del cuerpo a péptidos tóxicos ricos en prolina. En los bebés, esto evitará una exposición temprana a los opioides y el sistema inmune inmaduro no se sensibilizará con este tipo de péptidos tóxicos ricos en prolina. También para adolescentes y adultos, una dieta que contenga niveles reducidos de péptidos tóxicos ricos en prolina

tendrá beneficios profilácticos, p. ej., para personas que padecen una enfermedad celíaca inadvertida o IBS. La descripción también se refiere a la complementación de una enzima adecuada para la descomposición en el cuerpo (humano o animal) de estos péptidos tóxicos ricos en prolina o péptidos en el estómago, es decir, en condiciones de pH ácido, preferiblemente en condiciones por debajo de pH 5. De acuerdo con la última realización, las personas que padecen enfermedad celíaca, enfermedades asociadas con la aparición de enfermedad celíaca o enfermedades provocadas por un nivel disminuido de proteasas específicas de prolina corporales requeridas para la descomposición de estos péptidos o polipéptidos, son capaces de degradar los péptidos o polipéptidos ricos en prolina relevantes en el estómago y en la parte proximal del duodeno. Además, las enzimas de acuerdo con la presente descripción no requieren recubrimientos protectores.

Preferiblemente, al menos el 80% de los péptidos o polipéptidos ricos en prolina tóxicos que se forman tras incubación de péptidos o polipéptidos o proteínas con subtilisina (EC 3.4.21.62), preferiblemente una subtilisina de *Bacillus licheniformis* (o subtilisina Carlsberg) bajo condiciones de pH neutro son hidrolizados por la endoproteasa específica para prolina de acuerdo con la invención. La formación de este tipo de péptidos resistentes a subtilisina se ilustra en el Ejemplo 4 de esta solicitud. Este tipo de péptidos ricos en prolina resistentes a subtilisina están relacionados a menudo con las enfermedades mencionadas anteriormente. Ejemplos de estos péptidos son BCM-7, péptidos relacionados con BCM-7, es decir, péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos YPFP tal como está presente en la posición 60 a 63 de la molécula de beta-caseína. Además, los péptidos derivados de gliadina que comprenden el motivo Gln-Xxx-Pro (Q-X-P), por ejemplo, el epítopo PYPQPQLPY, así como otras moléculas resistentes a subtilisina que comprenden este motivo Q-X-P o E-X-P que pueden obtenerse a partir de gliadina, hordeína, secalina o avenina son ejemplos de ello. Más preferiblemente, al menos 90%, aún más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 99% de péptidos ricos en prolina que se formarían por hidrólisis por subtilisina se descomponen o no se forman utilizando la endoproteasa específica para prolina de acuerdo con la invención. Lo más preferiblemente, estos péptidos ricos en prolina pueden degradarse de acuerdo con el procedimiento de la descripción en condiciones por debajo de pH 5,5.

Una forma de suministrar las enzimas requeridas sería en forma de una ayuda digestiva, p. ej., como formulaciones enzimáticas estabilizadas que se co-ingestan con la comida para ayudar a la digestión gastro-intestinal de los péptidos o polipéptidos ricos en prolina de la dieta. Otra forma sería prevenir o limitar la ingesta de las secuencias problemáticas ricas en prolina tóxica, p. ej., utilizando alimentos proteicos "pre-digeridos" con la enzima *Aspergillus*. Un alimento proteico podría suministrarse en forma de un hidrolizado, p. ej., un gluten o un hidrolizado de proteína de la leche, e incluye hidrolizados que han sido ampliamente digeridos por endoproteasas, así como exoproteasas para liberar grandes cantidades de aminoácidos libres. Un ejemplo típico de esta última aplicación sería la generación de hidrolizados de gluten ricos en glutamato, entre otros, para aplicaciones sabrosas. El hidrolizado podría consumirse como tal o podría servir como ingrediente alimentario. De otra manera, la descripción proporciona el uso de una composición para mejorar la tolerabilidad de los productos alimenticios, caracterizada porque la composición comprende una endoproteasa específica de prolina estable frente a los ácidos de acuerdo con la divulgación. En aún otra forma, la descripción proporciona un procedimiento para preparar un alimento que comprende la adición de una endoproteasa específica para prolina estable frente a los ácidos para una tolerabilidad mejorada de un producto alimenticio. En todas estas aplicaciones, la enzima específica para prolina se utilizaría como una llamada ayuda de procesamiento.

Las cepas del género *Aspergillus* tienen un estado de calidad alimentaria y enzimas derivadas de estos microorganismos son conocidas por ser de una fuente de calidad alimentaria insospechada. De acuerdo con otra realización preferida, la enzima es secretada por su célula productora en lugar de representar una denominada enzima citosólica o periplasmática no secretada. De esta manera, las enzimas pueden recuperarse del caldo celular en un estado esencialmente puro sin costosos pasos de purificación. Preferiblemente, la enzima tiene una alta afinidad hacia su sustrato en las condiciones de pH y temperatura predominantes. Preferiblemente, la enzima no es inactivada por las enzimas proteolíticas gastrointestinales, tales como pepsina o tripsina, elastasa y quimotripsina en las condiciones de pH de esa parte relevante del tracto gastrointestinal. Más preferiblemente, la enzima es activa tanto en el estómago como en el duodeno y no requiere un recubrimiento protector.

El tubo digestivo de los seres humanos es una secuencia de diferentes compartimientos. Los alimentos se ingieren y, después de tragarlos, llegan al estómago donde se mezclan con ácido y la endoproteasa pepsina. Tiempos de permanencia típicos de los alimentos sólidos en el estómago varían de una a unas pocas horas. La apertura ocasional de la píloris permite que el alimento acidificado y parcialmente hidrolizado fluya hacia el intestino delgado. En la primera parte del intestino delgado, es decir, en el duodeno, se agregan bilis y jugo pancreático. El jugo pancreático contiene bicarbonato para neutralizar parcialmente el contenido del estómago. El jugo pancreático también contiene un conjunto adicional de proteasas, es decir, las endoproteasas tripsina, quimotripsina y elastasa, así como las carboxipeptidasas A y B para degradar aún más los péptidos y polipéptidos formados por la pepsina en el estómago. Después del duodeno, el alimento procesado llega al yeyuno. El duodeno y el yeyuno son los sitios principales para la absorción de proteínas en el tracto gastrointestinal. Este proceso de absorción implica una

descomposición proteolítica adicional de las proteínas de la dieta por parte de diferentes proteasas ancladas en las células del borde en cepillo del epitelio intestinal. La última hidrólisis va acompañada de un transporte facilitado de péptidos pequeños, así como de aminoácidos libres sobre la pared intestinal. La última parte del intestino delgado está formada por el íleon, después de lo cual el alimento procesado ingresa en el intestino grueso (colon). En el colon se produce una fermentación intensiva, pero no hay una absorción apreciable de aminoácidos o péptidos.

La ingesta de gluten por pacientes con enfermedad celíaca conduce a lesiones del intestino delgado proximal. La atrofia de las vellosidades intestinales es uno de los rasgos más característicos de este tipo de lesiones. Esta atrofia vellosa no se limita al yeyuno, sino que también se puede demostrar en el duodeno distal (Meijer, J.W.R. et al; Virchows Arch. febrero de 2003; 442:124-128). Esta observación indica que en pacientes celíacos los efectos dañinos de los péptidos tóxicos ricos en prolina ya son evidentes en una zona inmediatamente aguas abajo del estómago. Los autores de la invención han encontrado que las terapias enzimáticas destinadas a la prevención de los síntomas de la enfermedad celíaca deben apuntar a hidrolizar los péptidos ricos en prolina relevantes en el estómago en lugar de en la parte más distal del tracto gastrointestinal. Ventajosamente, la actividad de la enzima aplicada en la terapia enzimática es tal que comienza a funcionar en el estómago y continúa activa en el duodeno. Los autores de la invención han encontrado que también los péptidos opioides que juegan un papel en el desarrollo de trastornos psiquiátricos, respiratorios y cardiovasculares se destruyen mejor en el estómago. Como el duodeno y el yeyuno son los sitios principales para la absorción de proteínas, el nivel de péptidos tóxicos en esta parte del intestino delgado debe ser lo más bajo posible para minimizar los síntomas asociados con la presencia de estos péptidos tóxicos.

En el uso como ayuda digestiva, la enzima correctora debe ser suficientemente activa a una temperatura de 37 grados C y debe tener preferiblemente un pH bajo óptimo para sobrevivir a las condiciones ácidas en el estómago. De acuerdo con los datos publicados, la acidez de los alimentos ingeridos disminuye de un valor inicial de pH 5 a pH 3,5 treinta minutos después de la ingesta, seguido de una disminución adicional a pH 2 sesenta minutos después de la ingesta (tesis de Mans Minkus; Universidad de Utrecht, Países Bajos; ISBN:90-393-1666-X). Por lo tanto, de manera ideal, las enzimas destinadas a la terapia enzimática deberían ser activas con valores de pH tan bajos como 2. Estudios sobre el vaciado gástrico indican que 45 minutos después de la ingesta, casi el 90% de los alimentos sólidos todavía está presente en el estómago (R. Notivol et al., 1984 Scand J. Gastroenterol. 19:1107-1113). Más allá del estómago, el pH de los alimentos aumenta lentamente hasta alcanzar un pH de 5 en la parte distal del duodeno, es decir, aproximadamente 50 cm más allá del píloro (Handbook of Physiology, American Physiological Society, Washington, D.C., 1968, Ed. Werner Heidel; Sección 6: Alimentary Canal, Volumen 111, págs. 1457-1490). En el documento WO 03/068170 se especifican diferentes "glutenasas" que pueden disminuir los niveles de oligopéptidos de gluten tóxicos en los alimentos, ya sea antes o después de la ingesta por un paciente. El término "glutenasa" se refiere a enzimas proteasas o peptidasas, más específicamente proteasas específicas para prolilo, que son capaces de escindir oligopéptidos tóxicos de proteínas de gluten en fragmentos no tóxicos. Dado que todas estas glutanasas mencionadas típicamente están destinadas a ser activas en el intestino, son óptimamente activas en condiciones de pH casi neutro. El documento WO 03/068170 enseña la degradación de péptidos tóxicos ricos en prolina tóxicos en o más allá del duodeno en lugar de en el estómago o la parte proximal del duodeno. Además, el documento WO 03/068170 se refiere a preparaciones enzimáticas protegidas por los denominados recubrimientos entéricos que enmascaran la actividad enzimática a pH bajo, de modo que las enzimas presentes pasarán a través del estómago y solo serán activas en el intestino en condiciones de pH neutro.

Si se utiliza como ayuda para el procesamiento industrial en la producción de hidrolizados de proteínas, la enzima debería ser suficientemente activa en condiciones que permitan incubaciones microbianas seguras en condiciones industriales no estériles. La actividad enzimática adecuada a una temperatura de procesamiento de al menos 50 grados C y un valor de pH muy inferior a pH 5,5 cumple estos requisitos.

El basidiomiceto *Agaricus bisporus* (Sattar *et al*;. J. Biochem 107, 256-261 (1990)) y el ascomiceto no relacionado *Aspergillus niger* (documento WO 02/45524) han demostrado ambos que producen una prolil endopeptidasa extracelular. Sin embargo, la enzima obtenida del basidiomiceto no sobrevivirá a valores de pH inferiores a 5 y, por lo tanto, es menos atractiva. Preferiblemente, se utiliza una prolil endopeptidasa de *A. niger* que tiene un óptimo de pH ácido.

La presente descripción proporciona preparaciones enzimáticas que combinan bajo costo, aceptación legislativa con una eficacia probada en condiciones de pH ácido hacia secuencias de péptidos ricos en prolina. Preferiblemente, se puede utilizar la misma enzima para degradar no solo la A1 y las beta-casomorfinas de tipo A2, sino también varios epítopos de gluten.

Se encuentra que esta endoproteasa específica para prolina derivada de *Aspergillus* es muy activa en la descomposición de péptidos o polipéptidos ricos en prolina o incluso proteínas. Ventajosamente, esta enzima es secretada por el microorganismo productor en el caldo de fermentación, tiene un óptimo de pH ácido y puede

producirse de calidad alimentaria y de forma económica. Los péptidos beta-casomorfinas relevantes contienen hasta cuatro residuos de prolina en la molécula y, además, las beta-casomorfinas A1 y A2 tienen diferentes secuencias de aminoácidos. Sorprendentemente, los autores de la invención han encontrado que la enzima *Aspergillus* es capaz de hidrolizar beta-casomorfinas en el lado C-terminal de la prolina en la posición 61 y, por lo tanto, inactiva eficazmente todos los BCM-7 y péptidos relacionados con BCM-7, tanto para A1 como para A2 beta- caseína. Esto es bastante notable porque han descubierto que una endoproteasa altamente agresiva y ampliamente utilizada con una amplia especificidad para el sustrato, tal como subtilisina (EC 3.4.21.64) disponible comercialmente, tal como, por ejemplo, Alcalasa, no puede degradar BCM-7. De manera similar, otras proteasas disponibles industrialmente no podrán degradar BCM-7. De hecho, la endoproteasa específica para prolina derivada de *Aspergillus* puede hidrolizar beta-casomofina pero, sorprendentemente, en solo uno de los cuatro residuos de prolina presentes en BCM-7. Sin embargo, debido a la especificidad de esta enzima de *Aspergillus* particular hacia este residuo de prolina particular, BCM-7, así como todas las moléculas relacionadas con BCM-7 se destruyen efectivamente por incubación con esta enzima, porque el motivo Tyr-Pro-Phe es escindido por la enzima. Además, moléculas de BCM-7 derivadas de las beta-caseínas A1, así como A2 son inactivadas por incubación con la endoproteasa específica para prolina de *Aspergillus*.

La ventaja de una verdadera endoproteasa específica para prolina es que la endoproteasa específica para prolina puede iniciar secuencias ricas en prolina hidrolizantes inmediatamente después de poner en contacto la enzima con la proteína. Las prolil oligopeptidasas pueden volverse activas solo después de una degradación previa significativa de las moléculas de gluten o caseína por otras, por ejemplo, endoproteasas gastrointestinales. A la vista de la extensa degradación requerida y el tiempo limitado disponible antes de que el alimento ingrese al intestino delgado, una endoproteasa específica para prolina verdadera tiene ventajas de aplicación significativas sobre las oligopeptidasas conocidas. Otra ventaja de una verdadera endoproteasa específica de prolina es que puede utilizarse industrialmente para reducir el nivel de péptidos tóxicos ricos en prolina en gluten sin una destrucción total de la estructura del gluten. Por ejemplo, extrudir una pasta de gluten de trigo junto con la enzima derivada de *Aspergillus* proporcionará un producto con algunas propiedades de textura residual, pero con un nivel fuertemente reducido de péptidos tóxicos ricos en prolina. Para lograr la misma reducción de péptidos tóxicos ricos en prolina con una prolil oligopeptidasa, se requeriría una hidrólisis previa casi total con otras proteasas para lograr las longitudes de péptido deseadas por debajo de 30 residuos de aminoácidos. Huelga decir que esto dará como resultado una pérdida completa de todas las propiedades físico-químicas relevantes del gluten, es decir, una pérdida de consistencia de la masa y la exclusión del horneado de panes con una forma y volumen aceptables. Di Cagno et al (Appl. Environ. Microbiol., Vol 70(2)1088-1096, 2004) informan sobre la elaboración de un pan de masa madre que es bien tolerado por los pacientes con celiaquía sprúe. En su enfoque, el nivel de epítopos tóxicos ricos en prolina se minimizó utilizando una masa preparada con una alta proporción de harinas no tóxicas y fermentándola con lactobacilos seleccionados durante un período de 24 horas. Aunque sus resultados son ciertamente de interés científico, es obvio que en un entorno industrial períodos de fermentación de hasta 24 horas no son económicamente factibles. Además, su alta proporción de harinas no tóxicas implica que habrá una escasez de gluten "regular", por lo que el volumen del pan final será limitado. Por lo tanto, sería ventajoso utilizar un método económico que permita la producción de pan de trigo al 100% utilizando procedimientos industriales existentes, pero con niveles limitados de péptidos tóxicos ricos en prolina. Panes de este tipo pueden convertirse en un componente importante de las dietas destinadas a reducir la ingesta diaria de péptidos tóxicos. Grupos de consumidores para los que una dieta de este tipo es de especial relevancia incluyen bebés, jóvenes que padecen IBS, personas mayores e individuos que padecen enfermedades y síntomas como se describe. Aunque para los pacientes celíacos una ingesta diaria de menos de 50 miligramos de gluten se considera segura, cualquier dieta que contenga péptidos ricos en prolina significativamente menos tóxicos que los presentes en el consumo occidental medio de 13 gramos de gluten por día es probable que sea beneficiosa para los grupos de consumidores mencionados anteriormente.

En conjunto, estas consideraciones indican ventajas nuevas y considerables para la enzima derivada de *A. niger* frente a las enzimas mencionadas en la técnica anterior. Composiciones que contienen las enzimas de acuerdo con la descripción se utilizan ventajosamente para reducir o retrasar la sensibilización al gluten o los fenómenos de un metabolismo opioide alterado o los fenómenos del IBS. Composiciones de este tipo pueden aplicarse como ayuda digestiva para lograr una reducción gastrointestinal *in situ* de los péptidos tóxicos ricos en prolina. Alternativamente, este tipo de composiciones se pueden aplicar como ayuda de procesamiento para producir hidrolizados de proteínas sin dichos péptidos tóxicos ricos en prolina. Dentro del campo de los hidrolizados de proteínas, la elaboración de cerveza proporciona un caso especial en el que la aplicación de la endoproteasa específica para prolina de bajo pH derivada de *A. niger* ofrece un cierto número sorprendente de ventajas. El documento WO 02/046381 enseña que una endoproteasa específica para prolilo aplicada durante la etapa de maceración de la cerveza o antes de la filtración de la cerveza o antes del almacenamiento de la cerveza reducirá la formación de turbidez de la cerveza. Los datos actuales de los autores de la invención ilustran que una incubación adecuada con la enzima de pH bajo también reducirá el nivel de péptidos tóxicos ricos en prolina tóxica derivados de cereales. Sorprendentemente, autores de la invención han encontrado que el tratamiento de cervezas u otras bebidas que contienen proteínas de

cereales con la endoproteasa específica para prolina no solo dará como resultado niveles reducidos de turbidez, sino que también conducirá a productos que serán seguros para las personas que padecen enfermedad celíaca.

El Ejemplo 1 de la presente solicitud muestra el óptimo de pH ácido y una temperatura ideal óptima de la endoproteasa específica para prolina derivada de *Aspergillus*. En los Ejemplos 2 y 3 los autores de la invención demuestran que la endoproteasa específica para prolina producible por *Aspergillus niger* es una verdadera endoproteasa específica para prolina que puede escindir proteínas grandes e intactas con la misma eficacia que péptidos o polipéptidos más pequeños. De hecho, los datos de los autores de la invención indican que la enzima de *Aspergillus* es un nuevo miembro de la familia S28 en lugar de la familia S9 a la que pertenecen las oligopeptidasas conocidas (N.D. Rawlings y A.J. Barrett, Methods in Enzymology, Vol. 244, págs. 19-61, 1994; N.D. Rawlings y A.J. Barrett, Biochimica & Biophysica Acta 1298 (1996) 1-3). Los autores de la invención han encontrado que, en contraste con las prolil oligopeptidasas conocidas, la prolil endoproteasa derivada de *Aspergillus* es activa bajo condiciones ácidas en el estómago y muestra altas eficiencias hacia la hidrólisis de grandes fragmentos de proteínas y polipéptidos ricos en prolina. Altas eficiencias de este tipo se ilustran en los Ejemplos 4, 5 y 6. En el Ejemplo 4, los autores de la invención demuestran que durante la producción de hidrolizados de proteínas de la leche con Alcalasa, una proteasa agresiva de amplio espectro utilizada frecuentemente en la producción de hidrolizados de proteínas, varios péptidos que incorporan secuencias de BCM-7 sobreviven al proceso de hidrólisis. Sin embargo, estos péptidos desaparecen rápidamente tras una incubación en condiciones ácidas con la prolil endoproteasa derivada de *Aspergillus*. Los datos proporcionados en el Ejemplo 5 revelan el hecho sorprendente de que la enzima de Aspergillus escinde solo uno de los cuatro residuos de prolina disponibles en la molécula BCM-7 derivada de caseína beta-A2. Esto indica que la incubación de un sustrato rico en prolina con cualquier proteasa específica para prolina no implica automáticamente la escisión de todos los enlaces peptídicos que implican un residuo de prolina, ni siquiera en condiciones de una relación enzima/sustrato drásticamente aumentada. En el Ejemplo 6., los autores de la invención demuestran la eficacia de la prolil endoproteasa derivada de *Aspergillus* hacia el 33-mero derivado de gliadina que se afirma que es un epítopo principal en pacientes celíacos. Aunque nuevamente la Alcalasa de amplio espectro no puede escindir esta molécula, ni en condiciones alcalinas ni ácidas, la enzima derivada de Aspergillus frecuentemente escinde la molécula en condiciones ácidas, generando 99,5% de péptidos con una longitud máxima de 6 residuos de aminoácidos. Entonces, a pesar de su alta eficacia hacia los péptidos ricos en prolina en condiciones ácidas, incluso la enzima derivada de *Aspergillus* deja al menos 0,5% de un heptámero con la secuencia de aminoácidos YPQPQLP. Como la secuencia PYPQPQLPY es un epítopo de células T específicas para el paciente celíaco conocido, este hallazgo ilustra que para enzimas sub-óptimas específicas de prolina como las conocidas oligopeptidasas específicas para prolina, incluida la enzima derivada de *Flavobacterium meningosepticum,* una aplicación *in vivo* realista para prevenir la formación de péptidos tóxicos de las moléculas de gluten demostrará ser imposible. La última conclusión es confirmada por los experimentos mostrados en los Ejemplos 7 y 8. En el Ejemplo 7, los autores de la invención comparan los perfiles de actividad de la endoproteasa específica para prolina derivada de A. niger con la oligopeptidasa específica para prolina derivada de F. meningosepticum entre pH 2 - 12. Mientras que la enzima derivada de A. niger muestra actividad entre pH 2,5 y 7,0, la enzima de F. meningosepticum necesita un pH superior a 5,0 para activarse. En el Ejemplo 8, los autores de la invención imitan la situación en el estómago al exponer ambas enzimas específicas para prolina a condiciones de pH bajo en ausencia y presencia de la enzima gástrica pepsina. Las mediciones posteriores de la actividad en condiciones de pH óptimas para la enzima individual muestran que la enzima F. meningosepticum no puede sobrevivir a las condiciones de pH 2 o pH 3. En presencia de pepsina, la enzima F. meningosepticum ya está irrecuperablemente dañada a pH 4. En contraste, la enzima derivada de A.niger sobrevive en condiciones de pH tan bajas como pH 2 e incluso en presencia de pepsina, enfatizando su valor para hidrolizar péptidos tóxicos en el estomago. En el Ejemplo 9, los autores de la invención ilustran que la enzima derivada de A. niger puede escindir un gran número de epítopos de gluten HLA-DQ2 conocidos. Curiosamente, las posiciones de los sitios de escisión observados predicen que todos los epítopos de células T como se conocen en la bibliografía se destruyen. En el Ejemplo 10, los autores de la invención recuperan epítopos de gluten de 100% de cerveza de malta y 100% de pan de trigo y demuestran que pueden detectar estos epítopos en un ensayo de anticuerpos. En el Ejemplo 11, los autores de la invención demuestran que la cerveza producida mediante la incorporación de la enzima derivada de A. niger en el proceso de producción da como resultado niveles apreciablemente más bajos de epítopos de gluten. En el Ejemplo 12, los autores de la invención demuestran que se puede obtener un efecto similar incorporando la enzima en una masa de trigo para producir un pan de molde holandés con niveles reducidos de epítopos de gluten.

El gluten es un compuesto no soluble en agua con una estructura tridimensional compleja. Estas propiedades, en combinación con su composición de aminoácidos ricos en prolina, hacen que las moléculas de gluten sean resistentes a la proteólisis gástrica e intestinal. Dado que ninguna de las actividades proteolíticas naturales secretadas en la luz gastrointestinal es capaz de escindir enlaces peptídicos que implican prolina, tiene sentido el uso de enzimas exógenas sinérgicas específicas para prolina. Sin embargo, las personas que padecen la enfermedad celíaca pueden ser extremadamente sensibles a los muchos epítopos que están presentes en el gluten. De acuerdo con la presente descripción, el efecto de las proteasas digestivas naturales se puede mejorar con la

prolil endoproteasa derivada de *Aspergillus*, y en esta memoria se describe incluso una mejora adicional de la capacidad hidrolítica de esta mezcla proteolítica.

Es bien sabido que los enlaces peptídicos que implican residuos cargados negativamente, tales como Glu (E) y Asp (D) forman sustratos pobres para la proteasas. Además, las enzimas proteolíticas gastrointestinales naturales no pueden hacer frente a estos residuos como lo demuestra el aislamiento del péptido resistente a la proteasa gástrica y pancreática WQIPEQSR de la gliadina (véase Shan *et al*). Esta última publicación también deja claro que los residuos de glutamina (Q) omnipresentes en el gluten pueden desamidarse a residuos de glutamato (E) por la transglutaminasa tisular. Desafortunadamente, esta desamidación regioespecífica de péptidos de gliadina aumenta aún más su potencial inmunogénico. En este contexto, los autores de la invención han sido capaces de crear una combinación enzimática efectiva existente de una endoproteasa específica para prolina derivada de *Aspergillus* con una endoproteasa auxiliar para prevenir la formación de péptidos ricos en prolina tóxica ricos en prolina. De acuerdo con la presente descripción, se pueden utilizar endoproteasas específicas para glutamato (EC 3.4.21.19), por ejemplo, aquellas endoproteasas específicas para glutamato que son secretadas en exceso por un cierto número de microorganismos de calidad alimenticia, tales como *Bacillus* y *Streptomyces.* Estas enzimas se pueden producir de forma económica y de calidad alimentaria. Se prefieren las enzimas que tienen un paso seguro a través del estómago, con respecto a su actividad enzimática. En general, esas enzimas tendrán un óptimo de pH ácido o neutro. En combinación con la prolil endoproteasa derivada de *Aspergillus*, esta categoría de endoproteasas específicas para glutamato se considera útil en la producción de hidrolizados de proteínas con bajos niveles de péptidos tóxicos ricos en prolina.

Sorprendentemente, la presente investigación de los autores de la invención demuestra que, aparte de las endoproteasas específicas para glutamato, existen otras endoproteasas que tienen un efecto sinérgico en las incubaciones con la endoproteasa específica para prolina de *Aspergillus*. Los autores de la invención concluyen que las endoproteasas (EC 3.4.21-99) capaces de escindirse entre los residuos de aminoácidos Q (glutamina) y L (leucina) se combinan ventajosamente con la endopeptidasa específica para prolina de *Aspergillus.* Especialmente, se utilizan ventajosamente las endoproteasas que tienen óptimos de pH por debajo de pH 5,0 y que prefieren residuos de glutamina o leucina en la posición P1 o P1' del sustrato, tales como las aspergilopepsinas (EC 3.4.23.18 y 19) y las mucorpepsinas (EC 3.4.23.23).

Una aplicación de las enzimas de acuerdo con la invención es su uso como una ayuda digestiva. En esta solicitud, las composiciones de la presente descripción se administran preferiblemente por vía oral, pero también se pueden administrar por otras vías directas. Las composiciones se administran típicamente a seres humanos, pero también se pueden administrar a animales, preferiblemente mamíferos, para aliviar los síntomas típicos de una sensibilidad incrementada al gluten o un metabolismo alterado de la caseína o del gluten o IBS. En su aplicación como ayuda digestiva, las enzimas de acuerdo con la descripción pueden formularse en forma de un polvo seco, por ejemplo, en una píldora, una tableta, un gránulo, una bolsita o una cápsula. Alternativamente, las enzimas de acuerdo con la descripción pueden formularse en formas de un líquido en, por ejemplo, un jarabe o una cápsula o pueden incorporarse en un producto alimenticio con una actividad de agua (Aw) inferior a 0,85. Las composiciones utilizadas en las diversas formulaciones y que contienen las enzimas de acuerdo con la descripción también pueden incorporar al menos un compuesto del grupo que consiste en un vehículo, adyuvante, excipiente, estabilizador, tampón y diluyente fisiológicamente aceptable, términos que se utilizan en su sentido ordinario para indicar sustancias que ayudan en el empaquetamiento, la entrega, absorción, estabilización o, en el caso de un adyuvante, mejorando el efecto fisiológico de las enzimas. Los antecedentes relevantes sobre los diversos compuestos que se pueden utilizar en combinación con las enzimas de acuerdo con la descripción en forma de polvo se pueden encontrar en "Pharmaceutical Dosage Forms", segunda edición, Volúmenes 1, 2 y 3, ISBN 0-8247-8044 -2 Marcel Dekker, Inc. Aunque las enzimas de acuerdo con la descripción formuladas como un polvo seco pueden almacenarse durante períodos bastante largos, se debe evitar el contacto con la humedad o el aire húmedo eligiendo un empaquetamiento adecuado, tal como, por ejemplo, un blíster de aluminio. Si se formulan en forma líquida, los compuestos utilizados para estabilizar la actividad enzimática y la conservación microbiana juegan un papel importante. La estabilización de la actividad enzimática puede requerir actividades en agua reducidas, tal como se pueden obtener mediante el uso de polioles, tales como glicerol o diversos azúcares. Además, los cationes divalentes, tales como Ca2+ o Mg2+ son conocidos por sus efectos estabilizadores, así como por agentes reductores como aminoácidos que contienen azufre y compuestos fenólicos, tales como BHT o galato de propilo. La conservación microbiana de grado alimenticio se puede lograr utilizando combinaciones bien conocidas de condiciones de pH bajo o actividades bajas en agua con sorbato o benzoato o parabenos. Además, pueden requerirse espesantes de calidad alimentaria tales como un hidrocoloide. Una forma de aplicación oral relativamente nueva es el uso de cápsulas de gelatina que contienen un líquido. En esta aplicación, el líquido es típicamente un aceite o un polietilenglicol o una lecitina en los que se pueden suspender las enzimas secas de acuerdo con la descripción. En el documento US2002/0136800 se proporcionan ejemplos de formulaciones de tabletas con una estabilidad enzimática mejorada.

Descripción de las Figuras

Figura 1: Una representación gráfica del pH óptimo de la endoproteasa específica para prolina derivada de *A. niger* utilizando el péptido sintético Z-Gly-Pro-pNA como sustrato (véase el Ejemplo 1).

Figura 2: SDS-PAGE de ovoalbumina intacta y un péptido 27-mero sintético después de la incubación con una endoproteasa específica para prolina derivada de *A. niger* purificada por cromatografía (véase el Ejemplo 3).

Figura 3: Una representación gráfica de los óptimos de pH de la endoproteasa específica para prolina derivada de *A. niger* y F. meningosepticum (véase el Ejemplo 7).

Materiales y Métodos

Materiales.

Las siguientes enzimas se obtuvieron de Sigma: amiloglucosidasa de *Aspergillus niger,* 300 U/ml, Sigma A-7095; pepsina de mucosa de estómago porcino, 2331 U/mg, Sigma P-7012; transglutaminasa de cobaya, Sigma T-5398. La solución de tripsina al 2,5% se obtuvo de los cartuchos Gibco (BRL 25090-028) y Sep-Pak Plus tC18, Waters Nº 036810 de Waters. Alcalase® AF 2.4 L que tiene una actividad de 2,6 Unidades UA(A) (Anson Unidad de Alcalasa)/gramo de producto se obtuvo de Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca). De acuerdo con Novozymes, los detalles de esta medición de la actividad se pueden encontrar en Novozymes Analytical Method LUNA nº 2003-32153-01/SOPNº:EB-SM-0218.02/02).

Los péptidos sintéticos se obtuvieron de Pepscan Systems BV (Lelystad, Países Bajos). Los sustratos peptídicos cromogénicos se obtuvieron de Pepscan Systems o de Bachem, Suiza.

Endoproteasa específica para prolina de *A. niger.*

La sobreproducción y la purificación cromatográfica de la endoproteasa específica para prolina de Aspergillus niger se realizó como se describe en el documento WO 02/45524. La actividad de la enzima (1 unidad/10 mg de proteína) se sometió a ensayo en el péptido sintético Z-Gly-Pro-pNA a 37 grados C en un tampón citrato/fosfato disódico pH 4,6. El producto de reacción se controló espectrofotométricamente a 405 nM. La actividad de la enzima prolil oligopeptidasa comercial (adquirida de ICN Biomedicals/MP Biomedicals, Aurora, Ohio, EE.UU.) fue de 35 unidades por mg de producto y se sometió a ensayo en Z-Gly-Pro-pNA a 30 grados C en un tampón de pH 7,0. El producto de reacción se controló espectrofotométricamente a 405 nM. Para ambas enzimas, una unidad se define como la cantidad de enzima que provoca la liberación de 1 µmol de p-nitroanilida por minuto bajo las condiciones especificadas.

Análisis LC/MS.

Se utilizó HPLC usando un espectrómetro de masas con trampa de iones (Thermo Electront®, Breda, Países Bajos) acoplado a una bomba P4000 (Thermoquest®, Breda, Países Bajos) para caracterizar los hidrolizados de proteínas enzimáticas producidos por la mezcla enzimática de la invención. Los péptidos se separaron utilizando una columna PEPMAP C18 300A (MIC-15-03-C18-PM, LC Packings, Amsterdam, Países Bajos) en combinación con un gradiente de ácido fórmico al 0,1% en agua Milli Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.; Solución A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (Solución B) para elución. El gradiente comenzó al 95% de la Solución A y aumentó al 40% de la Solución B en 140 minutos y se mantuvo en la última relación durante otros 5 minutos. El volumen de inyección utilizado fue de 50 microlitros, el caudal fue de 50 microlitros por minuto y la temperatura de la columna se mantuvo a 30°C. La concentración de proteína de la muestra inyectada fue de aproximadamente 50 microgramos/mililitro.

Información detallada sobre los péptidos individuales se obtuvo utilizando el algoritmo MS/MS "dependiente de exploración", que es un algoritmo característico para un espectrómetro de masas de trampa de iones.

El análisis de escaneo completo fue seguido por análisis de escaneo de zoom para la determinación del estado de carga de los iones más intensos en el intervalo de masa de exploración. El posterior análisis MS/MS del último ion dio como resultado una información parcial de la secuencia peptídica, que podría utilizarse para la búsqueda en la base de datos utilizando la aplicación SEQUEST de Xcalibur Bioworks (Thermoquest®, Breda, Países Bajos). Los bancos de datos utilizados se extrajeron del banco de datos OWL.fasta, disponible en el NCBI (National Centre for Biotechnology Informatics), que contiene las proteínas de interés para la aplicación utilizada. En esos experimentos en los que se midieron sustratos de proteínas bien caracterizados, tales como proteínas del suero lácteo o caseínas, se aumentó la precisión de la técnica de análisis al omitir esos espectros de MS/MS con un ajuste de secuencia de menos del 50%.

Angiotensina (M = 1295,6) se utilizó para sintonizar la sensibilidad óptima en el modo MS y para la fragmentación óptima en el modo MS/MS, realizando una infusión constante de 60 microg/ml, dando como resultado especies con carga doble y triple en el modo MS, y una energía de colisión óptima de aproximadamente el 35% en modo MS/MS.

MALDI-TOF

MALDI-TOF se realizó utilizando un espectrómetro de masas Voyager De-Pro (Applied Biosystems). Después de mezclar con la matriz apropiada, las muestras de péptidos se midieron en un modo lineal. Las masas encontradas a través del software MassLynx fueron secuenciadas por Post Source Decay (PSD) para confirmar la secuencia de aminoácidos de los péptidos propuestos.

Cuantificación de péptidos de gluten en muestras de alimentos.

Anticuerpos monoclonales específicos para péptidos de alfa-gliadina, gamma-gliadina y LMW-glutenina estimuladores de células T están disponibles y se incorporaron en un ensayo de competencia para la detección de estos péptidos en muestras de alimentos (E.H.A. Spaenij-Dekking et al., GUT, 53: 1267-1273 (2004).

Ensayos basados en anticuerpos.

Para la generación de un ensayo basado en anticuerpos, anticuerpos monoclonales fueron criados en ratones Balb C contra péptido de alfa-, gamma-gliadina y un péptido de LMW glutenina conocidos estimuladores de células T. Después de la fusión de los bazos de los ratones con una línea celular de mieloma de ratón, se obtuvieron hibridomas productores de anticuerpos. Estos fueron clonados por dilución limitante y los anticuerpos monoclonales secretados por estas células fueron sometidos a ensayo para su uso en un ensayo de competencia de anticuerpos monoclonales. Para cada una de las especificidades se seleccionaron uno o dos anticuerpos monoclonales adecuados y se determinaron los epítopos reconocidos por los diferentes anticuerpos monoclonales (véase la tabla que figura a continuación).

Especificidad	Epítopo de células T	Epítopo de anticuerpos
α-gliadina (Glia-alfa2/9)	QLQPFPQPQLPY	QPFPQPQ
γ-gliadina (Glia-gamma1)	QPQQPQQSPFQQQRPF	QQRPFI
LMW glutenina (Glt-156)	QPPFSQQQQSPFSQ	QSPFS o PPFSQQ

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Los óptimos de pH y temperatura de la endoproteasa específica para prolina como se obtienen de *A. niger.*

La endoproteasa específica para prolina derivada de *A. niger* se sobre-expresó en un huésped de *A. niger*, aislado y purificado por cromatografía utilizando los materiales y los métodos descritos en el documento WO 02/45524. Para establecer el óptimo de pH de la enzima así obtenida, se prepararon tampones con diferentes valores de pH. Se hicieron tampones de pH 4,0 – 4,5 – 4,8 – 5,0 – 5,5 y 6,0 utilizando 0,05 mol/l de acetato de Na y CaCl2 0,02 M; se hicieron tampones de pH 7,0 y 8,0 utilizando tampones Tris/HCl 0,05 M que contenían CaCl2 0,02 M. Los valores del pH se ajustaron utilizando ácido acético y HCl, respectivamente. El péptido sintético cromogénico Z-Gly-Pro-pNA se utilizó como el sustrato. La solución tampón, la solución de sustrato y la pre-dilución de prolil endoproteasa (en una actividad de 0,1 U/mL), se calentaron a exactamente 37,0°C en un baño de agua. Después de mezclar, la reacción se siguió espectrofotométricamente a 405 nm a 37,0°C durante 3,5 min, midiendo cada 0,5 min. A partir de los resultados mostrados en la Figura 1, está claro que la endoproteasa específica para prolina derivada de *A. niger* tiene un óptimo de pH de alrededor de 4.
También se estableció el óptimo de temperatura de la prolil endoproteasa. Para ese fin, la preparación enzimática purificada se incubó en 0,1 mol/l de acetato de Na que contenía 0,02 mol/l de CaCl2 a pH 5,0 durante 2 horas a diferentes temperaturas utilizando Caseine Resorufine (Roche versión 3), ya que el sustrato y la actividad enzimática se cuantificaron midiendo a 574 nm. De acuerdo con los resultados obtenidos, la endoproteasa específica para prolina de *A. níger* tiene un óptimo de temperatura de alrededor 50 grados C.

El óptimo de pH muy ácido sugiere fuertemente que la endoproteasa específica para prolina derivada de *A. niger* tiene propiedades ideales para la aplicación industrial, así como para el consumo oral, ya que será óptimamente activa en las condiciones ácidas preferidas para la aplicación industrial y las condiciones que prevalecen en el estómago y la primera parte del intestino delgado. Además, el óptimo de temperatura de la enzima hace que la enzima sea ideal para ambas aplicaciones.

Ejemplo 2

La enzima obtenida de *A. niger* representa una nueva clase de enzimas específicas para prolina.

A partir de la secuencia codificante de la endoproteasa específica para prolina derivada de *A. niger* según se proporciona en el documento WO 02/45524 se puede determinar una secuencia de proteína de 526 aminoácidos. La novedad de la enzima se confirmó mediante búsquedas BLAST de bases de datos, tales como SwissProt, PIR y trEMBL. Para sorpresa de los autores de la invención, no se pudo detectar una homología clara entre la enzima de *A. niger* y las prolil oligopeptidasas conocidas. Sin embargo, una inspección más detallada de la secuencia de aminoácidos reveló una homología baja pero significativa con las carboxipeptidasas Pro-X (EC 3.4.16.2), las dipeptidil aminopeptidasas I (EC 3.4.14.2) y la serina proteasa específica del timo. Todas estas enzimas han sido asignadas a la familia S28 de las serina peptidasas. Además, la configuración GxSYxG alrededor del sitio activo serina se conserva entre estas enzimas y la endoproteasa derivada de *A. niger*. Adicionalmente, miembros de la familia S28 tienen un óptimo de pH ácido, tienen especificidad para escindirse en el lado carboxi terminal de los residuos de prolina y se sintetizan con una secuencia señal y un propéptido al igual que la endoproteasa específica para prolina derivada de *A. niger*. También el tamaño de la enzima de *A. niger* es similar a los de los miembros de la familia S28. Por lo tanto, la endoproteasa específica para la prolina de *A. niger* parece ser un miembro de la familia S28 de serina proteasas en lugar de la familia S9 en la que se han agrupado la mayoría de las prolil oligopeptidasas citosólicas, incluida la enzima obtenida de *Flavobacterium meningosepticum*. Sobre la base de estas características estructurales y fisiológicas, los autores de la invención han concluido que la enzima de *A. niger* pertenece a la familia de serina proteasas S28 más que a la familia S9. Una característica adicional que discrimina la enzima derivada de *A. niger* de las prolil oligopeptidasas pertenecientes a la familia S9 es el hecho de que, a diferencia de las endoproteasas prolil citosólicas pertenecientes a la última familia, la enzima de *A. niger* recientemente identificada se secreta en el medio de crecimiento. Hasta ahora, solo el basidiomiceto *Agaricus bisporus* (Sattar et al; J. Biochem. 107, 256-261 (1990)) y el ascomiceto *Aspergillus niger* no relacionado (documento WO 02/45524) han demostrado producir una prolil endopeptidasa extracelular. Sin embargo, la enzima obtenida del basidiomiceto no sobrevivirá a valores del pH inferiores a 5 y, por lo tanto, es mucho menos adecuada para la aplicación industrial, así como para el consumo oral.

Este es el primer informe sobre el aislamiento y la caracterización de un miembro de la familia S28 a partir de un eucariota inferior.

Ejemplo 3

La endoproteasa específica para la prolina derivada de *A. niger* puede hidrolizar proteínas grandes, así como péptidos pequeños y, por lo tanto, es una verdadera endoproteasa.

Debido a una característica estructural específica, las prolil oligopeptidasas pertenecientes a la familia S9 no pueden digerir péptidos mayores que 30 aminoácidos. Esta limitación es una desventaja obvia para una enzima, que está destinada a hidrolizar de la manera más rápida y eficiente posible todos los potenciales péptidos tóxicos ricos en prolina. Para ver si la endoproteasa específica para prolina derivada de *A. niger* exhibe las mismas limitaciones con respecto al tamaño de la molécula del sustrato, los autores de la invención han incubado la prolil endopeptidasa purificada por cromatografía de *A. niger* con un péptido sintético pequeño y con la molécula de ovoalbumina grande y han analizado por SDS-PAGE los productos de hidrólisis formados. El péptido sintético utilizado fue un 27-mero de la secuencia NH2-FRASDNDRVIDPGKVETLTIRRLHIPR-COOH y fue un regalo de la compañía Pepscan (Lelystad, Países Bajos). Como se muestra por su secuencia de aminoácidos, este péptido contiene 2 residuos de prolina, uno en el medio y otro cerca del extremo del péptido.

La molécula de ovoalbumina intacta (Pierce Imject, viales que contienen 20 mg de material liofilizado) consiste en 385 aminoácidos con un peso molecular de 42 750 Da. Esta molécula contiene 14 residuos de prolina, uno de los cuales se encuentra en el extremo C-terminal de la molécula y no puede ser escindido por una endoproteasa específica para prolina. La ovoalbúmina y el oligopéptido se incubaron por separado a 50°C con la endoproteasa específica para prolina derivada de *A. níger*. A varios intervalos de tiempo se tomaron muestras que se analizaron utilizando SDS-PAGE.

Una endoproteasa específica para prolina derivada de *A. níger* purificada por cromatografía con una actividad de 4,5 unidades/ml se diluyó 100 veces con tampón acetato 0,1 M pH 4 que contiene CaCl2 20 mM. La ovoalbumina se disolvió en tampón acetato pH 4 a una concentración de 1 mg/ml (22 µM). El 27-mero se disolvió en el mismo tampón para alcanzar una concentración de 0,48 mg/ml (152 µM). La molaridad de la ovoalbumina y la solución de 27-meros se eligió de tal manera que ambas soluciones contenían la misma molaridad en los residuos de prolina escindibles. La ovoalbumina contiene 13 sitios potenciales de escisión de la prolina, mientras que el péptido de 27-meros tiene solo dos. De ambas soluciones de sustrato, se incubaron 0,5 ml con 10 µl (0,45 miliU) de la solución enzimática en un termomezclador Eppendorf a 50°C. En varios intervalos de tiempo se extrajeron muestras de 10 µl de la mezcla de incubación y se mantuvieron a 20°C hasta la SDS-PAGE. Todos los materiales utilizados para la SDS-PAGE y tinción se adquirieron de Invitrogen. Las muestras se prepararon utilizando tampón LDS de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se separaron en geles Bis-Tris al 12%, utilizando el sistema tampón MES-SDS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La tinción se realizó utilizando la Simply Blue Safe Stain (Coomassie Coloidal G250).

Como puede verse en la Figura 2, la ovoalbúmina es escindida por la enzima derivada de *Aspergillus* en una banda discreta de aproximadamente 35 a 36 kD en las primeras 4,75 horas de incubación (pista 3). Los períodos de incubación prolongados resultan en una descomposición adicional en productos más pequeños de diversos pesos moleculares (pista 7).

El péptido de 27-meros también se descompone, a juzgar por las bandas más débiles en las pistas 4, 6 y 8 en comparación con la pista 2. El desplazamiento muy pequeño del peso molecular del producto (compárense las pistas 9 y 8) probablemente se deba a la escisión del residuo de arginina en el extremo carboxílico del péptido. La diferencia es de aproximadamente 200D (medida utilizando el software Alphalmager 3.3d en un sistema Alphalmager 2000) y la arginina tiene un PM de 174. Este pequeño desplazamiento del peso molecular es probablemente el primer paso en la descomposición del péptido.

El decaimiento adicional del producto sólo puede ser visto por la disminución de la intensidad de la banda en el gel SDS. Los productos de descomposición adicional no son visibles, ya que en la tinción en gel de componentes con un PM de aproximadamente 1000 no es posible con Coomassie Azul Brillante.

A partir de este experimento se puede concluir que, a diferencia de las prolil oligopeptidasas conocidas pertenecientes a la familia S9, el endoproteasa específica para prolina derivada de *A. niger* no tiene preferencia específica para escindir péptidos de pequeño tamaño frente a proteínas mucho más grandes. Como tal, la enzima derivada de *A. niger* representa una verdadera endoproteasa y una enzima preferida para escindir péptidos tóxicos ricos en prolina tóxica potenciales.

Ejemplo 4

Péptidos formados tras la incubación del 33-mero derivado de gliadina LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF con la endoproteasa específica para prolina de *A. niger.*

El tratamiento de los jugos gástricos y pancreáticos resistentes al 33-mero derivado de gliadina LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (M = 3911) según lo descrito por Shan et al (Science, Vol 297, 27 de septiembre de 2002) con Alcalasa a pH 8 o pH 5 no resultó en cualquier escisión de la molécula. Sin embargo, similar a la situación con el 10-mero derivado de beta-caseína, la incubación con 1 unidad de la endoproteasa específica para prolina de *A. niger* a pH 5 resultó en la descomposición total de la molécula en varios péptidos. La intensidad del triple 33-mero protonado a *m*/*z* 1304,4, cae 3 órdenes de magnitud. No se observó una disminución adicional de la intensidad de la molécula protonada y tampoco se observaron otras masas peptídicas tras el tratamiento del 33-mero con 10 unidades enzimáticas por gramo de proteína.

Después del tratamiento enzimático se formaron aproximadamente 6 péptidos principales y varios péptidos de menor importancia, con un péptido caracterizado por una *m*/*z* 565,2 como el más abundante. Los 6 péptidos se analizaron en modo LC/MS/MS y se encontró que todos ellos contenían prolina en el extremo C, confirmando la especificidad de la enzima. El péptido principal formado se caracteriza por una *m/z* 565.2 (secuencia ..QLP en la tabla 4). Aunque la secuencia "LP" C-terminal podría demostrarse inequívocamente para este péptido, la masa identificada en teoría no puede formarse por degradación endoproteolítica del 33-mero, de modo que queda cierta incertidumbre con respecto a la composición exacta N-terminal del péptido. Lo más probable es que m/z 565,2 sea la variante N-piroglutamilo de QPQLP (M = 581,3), aunque esto no se investigó más a fondo.

Apariencia de QPQLP: LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF
Apariencia de QPQLPYP: LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF.

El espectro LC/MS/MS del péptido con *m*/*z* 679 podría ser dilucidado que era PQPQLP. A pesar del hecho de que la naturaleza del péptido con *m*/*z* 565,2 no se entendió completamente, los datos obtenidos demuestran claramente la división preferente de la endoproteasa específica para prolina de *Aspergillus* en el lado C-terminal de los residuos de prolina en las posiciones 12, 19 y 26 (es decir, exclusivamente entre la prolina y el residuo de tirosina) de este 33-mero particular. Este patrón de escisión no se ve influenciado por el uso de mayores relaciones enzima/sustrato. En la tabla 4 se resume toda la información relevante.

La primera columna especifica las secuencias peptídicas derivadas, los puntos utilizados (también en la columna 5) indican que no se podía dar una posición de partida exacta del péptido debido a las discrepancias en masa inexplicadas. La segunda columna presenta los valores m/z de las moléculas protonadas, la tercera columna la intensidad de los péptidos observados en el modo LC/MS, la cuarta columna los porcentajes basados en el área pico de la molécula protonada y la quinta columna la posición de los péptidos identificados en la secuencia de aminoácidos total.

Tabla 1: Péptidos formados tras la incubación del 33-mero derivado de gliadina LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF con la endoproteasa específica para prolina de *A. niger.*

Secuencia de aminoácidos del péptido	*m/z*	Intensidad en modo LC/MS	Porcentaje	Posiciones en una secuencia total de aa
... YP	523,2	$1,9\ 10^{7}$	5,2	..14, ..21, ..28
YPQPQLP	842,3	$1,7\ 10^{6}$	0,5	13-19,20-26
QPQP	468,2	$3,4\ 10^{7}$	9,3	29-32
PQPQLP	679,2	$3,4\ 10^{7}$	9,3	14-19, 21-26
..QLP	565,2	$2,4\ 10^{8}$	65,9	..12, ..19, ..26
...PAG	599,2	$3,5\ 10^{7}$	9,6	

La escisión del 33-mero, que se afirma que es un epítopo principal en pacientes celíacos, no puede lograrse mediante jugos gástricos o pancreáticos o mediante incubación con la proteasa agresiva de amplio espectro Alcalasa, ni bajo condiciones alcalinas ni ácidas. No obstante, los resultados de los autores de la invención indican una escisión eficiente por la endoproteasa derivada de *A. niger* específica para prolina en condiciones ácidas. La última escisión tiene lugar exclusivamente entre los residuos de prolina y tirosina de la molécula y genera el 99.5% de péptidos con no más de 6 residuos de aminoácidos de largo. Así, a pesar de su alta eficacia hacia los péptidos ricos en prolina en condiciones ácidas, incluso la enzima derivada de *Aspergillus* deja al menos 0,5% de un heptámero con la secuencia de aminoácidos YPQPQLP. Como la secuencia PYPQPQLPY es un epítopo de células T específico para el paciente celíaco conocido, este hallazgo enfatiza una vez más que las enzimas subóptimas específicas para prolina con un óptimo de pH casi neutro, como las conocidas oligopeptidasas específicas para prolina y la enzima derivada de *Flavobacterium meningosepticum,* será imposible una aplicación realista *in vivo* para prevenir la formación de péptidos tóxicos a partir de moléculas de gluten.

Ejemplo 5

Los espectros de actividad de pH de la endoproteasa específica para prolina de *A. niger* y la oligopeptidasa específica para prolina de *F. meningosepticum*

Como se demostró en el Ejemplo 1, el óptimo del pH de la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* es de aproximadamente 4,2. En este primer ensayo, no se contemplaron valores de pH muy ácidos, por lo que el comportamiento de la enzima en los extremos de pH que pueden existir en el estómago no está completamente claro. El documento WO 03/068170 enseña que proteasas específicas para prolina, tales como la prolil oligopeptidasa de Flavobacterium meningosepticum o DPPIV de Aspergillus fumigatus o peptidil dipeptidasas de especies de Streptomyces presentan candidatos preferidos para la degradación in situ de péptidos ricos en prolina tóxica. Típicamente, todas las últimas proteasas presentan un pH óptimo casi neutro que parece excluir cualquier actividad hidrolítica en el estómago. Para demostrar la diferencia en el óptimo del pH que existe entre la endoproteasa específica para prolina de acuerdo con la invención y las enzimas de la técnica anterior, los autores de la invención compararon los espectros de actividad de pH de la endoproteasa derivada de *Aspergillus* y la oligopeptidasa derivada de *Flavobacterium*. La endoproteasa derivada de *Aspergillus* se obtuvo tal como se describe en el Ejemplo 1. La oligopeptidasa derivada de Flavobacterium se adquirió de ICN Biomedicals (35 unidades/mg; cat. nº 32082; Ohio, EE.UU.).

Para establecer los espectros de actividad del pH de las dos enzimas, se prepararon tampones con diferentes valores de pH. Se prepararon tampones que varían de pH 2,0 a 7,0 utilizando citrato 0,1 mol/l, se prepararon tampones que varían de pH 6,0 a 9,0 utilizando 0,1 mol/l de tris y se prepararon tampones que varían de pH 8,0 a 12,0 utilizando 0,2 mol/l de glicina. Los valores de pH requeridos se ajustaron utilizando HCl o NaOH. El péptido sintético cromogénico Z-Gly-Pro-AMC (Bachem, Suiza) se utilizó como sustrato para ambas enzimas. En cada uno de los pocillos (placas Costar nº 3631) se introdujeron 85 µL de tampón, 10 µL de solución enzimática y 5 µL del sustrato (Z-Gly-Pro-AMC 4 mM en metanol al 60%). La concentración final de la enzima *A. niger* fue de 32 ug/ml (3,2 miliunidades/ml), la concentración final de la enzima de F. *meningosepticum* fue de 0,21 ug/ml (7,4 miliunidades/ml). Después de mezclar, se dejó que la reacción continuara durante 30 minutos a 37,0°C, después de lo cual se midió la fluorescencia en un lector de placas de múltiples pocillos CytoFluor de PerSeptive Biosciences. Los datos relativos obtenidos se muestran en la Figura 3. Los datos obtenidos bajo estas condiciones de ensayo ligeramente diferentes confirman el óptimo de pH ácido de la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* como se establece en el Ejemplo 1. Los datos demuestran que la enzima de A. niger tiene aproximadamente 20% de actividad residual a pH 2,2 y 7,5. Los datos mostrados en la Figura 3 también confirman el óptimo de pH publicado del F. meningosepticum alrededor de pH 7,0. Más importante en el contexto de la presente solicitud de patente es que por debajo de pH 5,0 la enzima de F. meningosepticum no tiene actividad.

Estos datos demuestran que, en contraste con la enzima de *F. menigosepticum*, la endoproteasa específica para prolina derivada de *A. niger* es ideal para desplegar su actividad completa en las condiciones ácidas que prevalecen en el estómago y parte del duodeno.

Ejemplo 6

Estabilidades de la endoproteasa específica para prolina de *A. niger* y de la oligopeptidasa específica para prolina de *F. meningosepticum* en condiciones como las presentes en el estómago.

El requisito previo para una terapia enzimática de éxito es la degradación gastrointestinal eficiente de péptidos tóxicos ricos en prolina antes de que dichos péptidos alcancen a la parte distal del duodeno. Esto requiere que la enzima exógena que a utilizar para la terapia enzimática sea una proteasa específica para prolina que sea activa durante el tiempo de permanencia de la proteína de la dieta en el estómago y, opcionalmente, más allá del estómago. Para comparar las actividades de las proteasas específicas para prolina derivadas de *A. niger* y *F. meningosepticum* en estas condiciones "similares al estómago", los autores de la invención analizaron sus actividades residuales después de una incubación a 37 grados C durante diferentes períodos de tiempo en diferentes condiciones de pH y en presencia y ausencia de la proteasa gástrica pepsina. Las actividades enzimáticas residuales se analizaron utilizando un valor de pH y un péptido cromogénico óptimos para la enzima relevante, es decir, un pH de 7,0 y el sustrato Z-Gly-Pro-pNA para la enzima de F. meningosepticum y un pH de 4,0 y un sustrato Ala-Ala- Pro-pNA para la enzima de A. niger. La enzima de A. niger utilizada muestra alta actividad en Ala-Ala-Pro-pNA y algo de actividad (menos del 10% de su actividad en Ala-Ala-Pro-pNA) en el sustrato Ala-Ala-Ala-pNA. La enzima de A. niger, tal como se utiliza, no muestra actividad significativa en otros sustratos de Ala-Ala-X-pNA.

Tampones citrato/HCI de 0,2 mol/l se utilizaron para la obtención de las condiciones de pH ácido requeridas. La dosis de la enzima derivada de *A. niger* fue de 1,5 unidades/ml, la dosis de la enzima de F. meningosepticum (MP Biochemicals, Ohio, EE.UU.) de 3,3 unidades/ml (véase la sección Materiales y Métodos para las definiciones de las unidades). Se añadió pepsina (Sigma) en una concentración de 180 microgramos/ml. Se añadió pepstatina (Sigma) después del muestreo en una concentración de 1,67 microgramos/ml con el fin de inactivar la pepsina. En estas condiciones, la pepstatina no tuvo efecto inhibidor sobre las dos proteasas específicas para prolina. Las actividades residuales de las dos proteasas específicas para prolina se midieron cinéticamente a 405 nm, haciendo uso de los sustratos sintéticos Ala-Ala-Pro-pNA y Z-Gly-Pro-pNA, respectivamente. Con ese fin, 200 µL de solución de sustrato (2 mmol/l de Z-Gly-Pro-pNA en un tampón fosfato de 0,05 mol/l pH 7,0 o 1,5 mmol/l de Ala-Ala-Pro-pNA en un ácido acético de 0.05 mol/l tampón pH 4,0) se mezclaron con 50 microlitros (prediluidos de 10 a 100 x) de la muestra tratada con ácido/pepsina en pocillos de MTP. La absorbancia se midió cinéticamente durante 10 min a 405 nm a 30°C utilizando un lector TECAN Genios MTP (Salzburgo, Viena).

Los resultados representados en la Tabla 5 demuestran que el pH 4 representa el límite inferior en el que puede sobrevivir la enzima de *F. meningosepticum*. Téngase en cuenta que de acuerdo con los datos descritos en el Ejemplo 7, la enzima no tiene actividad en estas condiciones de pH. Después de 2 horas a pH 4,0, la enzima muestra aproximadamente un 25% de actividad residual si se somete a ensayo en condiciones óptimas. Sin embargo, tan pronto como esté presente pepsina, la enzima se inactiva completamente después de 15 minutos a este pH. En contraste con estos resultados están los datos obtenidos con la enzima de A. niger. La última enzima mantiene su actividad completa a valores de pH tan bajos como pH 2, e incluso en combinación con pepsina. Estos resultados sugieren fuertemente que solo las enzimas con un pH óptimo por debajo de 5,5 sean probablemente activas en el estómago, por lo que las proteasas específicas para prolina conocidas que pertenecen a las clases de enzimas EC 3.4.21.26 (prolil oligopeptidasas), EC 3.4.14.5 (dipeptidil-peptidasa IV) y EC 3.4.15.1 (peptidil-dipeptidasa A) no califican para la degradación de péptidos ricos en prolina en el estómago.

Tabla 2: Actividad enzimática residual de la oligopeptidasa de *F. meningosepticum* y la endoproteasa de *A. niger* después de diversos períodos de incubación en condiciones estomacales

Condiciones de incubación		Actividad enzimática residual de la oligopeptidasa de *F. meningosepticum* después de:				Actividad enzimática residual de la endoproteasa de *A. niger* después de:			
pH	Pepesina presente	15 min	30 min	60 min	120 min	15 min	30 min	60 min	120 min
2	No	-	-	-	-	+	+	+	+
	Sí	-	-	-	-	+	+	+	+
3	Nos	-	-	-	-	+	+	+	+
	Sí	-	-	-	-	+	+	+	+
4	No	+	+	+	+/-	+	+	+	+
	Sí	-	-	-	-	+	+	+	+

+ significa actividad residual presente si se ensaya en condiciones óptimas para la enzima,
- significa que no hay actividad residual presente si se ensaya en condiciones óptimas para la enzima.

Ejemplo 7

Actividad de la endoproteasa específica para prolina de *A. niger* hacia diversos epítopos de gluten

Un cierto número de publicaciones especifican péptidos derivados del gluten de trigo que son reconocidos por las células T del intestino delgado de pacientes con enfermedad celíaca. En este contexto, la unión de péptidos a moléculas HLA-DQ2 es de especial interés, porque las personas que portan solo el haplotipo HLA-DQ2 tienen, con mucho, la mayor probabilidad de desarrollar enfermedad celíaca (Maki et al.; N Engl J Med. 19 de junio de 2003; 348(25):2517-24). Todos los pacientes adultos con HLA-DQ2 examinados responden a las secuencias alfa-GLIA Glia-alfa2 y Glia-alfa9 (Arentz-Hansen et al, J. Exp. Med. 2000;6:337-342). Los niños con enfermedad celíaca de inicio reciente responden a los péptidos Glia-alfa20, Glia-gamma30, Glt-17, Glt-156 y Glu-21 (Vader et al, Gastroenterology 2002; 122:1729-1737). En el Ejemplo 6, los autores de la invención ya han demostrado la escisión con éxito del péptido Glia-alfa2 (PQPQLPYPQPQLPY) por la enzima derivada de A. niger. Aquí sometieron a ensayo si la enzima de *A. niger* también puede escindir otros péptidos derivados del gluten de trigo relevantes, así como homólogos de estos péptidos derivados de otros cereales.

A tal fin, los péptidos relevantes se sintetizaron después de que sus purezas se confirmaron por HPLC en fase inversa y espectrometría de masas (MALDI-TOF) de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección de Materiales y Métodos. Las digestiones peptídicas se llevaron a cabo mezclando 50 microlitros de la solución peptídica (1 mg/ml) con 50 microlitros de la solución enzimática de A. niger que contenía 0,43 microgramos/ml (0,043 miliunidades) en 50 milimol/l de tampón acetato de amonio pH 4,5. Después de diversos períodos de incubación a temperatura ambiente se tomaron muestras de 0,5 microlitros y se añadieron a 9,5 microlitros de una solución de la matriz (1: 1 de H2O y CH_3CN que contiene TFA al 0,2%). Después de desalar utilizando perlas de resina de iones Dowex, el líquido se detectó en una placa MALDI junto con algunos péptidos de referencia relevantes, después de lo cual se analizaron todos los péptidos. A partir de los datos obtenidos, se podrían deducir los sitios de escisión como se indica en la Tabla 6. Los péptidos Glt 156 es Glia gamma-2 son 10-meros; Glt 17 es un 8-mero, pero requiere la extensión C-terminal por un residuo P y uno L para una unión óptima. Los sitios de escisión inequívocos se indican mediante líneas verticales dobles, los sitios de escisión que eran menos evidentes se indican mediante una sola línea vertical. Los epítopos mínimos conocidos de células T en cada uno de los péptidos se indican mediante subrayado. Las U utilizadas en Glu-5 representan un residuo de leucina o isoleucina.

A partir de los datos obtenidos es evidente que no solo Glia-alfa2, sino, de hecho, todos los epítopos de gluten relevantes para pacientes jóvenes, así como adultos de HLA-DQ2 se hidrolizan de manera eficiente por la proteasa específica para prolina derivada de A. niger. Como la mayoría de los sitios de escisión pueden identificarse con los sitios mínimos de unión al epítopo de células T conocidos, es probable que la exposición de los epítopos de gluten a la enzima elimine el reconocimiento y, por lo tanto, prevenga eficazmente la posterior proliferación de células T que finalmente conduce a los síntomas característico de pacientes con enfermedad celíaca.

Tabla 3: Sitios de escisión de la endoproteasa derivada de *A.niger* en diversos epítopos de gluten de trigo conocidos.

Glia - α2	PQ // PQLP // YP QPQLPY
Glia - α9	QLQ P // FP // QPQLP // Y
Glia - α20	PFRP // QQP // YP / QPQPQ
Glia - γ1	QPQQ P // QQSFP // Q QQRP // F
Glia - γ2	QQ P // YPQQP // QQP FPQ
Glia - γ30	VQGQG IIQP // QQPAQ L
GTL - 17	QQP P // FSQQQQQ P // LPQ
GTL -156	QQP P // FSQQQQSP / F SQ
Glu - 5	QQUSQP // QUP // QQQ QUP // QQPQQF
Glu - 21	QPQP // FP // QQSEQSQQP // FQPQPF

En un enfoque similar, sitios de escisión de la enzima derivada de A. niger en un cierto número de homólogos de gluten derivados de avena, cebada y centeno de los epítopos de gluten de trigo (Vader, W et al, Gastroenterology 2003;125:1105-1113). Los resultados obtenidos (véase la Tabla 7) ilustran que la enzima derivada de A. niger no

solo puede escindir los epítopos de gluten de trigo responsables de la enfermedad celíaca, sino también los homólogos de estos péptidos que están presentes en la avena, la cebada y el centeno. Como en la Tabla 6, los sitios de escisión inequívocos se indican mediante líneas dobles.

Tabla 4: Sitios de escisión de la endoproteasa derivada de A. niger en diversos epítopos de gluten no de trigo conocidos

Fuente de gluten	Referencia	Secuencia de aminoácidos	Homólogo del epítopo de gluten de trigo
Avena	Av-gamma2B	QQP // FVQQQQP // FVQ	Glia-gamma2
Avena	Av-gamma2A	QQP // FVEQQEQPFVQ	Glia-gamma2 desamidada
Avena	Av-gamma2B	QQP // FVQQQQP // FVQQ	Glia-gamma2
Cebada	Hor-alpha2	QQFP // QPQQP // FPQQP	Glia-alpha2
Cebada	Hor-alpha9	PQQP // FP // QP // QQPFR // Q	Glia-alpha9
Centeno	Sec-alpha2	QP // FP // QP // QQPFPQSQ	Glia-alpha2

REIVINDICACIONES

1. Endoproteasa específica para prolina que comprende un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad con los aminoácidos 1 a 526 de SEQ ID NO: 2 que tiene un óptimo de pH por debajo de 6,5, preferiblemente por debajo de 5,5, más preferiblemente por debajo de 5,0, que es capaz de escindir epítopos de gluten a valores de pH inferiores a 5 y en presencia de pepsina, para uso como un medicamento o para fabricar un medicamento.

2. Endoproteasa específica para prolina para uso de la reivindicación 1, que es una enzima de *Aspergillus,* preferiblemente una enzima de *Aspergillus niger*.

3. Uso de endoproteasa específica para prolina que comprende un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad con los aminoácidos 1 a 526 de SEQ ID NO: 2 que tiene un óptimo de pH inferior a 6,5, preferiblemente inferior a 5,5, más preferiblemente inferior a 5,0, que es capaz de escindir epítopos de gluten a valores de pH inferiores a 5 y en presencia de pepsina, para la fabricación de un complemento dietético o un medicamento para el tratamiento o la prevención de trastornos psiquiátricos, incluidos autismo, esquizofrenia, ADHD (trastorno por déficit de atención con hiperactividad), trastorno bipolar del estado del ánimo y depresión y trastornos relacionados con la enfermedad celíaca, que son trastornos autoinmunes, especialmente diabetes tipo 1, dermatitis herpetiforme, tiroiditis autoinmune, enfermedades del colágeno, alopecia autoinmune y hepatitis autoinmune e IBS (síndrome del intestino irritable).

4. Uso de endoproteasa específica para prolina de la reivindicación 3, en donde la endoproteasa específica para prolina es una enzima de *Aspergillus,* preferiblemente una enzima de *Aspergillus niger*.

Figura 1

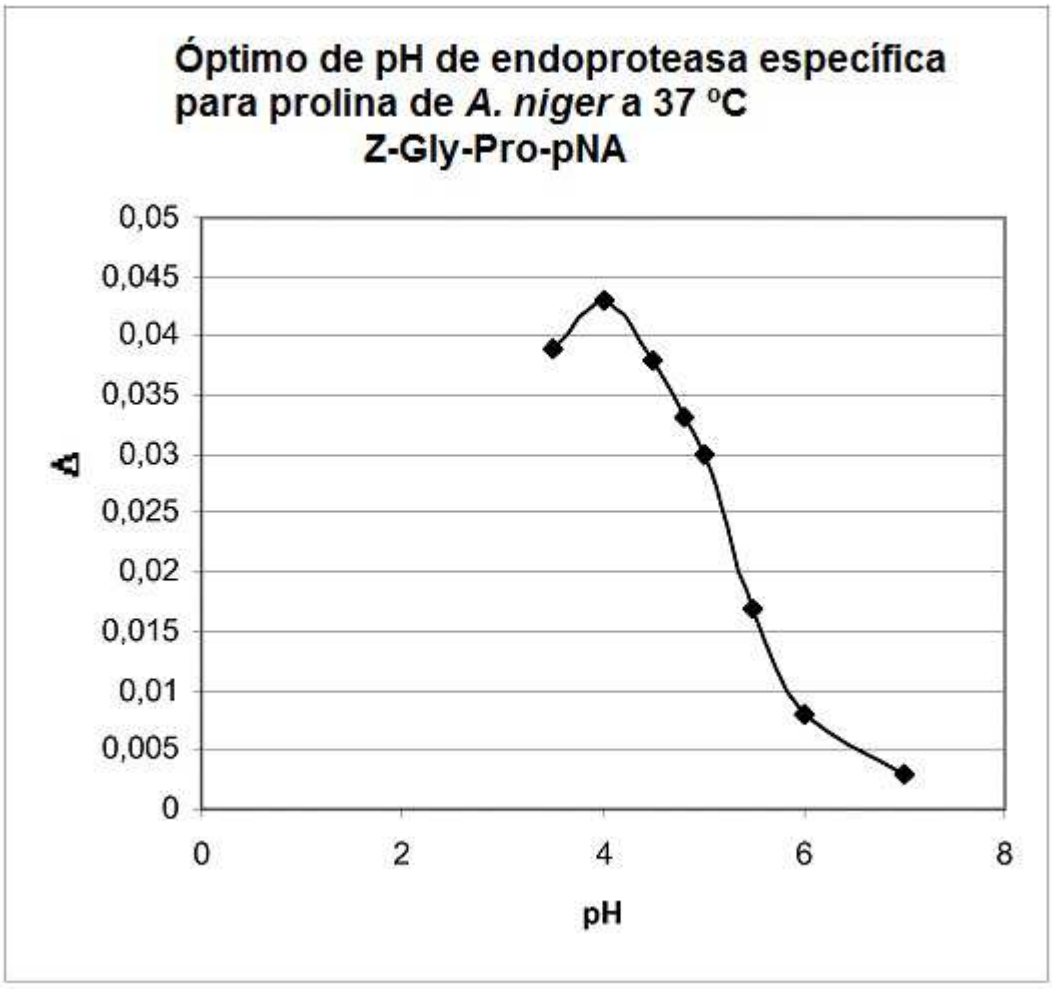
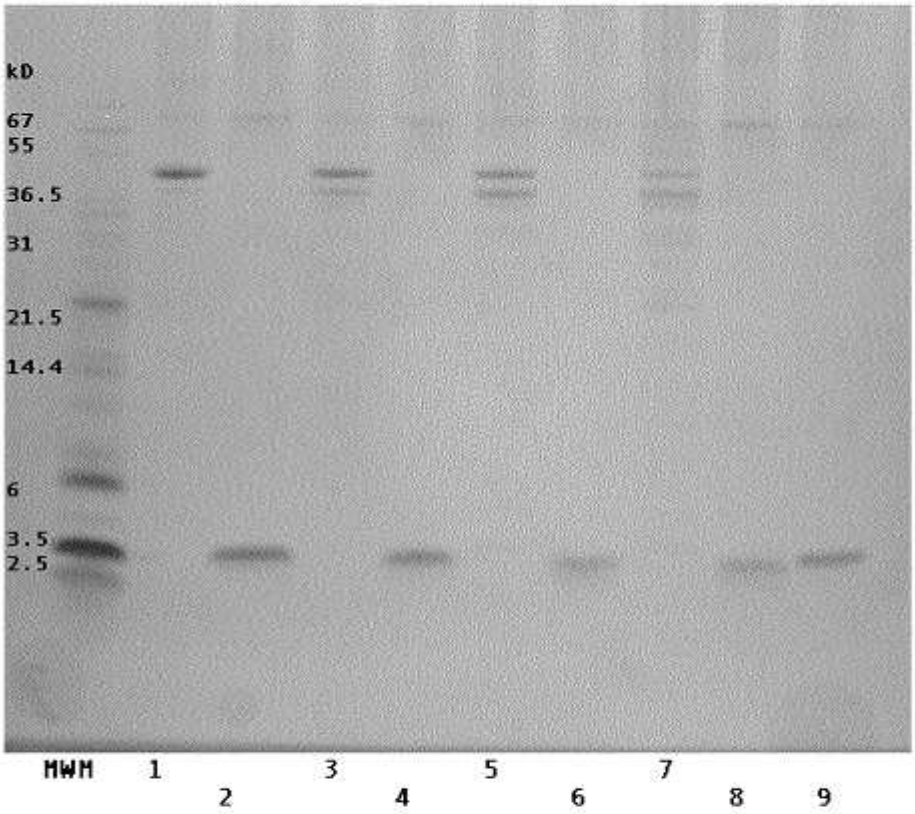

Óptimo de pH de endoproteasa específica para prolina de A. niger a 37 ºC
Z-Gly-Pro-pNA
0,05
0,045
0,04
0,035
0,03
0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
Δ
0
2
4
6
8
pH

Figura 2



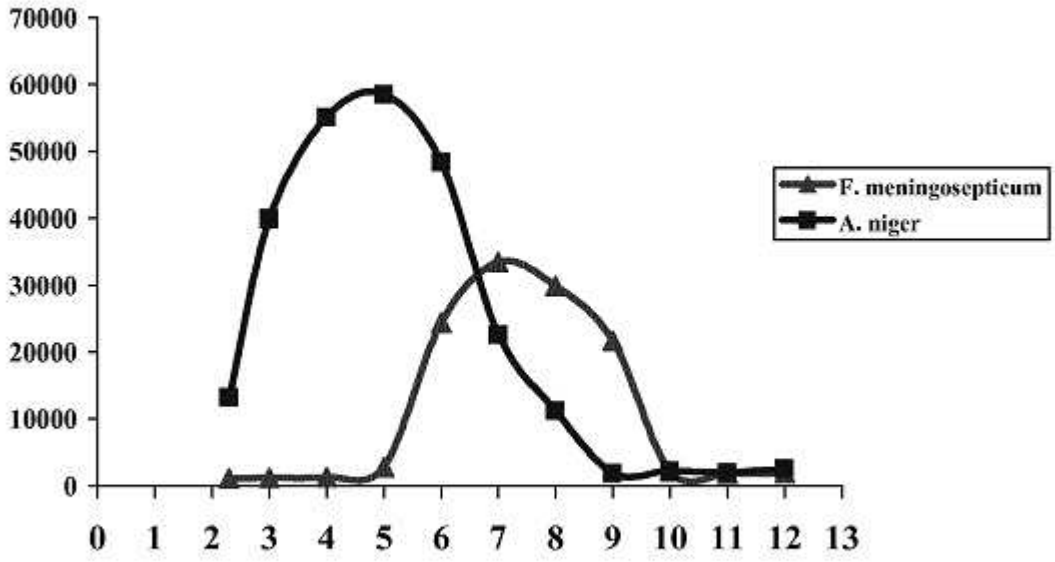
MWM= molecular weight markers

Lanes 1, 3, 5, 7: ovalbumine after 0, 4.75, 20,5 and 27.75 hours of incubation respectively (5µl loaded); lanes 2, 4, 6, 8: 27-mer peptide after 0, 4.75, 20,5 and 27.75 hours of incubation respectively (5µl loaded). Lane 9: 27-mer at 0 hours (2µl loaded).

MWM = marcadores del peso molecular

Pistas 1, 3, 5, 7: ovoalbúmina después de 0, 4,75, 20,5 y 27,75 horas de incubación, respectivamente (cargada con 5 µl); pistas 2, 4, 6, 8: péptido 27-mero después de 0, 4,75, 20,5 y 27,75 horas de incubación, respectivamente (cargado con 5 µl). Pista 9: 27-mero a 0 horas (cargado con 2 µl).

Figura 3


70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
F. meningosepticum
A. niger