

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 883 347**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/48	(2006.01)	A61P 25/24	(2006.01)
A61K 36/185	(2006.01)	A61P 37/02	(2006.01)
A61P 37/06	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)		
A61K 36/36	(2006.01)		
A61J 1/03	(2006.01)		
A61P 1/00	(2006.01)		
A61P 17/00	(2006.01)		
A61P 21/00	(2006.01)		
A61P 25/22	(2006.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2015 PCT/CA2015/000389**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15192211**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2015 E 15809878 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.06.2021 EP 3220946**

(54) Título: **Composiciones y procedimientos para atenuar y prevenir la inflamación intestinal debida a la presencia de antígenos alimentarios peptídicos en un intestino**

(30) Prioridad:

**16.06.2014 US 201462012865 P
19.02.2015 US 201562118396 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2021

(73) Titular/es:

**CODEXIS, INC (100.0%)
200 Penobscot Drive
Redwood City, CA 94063, US**

(72) Inventor/es:

**SCHRIEMER, DAVID y
REY, MARTIAL**

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 883 347 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para atenuar y prevenir la inflamación intestinal debida a la presencia de antígenos alimentarios peptídicos en un intestino

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

En esta memoria se proporcionan composiciones para uso en el tratamiento de la intolerancia al gluten y afecciones relacionadas, tales como enfermedad celíaca o sensibilidad al gluten. Se proporcionan además en esta memoria 10 composiciones y procedimientos para atenuar o impedir la infiltración de linfocitos intraepiteliales (IEL) inducida por la presencia de antígenos alimentarios proteicos en el intestino. Tales antígenos alimentarios proteicos incluyen 15 alimentos ricos en prolina difíciles de digerir, tales como las proteínas encontradas en el trigo, la cebada, el centeno, etc., que contienen gluten. El gluten, en particular, se hidroliza parcialmente en el tracto gastrointestinal y puede conducir a infiltración de IEL y producción de anticuerpos que incluyen IgA endomisial y transglutaminasa antitissular. Las 15 composiciones de esta invención proporcionan cantidades reducidas de tales antígenos alimentarios proteicos en el intestino, lo que a su vez reduce la cantidad de infiltración de IEL del intestino.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Varias enfermedades están mediadas por reacciones a proteínas alimentarias antigénicas en individuos susceptibles. 20 Por ejemplo, la ingestión de trigo, cebada y centeno, que contienen proteínas alimentarias antigénicas (p. ej., gluten), puede provocar respuestas autoinmunitarias anómalas, tales como enfermedad celíaca, alergia al trigo y dermatitis herpetiforme, en individuos intolerantes al gluten. El gluten es una mezcla de moléculas proteicas de prolamina y 25 glutenina ricas en glutamina y prolina.

25

La enfermedad celíaca es un trastorno autoinmunitario que afecta al intestino delgado. La mayoría de los individuos 30 que tienen las respuestas autoinmunitarias anómalas características de la enfermedad celíaca expresan las moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA) DQ2 o DQ8. Los síntomas de la enfermedad son provocados por una reacción a las proteínas del gluten, y también pueden incluir otras proteínas de almacenamiento en los productos de grano consumidos (p. ej., serpinas, purininas). Clínicamente, la enfermedad es detectable en parte mediante la cuantificación 35 de anticuerpos específicos para el gluten y la transglutaminasa tisular (tTG). Las respuestas autoinmunitarias dan como resultado el desarrollo de atrofia de las vellosidades de la mucosa del intestino delgado con hiperplasia de las criptas e inflamación de la mucosa. Los síntomas de la enfermedad celíaca pueden variar de un individuo a otro y pueden incluir uno o más de fatiga, diarrea crónica, estreñimiento, mala absorción de nutrientes, pérdida de peso, 40 distensión abdominal, anemia, así como un riesgo sustancialmente mayor de desarrollar osteoporosis y neoplasias malignas intestinales (linfoma y carcinoma).

35

La diabetes de tipo I es un factor de riesgo para la enfermedad celíaca. El autismo también está asociado a la enfermedad celíaca, y una dieta exenta de gluten puede ayudar a aliviar algunos síntomas del autismo. Similarmente, 45 se cree que algunas personas con trastorno por déficit de atención e hiperactividad presentan menos síntomas cuando se elimina el gluten de sus dietas. Otras afecciones que pueden beneficiarse de la eliminación del gluten en la dieta incluyen la artritis reumatoide y la fibromialgia. El documento WO 2012/006384 describe las enzimas degradadoras de gluten encontradas en bacterias de la especie *Rothia* que son capaces de romper los enlaces peptídicos en péptidos que contienen -XPQ-, -QQP-, -PPF-, -LYP- y/o -PFP-. Stepiak y col. (2006) American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, American Physiological Society, US 291 (4), G621-G629 describen la degradación del gluten muy eficiente con una prolil endoproteasa recientemente identificada y también describen las implicaciones para la enfermedad celíaca. La patente US 2005/249719 describe la administración de una dosis efectiva de glutenasa a un paciente celíaco o con dermatitis herpetiforme con el fin de reducir los niveles de oligopeptídos tóxicos del gluten atenuando o eliminando los efectos perjudiciales del gluten. Kadek y col. (2013) 50 describen la expresión y caracterización de la proteasa aspártica vegetal nepentesina-1 de *Nepenthes gracilis*. La patente US 2014/140980 describe composiciones, alimentos que comprenden nepentesina o un derivado de la misma y procedimientos para usar nepentesina o un derivado de la misma para modular la intolerancia al gluten y afecciones relacionadas, tales como enfermedad celíaca. Freeman (2008) Canadian Journal of Gastroenterology (2008) describe 55 las ventajas y dificultades del diagnóstico de la enfermedad celíaca del adulto.

55

El tratamiento para la intolerancia al gluten, especialmente la enfermedad celíaca, implica habitualmente una dieta estricta exenta de gluten de por vida. Sin embargo, una dieta exenta de gluten es inapropiada, restrictiva y el gluten es difícil de evitar. Por lo tanto, se necesitan tratamientos alternativos efectivos para la intolerancia al gluten y la enfermedad celíaca.

60

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere al descubrimiento de que la administración de una composición farmacéutica que comprende una o más enzimas de *Nepenthes* como se describen en esta memoria, en combinación con una proteína alimentaria potencialmente antigénica, da como resultado una disminución en la respuesta inmunitaria a la proteína alimentaria antigénica después de su ingestión, que incluye una disminución en la infiltración y/o producción de linfocitos

intraepiteliales en el intestino. Los linfocitos intraepiteliales son linfocitos T que están intercalados entre las células epiteliales del intestino grueso y delgado. Un recuento de linfocitos T aumentado es un indicador precoz de inflamación y está potencialmente asociado a intolerancia al gluten, lo que incluye la enfermedad celíaca.

5 Se cree que las propiedades tóxicas de las proteínas del gluten (p. ej., gliadinas y gluteninas) se deben en gran medida a los péptidos ricos en prolina y glutamina que se producen durante la degradación incompleta de las proteínas por las enzimas digestivas humanas (entre otras, la pepsina). Las endoproteasas gástricas y pancreáticas son incapaces de escindir estos subproductos peptídicos tóxicos o inmunogénicos de la degradación incompleta, al menos en parte debido al hecho de que tales enzimas carecen de especificidad por la prolina y/o la glutamina. Se cree que los péptidos provocan numerosos síntomas intestinales en individuos sensibles, que incluyen linfocitosis intraepitelial, atrofia de las vellosidades y/o inflamación. Otras proteínas presentes en el trigo también pueden estar implicadas en la respuesta autoinmunitaria, entre otras, las serpinas, las purininas, los inhibidores de alfa-amilasas/proteasas, las globulinas y las farininas.

10 15 Los linfocitos T son unos de los primeros en responder al ataque antigenico (es decir, la presencia de péptidos alimentarios tóxicos) en un individuo sensible. Los linfocitos T reaccionan rápidamente al ataque del antígeno y provocan inflamación y, en algunos casos, degradación del intestino. Por tanto, una reducción de los linfocitos T en el intestino indica una respuesta inmunitaria disminuida y es un indicador potencial de síntomas reducidos o eliminados asociados al consumo de alimentos inmunogénicos (p. ej., gluten) en individuos sensibles.

20 25 Sin ceñirnos a la teoría, se cree que al poner en contacto el gluten (u otra proteína antigenica) con una composición farmacéutica como se describe en esta memoria, la proteína se descompone en fragmentos polipeptídicos pequeños que reducen o eliminan una respuesta inmunitaria (es decir, no son tóxicos o son menos tóxicos).

30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 9999

Esta invención se basa además en el descubrimiento de que tales composiciones enzimáticas son capaces de degradar antígenos alimentarios proteicos hasta un nivel en el que la respuesta inmunitaria en el intestino, como se mide mediante la infiltración de IEL, se atenúa o elimina cuando se usan en combinación con alimentos La infiltración de IEL debida a la presencia de uno o más antígenos alimentarios peptídicos es un indicador biológico precoz de sensibilidad a antígenos alimentarios (p. ej., gluten). Por consiguiente, en un aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para atenuar o impedir una respuesta inmunitaria a antígenos alimentarios proteicos en el intestino de un mamífero, este procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos una enzima de *Nepenthes*. En una realización, la al menos una enzima de *Nepenthes* es nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas o una mezcla de las mismas. En una realización, la cantidad de la composición farmacéutica es efectiva para atenuar o impedir la infiltración de IEL en el intestino debida a la presencia del uno o más antígenos alimentarios peptídicos. En una realización, la infiltración de IEL es debida a la digestión incompleta de una proteína alimentaria potencialmente antigénica por las enzimas gástricas y/o intestinales endógenas. En una realización, la composición se administra al mamífero antes de la ingestión de un alimento o una proteína potencialmente antigénicos. En una realización, la composición se administra al mamífero con la ingestión de un alimento o una proteína potencialmente antigénicos. En una realización, la composición se administra al mamífero después de la ingestión de un alimento o una proteína potencialmente antigénicos. En una realización, la composición se administra al mamífero independientemente del consumo de un alimento o una proteína potencialmente antigénicos. En una realización, la proteína potencialmente antigénica es gluten. En una realización, la proteína potencialmente antigénica es una o más proteínas del trigo.

En una realización, la inflamación intestinal está caracterizada por infiltración y/o proliferación de IEL en el intestino. Por consiguiente, en un aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para atenuar o impedir la inflamación intestinal debida a la presencia de uno o más antígenos alimentarios peptídicos en el intestino de un mamífero, este procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos una enzima de *Nepenthes*. En una realización, la al menos una enzima de *Nepenthes* es nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas o una mezcla de las mismas. En una realización, la cantidad de la composición farmacéutica es efectiva para atenuar o impedir la inflamación intestinal debida a la presencia del uno o más antígenos alimentarios peptídicos. En una realización, la inflamación intestinal es debida a la digestión incompleta de una proteína alimentaria potencialmente antigénica por las enzimas gástricas y/o intestinales endógenas. En una realización, la composición se administra al mamífero antes de la ingestión de un alimento o una proteína potencialmente antigénicos. En una realización, la composición se administra al mamífero con la ingestión de un alimento o una proteína potencialmente antigénicos. En una realización, la composición se administra al mamífero después de la ingestión de un alimento o una proteína potencialmente antigénicos. En una realización, la composición se administra al mamífero independientemente del consumo de un alimento o una proteína potencialmente antigénicos. En una realización, la proteína potencialmente antigénica es gluten. En una realización, la proteína potencialmente antigénica es una o más proteínas del trigo.

En un aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para atenuar o impedir la linfocitosis intraepitelial debida a la presencia de uno o más antígenos alimentarios peptídicos en un intestino de un mamífero, este procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos una enzima de *Nepenthes*. En una realización, la al menos una enzima de *Nepenthes* es nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas o una mezcla de las mismas. En una realización, la cantidad de la composición farmacéutica es efectiva para inhibir la linfocitosis intraepitelial en el intestino. En una realización, la composición se administra al mamífero antes de la ingestión de un alimento o una proteína potencialmente antigénicos. En una realización, la composición se administra al mamífero con la ingestión de un alimento o una proteína potencialmente antigénicos. En una realización, la composición se administra al mamífero después de la ingestión de un alimento potencialmente antigénico. En una realización, la composición se administra al mamífero independientemente del consumo de un alimento o una proteína potencialmente antigénicos. En una realización, la proteína potencialmente antigénica es gluten. En una realización, la proteína potencialmente antigénica es una o más proteínas del trigo.

En una realización, la cantidad efectiva de la composición farmacéutica es de entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 1 g. En una realización, la cantidad efectiva de la composición farmacéutica depende de la cantidad de proteína potencialmente antigénica consumida.

En una realización, esta descripción se refiere a tratar y/o mejorar al menos un síntoma asociado a una respuesta inmunitaria a la presencia de gluten u otra proteína antigénica en el intestino de un paciente. Los síntomas incluyen, sin limitación, "mente confusa", depresión, ansiedad, comportamiento similar al TDAH, dolor abdominal, hinchazón, diarrea, estreñimiento, cefaleas, migrañas, dolor de huesos o articulaciones, fatiga crónica, lesión del intestino delgado, desarrollo de anticuerpos contra la transglutaminasa tisular (tTG), acné extenso, vómitos, pérdida de peso, irritabilidad, anemia ferropénica, artritis, hormigueo, entumecimiento en las extremidades, infertilidad y úlceras aftosas en la boca.

En un aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para atenuar o impedir la atrofia de las vellosidades debida a la presencia de uno o más antígenos alimentarios peptídicos en un intestino de un mamífero, este

- procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos una enzima de *Nepenthes*. En una realización, la al menos una enzima de *Nepenthes* es nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas o una mezcla de las mismas. En una realización, la proteína potencialmente antigénica es degradada por la composición farmacéutica para inhibir la atrofia de las vellosidades en el intestino. En una realización, la proteína potencialmente antigénica es gluten. En una realización, la proteína potencialmente antigénica es una o más proteínas del trigo.
- En un aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para reducir la respuesta de linfocitos T a un antígeno alimentario peptídico, comprendiendo el procedimiento poner en contacto el antígeno alimentario peptídico con una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos una enzima de *Nepenthes*. En una realización, la al menos una enzima de *Nepenthes* es nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas o una mezcla de las mismas, en condiciones donde dicho antígeno es degradado para reducir la respuesta de linfocitos T al antígeno. En una realización, se reduce la respuesta de linfocitos T en un intestino de un mamífero. En una realización, el antígeno se pone en contacto con la composición farmacéutica en el estómago de un mamífero. En una realización, el antígeno se pone en contacto con la composición farmacéutica *ex vivo*. En una realización, el antígeno es gluten. En una realización, el antígeno es una proteína inmunotóxica del gluten.
- En un aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para atenuar o impedir una manifestación de la enfermedad celíaca que se produce por la presencia de proteína de trigo parcialmente hidrolizada en un intestino de un paciente que tiene enfermedad celíaca, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos una enzima de *Nepenthes*. En una realización, la al menos una enzima de *Nepenthes* es nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas o una mezcla de las mismas para atenuar o impedir una manifestación de la enfermedad celíaca.
- En un aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para mejorar la digestibilidad de una proteína de un alimento en un mamífero con un trastorno intestinal, este procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos una enzima de *Nepenthes*. En una realización, la al menos una enzima de *Nepenthes* es nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas o una mezcla de las mismas, en condiciones donde la proteína del alimento es degradada por la composición farmacéutica. En una realización, la degradación de la proteína mejora la absorción de la proteína en el intestino. En una realización, se atenúa o impide al menos un síntoma del trastorno. En una realización, el trastorno intestinal es enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable o colitis. En una realización, se aumenta la absorción de proteínas de los alimentos.
- En un aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para tratar la insuficiencia de enzimas pancreáticas en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos una enzima de *Nepenthes*. En una realización, la al menos una enzima de *Nepenthes* es nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas y una mezcla de las mismas. En una realización, se administran una o más enzimas pancreáticas. La una o más enzimas pancreáticas se pueden administrar simultáneamente a la composición farmacéutica o en un momento diferente. En una realización, la enzima pancreática es una lipasa, una amilasa, una proteasa o una mezcla de las mismas. En una realización, la insuficiencia de enzimas pancreáticas se debe a pancreatitis, fibrosis quística, síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond, cálculos biliares, lupus, esprue celíaco, cáncer pancreático o cirugía pancreática. En una realización, la pancreatitis es pancreatitis crónica.
- En una realización, la enzima de *Nepenthes* se concentra, aísla o extrae a partir del fluido de la jarra de una planta de *Nepenthes*. En una realización, la enzima de *Nepenthes* comprende nepentesina I recombinante, nepentesina II recombinante, neprosina recombinante, una variante de las mismas o una mezcla de las mismas.
- En una realización, la variante de las mismas comprende una proteína, cuya secuencia aminoacídica tiene al menos 85 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21. En una realización, la variante de las mismas comprende una proteína, cuya secuencia aminoacídica tiene al menos 85 % de homología de secuencia con el aminoácido codificado por el ADNc seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 14.
- En una realización, el alimento es un líquido. En un aspecto de la descripción, el alimento es un sólido. En una realización preferida, la composición farmacéutica se administra por vía oral.
- Incluso cuando un paciente cumple con una dieta exenta de gluten estricta, el gluten es difícil de evitar. Numerosos alimentos, particularmente los alimentos procesados, están contaminados con cantidades pequeñas de gluten. El consumo de cantidades incluso mínimas de gluten puede conducir a la reaparición de los síntomas en un paciente con enfermedad celíaca. Esto también ocurre con otros alimentos potencialmente inmunogénicos.
- En una realización, la composición farmacéutica se administra independientemente de si el paciente ha ingerido (p. ej., ha ingerido conscientemente) un alimento que contiene una proteína potencialmente inmunogénica. En una

realización, la composición farmacéutica se administra según sea necesario, p. ej., antes, durante, y/o después de una comida que podría estar contaminada con una proteína potencialmente inmunogénica, o en la que se desconoce el contenido de proteína potencialmente inmunogénica. En una realización, la composición farmacéutica se administra regularmente. En una realización, la composición farmacéutica se administra al menos una vez al día. En una realización, la composición farmacéutica se administra dos, tres, cuatro o más veces al día. En una realización, la composición farmacéutica se administra junto con (p. ej., antes de, durante o después de) cada comida y/o aperitivo. En una realización, la composición farmacéutica se incluye como parte de una formulación de liberación prolongada en la que hay una liberación continua de una o más enzimas para permitir la ingestión intermitente de aperitivos, etc., sin tener en cuenta el contenido de proteína antigénica del alimento.

En una realización, la composición farmacéutica se mantiene en un sistema acuoso, a aproximadamente pH 2, donde se cargan los grupos amino libres de dicha enzima. En una realización, la composición se mantiene a pH neutro antes de entrar en contacto con los ácidos del estómago. En una realización, la composición farmacéutica comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, de tal manera que el pH de la composición permanece pH 5 o 6 tras entrar en contacto con los ácidos del estómago.

En una realización, la cantidad efectiva de composición farmacéutica es de entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 1 g. En una realización, la cantidad efectiva de composición farmacéutica es de entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 1 g por 1 g de sustrato (p. ej., gluten u otra proteína potencialmente inmunogénica). En una realización, la composición farmacéutica comprende más de una de nepentesina I, nepentesina II, neprosina o una variante de las mismas.

En una realización, el mamífero es un ser humano. En un aspecto, el ser humano padece sensibilidad al gluten o enfermedad celíaca. En un aspecto, se contempla que la sensibilidad intestinal a la proteína intestinal antigénica se correlaciona, directa o indirectamente, con trastorno por déficit de atención e hiperactividad, autismo, artritis reumatoide, fibromialgia y/o dermatitis herpetiforme. Se contempla además que la eliminación de tales proteínas intestinales antigénicas del intestino usando composiciones de esta invención tendrá un efecto positivo sobre el trastorno por déficit de atención e hiperactividad, el autismo, la artritis reumatoide, la fibromialgia y/o la dermatitis herpetiforme. En una realización preferida, el ser humano padece enfermedad celíaca.

En un aspecto, esta descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas o una mezcla de las mismas. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende neprosina o una variante y/o sal de las mismas. En una realización preferida adicional, la composición farmacéutica comprende además al menos una enzima de *Nepenthes* adicional. En una realización, la enzima de *Nepenthes* adicional comprende nepentesina I, nepentesina II, una variante de las mismas y/o una sal de las mismas.

Sin ceñirnos a la teoría, se cree que la nepentesina I, la nepentesina II y la neprosina son menos activas o sustancialmente inactivas a pH de neutro o básico. Esto puede ser importante cuando hay posibilidad de una digestión no deseable por la una o más enzimas. Por ejemplo, cuando la composición farmacéutica se administra por vía oral, el tamponamiento de la composición a pH 6,5 o superior puede dar como resultado una forma menos activa de la una o más enzimas, de tal manera que la mucosa oral, la mucosa esofágica y otras células que pueden entrar en contacto con la composición no serán digeridas por la una o más enzimas contenidas en la misma. Asimismo, cuando la composición se añade a un alimento, la una o más enzimas tamponadas no serán capaces (o serán menos capaces) de digerir el alimento antes de consumirlo. En tales situaciones, la introducción de la composición en el entorno ácido del estómago dará como resultado una disminución del pH y la activación de la una o más enzimas.

En una realización, la composición farmacéutica se tampona a aproximadamente pH 6,5 o superior. En una realización preferida, la composición se tampona de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5. En una realización, la composición está en forma líquida. En una realización, la composición está en forma sólida. En una realización, el pH de la composición se ajusta en forma líquida y la composición se seca para formar un sólido.

En una realización, la composición farmacéutica comprende una o más proteasas adicionales. En una realización, la una o más proteasas adicionales son una proteasa aspártica, una serina proteasa, una treonina proteasa, una cisteína proteasa, una ácido glutámico proteasa o una metaloproteasa. En una realización, la composición farmacéutica comprende una o más exoproteasas adicionales, tales como leucina aminopeptidasas y carboxipeptidasas. En una realización, la una o más proteasas adicionales son tripsina. En una realización preferida, la una o más proteasas adicionales son activas a pH ácido (p. ej., pH 2-6).

En un aspecto, la invención se refiere a una formulación que comprende la composición farmacéutica de la invención, donde la una o más enzimas están presentes en un vehículo de liberación retardada de tal manera que la una o más enzimas se liberan continuamente mientras la formulación está presente en el estómago. En una realización, la formulación tiene un pH superior a aproximadamente 5 antes de entrar en contacto con los ácidos del estómago. En una realización, la formulación comprende un tampón biológicamente aceptable, de tal manera que el pH de la composición permanece a aproximadamente pH 5 o 6 durante al menos un período de tiempo tras entrar en contacto con los ácidos del estómago.

En una realización, la descripción se refiere a una formulación de dosis unitaria de la composición farmacéutica. Por ejemplo, y sin limitación, la dosis unitaria puede estar presente en un comprimido, una cápsula y similares. La dosis unitaria puede estar en forma sólida, líquida, en polvo o en cualquier otra forma. Sin ceñirnos a la teoría, se prevé que una formulación de dosis unitaria de la composición farmacéutica permitirá la administración correcta (p. ej., en base a la cantidad de proteína inmunogénica ingerida) evitando al mismo tiempo los posibles efectos secundarios negativos de administrar una cantidad excesiva de la composición.

En una realización, la descripción se refiere a una forma proenzimática de la nepentesina I, nepentesina II, neprosina y/o a una variante de las mismas. En una realización, está presente un propéptido en la enzima. En una realización preferida, el propéptido se elimina mediante pH ácido, activando de ese modo la enzima. En una realización, el propéptido comprende la secuencia aminoacídica del propéptido de origen natural para la enzima. En una realización, el propéptido es un propéptido artificial o un propéptido meterólogo (es decir, un propéptido lábil en ácidos de una proteína y/o especie diferentes).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra una alineación de las secuencias proteicas para nepentesina I de *Nepenthes mirabilis* (SEQ ID NO: 5), *Nepenthes alata* (SEQ ID NO: 6), *Nepenthes gracilis* (SEQ ID NO: 7), *Zea mays* (SEQ ID NO: 10) y *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 11), y nepentesina II de *Nepenthes mirabilis* (SEQ ID NO: 8), *Nepenthes gracilis* (SEQ ID NO: 9), *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 12) y *Zea mays* (SEQ ID NO: 13).

La **Figura 2** indica los tamaños de las proteínas de nepentesina recombinantes. A: Gel de nepentesina I teñido con Coomassie. B: Análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de nepentesina I activada con ácido. C: Gel de nepentesina II teñido con Coomassie. D: Análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de nepentesina II activada con ácido.

La **Figura 3** indica los tamaños de la nepentesina I y nepentesina II naturales (agrupadas a partir de 2-3 especies) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

La **Figura 4** es una fotografía de un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie que indica los pesos moleculares de los fragmentos de gluten después de la digestión con nepentesina II recombinante, extracto de *Nepenthes* o pepsina.

La **Figura 5A** es una fotografía de viales que contienen una suspensión de proteína del gluten digerida con pepsina (40 µg) o con la cantidad indicada de nepentesina I recombinante o nepentesina II recombinante. La **Figura 5B** es una fotografía de viales que contienen una suspensión de proteína del gluten digerida con pepsina (40 µg) o con la cantidad indicada de extracto de *Nepenthes*. Los viales incubados con nepentesina o extracto de *Nepenthes* son menos turbios que el vial de pepsina, lo que demuestra la digestión más energética del gluten.

La **Figura 6** muestra la longitud promedio de todos los péptidos identificados a partir de la digestión de gliadina de trigo con fluido de *Nepenthes* enriquecido, usando CL-EM/EM, después de 1, 5, 10, 15, 30, 60, 130, 360 u 810 minutos a 37 °C. Se usó un límite de corte de confianza de 95 % ($p < 0,05$) en las puntuaciones para REDUCIR la identificación de falsos positivos. La desviación estándar relativa de la longitud de los péptidos se muestra en la figura insertada.

La **Figura 7** muestra el número de péptidos identificados mediante CL-EM/EM después de 1, 5, 10, 15, 30, 60, 130, 360 u 810 minutos de digestión a 37 °C, agrupados por longitud. Datos como en la **Figura 6**.

La **Figura 8** muestra los mismos datos que la **Figura 6**, como una probabilidad acumulada de obtener una cierta longitud después de 10, 60, 120, 360 u 810 minutos de digestión a 37 °C.

La **Figura 9** muestra las preferencias de escisión en (A) el lado PI o aminoterminal del sitio de escisión y en (B) el lado P1' o carboxiterminal del sitio de escisión para las enzimas indicadas. Las barras de la izquierda para cada residuo indican digestión con extracto de *Nepenthes*, las barras del medio indican digestión con extracto de *Nepenthes* purificado y las barras de la derecha con nepentesina I recombinante. El % de escisión representa el número de escisiones observadas en el residuo dado, con respecto al número total de péptidos presentes. Los datos se obtuvieron a partir de productos de la digestión de gliadina.

La **Figura 10** muestra el perfil de purificación por intercambio iónico para fluido de *Nepenthes*. Los picos correspondientes a la neprosina y la nepentesina se indican mediante flechas. La región enmarcada indica las fracciones recogidas.

La **Figura 11** muestra los pesos corporales de los ratones durante el ciclo del tratamiento. Los animales de control negativo (●) no se expusieron a gliadina. Los animales de control positivo (■) se expusieron a gliadina digerida por pepsina. Los animales del tratamiento 1 (▲) se expusieron a gliadina digerida con extracto de *Nepenthes*. Los animales del tratamiento 2 (▼) se expusieron a gliadina digerida con nepentesina II recombinante.

La **Figura 12** es una fotografía de la inmunohistoquímica para los IEL positivos para CD3 en el intestino de los ratones tratados.

La **Figura 13** muestra el número medio de linfocitos intraepiteliales (IEL) positivos para CD3 por 100 enterocitos en el intestino para cada grupo de tratamiento. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

La **Figura 14** muestra las proporciones promedio de vellosidades a criptas para cada grupo de tratamiento.

La **Figura 15A** presenta un muestreo de las porciones de gliadina que son digeridas por la neprosina, como se detectan mediante CL-EM/EM dependiente de los datos.

La **Figura 15B** muestra el perfil de digestión de la gliadina después de la digestión con neprosina. Los puntos indican sitios de escisión.

La **Figura 16** muestra la ubicación de los polimorfismos en la secuencia aminoacídica de la neprosina de diferentes especies de *Nepenthes*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La descripción detallada de la invención se divide en varias secciones sólo por conveniencia del lector y la descripción encontrada en cualquier sección se puede combinar con la de otra sección.

I. Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen los mismos significados que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. A continuación, se describen los procedimientos, dispositivos y materiales preferidos. Nada de lo contenido en esta memoria se debe interpretar como una admisión de que esta invención no está legitimada para preceder a tal descripción en virtud de la invención anterior.

Como se emplean en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto lo dicte claramente de otro modo.

Como se emplea en esta memoria, el término "que comprende" está destinado a significar que las composiciones y los procedimientos incluyen los elementos mencionados, pero no excluyen otros. "Que consiste esencialmente en", cuando se usa para definir composiciones y procedimientos, significará excluir otros elementos de cualquier importancia esencial para la combinación. Por ejemplo, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definen en esta memoria no excluiría otros elementos que no afecten materialmente a la una o más características básicas y novedosas de la invención reivindicada. "Que consiste en" significará excluir más de una traza de otros ingredientes y las etapas importantes del procedimiento mencionadas. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

Como se emplea en esta memoria, un "alimento o proteína potencialmente antigenicos" es cualquier alimento o proteína que puede provocar una respuesta inmunitaria y/o inflamatoria en el intestino de un individuo sensible. En una realización preferida, el individuo es un ser humano y el alimento es un alimento destinado al consumo humano. Los alimentos potencialmente antigenicos incluyen, sin limitación, trigo, centeno, cebada, cacahuetes, nueces y semillas. En una realización, las proteínas potencialmente antigenicas de estos alimentos incluyen proteínas de prolamina, albúminas 2S, proteínas de transferencia de lípidos no específicas, inhibidores bifuncionales de α -amilas/proteasas, proteína hidrófoba de soja, indolinas, gluten, serpinas, purininas, inhibidores de α -amilas/proteasas, globulinas y farininas. En una realización preferida, la proteína (o el péptido) potencialmente antigenica es rica en residuos de prolina y/o glutamina. En una realización especialmente preferida, la proteína potencialmente antigenica es gluten. En otra realización preferida, la proteína potencialmente antigenica es una proteína del trigo.

Como se emplea en esta memoria, el término "gluten" se refiere en general a las proteínas presentes en el trigo o especies de granos relacionadas, que incluyen cebada y centeno, que tienen un efecto potencialmente perjudicial para ciertos individuos. Las proteínas del gluten incluyen gliadinas, tales como α -gliadinas, β -gliadinas, γ -gliadinas y ω -gliadinas, que son proteínas monoméricas, y gluteninas, que son mezclas muy heterogéneas de agregados de subunidades peso molecular alto y peso molecular bajo unidas mediante enlaces disulfuro. Se han caracterizado muchas proteínas del gluten de trigo. Véase, por ejemplo, Woychik y col., Amino Acid Composition of Proteins in Wheat Gluten, J. Agric. Food Chem., 9 (4), 307-310 (1961). El término gluten, como se emplea en esta memoria, también incluye oligopéptidos que se pueden obtener de la digestión humana normal de proteínas del gluten de alimentos que contienen gluten y provocan la respuesta inmunitaria anómala. Algunos de estos oligopéptidos son resistentes a las enzimas digestivas normales. Se cree que el gluten, lo que incluye las proteínas y los oligopéptidos antes mencionados, actúa como un antígeno para los linfocitos T (p. ej., IEL) en pacientes con intolerancia al gluten (p. ej., esprue celíaco). El término gluten también se refiere a gluten desnaturalizado, tal como se encontraría en los

productos horneados.

Como se emplea en esta memoria, la expresión “sensibilidad al gluten y afecciones relacionadas” se refiere a cualquier afección derivada de la intolerancia o sensibilidad a proteínas o péptidos del gluten. Estas incluyen, sin limitación, esprue celíaco (enfermedad celíaca), alergia al trigo, sensibilidad al gluten, enteropatía sensible al gluten, sensibilidad idiopática al gluten y dermatitis herpetiforme. Las afecciones relacionadas también incluyen, sin limitación, autismo, trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), artritis reumatoide, fibromialgia, enfermedad de Crohn, mala absorción de nutrientes y síndrome del intestino irritable (SII).

El término “neprosina” se refiere a una prolil endoproteasa con un peso molecular de aproximadamente 29 kilodalton (kDa). La neprosina se puede aislar a partir de las secreciones de la jarra de la especie *Nepenthes*. La neprosina escinde proteínas carboxiterminales a la prolina, con especificidad alta. La enzima es activa de aproximadamente pH 2 a aproximadamente pH 6. En una realización, la neprosina tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1. La secuencia aminoacídica de la neprosina no es homóloga a ninguna otra proteína conocida. En una realización, la neprosina está codificada por la secuencia de ADNc de SEQ ID NO: 2. En una realización, la neprosina comprende una secuencia señal. En una realización, la secuencia señal comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 3. En una realización, la neprosina no comprende una secuencia señal.

Neprosina incluye todas las isoformas, isotipos y variantes de la neprosina, la neprosina recombinante y sales de las mismas. Sales se refiere a aquellas sales formadas por la neprosina con una o más bases o uno o más ácidos que conservan la efectividad biológica y las propiedades de la neprosina libre, y que no son biológicamente, o de otro modo, no deseables. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico básicas, tales como resinas de isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-diethylaminoetanol, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilenodiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, poliamina y similares. Los ácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

Los ejemplos de proteasas incluyen, sin limitación, proteasas aspárticas, serina proteasas, treonina proteasas, cisteína proteasas, ácido glutámico proteasas y metaloproteasas. Las proteasas que pueden ser útiles en la presente invención incluyen, sin limitación, BACE, catepsina D, catepsina E, quimosina (o “renina”), napsina, pepsina, plasmepsina, presenilina, renina, tripsina, quimiotripsina, elastasa y cisteína endoproteasa (EP) B2 (también conocida como EPB2). Las proteasas incluyen las descritas, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos n.º 7 320 788; 7 303 871; 7 320 788; 7 628 985; 7 910 541 y 7 943 312; y las patentes PCT de n.º de publicación 2005/107786; 2008/115428; 2008/115411; 2010/021752; 2010/042203; 2011/097266. En una realización preferida, la al menos una proteasa adicional es activa a pH ácido, tal como el encontrado en el estómago (p. ej., pH 1,5 a 3,5).

El término “nepentesina” se refiere a la proteasa aspártica que tiene el número de la Comisión de Enzimas EC 3.4.23.12, e incluye todas las isoformas, isotipos y variantes de la nepentesina tales como nepentesina I y nepentesina II, isoformas de la nepentesina y nepentesina recombinante, y sales de las mismas. La nepentesina (EC 3.4.23.12) es una proteasa aspártica de origen vegetal que se puede aislar o concentrar a partir de un abanico de fuentes vegetales, tales como las secreciones de la jarra de *Nepenthes*, una planta de jarra carnívora, conocida como habitualmente como copas de mono en las regiones tropicales. La nepentesina se describe pormenorizadamente en la solicitud de patente de los Estados Unidos de n.º de serie 13/843 369, depositada el 15 de marzo de 2013. La alineación de secuencias de las secuencias proteicas de nepentesina conocidas (y las secuencias proteicas putativas de nepentesina) se muestra en la **Figura 1**.

En una realización, “cantidad efectiva” se refiere a la cantidad de una composición que da como resultado la inhibición o mejora de los síntomas en un sujeto o un resultado biológico deseado, p. ej., signos clínicos mejorados, aparición retardada de la enfermedad, etc. La cantidad efectiva puede ser determinada por un experto en la materia. El nivel de dosis seleccionado puede depender de la gravedad de la afección que se está tratando y de la afección y los antecedentes médicos del mamífero que se está tratando. Por ejemplo, un experto en la materia iniciará las dosis de la composición a niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentará gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado.

El término “manifestaciones de la enfermedad celíaca” se refiere a cualquiera de los síntomas o presentaciones clínicas de la enfermedad celíaca. Tales manifestaciones incluyen, sin limitación, inflamación intestinal, “mente confusa”, depresión, ansiedad, comportamiento similar al TDAH, dolor abdominal, hinchazón, diarrea, estreñimiento, cefaleas, migrañas, dolor de huesos o articulaciones, fatiga crónica, lesión del intestino delgado, desarrollo de anticuerpos contra la transglutaminasa tisular (tTG), acné extenso, vómitos, pérdida de peso, irritabilidad, anemia

ferropénica, artritis, hormigueo, entumecimiento en las extremidades, infertilidad y úlceras aftosas en la boca. Las manifestaciones incluyen además atrofia de las vellosidades de la mucosa del intestino delgado con hiperplasia de las criptas, inflamación de la mucosa del intestino, mala absorción de nutrientes, distensión abdominal, así como un riesgo sustancialmente mayor de desarrollo de osteoporosis y neoplasias intestinales malignas (linfoma y carcinoma).

5

"Administración simultánea" o "cotratamiento", como se emplean en esta memoria, incluye la administración de los agentes juntos, o antes o después uno de otro.

10 Los términos "modular", "atenuar" o "mejorar" significan cualquier tratamiento de una enfermedad o un trastorno en un sujeto, tal como un mamífero, lo que incluye:

- 15 impedir o proteger contra la enfermedad o el trastorno, es decir, hacer que la reacción biológica anómala o los síntomas no se desarrollen;
- inhibir la enfermedad o el trastorno, es decir, detener o impedir el desarrollo de reacciones biológicas anómalas y/o síntomas clínicos; y/o
- aliviar la enfermedad o el trastorno, es decir, provocar la regresión de las reacciones biológicas anómalas y/o los síntomas.

20

Como se emplean en esta memoria, los términos "impedir" o "inhibir" se refieren al tratamiento profiláctico de un sujeto que lo necesita. El tratamiento profiláctico se puede lograr proporcionando una dosis apropiada de un agente terapéutico a un sujeto con riesgo de padecer una dolencia, evitando sustancialmente de ese modo la aparición de la dolencia.

25

Como se emplea en esta memoria, el término "afección" se refiere a una enfermedad para la que se usan los compuestos, las composiciones y los procedimientos proporcionados en esta memoria.

30 Como se emplean en esta memoria, los términos "paciente" o "sujeto" se refieren a mamíferos e incluyen seres humanos y mamíferos no humanos. En realizaciones particulares de esta memoria, el paciente o sujeto es un ser humano.

El término "aproximadamente", cuando se usa antes de un valor numérico, indica que el valor puede variar dentro de un intervalo razonable: $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ o $\pm 0,2\%$.

35

Un polinucleótido o una región polinucleotídica (o un polipéptido o una región polipeptídica) que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 %) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son iguales al comparar las dos secuencias. La alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., Eds. 1987) Suplemento 30, apartado 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferiblemente, se usan los parámetros predeterminados para la alineación. Un programa de alineación es BLAST, que usa parámetros predeterminados. Los ejemplos de los programas incluyen BLASTN y BLASTP que usan los parámetros predeterminados siguientes: código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; esperado = 10; matriz = BLOSUM62; descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTUACIÓN ALTA; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de CDS de GenBank + Swiss-Prot + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la dirección de Internet siguiente: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST.

50 "Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear con fines comparativos. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre secuencias es función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos de 40 % de identidad, o alternativamente menos de 25 % de identidad, con una de las secuencias de la presente descripción.

55

II. Procedimientos

60 En un aspecto, esta descripción se refiere a procedimientos para modular una afección mediada por la intolerancia al gluten en un paciente, que comprenden administrar al paciente una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una enzima de *Nepenthes*. En una realización preferida, la afección es enfermedad celíaca o una alergia al trigo.

65 En otro aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para atenuar o impedir la producción y/o el reclutamiento de IEL en el intestino debido a la presencia de un antígeno alimentario peptídico en un intestino de un mamífero. En una realización, el procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de una

composición farmacéutica que comprende una enzima de *Nepenthes*. En una realización, la proteína del gluten es degradada por la composición farmacéutica para atenuar o impedir la producción y/o el reclutamiento de IEL en el intestino.

5 En un aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para atenuar o impedir la inflamación intestinal debida a la presencia de un antígeno alimentario peptídico en el intestino de un mamífero. En una realización, el procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una enzima de *Nepenthes*. En una realización, el antígeno alimentario peptídico es degradado por la una o más enzimas para atenuar o impedir la inflamación intestinal.

10 15 En un aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para atenuar o impedir la linfocitosis intraepitelial debida a la presencia de un antígeno alimentario peptídico en un intestino de un mamífero. En una realización, el procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una enzima de *Nepenthes*. En una realización, el antígeno alimentario peptídico es degradado por la composición farmacéutica para atenuar o impedir la linfocitosis intraepitelial en el intestino.

20 25 En un aspecto, esta descripción se refiere a un procedimiento para atenuar o impedir la atrofia de las vellosidades debida a la presencia de un antígeno alimentario peptídico en un intestino de un mamífero. En una realización, el procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una enzima de *Nepenthes*. En una realización, el antígeno alimentario peptídico es degradado por la composición farmacéutica para atenuar o impedir la atrofia de las vellosidades en el intestino. En una realización, la atrofia de las vellosidades es un resultado de la inflamación del intestino.

30 35 En una realización, la enzima de *Nepenthes* es nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas o una mezcla de las mismas. En una realización preferida, la formulación farmacéutica es una formulación de liberación prolongada.

40 45 En una realización, la variante es una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que tiene al menos 85 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 20 o SEQ ID NO: 21. En una realización, la variante es una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que tiene al menos 85 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1. En una realización, la variante es una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que tiene al menos 85 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 5. En una realización, la variante es una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que tiene al menos 85 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 6. En una realización, la variante es una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que tiene al menos 85 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 7. En una realización, la variante es una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que tiene al menos 85 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 8. En una realización, la variante es una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que tiene al menos 85 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 9. En una realización, la variante es una proteína que tiene una amina o secuencia de ácido que tiene al menos 85 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 20. En una realización, la variante es una proteína que tiene una secuencia aminoacídica que tiene al menos 85 % de homología con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 21.

50 55 En una realización, la composición farmacéutica comprende un extracto de fluido de jarras de *Nepenthes*. En una realización, la composición farmacéutica comprende nepentesina I, nepentesina II y/o neprosina purificadas a partir de un extracto de fluido de jarras de *Nepenthes*. En una realización, al menos una de nepentesina I, nepentesina II, neprosina o una variante de las mismas es una proteína recombinante. En una realización, la composición farmacéutica está entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 8 antes de la administración. Las composiciones farmacéuticas para uso en los procedimientos descritos en esta memoria se analizan más pormenorizadamente a continuación.

60 En una realización preferida, el mamífero es un ser humano. En una realización, el ser humano padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en intolerancia al gluten, enfermedad celíaca, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, autismo, artritis reumatoide, fibromialgia y dermatitis herpetiforme. En una realización, el ser humano padece una alergia alimentaria.

65 En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía oral antes, durante o inmediatamente después del consumo de un alimento que contiene gluten.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra al sujeto antes de la ingestión por el sujeto del alimento que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra dentro de un período en el que la enzima es al menos parcialmente efectiva (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 50 %, 70 %, 90 % de la actividad original) para degradar el gluten en el alimento que ingerirá el sujeto. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra como máximo aproximadamente 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora o 30 minutos antes de la ingestión del alimento por el sujeto.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra al sujeto simultáneamente a la ingestión por el sujeto del alimento potencialmente inmunogénico. En algunas realizaciones, la composición enzimática se administra con el alimento. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra independientemente del alimento.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra al sujeto poco después de la ingestión por el sujeto del alimento potencialmente inmunogénico. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra dentro de un período en el que al menos parte (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 50 %, 70 %, 90 %) del uno o más antígenos del alimento están todavía en el estómago del sujeto. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra como máximo 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora o 30 minutos después de la ingestión del alimento por el sujeto.

Habitualmente, la composición farmacéutica se administra en una cantidad que es segura y suficiente para producir el efecto deseado de desintoxicación del uno o más antígenos alimentarios peptídicos. La dosis de la composición farmacéutica puede variar en función de muchos factores, tales como la enzima particular administrada, la sensibilidad del sujeto al alimento, la cantidad y los tipos de alimentos que contienen antígeno ingeridos, las propiedades farmacodinámicas de la enzima, el modo de administración, la edad, salud y peso del receptor, la naturaleza y magnitud de los síntomas, la frecuencia del tratamiento y el tipo de tratamiento simultáneo, si lo hay, y la tasa de depuración de la enzima. Un experto en la materia puede determinar la dosis apropiada en base a los factores anteriores. La composición se puede administrar inicialmente en una dosis adecuada que se puede ajustar según proceda, en función de la respuesta clínica. Se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis exacta que se debe emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y/o la gravedad de la enfermedad o el trastorno, y se debe decidir según el juicio del facultativo y las circunstancias de cada sujeto.

La dosis o pauta posológica de un sujeto adulto puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes, y también ajustarse para otra administración u otros formatos, en proporción, por ejemplo, al peso molecular o la respuesta inmunitaria. La administración o los tratamientos se pueden repetir a intervalos apropiados, a discreción del facultativo.

Generalmente, la composición farmacéutica se administra cuando se necesita, tal como cuando el sujeto consumirá, está consumiendo o ha consumido un alimento que comprende una proteína antigénica o se sospecha que comprende una proteína antigénica. En cualquier caso, se puede administrar en dosis de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1000 mg de enzima por kg de peso corporal al día, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 g por dosis para una persona promedio. En algunas realizaciones, la enzima se puede administrar a 0,001; 0,01; 0,1; 1, 5, 10, 50, 100, 500 o 1000 mg/kg peso corporal al día, y a intervalos entre cualesquiera dos de estos valores (incluidos los extremos). En algunas realizaciones, la enzima se puede administrar a 1 mg, 10 mg, 100 mg, 200 mg, 500 mg, 700 mg, 1 g, 10 g, 20 g, 50 g, 70 g, 100 g por dosis, y a intervalos entre cualesquiera dos de estos valores (incluidos los extremos). En algunas realizaciones, se puede administrar una, dos, tres veces, etc., al día, en función del número de veces que el sujeto ingiere un alimento que comprende una proteína antigénica y/o de la cantidad de tal alimento que consume. La cantidad de enzima mencionada en esta memoria se puede referir a la enzima total o a cada enzima de la composición.

En algunas realizaciones, la cantidad de composición farmacéutica administrada es dependiente de la cantidad (o cantidad aproximada) de sustrato (p. ej., gluten y/u otra proteína o proteína potencialmente antigénica) consumido/que se va a consumir. En una realización, se administra de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1 g de enzima por 1 g de sustrato. En una realización, se administra de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 1 g de enzima por 1 g de sustrato. En una realización, se administra de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g de enzima por 1 g de sustrato. En una realización, se administra de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1 g de enzima por 1 g de sustrato. En una realización, se administra de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de enzima por 1 g de sustrato. En una realización, se administra de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 250 mg de enzima por 1 g de sustrato. En una realización, se administra de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg de enzima por 1 g de sustrato. En una realización, se administra de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg de enzima por 1 g de sustrato. Esto incluye cualquier valor en estos intervalos (incluidos los extremos), y subintervalos entre cualesquiera dos de estos valores.

En una realización, la proporción de sustrato a enzima administrada es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10 000:1. En una realización preferida, la proporción de sustrato a enzima es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1000:1. En una realización, la proporción de sustrato a enzima es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 100:1.

La composición farmacéutica de esta invención se puede administrar como único agente activo o se puede administrar en combinación con otros agentes (simultánea, secuencial o independientemente, o mediante coformulación), que incluyen otros compuestos que presentan una actividad terapéutica igual o similar y que se ha determinado que son seguros y eficaces para tal administración combinada.

- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra con una enzima adicional, tal como una proteasa gástrica, una proteasa aspártica (tal como pepsina, pepsinógeno o las descritas por Chen y col., Aspartic proteases gene family in rice: Gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation, Gene 442:108-118 (2009)) y enzimas tales como otra prolil endopeptidasa (PEP), dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) y dipeptidil carboxipeptidasa (DCP) o cisteína proteinasa B (descritas en la patente de los Estados Unidos n.º 7 910 541). En una realización, la otra enzima se administra en forma de bacterias que producen y/o secretan la enzima adicional. En una realización, las bacterias están diseñadas para producir y/o secretar nepentesina I, nepentesina II, neprosina y/o una variante de las mismas.
- 10 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra al sujeto con otro agente. Los ejemplos no limitantes de agentes que se pueden administrar con la composición farmacéutica incluyen inhibidores de la transglutaminasa tisular, agentes antiinflamatorios tales como amilasas, glucoamilasas, endopeptidasas, inhibidores de la HMG-CoA reductasa (p. ej., compactina, lovastatina, simvastatina, pravastatina y atorvastatina), antagonistas del receptor de leucotrienos (p. ej., montelukast y zafirlukast), inhibidores de la COX-2 (p. ej., celecoxib y rofecoxib), inhibidores de la MAP cinasa p38 (p. ej., BIRB-796); agentes estabilizadores de los mastocitos tales como cromoglicato de sodio (cromolín), pemirolast, proxicromil, repirinast, doxantrazol, amlexanox nedocromil y probicromil, agentes antiulcerosos, agentes antialérgicos tales como agentes antihistamínicos (p. ej., acrivastina, cetirizina, desloratadina, ebastina, fexofenadina, levocetirizina, loratadina y mizolastina), inhibidores de la transglutaminasa 2 (TG2), agentes anti-TNF_α y antibióticos. En otra realización, el agente adicional es un probiótico. Los probióticos incluyen, sin limitación, especies y cepas de lactobacilos, levaduras, bacilos o bifidobacterias. En una realización, el otro agente es elafina. En una realización, el otro agente se administra en forma de bacterias que producen y/o secretan el agente adicional.
- 15 En algunas realizaciones, el otro agente comprende una enzima (p. ej., proteasa) que es activa en el intestino. Sin ceñirnos a la teoría, se cree que tales enzimas pueden actuar sinéricamente con la una o más enzimas de la composición farmacéutica para degradar adicionalmente las proteínas inmunogénicas.
- 20 En algunas realizaciones, también se proporciona en esta memoria el uso de una composición enzimática que comprende nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas y/o una sal de las mismas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una de las afecciones y enfermedades antes mencionadas.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- III. Composiciones Farmacéuticas**
- La composición farmacéutica se puede administrar en un abanico de composiciones sola o con vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados.
- Por consiguiente, en otro aspecto de la descripción, se proporciona en esta memoria una composición que comprende nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas y/o una sal de las mismas. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica. Las composiciones se pueden formular en formas sólidas, semisólidas o líquidas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, inyecciones, geles y microesferas. La administración de la composición se puede conseguir de diversas maneras, por ejemplo, mediante administración oral.
- En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas o una mezcla de las mismas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" hace referencia a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra el agente terapéutico. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tal como agua y aceites, que incluyen los derivados del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos.
- Los excipientes farmacéuticos aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, carbonato de calcio, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades pequeñas de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva de la una o más enzimas, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración correcta al paciente. La formulación se debe adecuar al modo de administración.
- Para administración oral, la composición farmacéutica se puede usar sola o en combinación con aditivos apropiados

para fabricar comprimidos, polvos, gránulos, cápsulas, jarabes, líquidos, suspensiones, etc. Por ejemplo, las formas orales sólidas de la composición se pueden preparar con aditivos convencionales, desintegrantes, lubricantes, diluyentes, agentes tamponadores, agentes humectantes, conservantes y aromatizantes. Los ejemplos no limitantes de excipientes incluyen lactosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábica, almidón de maíz, carboximetilcelulosa de sodio, talco, estearato de magnesio, aromas y colorantes. En algunas realizaciones, la formulación libera la una o más enzimas en el estómago del sujeto de manera que el uno o más antígenos alimentarios peptídicos puedan ser degradados por la una o más enzimas.

La composición se puede liofilizar a partir de una solución acuosa, opcionalmente en presencia de tampones (p. ej., tampones de fosfato, citrato, histidina, imidazol) y excipientes (p. ej., crioprotectores tales como sacarosa, lactosa, trehalosa) apropiados. Las tortas liofilizadas pueden mezclarse opcionalmente con excipientes y prepararse en diferentes formas.

En otro aspecto de la descripción, se proporcionan procedimientos para tratar la intolerancia al gluten o una afección asociada, tal como enfermedad celiaca, alergia al trigo, sensibilidad al gluten y dermatitis herpetiforme, en un paciente que lo necesita, que comprenden tratar un alimento que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten con una cantidad efectiva de la composición antes del consumo por el paciente. En algunas realizaciones, el alimento se combina con una cantidad efectiva de la composición durante su preparación. En una realización, la composición se añade después de cualquier etapa de calentamiento en la preparación del alimento. En una realización, la composición se añade antes de una o más etapas de calentamiento en la preparación del alimento.

La nepentesina I, la nepentesina II y la neprosina se presentan como proenzimas en *Nepenthes* antes de la activación. Es decir, la proteína incluye un propéptido que se escinde para activar la enzima en el fluido de la jarra. En una realización, la composición comprende nepentesina I, nepentesina II, neprosina, una variante de las mismas y/o una sal de las mismas que comprende un propéptido. En una realización, el propéptido es adyacente al extremo amino de la enzima. En una realización, el propéptido es el propéptido de origen natural de la enzima. En una realización, el propéptido es un propéptido heterólogo (p. ej., de una proteína o especie diferentes, o sintético). En una realización, el propéptido se escinde mediante condiciones ácidas. En una realización, el propéptido se escinde mediante una enzima. En una realización, la presencia del propéptido da como resultado actividad retardada de la enzima en el estómago (p. ej., debido al tiempo necesario para eliminar el propéptido y producir la enzima madura). En una realización, el propéptido está diseñado para ser eliminado más lentamente con el fin de retardar la actividad de la enzima en el estómago. En una realización, el propéptido está diseñado para ser eliminado más rápidamente con el fin de acelerar la actividad de la enzima en el estómago.

En una realización preferida, la formulación es una formulación de liberación controlada. El término "formulación de liberación controlada" incluye formulaciones de liberación prolongada y de liberación a lo largo del tiempo. Las formulaciones de liberación controlada son muy conocidas en la técnica. Estas incluyen excipientes que permiten la liberación prolongada, periódica, pulsada o retardada del fármaco. Las formulaciones de liberación controlada incluyen, sin limitación, incorporación del fármaco en una matriz; revestimientos entéricos; microencapsulación; geles e hidrogeles; y cualquier otra formulación que permita la liberación controlada de un fármaco.

En algunas realizaciones, la composición se administra como un aditivo alimentario junto con un alimento que comprende o se sospecha que comprende una proteína alimentaria potencialmente antigénica. En una realización, el alimento comprende o se sospecha que comprende gluten, por ejemplo, pan, pasta, cereales y similares, preparados a partir de trigo, centeno y cebada, etc. En algunas realizaciones, la composición se añade como un ingrediente en tal alimento. En algunas realizaciones, la composición se dispersa en un alimento antes del consumo, opcionalmente a un pH al que es inactiva, tal como un pH de aproximadamente 5 o superior. En algunas realizaciones, la composición se puede preparar o incorporar en un polvo, una crema para untar, un spray, una salsa, una salsa para mojar, una nata montada, etc., que se puede aplicar al alimento cuando el alimento está siendo consumido por el paciente. En algunas realizaciones, la composición se puede preparar en formas que despiertan el apetito, tales como caramelos, chicles, complementos nutricionales masticables, jarabe, etc. para una administración fácil. En algunas realizaciones, la composición se puede mezclar con alimentos habituales, tales como azúcar, sal, aderezos para ensaladas, especias, queso, mantequilla, margarinas, cremas para untar, mantequilla, grasas comestibles para freír, mayonesas, productos lácteos, mantequillas de nueces, mantequillas de semillas, mantequillas de almendra, mantequilla de cacahuete, etc. Preferiblemente, los alimentos o aditivos que comprenden la composición no necesitan calentamiento antes de ser ingeridos por un paciente, de manera que se puede minimizar la posible pérdida de actividad de la una o más enzimas debido a la temperatura elevada.

En una realización, la una o más enzimas de la composición se activan tras entrar en contacto con el ácido (es decir, en el estómago).

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un producto alimentario que comprende neprosina, nepentesina I, nepentesina II, una variante de las mismas o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el producto alimentario comprende gluten o se sospecha que comprende gluten, tal como productos para horneado (p. ej., tartas, magdalenas, donuts, pasteles, panecillos y pan), pasta, galletas saladas, nachos, cereales, etc. hechos de trigo, centeno y cebada. En algunas realizaciones, el producto alimentario se puede consumir con otro producto alimentario

que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten. Los ejemplos no limitantes de tal alimento incluyen un polvo, una crema para untar, un espray, una salsa, una salsa para mojar, una nata montada, caramelos, chicles, jarabe, azúcar, sal, aderezos para ensaladas, especias, queso, mantequilla, margarinas, cremas para untar, mantequilla, grasas comestibles para freír, mayonesas, productos lácteos, mantequillas de nueces, mantequillas de semillas, mantequillas de almendras, mantequilla de cacahuete, etc.

En algunas realizaciones, la composición que comprende neprosina, nepentesina I, nepentesina II, una variante de las mismas o una combinación de las mismas se mezcla con alimentos o se usa para pretratar alimentos que contienen gluten. La composición presente en los alimentos puede ser enzimáticamente activa para reducir el nivel de gluten en el alimento antes de, o durante, la ingestión.

En un aspecto de la descripción, se añade una composición que comprende neprosina, nepentesina I, nepentesina II, una variante de las mismas o una combinación de las mismas se añade al alimento antes de consumir el alimento. En una realización, la descripción se refiere a un dispensador que comprende un excipiente interno y una cantidad efectiva de la composición farmacéutica para digerir el gluten. En una forma de realización, la composición farmacéutica y/o el excipiente interno se añaden al alimento antes de consumir el alimento. En una realización, el alimento comprende gluten o se sospecha que comprende gluten. En una realización, el excipiente interno comprende cloruro de sodio o yoduro de sodio, o una mezcla de los mismos. En una realización, la composición farmacéutica y/o el excipiente interno están en forma granular, dimensionados para dispensar eficientemente desde dicho dispensador.

En algunas realizaciones, la composición (tal como la composición farmacéutica o la composición comestible) o el producto alimentario comprende de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 80 %, de aproximadamente 25 % a aproximadamente 75 % de la una o más enzimas. En algunas realizaciones, la cantidad de enzima en la composición (tal como la composición farmacéutica o la composición comestible) o el producto alimentario es aproximadamente 0,01 %, aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 % de la composición total o el producto alimenticio, o un intervalo entre cualesquiera dos de los valores (incluidos los extremos).

En algunas realizaciones, la composición comprende neprosina y nepentesina, o una variante de las mismas. En algunas realizaciones, la nepentesina es nepentesina I y/o nepentesina II, o una variante de las mismas. En algunas realizaciones, la nepentesina es nepentesina I recombinante y/o nepentesina II recombinante, o una variante de las mismas. En algunas realizaciones, la nepentesina es nepentesina I recombinante y nepentesina II recombinante, o una variante de cada una de las mismas. En algunas realizaciones, la neprosina es neprosina recombinante o una variante de la misma. En una realización preferida, la composición comprende nepentesina I, nepentesina II y/o neprosina que comprenden la una o más secuencias aminoácidas de la nepentesina I, nepentesina II, y/o neprosina de una especie de *Nepenthes*, o una o más variantes de las mismas.

Se han descrito las secuencias de ARNm/ADNc de nepentesina I de varias especies de *Nepenthes*, por ejemplo, *Nepenthes mirabilis* (n.º de entrada de GenBank JX494401), *Nepenthes gracilis* (n.º de entrada de GenBank AB114914) y *Nepenthes alata* (n.º de entrada de GenBank AB266803). Se han descrito las secuencias de ARNm/ADNc de nepentesina II de varias especies de *Nepenthes*, por ejemplo, *Nepenthes mirabilis* (número de acceso de GenBank JX494402) y *Nepenthes gracilis* (número de acceso de GenBank AB114915).

Se han descrito las secuencias proteicas de nepentesina I de varias especies de *Nepenthes*, por ejemplo, *Nepenthes mirabilis* (n.º de acceso de GenBank AFV26024; SEC ID NO: 5), *Nepenthes gracilis* (n.º de acceso de GenBank BAD07474; SEC ID NO: 7) y *Nepenthes alata* (n.º de acceso de GenBank BAF98915; SEC ID NO: 6). Se han descrito las secuencias proteicas de nepentesina II de varias especies de *Nepenthes*, por ejemplo, *Nepenthes mirabilis* (n.º de acceso de GenBank AFV26025; SEQ ID NO: 8) y *Nepenthes gracilis* (n.º de acceso de GenBank BAD07475; SEQ ID NO: 9). Las secuencias también se encuentran en la solicitud de patente de los estados Unidos de n.º de publicación 2014/0186330.

En algunas realizaciones, la nepentesina es una variante de nepentesina que tiene al menos aproximadamente 85 % de homología de secuencia con una secuencia aminoácida de nepentesina I (p. ej., SEQ ID NO: 5; SEC ID NO: 6; SEC ID NO: 7 o SEQ ID NO: 21). En algunas realizaciones, la variante tiene al menos aproximadamente 90 % de homología de secuencia con una secuencia aminoácida de nepentesina I. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos aproximadamente 95 % de homología de secuencia con una secuencia aminoácida de nepentesina I. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos aproximadamente 96 % de homología de secuencia con una secuencia aminoácida de nepentesina I. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos aproximadamente 97 % de homología de secuencia con una secuencia aminoácida de nepentesina I. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos 98 % de homología de secuencia con una secuencia aminoácida de nepentesina I. En algunas

realizaciones, la variante tiene al menos 99 % de homología de secuencia con una secuencia aminoacídica de nepentesina I. En una realización, la nepentesina comprende la secuencia aminoacídica de SEC ID NO: 5; SEC ID NO: 6; SEC ID NO: 7 o SEQ ID NO: 21.

5 En algunas realizaciones, la nepentesina es una variante de nepentesina que tiene al menos aproximadamente 85 % de homología de secuencia con una secuencia aminoacídica de nepentesina II (p. ej., SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 22). En algunas realizaciones, la variante tiene al menos aproximadamente 90 % de homología de secuencia con una secuencia aminoacídica de nepentesina II. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos 10 aproximadamente 95 % de homología de secuencia con una secuencia aminoacídica de nepentesina II. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos aproximadamente 96 % de homología de secuencia con una secuencia aminoacídica de nepentesina II. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos 15 aproximadamente 97 % de homología de secuencia con una secuencia aminoacídica de nepentesina II. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos aproximadamente 98 % de homología de secuencia con una secuencia aminoacídica de nepentesina II. En algunas realizaciones, la variante tiene al menos aproximadamente 99 % de homología de secuencia con una secuencia aminoacídica de nepentesina II. En una realización, la nepentesina comprende la secuencia aminoacídica de nepentesina I de SEQ ID NO: 8; SEC ID NO: 9 o SEQ ID NO: 22 que conserva actividad de glutenasa. En una realización particularmente preferida, la secuencia codifica una variante de nepentesina I que degrada al menos un péptido tóxico del gluten.

20 En un aspecto de la descripción, la proporción de neprosina a nepentesina I y/o II en la composición es tal que el antígeno alimentario peptídico se escinde en fragmentos suficientemente pequeños y/o inocuos para impedir la intolerancia al gluten, enfermedad celíaca, alergia al trigo o dermatitis herpetiforme, la inflamación, la proliferación o el reclutamiento de IEL, la linfocitosis intraepitelial y/o la atrofia de las vellosidades, o cualquier síntoma de las mismas, 25 en un intestino del sujeto. En algunas realizaciones, la proporción de neprosina:nepentesina es de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 100:1.

En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina (nepentesina I y/o II) de al menos aproximadamente 100:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 30 aproximadamente 90:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos aproximadamente 70:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 35 aproximadamente 60:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos aproximadamente 50:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 40:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 45:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 30:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 40:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 20:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 45:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 10:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 50:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 35:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 40:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 25:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 45:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 20:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 40:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 15:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 35:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 40:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 10:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 35:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 40:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 5:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 40:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 4:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 3:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 2:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:2. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:3. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:4. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:5. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:10. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:20. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:30. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:40. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:50. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:60. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:70. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:80. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:90. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 1:100. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de neprosina a nepentesina de al menos 60:1.

65 En un aspecto de la descripción, la proporción de nepentesina I a nepentesina II en la composición es tal que el antígeno alimentario peptídico se escinde en fragmentos suficientemente pequeños y/o inocuos para impedir la inflamación, la proliferación o el reclutamiento de IEL, la linfocitosis intraepitelial y/o la atrofia de las vellosidades en un intestino del sujeto. En algunas realizaciones, la proporción de nepentesina I:nepentesina II es de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 100:1.

En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 100:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 90:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 70:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 60:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 50:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 40:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 30:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 20:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 10:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 5:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 4:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 3:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 2:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:2. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:3. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:4. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:5. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:10. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:20. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:30. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:40. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:50. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:60. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:70. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:80. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:90. En algunas realizaciones, la composición comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:100.

IV. Procedimientos de preparación

Se contempla que la nepentesina y/o la neprosina se pueden concentrar (o extraer) o purificar mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo (pero no limitados a) filtración o purificación por afinidad basada en pepstatina inmovilizada, de una fuente natural, lo que incluye secreciones de las jarras de plantas tales como *Nepenthes*. También se puede usar cromatografía de proteínas clásica, tal como cromatografía de exclusión por tamaños (también conocida como cromatografía de permeación en gel) y/o cromatografía de cromatoenfoque, para concentrar (o extraer) o purificar nepentesina y/o neprosina. El cromatoenfoque se puede usar antes o después de la exclusión por tamaños. La nepentesina I, la nepentesina II y la neprosina se encuentran en cantidades relativamente pequeñas en las secreciones vegetales naturales. La producción de nepentesina I, nepentesina II y/o neprosina se puede aumentar, por ejemplo, usando tecnologías de bioingeniería para crear plantas transgénicas que expresen y/o secretan cantidades aumentadas de la una o más enzimas deseadas, o una variante de las mismas.

Además de aislarla de una fuente vegetal, la enzima de *Nepenthes* o variante de la misma se puede preparar mediante síntesis química. La síntesis química se puede conseguir acoplando los aminoácidos según la secuencia de la enzima o variante deseada. Se dispone de diversos procedimientos de acoplamiento peptídico y aparatos de síntesis peptídica comerciales para sintetizar péptidos o proteínas, por ejemplo, los sintetizadores automáticos de Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Beckman y otros fabricantes.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un procedimiento para preparar una enzima de *Nepenthes* o variante de la misma usando sistemas de producción recombinante transformando o transfeciendo una célula con el ADN (p. ej., ADNc) y/o ARN mensajero de la una o más enzimas de manera que la célula sea capaz de producir la una o más enzimas. Por ejemplo, se puede producir nepentesina creando sistemas de vector hospedador en organismos tales como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Lactobacillus*, *Bacilli*, *Aspergilli* y cultivos de células vegetales, tales como células de tabaco, etc.

También se proporcionan vectores y células hospedadoras, tales como *E. coli*, que comprenden polinucleótidos y composiciones que contienen cualquiera de los polinucleótidos o polipéptidos como se describen en esta memoria.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un procedimiento para producir enzima de *Nepenthes* recombinante

(nepentesina I, nepentesina I y/o neprosina, o una variante de las mismas) que comprende expresar en un organismo hospedador elegido una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha enzima e insertar la secuencia de ácido nucleico en un vector diseñado apropiadamente. En un aspecto de la descripción, la enzima recombinante es nepentesina I o una variante de la misma. En un aspecto de la descripción, la enzima recombinante es nepentesina II o una variante de la misma. En un aspecto de la descripción, la enzima recombinante es neprosina o una variante de la misma. En un aspecto de la descripción, la enzima recombinante es una mezcla de nepentesina I, nepentesina II y/o neprosina, o una variante de las mismas.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición que comprende nepentesina recombinante, tal como nepentesina I y/o nepentesina II o una variante de las mismas. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es nepentesina I o una variante de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es nepentesina II o una variante de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es una mezcla de nepentesina I y nepentesina II o variantes de las mismas.

En un aspecto, esta descripción se refiere a un ADNc como se describe en esta memoria. En una realización, esta descripción se refiere a un vector que comprende un ADNc como se describe en esta memoria. En una realización, el vector es un vector de expresión. En una realización, esta descripción se refiere a una célula que expresa nepentesina I recombinante, nepentesina II recombinante, neprosina recombinante, una variante o una mezcla de las mismas.

En algunas realizaciones, la biosíntesis de una o más enzimas de *Nepenthes* se puede conseguir transformando una célula con un vector que comprende un ADNc que codifica nepentesina I, por ejemplo, la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, n.º de acceso de GenBank JX494401, n.º de acceso de GenBank AB114914 o n.º de acceso de GenBank AB266803. En algunas realizaciones, la biosíntesis de nepentesina se puede conseguir transformando una célula con un vector que comprende una secuencia homóloga a un ADNc que codifica nepentesina I, esta secuencia codifica una proteína con actividad de proteasa. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 60 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 70 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 80 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 85 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 90 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 95 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 96 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 97 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 98 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 99 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina I. En una realización preferida, la secuencia codifica una variante de nepentesina I que conserva actividad de glutenasa. En una realización particularmente preferida, la secuencia codifica una variante de nepentesina I que degrada al menos un péptido tóxico del gluten.

En algunas realizaciones, la biosíntesis de una o más enzimas de *Nepenthes* se puede conseguir transformando una célula con un vector que comprende un ADNc que codifica nepentesina II, por ejemplo, la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, n.º de acceso de GenBank JX494402 o n.º de acceso de GenBank AB114915. En algunas realizaciones, la biosíntesis de nepentesina se puede conseguir transformando una célula con un vector que comprende una secuencia homóloga a un ADNc que codifica nepentesina II, esta secuencia codifica una proteína con actividad de proteasa. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 60 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 70 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 80 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 85 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 90 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 95 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 96 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 97 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 98 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 99 % de homología con un ADNc que codifica nepentesina II. En una realización preferida, la secuencia codifica una variante de nepentesina II que conserva actividad de glutenasa. En una realización particularmente preferida, la secuencia codifica una variante de nepentesina II que degrada al menos un péptido tóxico del gluten.

En algunas realizaciones, la biosíntesis de una o más enzimas de *Nepenthes* se puede conseguir transformando una célula con un vector que comprende un ADNc que codifica neprosina, por ejemplo, la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la biosíntesis de neprosina se puede conseguir transformando una célula con un vector que comprende una secuencia homóloga a un ADNc que codifica neprosina, esta secuencia codifica una proteína con actividad de proteasa. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 60 % de homología con un ADNc que codifica neprosina. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 70 % de homología con un ADNc que codifica neprosina. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 80 % de homología con un ADNc que codifica neprosina. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 85 % de homología con un ADNc que

codifica neprosina. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 90 % de homología con un ADNc que codifica neprosina. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 95 % de homología con un ADNc que codifica neprosina. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 96 % de homología con un ADNc que codifica neprosina. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 97 % de homología con un ADNc que codifica neprosina. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 98 % de homología con un ADNc que codifica neprosina. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 99 % de homología con un ADNc que codifica neprosina. En una realización preferida, la secuencia codifica una variante de neprosina que conserva actividad de prolil endoproteasa. En una realización especialmente preferida, la secuencia codifica una variante de nepentesina II que conserva actividad de glutenasa. En una realización particularmente preferida, la secuencia codifica una variante de neprosina que degrada al menos un péptido tóxico del gluten.

Sin ceñirnos a la teoría, se cree que la respuesta inflamatoria al gluten en los intestinos de individuos afectados es debida a la hidrólisis incompleta de las proteínas del gluten, lo que conduce a la formación de péptidos tóxicos (inmunotóxicos) del gluten. Se conocen varios péptidos inmunotóxicos y/o potencialmente inmunotóxicos del gluten. Estos incluyen, pero no se limitan a, el 33-mer (SEQ ID NO: 15, LQLQPF(PQPQLPY)₃PQPQPF) y p31-49 (SEQ ID NO: 16, LGQQQPFPPQQPYPQPF) de α -gliadina; Gly-156 (SEQ ID NO: 17, QQQQPPFSQQQQSPFSQQQQ) de glutenina de bajo peso molecular; y la repetición de nonapéptidos (SEQ ID NO: 18, GYYPTSPQQ) y la repetición de hexapéptidos (SEQ ID NO: 19, PGQQQQ) de glutenina de alto peso molecular.

En algunas realizaciones, se sintetiza nepentesina I, nepentesina II, neprosina y/o una variante de las mismas transfectando, infectando o transformando una célula con uno o más vectores que comprenden una secuencia de ADNc de cada enzima deseada. Es decir, se puede diseñar una única célula, línea celular u organismo para producir dos o más enzimas. En algunas realizaciones, las enzimas deseadas se sintetizan mediante células independientes y se combinan en la composición farmacéutica. En una realización preferida, la nepentesina I, nepentesina II, neprosina y/o una variante de las mismas recombinantes no están glucosiladas. En una realización, la nepentesina I, nepentesina II, neprosina recombinantes y/o una variante de las mismas tienen un patrón de glucosilación diferente a la enzima natural (es decir, nepentesina I, nepentesina II o neprosina aisladas de una planta de *Nepenthes*).

La una o más enzimas de *Nepenthes* sintéticas (p. ej., recombinantes) se pueden concentrar o purificar según procedimientos conocidos, tales como aquellos para aislar una o más enzimas de *Nepenthes* del líquido de la jarría de la planta.

En algunas realizaciones, el producto proteico aislado de una fuente natural o una fuente sintética (p. ej., recombinante) comprende al menos 20 % en peso de al menos una enzima de *Nepenthes* o una variante de la misma. En algunas realizaciones, el producto proteico aislado comprende al menos aproximadamente 50 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % en peso de la enzima de *Nepenthes* o variante de la misma. En algunas realizaciones, el producto proteico aislado comprende al menos 99 % en peso de la enzima de *Nepenthes* o variante de la misma.

En algunas realizaciones, la enzima de *Nepenthes* recombinante o variante de la misma comprende sustancialmente solo nepentesina recombinante o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante o variante de la misma comprende sustancialmente solo nepentesina I recombinante o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante o variante de la misma comprende sustancialmente solo nepentesina II o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante o variante de la misma comprende nepentesina I y nepentesina II, o una variante de las mismas. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante o una variante de la misma comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II (o una variante de cada una de las mismas) de al menos aproximadamente 100:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 90:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 70:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 60:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 50:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 40:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 30:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 20:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 10:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 5:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 4:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 3:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 2:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:2. En algunas realizaciones, la nepentesina

recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:3. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:4. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:5. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:10. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:20. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:30. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:40. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:50. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:60. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:70. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:80. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:90. En algunas realizaciones, la nepentesina recombinante comprende una proporción de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:100.

proteasa original de la nepentesina II. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende nepentesina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 80 % de la actividad de proteasa original de la nepentesina II. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende nepentesina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 90 % de la actividad de proteasa original de la nepentesina II. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende nepentesina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 100 % de la actividad de proteasa original de la nepentesina II.

En algunas realizaciones, el producto proteico aislado de una fuente natural o una fuente sintética comprende neprosina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 10 % de la actividad de proteasa original de la neprosina de *Nepenthes*. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende neprosina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 20 % de la actividad de proteasa original de la neprosina. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende neprosina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 30 % de la actividad de proteasa original de la neprosina. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende neprosina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 40 % de la actividad de proteasa original de la neprosina. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende neprosina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 50 % de la actividad de proteasa original de la neprosina. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende neprosina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 60 % de la actividad de proteasa original de la neprosina. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende neprosina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 70 % de la actividad de proteasa original de la neprosina. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende neprosina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 80 % de la actividad de proteasa original de la neprosina. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende neprosina o una variante de la misma con al menos aproximadamente 90 % de la actividad de proteasa original de la neprosina. En algunas realizaciones, el producto proteico comprende neprosina o una variante de la misma con más de aproximadamente 100 % de la actividad de proteasa original de la neprosina.

A menos que se indique de otro modo, las abreviaturas usadas a lo largo de esta memoria descriptiva tienen los significados siguientes:

g	= gramo
kDa	= kilodalton
kg	= kilogramo
L	= litro
CL	= cromatografía líquida
mg	= miligramo
min	= minuto
mL	= mililitro
mm	= milimolar
EM	= espectrometría de masas
nM	= nanomolar
pM	= picomolar
d.e.	= desviación estándar
μ Ci	= microcurio
μ g	= microgramo
μ L	= microlitro
μ M	= micromolar
μ m	= micrómetro
$^{\circ}$ C	= grado Celsius

Estos símbolos de una letra tienen el significado siguiente cuando representan aminoácidos:

A	= alanina
R	= arginina
N	= asparagina
D	= ácido aspártico
C	= cisteína
E	= ácido glutámico
Q	= glutamina
G	= glicina

	H	= histidina
	I	= isoleucina
5	L	= leucina
	K	= lisina
10	M	= metionina
	F	= fenilalanina
	P	= prolina
15	S	= serina
	T	= treonina
20	W	= triptófano
	Y	= tirosina
	V	= valina

25 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación del extracto de nepentesina

30 **Productos químicos**

Se compró agua y acetonitrilo, de grado HPLC Burdick & Jackson, de VWR. Se compró ácido fórmico, Tris y glicina de Sigma Aldrich.

35 **Cultivo vegetal**

Se compraron trasplantes de *Nepenthes rafflesiana*, *Nepenthes ampularia*, *Nepenthes mirabilis*, y *Nepenthes globosa* se compraron de Keehns Carnívores (www.keehnscarnivores.ca). Estos se colocaron en macetas con corteza de madera, perlita, turba en polvo y humus (40, 35, 10, 5 %, respectivamente). Las condiciones de crecimiento implicaron 14 horas de luz al día, 80 % humedad y temperatura en el intervalo de 23 °C a 28 °C con 2 a 3 riegos a la semana. Tras la madurez de la jarra, las plantas se alimentaron con una o dos *Drosophila* por jarra y el fluido de la jarra se recogió una semana después. Se dejó que las jarras y sus secreciones se recuperaran durante una semana antes de una segunda ronda de alimentación y extracción.

45 **Preparación de extracto**

Se recogió fluido de la jarra de las cuatro especies de plantas y se combinó. El fluido de la jarra bruto se aclaró primero a través de un filtro de 0,22 µm, a continuación se concentró de 80 a 100 veces usando un filtro de corte de peso molecular de 10 kDa de ultracentrífuga Amicon (ambos de Millipore). Antes de usarlo en las digestiones, el concentrado se activó con ácido con glicina-HCl 100 mM (pH 2,5) durante 3 horas, a continuación se lavó 3X con glicina-HCl 100 mM (pH 2,5) en el dispositivo de filtración, usando un volumen de fluido de 10X para cada lavado. Las bacterias aisladas finales se rediluyeron a continuación a una concentración de 11X en base al muestreo original de fluido de la jarra.

55 **Caracterización del extracto de fluido de jarra**

Las secreciones de fluido de la planta de jarra se concentraron y las enzimas de digestión se activaron mediante reducción del pH (pH 2,5). El impacto del procedimiento de enriquecimiento y la activación sobre el proteoma del fluido se determinó usando procedimientos proteómicos. Primero, para confirmar la presencia de enzima nepentesina, el concentrado inactivo se separó mediante SDS-PAGE. Siete zonas de gel contiguas con tinción de Coomassie muy tenue se digirieron con tripsina y se analizaron mediante nanoCL-EM/EM usando procedimientos convencionales. No cabe esperar que este sea un catálogo completo del proteoma del fluido activado, pero el análisis confirmó la presencia de la proteasa aspártica nepentesina I/II, así como de una glucanasa, quitinasa, carboxipeptidasa y peroxidasa de origen vegetal, además de niveles moderados de *Drosophila* y contaminación bacteriana. La baja complejidad del proteoma del fluido es compatible con los análisis recientes, Hatano N, Hamada T (2012) Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. Journal of

Proteomics 3;75(15):4844-52 (publicación electrónica de 15 de junio de 2012), pero se encontró nepentesina-I distribuida a lo largo de un intervalo de masas mucho más amplio en este análisis (40-70 kDa).

El fluido activado con ácido se procesó y analizó de una manera similar. El procedimiento de activación redujo el rendimiento total de proteínas y también pareció simplificar la composición. Aparte de nepentesina-I, solo se observó una contaminación pequeña de queratina y actina. Estos análisis indican la baja complejidad del fluido enriquecido, en el que la nepentesina es el componente principal. La concentración total de proteínas del fluido activado y enriquecido 80X se midió mediante un ensayo de BCA y se determinó que era 22 ng/μL. Este valor es compatible con un estudio anterior que describe el enriquecimiento del fluido. Tokes ZA, y col., Digestive Enzymes Secreted by Carnivorous Plant Nepenthes-Macferlanei-L. Planta 119(1):39-46 (1974).

Ejemplo 2: Purificación de extracto de nepentesina

Purificación de extracto

Se equilibró pepstatina inmovilizada en sefarosa en una columna de 50 x 2 cm de DI en glicina-HCl 20 mM, pH 2,5-3. El fluido de la jarra filtrado (preparado como se describe en el Ejemplo 1) se sometió a dos ciclos a través de la columna y la columna se lavó con 100 mL de tampón de equilibrio (glicina-HCl 20 mM, pH 2,5). La columna se eluyó con bicarbonato de amonio 100 mM a pH 8,7 y se recogieron las fracciones. Con el fin de conservar al máximo la actividad enzimática, el pH se disminuyó a 4 inmediatamente después de la recogida de las fracciones con glicina-HCl 2 M, pH 2,5. La actividad se verificó usando un ensayo de digestión y las fracciones más activas se combinaron y concentraron hasta aproximadamente 80x, en base al volumen original de fluido.

Las únicas endoproteasas encontradas a niveles detectables en el fluido y/o extracto de Nepenthes son proteasas aspárticas y prolil endoproteasa.

Ejemplo 3: Nepentesina I recombinante

El gen para la nepentesina I (SEQ ID NO: 4; que codifica los residuos aminoácidos 20-413, de *N. gracilis*, sin la secuencia señal de la planta) se preparó a partir de ADNc de nepentesina I y se colocó entre los sitios de restricción NdeI y HindIII. Esta secuencia se clonó en pET21a, usando T4 ADN ligasa (1 U) (New England Bio, NEB), tampón de T4 ADN ligasa (NEB), ATP (0,5 mM) (NEB), 0,5 μg de vector pET21a y 2 μg de ADNc de nepentesina I. Esta se incubó a 18 °C durante 4 horas. La mezcla de ligación (5 μL) se añadió a 200 μL de células competentes NovaBlue y se incubó en hielo durante 15 minutos. Las células se transformaron mediante choque térmico (45 segundos a 42 °C, a continuación inmediatamente en hielo, con 1 ml de medio LB), se incubaron durante 1 hora a 37 °C y se sembraron en placas con antibióticos (tetraciclina y ampicilina). Después de confirmar la presencia de genes en varias colonias blancas, se eligió una colonia representativa para Maxiprep. El plásmido recombinante resultante pET21a/R.Nepl se transformó en C41 de *E. coli* mediante choque térmico como anteriormente, para expresión con inducción por IPTG. Aquí, las células se hicieron crecer a una DO₆₆₀ de 0,6 y se indujeron con IPTG 0,1 mM durante cuatro horas a 37 °C. La proteína expresada fue a cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión se aislaron como se indica a continuación. Las células se centrifugaron, se añadió tampón de lisis de sacarosa (25 % de sacarosa, TrisCl 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, NaN₃ 1 mM e inhibidores de proteasas) y las células se sometieron a cuatro rondas de congelación/descongelación y sonicación. Esto fue seguido de adición de ADNasa y ARNasa durante una incubación de 30 min a temperatura ambiente. El preparado se centrifugó (~15 min a 5000 x g) para sedimentar los cuerpos de inclusión y los fragmentos de membrana. Este sedimento se resuspendió en tampón Triton (TrisCl 50 mM pH 7,4, NaCl 10 mM, β-mercaptopropanoilo 1 mM, NaN₃ 1 mM, 0,5 % de Triton X100 + inhibidores de proteasas) y se realizó la sonicación en hielo. Se centrifugó de nuevo, para sedimentar los cuerpos de inclusión, y el sedimento se lavó dos veces en hielo (con mezcla y sonicación) en un tampón exento de Triton (TrisCl 50 mM pH 7,4, NaCl 10 mM, β-mercaptopropanoilo 1 mM, NaN₃ 1 mM, inhibidores de proteasas).

El sedimento proteico se sometió a continuación a replegamiento. Se suspendió un g de cuerpos de inclusión en 1 L de CAPS 50 mM pH 10,5, urea 8 M, EDTA 1 mM, glicina 1 mM, NaCl 500 mM, β-mercaptopropanoilo 300 mM y se agitó durante 1 h. La suspensión se dializó contra Tris 50 mM, pH 11, dos veces durante 1 hora cada vez, seguido de un día de diálisis contra Tris 50 mM, pH 7,5 y, por último, diálisis contra tampón de fosfato con NaCl 300 mM, pH 7,0.

La solución se centrifugó a alta velocidad (10 000 x g durante 15 min) para eliminar toda la proteína no replegada y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22 μm. La nepentesina I se activó a pH 2,5 (glicina-HCl) durante la noche a 4 °C. Los rendimientos varían de 10 a 100 mg de proteína activada plegada, partiendo de 1 L de cultivo celular.

Ejemplo 4: Nepentesina II recombinante

El ADNc de nepentesina II (véase la SEQ ID NO: 14) de *N. gracilis*, sin la secuencia señal de la planta) se usó para preparar ADNc de nepentesina II. Esta secuencia se clonó en pET21a entre los sitios de restricción NdeI y HindIII, usando T4 AND ligasa (1 U) (New England Bio, NEB), ATP (0,5 mM) (NEB), 0,5 μg

de vector pET21a y 2 µg del ADNc de nepentesina II. Esta se incubó a 18 °C durante 4 horas. La mezcla de ligación (5 µL) se añadió a 200 µL de células competentes NovaBlue y se incubó en hielo durante 15 minutos. Las células se transformaron mediante choque térmico (45 segundos a 42 °C, a continuación inmediatamente en hielo, con 1 ml de medio LB), se incubaron durante 1 hora a 37 °C y se sembraron en placas con antibióticos (tetraciclina y ampicilina). Después de confirmar la presencia de genes en varias colonias blancas, se eligió una colonia representativa para Maxiprep. El plásmido recombinante resultante pET21a/R.Nepl se transformó en C41 de *E. coli* mediante choque térmico como anteriormente, para expresión con inducción por IPTG. Aquí, las células se hicieron crecer a una OD₆₆₀ de 0,6 y se indujeron con IPTG 0,1 mM durante cuatro horas a 37 °C. La proteína expresada fue a cuerpos de inclusión.

- Los cuerpos de inclusión se aislaron como se indica a continuación. Las células se centrifugaron, se añadió tampón de lisis de sacarosa (25 % de sacarosa, TrisCl 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, NaN₃ 1 mM e inhibidores de proteasas) y las células se sometieron a cuatro rondas de congelación/descongelación y sonicación. Esto fue seguido de adición de ADNasa y ARNasa durante una incubación de 30 min a temperatura ambiente. El preparado se centrifugó (~15 min a 5000 x g) para sedimentar los cuerpos de inclusión y los fragmentos de membrana. Este sedimento se resuspendió en tampón Triton (TrisCl 50 mM pH 7,4, NaCl 10 mM, β-mercaptopropanoilo 1 mM, NaN₃ 1 mM, 0,5 % de Triton X100 + inhibidores de proteasas) y se realizó la sonicación en hielo. Se centrifugó de nuevo, para sedimentar los cuerpos de inclusión, y el sedimento se lavó dos veces en hielo (con mezcla y sonicación) en un tampón exento de Triton (TrisCl 50 mM pH 7,4, NaCl 10 mM, β-mercaptopropanoilo 1 mM, NaN₃ 1 mM, inhibidores de proteasas).
- El sedimento proteico se sometió a continuación a replegamiento. Se suspendió un g de cuerpos de inclusión en 1 L de CAPS 50 mM pH 10,5, urea 8 M, EDTA 1 mM, glicina 1 mM, NaCl 500 mM, β-mercaptopropanoilo 300 mM y se agitó durante 1 h. La suspensión se dializó contra Tris 50 mM, pH 11, dos veces durante 1 hora cada vez, seguido de un día de diálsis contra Tris 50 mM, pH 7,5 y, por último, diálsis contra tampón de fosfato con NaCl 300 mM, pH 7,0.
- La solución se centrifugó a alta velocidad (10 000 x g durante 15 min) para eliminar toda la proteína no replegada y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22 µm. La nepentesina II se activó a pH 2,5 (glicina-HCl) durante la noche a 4 °C. Los rendimientos varían de 10 a 100 mg de proteína activada plegada, partiendo de 1 L de cultivo celular.

Ejemplo 5. Glucosilación de enzimas de *Nepenthes*

La producción recombinante de nepentesina I (A) y II (C) a partir del replegamiento de cuerpos de inclusión de *E. coli* purificados se muestra en la **Figura 2**. Se monitorizó cada etapa del procedimiento de replegamiento y se muestran como: proteína total solubilizada de cuerpos de inclusión de *E. coli* purificados (carril 1), nepentesina replegada después de la diálsis final (carril 2), activación con ácido durante 24 horas (glicina-HCl 100 mM, pH 2,5) del producto replegado (carril 3). Se realizó el análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en las enzimas nepentesina I (B) y II (D) activadas con ácido durante 24 horas. Los análisis de CL/EM-EM de los productos de la digestión en gel de las bandas activadas con ácido (A y C, carriles 3) confirmaron la presencia de nepentesina I y II puras, respectivamente.

Se realizaron análisis mediante MALDI-TOF de las nepentesinas naturales (agrupadas a partir de 2-3 especies). Los resultados se muestran en la **Figura 3**. Se cree que la masa a 37 200 es nepentesina II y la masas a 38 951 es nepentesina I. En cualquier caso, son diferentes a las masas de las enzimas recombinantes, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Masa de las nepentesinas recombinantes frente a las naturales

Nepentesina I	Masa (Daltons)*	Nepentesina II	Masa (Daltons)*
recombinante	37 460	recombinante	37 506
natural	38 949	natural	37 199
Diferencia:	1489		-307

* Se resta 1 Dalton por el protón añadido por la MALDI.

Sin ceñirnos a la teoría, creemos que esto confirma que la nepentesina I es de naturaleza glucosilada. La enzima madura activa de nepentesina II recombinante es más grande que la que existe en la naturaleza. Sigue siendo posible que la nepentesina II natural sea incluso más pequeña en cuanto a la secuencia proteica, pero tenga algo de glucosilación. Las masas de las enzimas naturales descritas en esta memoria difieren de las de Athauda y col., probablemente porque la espectrometría de masas es una técnica más exacta que la SDS-PAGE para determinar la masa de una molécula.

Ejemplo 6. Comparación de las enzimas de *Nepenthes* con la pepsina

Se realizó SDS-PAGE en gliadina digerida por la enzima indicada. La SDS-PAGE realiza un perfil aproximado de las proteínas según el peso molecular. La digestión de gliadina con pepsina, extracto de *Nepenthes* purificado o

nepentesina II recombinante se realizó en una proporción de sustrato a enzima de aproximadamente 100:1. Se incubó gliadina (5 mg) con el preparado indicado a 37 °C durante 2 h. La **Figura 4** muestra un gel de SDS-PAGE de la digestión de gliadina por nepentesina II recombinante, extracto de *Nepenthes* o pepsina. El gel muestra que la digestión de la gliadina por la nepentesina II recombinante da como resultado un patrón de digestión diferente y la digestión en péptidos más pequeños que la pepsina. Esto es particularmente evidente en las áreas enmarcadas del gel. El extracto de *Nepenthes* es tan efectivo para degradar la gliadina que no se observa proteína gliadina residual en esta región.

La Tabla 2 muestra los residuos preferidos, de baja probabilidad y prohibidos para la escisión carboxiterminal mediante pepsina, nepentesina I y II recombinantes y extracto de *Nepenthes*. La especificidad de la escisión carboxiterminal, la manera clásica en que se clasifican las enzimas, se resume en base a una gran colección de sustratos proteicos. Las nepentesinas son bastante diferentes de la pepsina en cuanto a especificidad de escisión, lo que indica que la nepentesina y la pepsina son enzimas muy diferentes. Los datos de la pepsina proporcionados en la Tabla 2 se resumen de la bibliografía (p. ej., "Determining the Specificity of Pepsin for Proteolytic Digestion", una tesis de Melissa Palashoff disponible en: books.google.ca/books?id=7O1nU4-6T-wC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false). Los datos de las enzimas de *Nepenthes* se resumen a partir de estudios de digestiones tales como el descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos de n.º de publicación 2014/0186330.

TABLA 2: Escisión carboxiterminal

	Pepsina	Nepentesina I y II	Extracto de Nepenthes
Preferidos	F, L, M	F, L, M, K, R, D, E, C, Y, A	F, L, M, K, R, D, E, C, Y
De baja probabilidad	W, C, Y, D, E, G, Q, N, S, T	W, G, N, Q, V, T	H, I, A, P, N, Q
"Prohibidos"	I, V, K, R, P, H, G	G, I, S, P	G, S, T, W, V

Se realizó un ensayo de CL-EM para determinar la capacidad de cada enzima para escindir el péptido tóxico del gluten de 33-mer. Se incubó 33-mer con la enzima indicada durante 0,5 h en una proporción (sustrato:enzima) de 100:1 y se determinó la cantidad de 33-mer no digerido con respecto a un patrón, siguiendo la práctica habitual. Los datos se proporcionan como porcentaje del control (33-mer sin enzima añadida).

La Tabla 3 proporciona la digestión del fragmento resistente a la pepsina de la proteína del gluten que se denomina "33-mer" (LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPF) SEQ ID NO: 15. Esta secuencia está fuertemente ligada a la enfermedad celíaca y a menudo se denomina péptido tóxico del gluten. Como todas las proteínas de gluten, el 33-mer es rico en los aminoácidos Q, P y L. Los tiempos de digestión prolongados usando solo pepsina no tuvieron mucho efecto sobre este péptido, fue muy resistente a la digestión con pepsina. En cambio, la nepentesina I, la nepentesina II y la fracción de alto peso molecular (>aprox. 10 kDa) de extracto de *Nepenthes* (fluido) presentaron la capacidad de digerir este péptido. Los datos se proporcionan como % de control (33-mer sin enzima).

TABLA 3: Digestión de 33 mer

Enzima para la digestión	Área de pico relativa (%)
Control	100,0
Fluido de Nepenthes	0,0
Nepentesina I	78,7
Nepentesina II	34,0
Pepsina	93,2

Se incubó suspensión de proteína gliadina (5 mg de gluten) con 40 o 200 µg de nepentesina I recombinante o nepentesina II recombinante o con 40 µg de pepsina y se examinó para determinar el grado de digestión (como se determina mediante el grado de turbidez de las soluciones correspondientes). Las cantidades crecientes de pepsina no tienen ningún efecto sobre la turbidez de la suspensión (datos no mostrados). La **Figura 5A** es una imagen de viales que contienen suspensión de gliadina y la cantidad indicada de nepentesina I recombinante, nepentesina II recombinante o pepsina. La **Figura 5B** es similar, pero se usaron 5, 20 o 100 µg de extracto de *Nepenthes*. Los viales incubados con nepentesina o extracto de *Nepenthes* fueron menos turbios que el vial de pepsina, lo que demuestra la digestión más energética de la gliadina.

Estos datos demuestran que los productos de la digestión de la proteína gliadina son diferentes entre las enzimas de *Nepenthes* y la pepsina a nivel de gel (que presenta los productos de digestión "más grandes"), a nivel de péptido (procesamiento del 33-mer) y a nivel de suspensión (aclarando la solución). La pepsina, la neprosina y la nepentesina son proteínas muy diferentes, con especificidades de escisión distintas, particularmente en lo que respecta a las proteínas del gluten. En pocas palabras, la pepsina no digiere adecuadamente el gluten de una manera que evite la toxicidad del gluten, mientras que las enzimas de *Nepenthes* sí lo hacen.

Ejemplo 7. Digestión de gliadina por extracto de Nepenthes

Se realizaron digestiones de gliadina por nepentesina en solución usando un inyector de muestras automático LEAP HTX-PAL y un sistema de dosificación diseñado para aplicaciones de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX). Los datos se recogieron usando un espectrómetro de masas QqTOF Triple-TOF 5600 de AB Sciex. Los péptidos se identificaron usando Mascot (v2.3) a partir de datos de EM/EM. Brevemente, se mezclaron 12 pmol de gliadina cruda (comprados en Sigma Aldrich) con 2 µL de extracto concentrado 100x, producido como se describe en el Ejemplo 1. Despues de la digestión, se inyectó todo el volumen en un sistema de CL de fase inversa conectado al espectrómetro de masas. Los péptidos se atraparon en una columna Magic C18 de 7 cm, 150 µm de d.i. y se eluyeron con un gradiente de acetonaítrilo de 10 % a 40 % en 10 o 30 minutos. Los péptidos detectados en estos análisis se seleccionaron para fragmentación CID en múltiples adquisiciones de espectros EM/EM dependientes de la información. Se buscaron espectros en una base de datos en miniatura que contenía las secuencias de todas las proteínas gliadina de trigo identificadas (α , β , γ , ω) más la glutenina de alto y bajo peso molecular.

La **Figura 6** muestra la longitud promedio de todos los péptidos identificados a partir de la digestión de gliadina de trigo con extracto de Nepenthes, usando CL-EM/EM, después de 1, 5, 10, 15, 30, 60, 130, 360 u 810 minutos a 37 °C. Se usó un límite de corte de confianza de 95 % ($p < 0,05$) en las puntuaciones para reducir la identificación de falsos positivos. La desviación estándar relativa de la longitud de los péptidos se muestra en la figura insertada.

La **Figura 7** muestra el número de péptidos identificados mediante CL-EM/EM después de 1, 5, 10, 15, 30, 60, 130, 360 u 810 minutos de digestión a 37 °C, agrupados por longitud. Datos como en la **Figura 6**.

La **Figura 8** muestra los mismos datos que la Figura 6, como una probabilidad acumulada de obtener una cierta longitud después de 10, 60, 120, 360 u 810 minutos de digestión a 37 °C.

Para la cartografía de la digestión, se realizó la digestión de gliadina como se describió anteriormente, excepto que la proporción de sustrato a enzima fue aproximadamente 1000:1. La gliadina se digirió a 37 °C durante 2 h con extracto de nepentesina, extracto de nepentesina purificado o nepentesina I recombinante.

La preferencia de escisión de P1 de la nepentesina I recombinante es muy similar a la del extracto de fluido concentrado, así como a la fracción purificada del extracto (**Figura 9A**). Sorprendentemente, el extracto presentó una preferencia superior por la glutamina que el extracto purificado o la nepentesina I recombinante.

La preferencia de escisión de P1' de la nepentesina I recombinante es muy similar a la del extracto de fluido concentrado, así como a la fracción purificada del extracto (**Figura 9B**). Sorprendentemente, el extracto presentó una preferencia superior por la prolina que el extracto purificado o la nepentesina I recombinante.

El extracto contiene nepentesina I, nepentesina II y neprosina, pero la estrategia de purificación recupera más nepentesina I que las otras dos enzimas. Sin desechar ceñirnos a la teoría, se cree que la escisión intensificada en la posición de la glutamina P1 y la posición de la prolina P1' por el extracto se debe a la neprosina, la nepentesina II y/o a la sinergia entre dos o más de las enzimas.

Ejemplo 8. Preparación de extracto de neprosina

Se extrajo neprosina del fluido de digestión de la especie *Nepenthes*. El fluido se recogió de la jarra de la planta 5 días después de alimentarla con moscas de la fruta congeladas. El líquido recogido se filtró para eliminar los insectos muertos y se lavó repetidamente con acetato de amonio 20 mM pH 5,0 mediante múltiples ciclos de concentración/filtración a través de una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa.

La neprosina se purificó parcialmente de la nepentesina en una columna Mono P 5/50 GL. Se inyectaron 5 mL de fluido concentrado 1,5X en la columna Mono P equilibrada a fuerza iónica baja (acetato de amonio 20 mM pH 6). Las proteínas se eluyeron con un gradiente de NaCl de 40 min (0 a 1 M) a 0,5 mL/min. Las fracciones se recogieron cada 0,5 mL. La actividad de la neprosina se evaluó en cada fracción digiriendo una proteína rica en prolina intrínsecamente desordenada, APLF. Los péptidos generados se separaron en una columna C8 y se analizaron mediante CL-EM/EM en un tripleToF 5600 (AB Sciex). Las fracciones 19-22 se enriquecieron en neprosina (**Figura 10**) y se denominan extracto de neprosina bruto; la neprosina es distinta de la nepentesina, que se enriqueció en fracciones posteriores.

Ejemplo 9. Eficacia de las enzimas de Nepenthes para inhibir la inflamación en los intestinos de ratones intolerantes al gluten

Objetivo: analizar la eficacia de la digestión *in vitro* de gliadina usando extracto de *Nepenthes* o nepentesina II recombinante para impedir el daño inducido por la gliadina *in vivo* usando ratones NOD-DQ8 sensibilizados con gliadina.

Diseño experimental: se sensibilizaron ratones NOD DQ8 con toxina del cólera (CT) y gliadina para romper la

tolerancia oral a la gliadina. Los controles negativos se trajeron con CT y gliadina, pero se dejaron exentos de exposiciones posteriores a gliadina oral. Las exposiciones a gliadina se realizaron con productos de la digestión de gliadina con una proteasa porcina (pepsina) que contenía un abanico de péptidos derivados tóxicos e inmunogénicos. Los grupos de tratamiento se expusieron a gliadina predigerida con extracto de *Nepenthes* o nepentesina II recombinante (durante 90 minutos a 37 grados Celsius). Se ha planteado la hipótesis de que los productos de la digestión de gliadina con extracto de *Nepenthes* o nepentesina II recombinante serán menos inmunogénicos *in vivo* que los productos de la digestión de gliadina con pepsina.

Grupos:

Control positivo (n=8) sensibilizado y expuesto a gliadina. Los ratones se sensibilizaron con toxina del cólera (CT) y pepsina-gliadina (P-G) (1 vez a la semana durante 3 semanas). Durante el periodo experimental, los ratones se alimentaron por sonda con P-gliadina (3 veces a la semana durante 3 semanas).

Control negativo (n=8) sensibilizado (a continuación, exento de gliadina). Los ratones se sensibilizaron con toxina del cólera (CT) y pepsina-gliadina (P-G) (1 vez a la semana durante 3 semanas). Durante el período experimental, los ratones se alimentaron por sonda con vehículo (3 veces a la semana durante 3 semanas).

Tratamiento 1 (n = 8): extracto de Nepenthes. Los ratones se sensibilizaron con toxina del cólera (CT) y pepsina-gliadina (P-G) (1 vez a la semana durante 3 semanas). Durante el período experimental, los ratones se alimentaron con *gliadina digerida con extracto de Nepenthes* (3 veces a la semana durante 3 semanas).

Tratamiento 2 (n = 8): los ratones se sensibilizaron con toxina del cólera (CT) y pepsina-gliadina (P-G) (1 vez a la semana durante 3 semanas). Durante el período experimental, los ratones se alimentaron por sonda con gliadina digerida por nepentesina II (3 veces a la semana durante 3 semanas).

Resultados:

Los 4 grupos de ratones se sensibilizaron con productos de la digestión de gliadina con pepsina más toxina del cólera. Los controles negativos se dejaron exentos de exposición a gliadina después de la sensibilización. Los controles positivos y los grupos de tratamiento se expusieron por vía oral a gliadina después de la sensibilización. La diferencia en los grupos tratados fue que la gliadina se predigirió con extracto de *Nepenthes* o nepentesina II. De esta manera, los "controles negativos" no estuvieron totalmente libres de la exposición a gliadina (ya que fueron expuestos durante la fase de sensibilización), y así simulaban la situación clínica de un paciente celíaco que entraba en remisión mientras seguía una dieta exenta de gluten.

Efectos clínicos/tóxicos: se evaluó el aspecto general de los ratones (movimiento, apertura de ojos, aseo). No se observaron efectos nocivos en ninguno de los grupos de tratamiento o control. Se registraron los pesos corporales a lo largo de los experimentos y no se observó pérdida de peso en ninguno de los grupos (Figura 11).

Cambios inmunitarios intrínsecos a la exposición a gliadina: se realizó inmunohistoquímica para analizar los linfocitos intraepiteliales CD3+ en los intestinos de los ratones de cada grupo de tratamiento (**Figura 12**). Este es un marcador inmunitario intrínseco rápido y precoz de la exposición intestinal a gliadina en el modelo. La exposición a gliadina dio como resultado recuentos de IEL aumentados en comparación con los ratones de control negativo y con los ratones expuestos a gliadina que fue predigerida con extracto de *Nepenthes* o nepentesina II (**Figura 13**). No se observaron diferencias en los recuentos de IEL entre los grupos tratados con extracto de *Nepenthes* y nepentesina II.

Proporciones de vellosidades a criptas: se observaron tendencias no significativas a proporciones de vellosidades a criptas (V/C) inferiores en el grupo de control positivo (**Figura 14**). Los grupos tratados con extracto de *Nepenthes* y nepentesina II tuvieron una tendencia a proporciones superiores en comparación con los controles positivos y negativos.

Interpretación/análisis de los resultados:

Una exposición de tres semanas a gliadina predigerida con extracto de *Nepenthes* o nepentesina II fue segura y no indujo disminuciones a corto plazo en el peso corporal ni ningún acontecimiento clínico adverso en los ratones.

Las exposiciones orales a gliadina condujeron a aumentos significativos en los recuentos de IEL en el intestino delgado en ratones previamente sensibilizados. El aumento de IEL no se observó en ratones que fueron expuestos a gliadina que se había predigerido con extracto de *Nepenthes* o nepentesina II. Esto sugiere una antigenicidad luminal inferior de la gliadina tratada con extracto de *Nepenthes* o nepentesina II.

La reducción en las proporciones V/C fue muy moderada en el grupo de control positivo. Sin embargo, hubo tendencias no significativas a proporciones V/C superiores en los ratones que fueron expuestos a gliadina que fue predigerida con extracto de *Nepenthes* o nepentesina II. La reducción en las proporciones V/C en este modelo animal es moderada y varía con la duración y la dosis de exposición a gliadina. Las diferencias son más evidentes entre los controles

positivos y negativos cuando estos últimos no han sido expuestos en absoluto a gliadina/gluten (no sensibilizados). Se cree que las diferencias en las proporciones V/C usando extracto de *Nepenthes* nepentesina II predigeridos en un entorno más crónico y/o en comparación con los ratones que no han sido expuestos en absoluto a gliadina (no sensibilizados) serían más pronunciadas.

5

Conclusión general: los resultados demuestran un efecto de la predigestión de gliadina con extracto de *Nepenthes* o nepentesina II para reducir la antigenicidad de los péptidos de gliadina en el intestino delgado de los ratones NOD/DQ8 sensibilizados.

10

Ejemplo 10. Digestión de gliadina por la neprosina

15

Se incubó extracto bruto de neprosina con gliadina a pH 2,5 y los fragmentos peptídicos resultantes se analizaron mediante EM. Los resultados se muestran en las **Figuras 15A y 15B** (un punto [...] indica un sitio de escisión). La cobertura de la secuencia proteica por el extracto fue 61 %. Aproximadamente 57 % de los sitios potenciales de escisión de prolina (P) (carboxiterminales) en la gliadina fueron procesados por el extracto de neprosina bruto. Sin ceñirnos a la teoría, se cree que al menos una porción de los sitios de escisión de la glutamina fueron debidos a una pequeña cantidad de contaminación del extracto con proteínas de nepentesina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NEPETX, LLC

5 <120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR LA INTOLERANCIA AL GLUTEN Y LOS TRASTORNOS DERIVADOS DE LA MISMA

<130> 16411-37

10 <140> PCT/CA2015/000389

<141> 16/06/2015

<150> 62/118 396

<151> 19/02/2015

15 <150> 62/012 865

<151> 16/06/2014

<160> 150

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 380

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

30 <400> 1

Met	Gln	Ala	Lys	Phe	Phe	Thr	Phe	Val	Ile	Leu	Ser	Ser	Val	Phe	Tyr
1					5					10				15	

Phe	Asn	Tyr	Pro	Leu	Ala	Glu	Ala	Arg	Ser	Ile	Gln	Ala	Arg	Leu	Ala
					20				25				30		

Asn	Lys	Pro	Lys	Gly	Thr	Ile	Lys	Thr	Ile	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Glu
					35			40				45			

Val	Val	Asp	Cys	Val	Asp	Ile	Tyr	Lys	Gln	Pro	Ala	Phe	Asp	His	Pro
					50			55				60			

Leu	Leu	Lys	Asn	His	Thr	Leu	Gln	Met	Gln	Pro	Ser	Ser	Tyr	Ala	Ser
					65			70			75			80	

Lys	Val	Gly	Glu	Tyr	Asn	Lys	Leu	Glu	Gln	Pro	Trp	His	Lys	Asn	Gly
					85			90				95			

Glu	Cys	Pro	Lys	Gly	Ser	Ile	Pro	Ile	Arg	Arg	Gln	Val	Ile	Thr	Gly
					100			105				110			

Leu	Pro	Val	Val	Lys	Lys	Gln	Phe	Pro	Asn	Leu	Lys	Phe	Ala	Pro	Pro
					115			120				125			

ES 2 883 347 T3

Ser Ala Asn Thr Asn His Gln Tyr Ala Val Ile Ala Tyr Phe Tyr Gly
 130 135 140

Asn Ala Ser Leu Gln Gly Ala Asn Ala Thr Ile Asn Ile Trp Glu Pro
 145 150 155 160

Asn Leu Lys Asn Pro Asn Gly Asp Phe Ser Leu Thr Gln Ile Trp Ile
 165 170 175

Ser Ala Gly Ser Gly Ser Ser Leu Asn Thr Ile Glu Ala Gly Trp Gln
 180 185 190

Val Tyr Pro Gly Arg Thr Gly Asp Ser Gln Pro Arg Phe Phe Ile Tyr
 195 200 205

Trp Thr Ala Asp Gly Tyr Thr Ser Thr Gly Cys Tyr Asp Leu Thr Cys
 210 215 220

Pro Gly Phe Val Gln Thr Asn Asn Tyr Tyr Ala Ile Gly Met Ala Leu
 225 230 235 240

Gln Pro Ser Val Tyr Gly Gln Gln Tyr Glu Leu Asn Glu Ser Ile
 245 250 255

Gln Arg Asp Pro Ala Thr Gly Asn Trp Trp Leu Tyr Leu Trp Gly Thr
 260 265 270

Val Val Gly Tyr Trp Pro Ala Ser Ile Tyr Asn Ser Ile Thr Asn Gly
 275 280 285

Ala Asp Thr Val Glu Trp Gly Gly Glu Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Thr
 290 295 300

Gly Gly Phe His Thr Thr Gln Met Gly Ser Gly His Phe Pro Thr
 305 310 315 320

Glu Gly Tyr Gly Lys Ala Ser Tyr Val Arg Asp Leu Gln Cys Val Asp
 325 330 335

Thr Tyr Gly Asn Val Ile Ser Pro Thr Ala Asn Ser Phe Gln Gly Ile
 340 345 350

Ala Pro Ala Pro Asn Cys Tyr Asn Tyr Gln Phe Gln Gln Gly Ser Ser
 355 360 365

Glu Leu Tyr Leu Phe Tyr Gly Gly Pro Gly Cys Gln
 370 375 380

<210> 2

<211> 1480

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

10 <220>

<221> base_modificada

ES 2 883 347 T3

<222> (1448)..(1449)

<223> a, c, t, g, desconocida u otra

5 <400> 2

acatggggac	ggcctaatta	gtaatctcaa	gtttgatgtt	taaaaggctt	caactatgca	60
agctaagttt	ttcacatttg	ttatactttc	ctctgtattt	tatttcaact	atcccttggc	120
tgaagcaaga	tcgattcaag	caagattagc	caataaacca	aagggtacta	tcaaaaccat	180
aaaggagat	gatggagagg	tggttgattg	tgttgatata	tataagcaac	cagctttga	240
ccacccactt	ttaaaaaatc	acactttaca	gatgcaaccc	agttcatacg	catccaaggt	300
cggtaatac	aataagctt	aacaaccatg	gcataaaaat	ggtgagtgcc	ctaaaggttc	360
aatcccaatt	agaaggcaag	ttatcactgg	tctccccgtc	tgaaaaaac	aatttcctaa	420
cttggaaattt	gccccaccaa	gtgcaaatac	aaaccaccag	tatgctgtca	ttgcataactt	480
ttacggcaat	gcatcattgc	aaggagcaa	tgcaaccatt	aacatatggg	agcccaattt	540
gaaaaaccct	aacggggact	tcagtttac	tcaaatttgg	atctctgtg	gcaagtggatc	600
cagcttgaat	accattgagg	caggatggca	agtgtatcca	ggaagaacag	gtgactcaca	660
gccaagattt	ttcatatatt	ggacagccga	tggttatact	tgcacgggtt	gctatgattt	720
aacatgccc	ggatttgtc	aaactaacaa	ctattatgcc	attggtatgg	cgttacaacc	780
ctctgtgtac	ggcggacaac	aatatgagtt	aaacgaatcc	atacaaaggg	accaggcgac	840
cgaaaaactgg	tggctctacc	tgtggggac	tgttgtcgga	tactggccgg	cgtcgatata	900
caactccata	actaacggtg	ccgataccgt	agaatgggga	ggagagattt	acgactcgtc	960
cggaaacctgt	ggattccaca	cgacaactca	gatgggaagc	ggtcatttc	cgacccaagg	1020
ttatggaaaa	gcaagctacg	tacgtgatct	tcaatgcgta	gatacctacg	ggaatgtcat	1080
atctccgacg	gcgaacagct	tccagggaat	agtcctgcg	ccgaattgtt	ataactatca	1140
gtttcagcaa	ggcagctctg	aactgtatct	cttttacggt	ggccctggat	gccagtgaat	1200
gaactataat	attgcaggcc	tctgataata	agagggggag	agagagagag	agggggggcag	1260
ctggctagcc	tataaataag	tcccacacact	gtagcttgc	gtttcttga	caataatgca	1320
gcggtcatga	aggatgttga	acgcactagg	gttttttctt	ccgttcaactt	ctgatttgaa	1380
tggatcgaga	agacagcatt	gaactgtatg	acctaaattt	ttttcttattt	attttgatata	1440
caatgggnna	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa			1480

10

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20 <400> 3

ES 2 883 347 T3

Gln Ala Lys Phe Phe Thr Phe Val Ile Leu Ser Ser Val Phe Tyr Phe
 1 5 10 15

Asn Tyr Pro Leu Ala Glu Ala
 20

<210> 4

<211> 1234

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

10 <400> 4

acgtcaagaa cagctctcaa tcaccgtcac gaagccaaag taacgggctt tcagataatg	60
cttgaacatg ttgattcggg caaaaaactta accaaattcc agctcttaga acgtgctatc	120
gaaaagggtta gtcgtagatt gcagaggctc gaagccatgt taaatggccc ctccggtgtg	180
gaaacttccg tctacgccgg agatggcgaa tatctgatga acttatcgat tggaaactccg	240
gcacaacctt tctccgcaat catggatacc ggtagcgatc ttatctggac gcagtgccag	300
ccttgcactc agtgttttaa tcaatcaacg cccatattta atcctcaagg atcatcctcc	360
ttctccaccc tcccttgctc aagccaactc tgtcaagccc tttcaagccc gacatgctct	420
aataatttct gccaatacac ctacgggtat ggggacgggt ccgaaaccca aggatccatg	480
ggcactgaga ctctcactt cgggtcggtt tccatcccta atatcacatt cggtcgcccc	540
gaaaacaacc aagggtttgg gcaaggaaac ggggcaggct tggttgggat gggtcgcccc	600
cctctgtcgc ttccctctca actcgtcgatc accaaattct cttactgcat gaccccccatt	660
ggtagctcaa cccctagcac tcttctatttgg ggatcactgg ctaattctgt caccggcggt	720
agtcctaata caaccctaata ccaaagctct caaaataccaa ctttctatta tattactctc	780
aacgggttga gtgttggttc aactcgttgc cccattgtatc cgagtgcgtt tgacttaat	840
agcaataatg gaacaggagg gataataata gactctggaa cgacacttac ttactcggtt	900
aacgcttatac aatctgttaag gcaagagttc atctcccaga ttaatctacc cgtcgtaaat	960
ggttccctcat ccggctttga tctgtgcattc cagacgcctt ctgatccgtc aaacctgcag	1020
ataccccacct ttgtgatgca ttttgcgggt ggagatttgg agttgcccag tgagaattat	1080
ttcatctccc caagcaacgg gctgatttgc ttggcgatgg ggagttcgatc gcagggatg	1140
tccattttttgg ggaatattca gcagaaaaac atgcttagtgc tttacgacac cggaaattcg	1200
15 gtggtttcat tcgcttctgc tcaatgtggt gcgt	1234

<210> 5

<211> 437

20 <212> PRT

<213> Nepenthes mirabilis

<400> 5

ES 2 883 347 T3

Met Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Phe Leu Leu Ala Leu Ser Ile Val Tyr
1 5 10 15

Ile Phe Val Ala Pro Thr His Ser Thr Ser Arg Thr Ala Leu Asn His
20 25 30

His His Glu Pro Lys Val Ala Gly Phe Gln Ile Met Leu Glu His Val
35 40 45

Asp Ser Gly Lys Asn Leu Thr Lys Phe Glu Leu Leu Glu Arg Ala Val
50 55 60

Glu Arg Gly Ser Arg Arg Leu Gln Arg Leu Glu Ala Met Leu Asn Gly
65 70 75 80

Pro Ser Gly Val Glu Thr Pro Val Tyr Ala Gly Asp Gly Glu Tyr Leu
85 90 95

Met Asn Leu Ser Ile Gly Thr Pro Ala Gln Pro Phe Ser Ala Ile Met
100 105 110

Asp Thr Gly Ser Asp Leu Ile Trp Thr Gln Cys Gln Pro Cys Thr Gln
115 120 125

Cys Phe Asn Gln Ser Thr Pro Ile Phe Asn Pro Gln Gly Ser Ser Ser
130 135 140

Phe Ser Thr Leu Pro Cys Ser Ser Gln Leu Cys Gln Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Pro Thr Cys Ser Asn Asn Ser Cys Gln Tyr Thr Tyr Gly Tyr Gly Asp
165 170 175

ES 2 883 347 T3

Gly Ser Glu Thr Gln Gly Ser Met Gly Thr Glu Thr Leu Thr Phe Gly
 180 185 190

Ser Val Ser Ile Pro Asn Ile Thr Phe Gly Cys Gly Glu Asn Asn Gln
 195 200 205

Gly Phe Gly Gln Gly Asn Gly Ala Gly Leu Val Gly Met Gly Arg Gly
 210 215 220

Pro Leu Ser Leu Pro Ser Gln Leu Asp Val Thr Lys Phe Ser Tyr Cys
 225 230 235 240

Met Thr Pro Ile Gly Ser Ser Thr Ser Ser Thr Leu Leu Leu Gly Ser
 245 250 255

Leu Ala Asn Ser Val Thr Ala Gly Ser Pro Asn Thr Thr Leu Ile Glu
 260 265 270

Ser Ser Gln Ile Pro Thr Phe Tyr Tyr Ile Thr Leu Asn Gly Leu Ser
 275 280 285

Val Gly Ser Thr Pro Leu Pro Ile Asp Pro Ser Val Phe Lys Leu Asn
 290 295 300

Ser Asn Asn Gly Thr Gly Gly Ile Ile Ile Asp Ser Gly Thr Thr Leu
 305 310 315 320

Thr Tyr Phe Ala Asp Asn Ala Tyr Gln Ala Val Arg Gln Ala Phe Ile
 325 330 335

Ser Gln Met Asn Leu Ser Val Val Asn Gly Ser Ser Ser Gly Phe Asp
 340 345 350

Leu Cys Phe Gln Met Pro Ser Asp Gln Ser Asn Leu Gln Ile Pro Thr
 355 360 365

Phe Val Met His Phe Asp Gly Gly Asp Leu Val Leu Pro Ser Glu Asn
 370 375 380

Tyr Phe Ile Ser Pro Ser Asn Gly Leu Ile Cys Leu Ala Met Gly Ser
 385 390 395 400

Ser Ser Gln Gly Met Ser Ile Phe Gly Asn Ile Gln Gln Gln Asn Leu
 405 410 415

Leu Val Val Tyr Asp Thr Gly Asn Ser Val Val Ser Phe Leu Phe Ala
 420 425 430

Gln Cys Gly Ala Ser
 435

5 <210> 6
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Nepenthes alata

10 <400> 6

ES 2 883 347 T3

Met Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Phe Leu Leu Ala Leu Ser Ile Val Tyr
1 5 10 15

Ile Phe Val Ala Pro Thr His Ser Thr Ser Arg Thr Ala Leu Asn His
20 25 30

His His Glu Pro Lys Val Ala Gly Phe Gln Ile Met Leu Glu His Val
35 40 45

Asp Ser Gly Lys Asn Leu Thr Lys Phe Glu Leu Leu Glu Arg Ala Val
50 55 60

Glu Arg Gly Ser Arg Arg Leu Gln Arg Leu Glu Ala Met Leu Asn Gly
65 70 75 80

Pro Ser Gly Val Glu Thr Pro Val Tyr Ala Gly Asp Gly Glu Tyr Leu
85 90 95

Met Asn Leu Ser Ile Gly Thr Pro Ala Gln Pro Phe Ser Ala Ile Met
100 105 110

Asp Thr Gly Ser Asp Leu Ile Trp Thr Gln Cys Gln Pro Cys Thr Gln
115 120 125

Cys Phe Asn Gln Ser Thr Pro Ile Phe Asn Pro Gln Gly Ser Ser Ser
130 135 140

Phe Ser Thr Leu Pro Cys Ser Ser Gln Leu Cys Gln Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Pro Thr Cys Ser Asn Asn Ser Cys Gln Tyr Thr Tyr Gly Tyr Gly Asp
165 170 175

Gly Ser Glu Thr Gln Gly Ser Met Gly Thr Glu Thr Leu Thr Phe Gly
180 185 190

Ser Val Ser Ile Pro Asn Ile Thr Phe Gly Cys Gly Glu Asn Asn Gln
195 200 205

ES 2 883 347 T3

Gly Phe Gly Gln Gly Asn Gly Ala Gly Leu Val Gly Met Gly Arg Gly
210 215 220

Pro Leu Ser Leu Pro Ser Gln Leu Asp Val Thr Lys Phe Ser Tyr Cys
225 230 235 240

Met Thr Pro Ile Gly Ser Ser Asn Ser Ser Thr Leu Leu Leu Gly Ser
245 250 255

Leu Ala Asn Ser Val Thr Ala Gly Ser Pro Asn Thr Thr Leu Ile Gln
260 265 270

Ser Ser Gln Ile Pro Thr Phe Tyr Tyr Ile Thr Leu Asn Gly Leu Ser
275 280 285

Val Gly Ser Thr Pro Leu Pro Ile Asp Pro Ser Val Phe Lys Leu Asn
290 295 300

Ser Asn Asn Gly Thr Gly Gly Ile Ile Ile Asp Ser Gly Thr Thr Leu
305 310 315 320

Thr Tyr Phe Val Asp Asn Ala Tyr Gln Ala Val Arg Gln Ala Phe Ile
325 330 335

Ser Gln Met Asn Leu Ser Val Val Asn Gly Ser Ser Ser Gly Phe Asp
340 345 350

Leu Cys Phe Gln Met Pro Ser Asp Gln Ser Asn Leu Gln Ile Pro Thr
355 360 365

Phe Val Met His Phe Asp Gly Gly Asp Leu Val Leu Pro Ser Glu Asn
370 375 380

Tyr Phe Ile Ser Pro Ser Asn Gly Leu Ile Cys Leu Ala Met Gly Ser
385 390 395 400

Ser Ser Gln Gly Met Ser Ile Phe Gly Asn Ile Gln Gln Gln Asn Leu
405 410 415

Leu Val Val Tyr Asp Thr Gly Asn Ser Val Val Ser Phe Leu Ser Ala
420 425 430

Gln Cys Gly Ala Ser
435

<210> 7

<211> 437

<212> PRT

<213> Nepenthes gracilis

<400> 7

ES 2 883 347 T3

Met Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Phe Leu Leu Ala Leu Ser Ile Val Tyr
1 5 10 15

Ile Phe Val Ala Pro Thr His Ser Thr Ser Arg Thr Ala Leu Asn His
20 25 30

Arg His Glu Ala Lys Val Thr Gly Phe Gln Ile Met Leu Glu His Val
35 40 45

Asp Ser Gly Lys Asn Leu Thr Lys Phe Gln Leu Leu Glu Arg Ala Ile
50 55 60

Glu Arg Gly Ser Arg Arg Leu Gln Arg Leu Glu Ala Met Leu Asn Gly
65 70 75 80

Pro Ser Gly Val Glu Thr Ser Val Tyr Ala Gly Asp Gly Glu Tyr Leu
85 90 95

Met Asn Leu Ser Ile Gly Thr Pro Ala Gln Pro Phe Ser Ala Ile Met
100 105 110

Asp Thr Gly Ser Asp Leu Ile Trp Thr Gln Cys Gln Pro Cys Thr Gln
115 120 125

Cys Phe Asn Gln Ser Thr Pro Ile Phe Asn Pro Gln Gly Ser Ser Ser
130 135 140

Phe Ser Thr Leu Pro Cys Ser Ser Gln Leu Cys Gln Ala Leu Ser Ser
145 150 155 160

Pro Thr Cys Ser Asn Asn Phe Cys Gln Tyr Thr Tyr Gly Tyr Gly Asp
165 170 175

Gly Ser Glu Thr Gln Gly Ser Met Gly Thr Glu Thr Leu Thr Phe Gly
180 185 190

Ser Val Ser Ile Pro Asn Ile Thr Phe Gly Cys Gly Glu Asn Asn Gln
195 200 205

Gly Phe Gly Gln Gly Asn Gly Ala Gly Leu Val Gly Met Gly Arg Gly
210 215 220

Pro Leu Ser Leu Pro Ser Gln Leu Asp Val Thr Lys Phe Ser Tyr Cys
225 230 235 240

ES 2 883 347 T3

Met Thr Pro Ile Gly Ser Ser Thr Pro Ser Asn Leu Leu Leu Gly Ser
245 250 255

Leu Ala Asn Ser Val Thr Ala Gly Ser Pro Asn Thr Thr Leu Ile Gln
260 265 270

Ser Ser Gln Ile Pro Thr Phe Tyr Tyr Ile Thr Leu Asn Gly Leu Ser
275 280 285

Val Gly Ser Thr Arg Leu Pro Ile Asp Pro Ser Ala Phe Ala Leu Asn
290 295 300

Ser Asn Asn Gly Thr Gly Gly Ile Ile Ile Asp Ser Gly Thr Thr Leu
305 310 315 320

Thr Tyr Phe Val Asn Asn Ala Tyr Gln Ser Val Arg Gln Glu Phe Ile
325 330 335

Ser Gln Ile Asn Leu Pro Val Val Asn Gly Ser Ser Ser Gly Phe Asp
340 345 350

Leu Cys Phe Gln Thr Pro Ser Asp Pro Ser Asn Leu Gln Ile Pro Thr
355 360 365

Phe Val Met His Phe Asp Gly Gly Asp Leu Glu Leu Pro Ser Glu Asn
370 375 380

Tyr Phe Ile Ser Pro Ser Asn Gly Leu Ile Cys Leu Ala Met Gly Ser
385 390 395 400

Ser Ser Gln Gly Met Ser Ile Phe Gly Asn Ile Gln Gln Gln Asn Met
405 410 415

Leu Val Val Tyr Asp Thr Gly Asn Ser Val Val Ser Phe Ala Ser Ala
420 425 430

Gln Cys Gly Ala Ser
435

<210> 8

<211> 437

5 <212> PRT

<213> Nepenthes mirabilis

<400> 8

Met Ala Ser Pro Leu His Ser Val Val Leu Gly Leu Ala Ile Val Ser
1 5 10 15

10

ES 2 883 347 T3

Ala Ile Val Ala Pro Thr Ser Ser Thr Ser Arg Gly Thr Leu Leu His
20 25 30

His Gly Gln Lys Arg Pro Gln Pro Gly Leu Arg Val Val Leu Glu Gln
35 40 45

Val Asp Ser Gly Met Asn Leu Thr Lys Tyr Glu Leu Ile Lys Arg Ala
50 55 60

Ile Lys Arg Gly Glu Arg Arg Met Arg Ser Ile Asn Ala Met Leu Gln
65 70 75 80

Ser Ser Ser Gly Ile Glu Thr Pro Val Tyr Ala Gly Ser Gly Glu Tyr
85 90 95

Leu Met Asn Val Ala Ile Gly Thr Pro Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ile
100 105 110

Met Asp Thr Gly Ser Asp Leu Ile Trp Thr Gln Cys Glu Pro Cys Thr
115 120 125

Gln Cys Phe Ser Gln Pro Thr Pro Ile Phe Asn Pro Gln Asp Ser Ser
130 135 140

Ser Phe Ser Thr Leu Pro Cys Glu Ser Gln Tyr Cys Gln Asp Leu Pro
145 150 155 160

Ser Glu Ser Cys Tyr Asn Asp Cys Gln Tyr Thr Tyr Gly Tyr Gly Asp
165 170 175

Gly Ser Ser Thr Gln Gly Tyr Met Ala Thr Glu Thr Phe Thr Phe Glu
180 185 190

Thr Ser Ser Val Pro Asn Ile Ala Phe Gly Cys Gly Glu Asp Asn Gln
195 200 205

Gly Phe Gly Gln Gly Asn Gly Ala Gly Leu Ile Gly Met Gly Trp Gly
210 215 220

Pro Leu Ser Leu Pro Ser Gln Leu Gly Val Gly Gln Phe Ser Tyr Cys
225 230 235 240

Met Thr Ser Ser Gly Ser Ser Ser Pro Ser Thr Leu Ala Leu Gly Ser
245 250 255

Ala Ala Ser Gly Val Pro Glu Gly Ser Pro Ser Thr Thr Leu Ile His
260 265 270

ES 2 883 347 T3

Ser Ser Leu Asn Pro Thr Tyr Tyr Tyr Ile Thr Leu Gln Gly Ile Thr
275 280 285

Val Gly Gly Asp Asn Leu Gly Ile Pro Ser Ser Thr Phe Gln Leu Gln
290 295 300

Asp Asp Gly Thr Gly Met Ile Ile Asp Ser Gly Thr Thr Leu Thr
305 310 315 320

Tyr Leu Pro Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Val Ala Gln Ala Phe Thr Asp
325 330 335

Gln Ile Asn Leu Ser Pro Val Asp Glu Ser Ser Ser Gly Leu Ser Thr
340 345 350

Cys Phe Gln Leu Pro Ser Asp Gly Ser Thr Val Gln Val Pro Glu Ile
355 360 365

Ser Met Gln Phe Asp Gly Gly Val Leu Asn Leu Gly Glu Glu Asn Val
370 375 380

Leu Ile Ser Pro Ala Glu Gly Val Ile Cys Leu Ala Met Gly Ser Ser
385 390 395 400

Ser Gln Gln Gly Ile Ser Ile Phe Gly Asn Ile Gln Gln Gln Glu Thr
405 410 415

Gln Val Leu Tyr Asp Leu Gln Asn Leu Ala Val Ser Phe Val Pro Thr
420 425 430

Gln Cys Gly Ala Ser
435

<210> 9

<211> 438

5 <212> PRT

<213> Nepenthes gracilis

<400> 9

Met Ala Ser Pro Leu Tyr Ser Val Val Leu Gly Leu Ala Ile Val Ser
1 5 10 15

Ala Ile Val Ala Pro Thr Ser Ser Thr Ser Arg Gly Thr Leu Leu His
20 25 30

His Gly Gln Lys Arg Pro Gln Pro Gly Leu Arg Val Asp Leu Glu Gln
35 40 45

10

ES 2 883 347 T3

Val Asp Ser Gly Lys Asn Leu Thr Lys Tyr Glu Leu Ile Lys Arg Ala
50 55 60

Ile Lys Arg Gly Glu Arg Arg Met Arg Ser Ile Asn Ala Met Leu Gln
65 70 75 80

Ser Ser Ser Gly Ile Glu Thr Pro Val Tyr Ala Gly Asp Gly Glu Tyr
85 90 95

Leu Met Asn Val Ala Ile Gly Thr Pro Asp Ser Ser Phe Ser Ala Ile
100 105 110

Met Asp Thr Gly Ser Asp Leu Ile Trp Thr Gln Cys Glu Pro Cys Thr
115 120 125

Gln Cys Phe Ser Gln Pro Thr Pro Ile Phe Asn Pro Gln Asp Ser Ser
130 135 140

Ser Phe Ser Thr Leu Pro Cys Glu Ser Gln Tyr Cys Gln Asp Leu Pro
145 150 155 160

Ser Glu Thr Cys Asn Asn Asn Glu Cys Gln Tyr Thr Tyr Gly Tyr Gly
165 170 175

Asp Gly Ser Thr Thr Gln Gly Tyr Met Ala Thr Glu Thr Phe Thr Phe
180 185 190

Glu Thr Ser Ser Val Pro Asn Ile Ala Phe Gly Cys Gly Glu Asp Asn
195 200 205

Gln Gly Phe Gly Gln Gly Asn Gly Ala Gly Leu Ile Gly Met Gly Trp
210 215 220

Gly Pro Leu Ser Leu Pro Ser Gln Leu Gly Val Gly Gln Phe Ser Tyr
225 230 235 240

Cys Met Thr Ser Tyr Gly Ser Ser Ser Pro Ser Thr Leu Ala Leu Gly
245 250 255

Ser Ala Ala Ser Gly Val Pro Glu Gly Ser Pro Ser Thr Thr Leu Ile
260 265 270

His Ser Ser Leu Asn Pro Thr Tyr Tyr Tyr Ile Thr Leu Gln Gly Ile
275 280 285

Thr Val Gly Gly Asp Asn Leu Gly Ile Pro Ser Ser Thr Phe Gln Leu
290 295 300

ES 2 883 347 T3

Gln Asp Asp Gly Thr Gly Gly Met Ile Ile Asp Ser Gly Thr Thr Leu
 305 310 315 320

Thr Tyr Leu Pro Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Val Ala Gln Ala Phe Thr
 325 330 335

Asp Gln Ile Asn Leu Pro Thr Val Asp Glu Ser Ser Ser Gly Leu Ser
 340 345 350

Thr Cys Phe Gln Gln Pro Ser Asp Gly Ser Thr Val Gln Val Pro Glu
 355 360 365

Ile Ser Met Gln Phe Asp Gly Gly Val Leu Asn Leu Gly Glu Gln Asn
 370 375 380

Ile Leu Ile Ser Pro Ala Glu Gly Val Ile Cys Leu Ala Met Gly Ser
 385 390 395 400

Ser Ser Gln Leu Gly Ile Ser Ile Phe Gly Asn Ile Gln Gln Glu
 405 410 415

Thr Gln Val Leu Tyr Asp Leu Gln Asn Leu Ala Val Ser Phe Val Pro
 420 425 430

Thr Gln Cys Gly Ala Ser
 435

<210> 10

<211> 472

5 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 10

Met Ala Phe His Ser Cys Thr Ile Ile Pro Ala Ser His His Ser Ser
 1 5 10 15

Met Ser Ser Ser Thr Ser Gln Met Ala Ser Leu Ala Val Leu Val Phe
 20 25 30

Leu Val Val Cys Ala Thr Leu Ala Ser Gly Ala Ala Ser Val Arg Val
 35 40 45

Gly Leu Thr Arg Ile His Ser Asp Pro Asp Thr Thr Ala Pro Gln Phe
 50 55 60

Val Arg Asp Ala Leu Arg Arg Asp Met His Arg Gln Arg Ser Arg Ser
 65 70 75 80

10

ES 2 883 347 T3

Phe Gly Arg Asp Arg Asp Arg Glu Leu Ala Glu Ser Asp Gly Arg Thr
85 90 95

Ser Thr Thr Val Ser Ala Arg Thr Arg Lys Asp Leu Pro Asn Gly Gly
100 105 110

Glu Tyr Leu Met Thr Leu Ala Ile Gly Thr Pro Pro Leu Pro Tyr Ala
115 120 125

Ala Val Ala Asp Thr Gly Ser Asp Leu Ile Trp Thr Gln Cys Ala Pro
130 135 140

Cys Gly Thr Gln Cys Phe Glu Gln Pro Ala Pro Leu Tyr Asn Pro Ala
145 150 155 160

Ser Ser Thr Thr Phe Ser Val Leu Pro Cys Asn Ser Ser Leu Ser Met
165 170 175

Cys Ala Gly Ala Leu Ala Gly Ala Ala Pro Pro Pro Gly Cys Ala Cys
180 185 190

Met Tyr Tyr Gln Thr Tyr Gly Thr Gly Trp Thr Ala Gly Val Gln Gly
195 200 205

Ser Glu Thr Phe Thr Phe Gly Ser Ser Ala Ala Asp Gln Ala Arg Val
210 215 220

Pro Gly Val Ala Phe Gly Cys Ser Asn Ala Ser Ser Ser Asp Trp Asn
225 230 235 240

Gly Ser Ala Gly Leu Val Gly Leu Gly Arg Gly Ser Leu Ser Leu Val
245 250 255

Ser Gln Leu Gly Ala Gly Arg Phe Ser Tyr Cys Leu Thr Pro Phe Gln
260 265 270

Asp Thr Asn Ser Thr Ser Thr Leu Leu Leu Gly Pro Ser Ala Ala Leu
275 280 285

Asn Gly Thr Gly Val Arg Ser Thr Pro Phe Val Ala Ser Pro Ala Arg
290 295 300

Ala Pro Met Ser Thr Tyr Tyr Tyr Leu Asn Leu Thr Gly Ile Ser Leu
305 310 315 320

Gly Ala Lys Ala Leu Pro Ile Ser Pro Gly Ala Phe Ser Leu Lys Pro
325 330 335

ES 2 883 347 T3

Asp Gly Thr Gly Gly Leu Ile Ile Asp Ser Gly Thr Thr Ile Thr Ser
340 345 350

Leu Ala Asn Ala Ala Tyr Gln Gln Val Arg Ala Ala Val Lys Ser Gln
355 360 365

Leu Val Thr Thr Leu Pro Thr Val Asp Gly Ser Asp Ser Thr Gly Leu
370 375 380

Asp Leu Cys Phe Ala Leu Pro Ala Pro Thr Ser Ala Pro Pro Ala Val
385 390 395 400

Leu Pro Ser Met Thr Leu His Phe Asp Gly Ala Asp Met Val Leu Pro
405 410 415

Ala Asp Ser Tyr Met Ile Ser Gly Ser Gly Val Trp Cys Leu Ala Met
420 425 430

Arg Asn Gln Thr Asp Gly Ala Met Ser Thr Phe Gly Asn Tyr Gln Gln
435 440 445

Gln Asn Met His Ile Leu Tyr Asp Val Arg Glu Glu Thr Leu Ser Phe
450 455 460

Ala Pro Ala Lys Cys Ser Thr Leu
465 470

<210> 11

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 11

Met Arg Gly Val Ser Val Val Leu Val Leu Ile Ala Cys Trp Leu Cys
1 5 10 15

Gly Cys Pro Val Ala Gly Glu Ala Ala Phe Ala Gly Asp Ile Arg Val
20 25 30

Asp Leu Thr His Val Asp Ala Gly Lys Glu Leu Pro Lys Arg Glu Leu
35 40 45

Ile Arg Arg Ala Met Gln Arg Ser Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ser
50 55 60

Val Val Arg Asn Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Ile Ala Gln Ala Arg
65 70 75 80

10

ES 2 883 347 T3

Glu Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Ala Val Arg Ala Ser Gly Asp Leu
85 90 95

Glu Tyr Val Leu Asp Leu Ala Val Gly Thr Pro Pro Gln Pro Ile Thr
100 105 110

Ala Leu Leu Asp Thr Gly Ser Asp Leu Ile Trp Thr Gln Cys Asp Thr
115 120 125

Cys Thr Ala Cys Leu Arg Gln Pro Asp Pro Leu Phe Ser Pro Arg Met
130 135 140

Ser Ser Ser Tyr Glu Pro Met Arg Cys Ala Gly Gln Leu Cys Gly Asp
145 150 155 160

Ile Leu His His Ser Cys Val Arg Pro Asp Thr Cys Thr Tyr Arg Tyr
165 170 175

Ser Tyr Gly Asp Gly Thr Thr Leu Gly Tyr Tyr Ala Thr Glu Arg
180 185 190

Phe Thr Phe Ala Ser Ser Gly Glu Thr Gln Ser Val Pro Leu Gly
195 200 205

Phe Gly Cys Gly Thr Met Asn Val Gly Ser Leu Asn Asn Ala Ser Gly
210 215 220

Ile Val Gly Phe Gly Arg Asp Pro Leu Ser Leu Val Ser Gln Leu Ser
225 230 235 240

Ile Arg Arg Phe Ser Tyr Cys Leu Thr Pro Tyr Ala Ser Ser Arg Lys
245 250 255

Ser Thr Leu Gln Phe Gly Ser Leu Ala Asp Val Gly Leu Tyr Asp Asp
260 265 270

Ala Thr Gly Pro Val Gln Thr Thr Pro Ile Leu Gln Ser Ala Gln Asn
275 280 285

Pro Thr Phe Tyr Tyr Val Ala Phe Thr Gly Val Thr Val Gly Ala Arg
290 295 300

Arg Leu Arg Ile Pro Ala Ser Ala Phe Ala Leu Arg Pro Asp Gly Ser
305 310 315 320

Gly Gly Val Ile Ile Asp Ser Gly Thr Ala Leu Thr Leu Phe Pro Val
325 330 335

ES 2 883 347 T3

Ala Val Leu Ala Glu Val Val Arg Ala Phe Arg Ser Gln Leu Arg Leu
340 345 350

Pro Phe Ala Asn Gly Ser Ser Pro Asp Asp Gly Val Cys Phe Ala Ala
355 360 365

Pro Ala Val Ala Ala Gly Gly Arg Met Ala Arg Gln Val Ala Val
370 375 380

Pro Arg Met Val Phe His Phe Gln Gly Ala Asp Leu Asp Leu Pro Arg
385 390 395 400

Glu Asn Tyr Val Leu Glu Asp His Arg Arg Gly His Leu Cys Val Leu
405 410 415

Leu Gly Asp Ser Gly Asp Asp Gly Ala Thr Ile Gly Asn Phe Val Gln
420 425 430

Gln Asp Met Arg Val Val Tyr Asp Leu Glu Arg Glu Thr Leu Ser Phe
435 440 445

Ala Pro Val Glu Cys
450

<210> 12

<211> 486

5

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 12

Met Ala Asp Arg Ile Thr Val Leu Ala Ile Ala Leu Leu Val Leu Ile
1 5 10 15

Leu Ser Pro Gln Met Ala Val Gln Gly Lys Pro Ala Ala Gly Asn Thr
20 25 30

Ala Ser Pro Arg Pro Lys Gln Gln Leu Gly Asn Phe Phe Lys Lys
35 40 45

His Gly Ser Asp Ile Ala Gly Leu Phe Pro Arg His Arg Asn Gly Gly
50 55 60

Ser Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Gln Ala Val Pro Ala Asp Gly Gly Glu
65 70 75 80

Asn Gly Gly Gly Gln Ser Gln Asp Pro Ala Thr Asn Thr Gly Met
85 90 95

10

ES 2 883 347 T3

Tyr Val Leu Ser Phe Ser Val Gly Thr Pro Pro Gln Val Val Thr Gly
100 105 110

Val Leu Asp Ile Thr Ser Asp Phe Val Trp Met Gln Cys Ser Ala Cys
115 120 125

Ala Thr Cys Gly Ala Asp Ala Pro Ala Ala Thr Ser Ala Pro Pro Phe
130 135 140

Tyr Ala Phe Leu Ser Ser Thr Ile Arg Glu Val Arg Cys Ala Asn Arg
145 150 155 160

Gly Cys Gln Arg Leu Val Pro Gln Thr Cys Ser Ala Asp Asp Ser Pro
165 170 175

Cys Gly Tyr Ser Tyr Val Tyr Gly Gly Ala Ala Asn Thr Thr Ala
180 185 190

Gly Leu Leu Ala Val Asp Ala Phe Ala Phe Ala Thr Val Arg Ala Asp
195 200 205

Gly Val Ile Phe Gly Cys Ala Val Ala Thr Glu Gly Asp Ile Gly Gly
210 215 220

Val Ile Gly Leu Gly Arg Gly Glu Leu Ser Pro Val Ser Gln Leu Gln
225 230 235 240

Ile Gly Arg Phe Ser Tyr Tyr Leu Ala Pro Asp Asp Ala Val Asp Val
245 250 255

Gly Ser Phe Ile Leu Phe Leu Asp Asp Ala Lys Pro Arg Thr Ser Arg
260 265 270

Ala Val Ser Thr Pro Leu Val Ala Ser Arg Ala Ser Arg Ser Leu Tyr
275 280 285

Tyr Val Glu Leu Ala Gly Ile Arg Val Asp Gly Glu Asp Leu Ala Ile
290 295 300

Pro Arg Gly Thr Phe Asp Leu Gln Ala Asp Gly Ser Gly Gly Val Val
305 310 315 320

Leu Ser Ile Thr Ile Pro Val Thr Phe Leu Asp Ala Gly Ala Tyr Lys
325 330 335

Val Val Arg Gln Ala Met Ala Ser Lys Ile Glu Leu Arg Ala Ala Asp
340 345 350

ES 2 883 347 T3

Gly Ser Glu Leu Gly Leu Asp Leu Cys Tyr Thr Ser Glu Ser Leu Ala
355 360 365

Thr Ala Lys Val Pro Ser Met Ala Leu Val Phe Ala Gly Gly Ala Val
370 375 380

Met	Glu	Leu	Glu	Met	Gly	Asn	Tyr	Phe	Tyr	Met	Asp	Ser	Thr	Thr	Gly
385					390					395					400

Leu Glu Cys Leu Thr Ile Leu Pro Ser Pro Ala Gly Asp Gly Ser Leu
405 410 415

Leu Gly Ser Leu Ile Gln Val Gly Thr His Met Ile Tyr Asp Ile Ser
420 425 430

Gly Ser Arg Leu Val Phe Glu Ser Leu Glu Gln Ala Pro Pro Pro Pro
435 440 445

Ser Gly Ser Ser Arg Gln Ser Ser Arg Arg Arg Ser Ser Ser Ala Pro
450 455 460

Pro	Pro	Leu	Thr	Ser	Pro	Ala	Val	Val	Val	Ile	His	Leu	Met	Leu	Val
465					470					475					480

Val Val Tyr Met Phe Leu
485

<210> 13

<211> 471

5 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 13

Met	Ala	Met	Met	Ala	Cys	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Arg	Lys	Leu	Ser	Leu
1				5					10					15	

Pro Cys Arg Thr Arg Thr Phe Gln Ala Leu Ile Leu Ser Thr Ala Val
20 25 30

Phe Leu Ala Ala Ser Thr Ala Val Val Val Gly Lys Glu Pro Gln Pro
35 40 45

Pro Ser Ser Ser Gly Gly Cys His Tyr Arg Phe Glu Leu Thr His
 50 55 60

Val Asp Ala Asn Leu Asn Leu Thr Ser Asp Glu Leu Met Arg Arg Ala
65 70 75 80

ES 2 883 347 T3

Tyr Asp Arg Ser Arg Leu Arg Ala Ala Ser Leu Ala Ala Tyr Ser Asp
85 90 95

Gly Arg His Glu Gly Arg Val Ser Ile Pro Asp Ala Ser Tyr Ile Ile
100 105 110

Thr Phe Tyr Leu Gly Asn Gln Arg Pro Glu Asp Asn Ile Ser Ala Val
115 120 125

Val Asp Thr Gly Ser Asp Ile Phe Trp Thr Thr Glu Lys Glu Cys Ser
130 135 140

Arg Ser Lys Thr Arg Ser Met Leu Pro Cys Cys Ser Pro Lys Cys Glu
145 150 155 160

Gln Arg Ala Ser Cys Gly Cys Gly Arg Ser Glu Leu Lys Ala Glu Ala
165 170 175

Glu Lys Glu Thr Lys Cys Thr Tyr Ala Ile Ile Tyr Gly Gly Asn Ala
180 185 190

Asn Asp Ser Thr Ala Gly Val Met Tyr Glu Asp Lys Leu Thr Ile Val
195 200 205

Ala Val Ala Ser Lys Ala Val Pro Ser Ser Gln Ser Phe Lys Glu Val
210 215 220

Ala Ile Gly Cys Ser Thr Ser Ala Thr Leu Lys Phe Lys Asp Pro Ser
225 230 235 240

Ile Lys Gly Val Phe Gly Leu Gly Arg Ser Ala Thr Ser Leu Pro Arg
245 250 255

Gln Leu Asn Phe Ser Lys Phe Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Tyr Gln Glu
260 265 270

Pro Asp Leu Pro Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Ala Pro Asp Met Ala
275 280 285

Thr Gly Ala Val Gly Gly Ala Ala Val Ala Thr Thr Ala Leu Gln
290 295 300

Pro Asn Ser Asp Tyr Lys Thr Leu Tyr Phe Val His Leu Gln Asn Ile
305 310 315 320

Ser Ile Gly Gly Thr Arg Phe Pro Ala Val Ser Thr Lys Ser Gly Gly
325 330 335

ES 2 883 347 T3

Val Phe Ala Lys Leu Val Thr Glu Leu Asp Arg Ile Met Lys Glu Arg
355 360 365

Lys Tyr Val Lys Glu Gln Pro Gly Arg Asn Asn Gly Gln Ile Cys Tyr
370 375 380

Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Asp Glu Ser Ser Lys Leu Pro Asp Met
385 390 395 400

Val Leu His Phe Ala Asp Ser Ala Asn Met Val Leu Pro Trp Asp Ser
405 410 415

Tyr Leu Trp Lys Thr Thr Ser Lys Leu Cys Leu Ala Ile Tyr Lys Ser
 420 425 430

Asn Ile Lys Gly Gly Ile Ser Val Leu Gly Asn Phe Gln Met Gln Asn
435 440 445

Thr His Met Leu Leu Asp Thr Gly Asn Glu Lys Leu Ser Phe Val Arg
450 455 460

Ala Asp Cys Ser Lys Val Ile
465 470

<210> 14

<211> 1317

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<220>

10 <223> De

<100> 14

<400>

atggccctac cactatactc tgtggtaactt ggcttagcaa tagtttctgc cattgttgca 60
ccaacaagct ccacctcaag aggaaccctt cttcatcatg gtcagaaaag gccacaaccc 120
ggccttcgtg ttgatctcg a gcaggtcgat tcgggcaaga atttgaccaa atacgagctc 180
atcaaacgtg ctatcaagcg tggggagagg aggatgcgaa gcattaatgc tatgttgcaag 240
agctcctccg gtattgaaac tcctgtttat gcgggagacg gtgaatatct aatgaacgtaa 300
gcaattggta ctccggatag ttctttctcg gccattatgg ataccggcag tgatctcatt 360
tggacgcatac gcgagccatg tacgcagtgc ttcaagtcaac ctacgccccat tttcaacccca 420
caggacttgtt cttccatttc tacccttccct tgcgagagcc agtattgcca agatctcccg 480

ES 2 883 347 T3

```

agcgtttccaca      540
acccaagggtt      600
atatggcaac      660
cgagaccttc      720
actttcgaga      780
cgatcccgtt      840
atcgcttcct      900
tctcaactcg      960
gcgtgggtca      1020
ttcatcgagt      1080
tattatatta      1140
cgctccaagg      1200
tataacggtt      1260
ggatggcgata      1317
atttgggtat      tccatcgagt
actttcaac      ttcaagacga      tggaactggc      gggatgataa      ttgactccgg      gacaacgctc
acttatctc      cacaagacgc      ttacaatgca      gtagcacaag      cgttcaactga      ccagataaat
ctccccaccg      tcgatgaatc      ctcgagcggc      ctcagtaacgt      gttccagca      accgtccgac
ggatcaaccg      tgcaagttcc      ggagatttca      atgcagttt      atggtgggtt      gctgaactta
gggaaacaga      atatattgat      ctctccagct      gaaggggtga      tatgcttggc      gatggaaagt
tcatcgcagc      tggaaatttc      cattttggg      aatatccagc      agcaagaaac      gcaggtgctc
tatgaccctc      agaatttggc      cgtgtcggtc      gttcctactc      agtgtggtgc      gtctgt

```

5 <210> 15

<211> 33

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10 <400> 15

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

Gln	Leu	Pro	Tyr	Pro	Gln	Pro	Gln	Leu	Pro	Tyr	Pro	Gln	Pro
				20				25				30	

Phe

15 <210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 16

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

Gln Pro Phe

25 <210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 17

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

5 Gln Gln Gln Gln
20

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 18

Gly Tyr Tyr Pro Thr Ser Pro Gln Gln
1 5

<210> 19

20 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 19

Pro Gly Gln Gly Gln Gln
1 5

30 <210> 20

<211> 359

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 20

40 Gln Ser Ser Ser Gly Ile Glu Thr Pro Val Tyr Ala Gly Asp Gly Glu

ES 2 883 347 T3

1	5	10	15												
Tyr	Leu	Met	Asn	Val	Ala	Ile	Gly	Thr	Pro	Asp	Ser	Ser	Phe	Ser	Ala
				20				25							30
Ile	Met	Asp	Thr	Gly	Ser	Asp	Leu	Ile	Trp	Thr	Gln	Cys	Glu	Pro	Cys
				35				40							45
Thr	Gln	Cys	Phe	Ser	Gln	Pro	Thr	Pro	Ile	Phe	Asn	Pro	Gln	Asp	Ser
				50				55							60
Ser	Ser	Phe	Ser	Thr	Leu	Pro	Cys	Glu	Ser	Gln	Tyr	Cys	Gln	Asp	Leu
				65			70			75					80
Pro	Ser	Glu	Thr	Cys	Asn	Asn	Glu	Cys	Gln	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Tyr	
				85				90							95
Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Thr	Gln	Gly	Tyr	Met	Ala	Thr	Glu	Thr	Phe	Thr
				100			105								110
Phe	Glu	Thr	Ser	Ser	Val	Pro	Asn	Ile	Ala	Phe	Gly	Cys	Gly	Glu	Asp
				115			120								125
Asn	Gln	Gly	Phe	Gly	Gln	Gly	Asn	Gly	Ala	Gly	Leu	Ile	Gly	Met	Gly
				130			135								140
Trp	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Gln	Leu	Gly	Val	Gly	Gln	Phe	Ser
				145			150			155					160
Tyr	Cys	Met	Thr	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ala	Leu	
				165				170							175
Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Glu	Gly	Ser	Pro	Ser	Thr	Thr	Leu
				180			185								190
Ile	His	Ser	Ser	Leu	Asn	Pro	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Leu	Gln	Gly
				195			200								205
Ile	Thr	Val	Gly	Gly	Asp	Asn	Leu	Gly	Ile	Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Gln
				210			215			220					
Leu	Gln	Asp	Asp	Gly	Thr	Gly	Gly	Met	Ile	Ile	Asp	Ser	Gly	Thr	Thr
				225			230			235					240
Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Tyr	Asn	Ala	Val	Ala	Gln	Ala	Phe
				245			250			255					

ES 2 883 347 T3

Thr Asp Gln Ile Asn Leu Pro Thr Val Asp Glu Ser Ser Ser Gly Leu
260 265 270

Ser Thr Cys Phe Gln Gln Pro Ser Asp Gly Ser Thr Val Gln Val Pro
275 280 285

Glu Ile Ser Met Gln Phe Asp Gly Gly Val Leu Asn Leu Gly Glu Gln
290 295 300

Asn Ile Leu Ile Ser Pro Ala Glu Gly Val Ile Cys Leu Ala Met Gly
305 310 315 320

Ser Ser Ser Gln Leu Gly Ile Ser Ile Phe Gly Asn Ile Gln Gln Gln
325 330 335

Glu Thr Gln Val Leu Tyr Asp Leu Gln Asn Leu Ala Val Ser Phe Val
340 345 350

Pro Thr Gln Cys Gly Ala Ser
355

<210> 21

<211> 359

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10

<400> 21

Asn Gly Pro Ser Gly Val Glu Thr Ser Val Tyr Ala Gly Asp Gly Glu
1 5 10 15

Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Gly Thr Pro Ala Gln Pro Phe Ser Ala
20 25 30

Ile Met Asp Thr Gly Ser Asp Leu Ile Trp Thr Gln Cys Gln Pro Cys
35 40 45

Thr Gln Cys Phe Asn Gln Ser Thr Pro Ile Phe Asn Pro Gln Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Phe Ser Thr Leu Pro Cys Ser Ser Gln Leu Cys Gln Ala Leu
65 70 75 80

Ser Ser Pro Thr Cys Ser Asn Asn Phe Cys Gln Tyr Thr Tyr Gly Tyr
85 90 95

Gly Asp Gly Ser Glu Thr Gln Gly Ser Met Gly Thr Glu Thr Leu Thr

ES 2 883 347 T3

	100		105		110
	Phe Gly Ser Val Ser Ile Pro Asn Ile Thr Phe Gly Cys Gly Glu Asn				
	115		120		125
	Asn Gln Gly Phe Gly Gln Gly Asn Gly Ala Gly Leu Val Gly Met Gly				
	130		135		140
	Arg Gly Pro Leu Ser Leu Pro Ser Gln Leu Asp Val Thr Lys Phe Ser				
	145		150		155
	Tyr Cys Met Thr Pro Ile Gly Ser Ser Thr Pro Ser Asn Leu Leu Leu				
	165		170		175
	Gly Ser Leu Ala Asn Ser Val Thr Ala Gly Ser Pro Asn Thr Thr Leu				
	180		185		190
	Ile Gln Ser Ser Gln Ile Pro Thr Phe Tyr Tyr Ile Thr Leu Asn Gly				
	195		200		205
	Leu Ser Val Gly Ser Thr Arg Leu Pro Ile Asp Pro Ser Ala Phe Ala				
	210		215		220
	Leu Asn Ser Asn Asn Gly Thr Gly Gly Ile Ile Ile Asp Ser Gly Thr				
	225		230		235
	Thr Leu Thr Tyr Phe Val Asn Asn Ala Tyr Gln Ser Val Arg Gln Glu				
	245		250		255
	Phe Ile Ser Gln Ile Asn Leu Pro Val Val Asn Gly Ser Ser Ser Gly				
	260		265		270
	Phe Asp Leu Cys Phe Gln Thr Pro Ser Asp Pro Ser Asn Leu Gln Ile				
	275		280		285
	Pro Thr Phe Val Met His Phe Asp Gly Gly Asp Leu Glu Leu Pro Ser				
	290		295		300
	Glu Asn Tyr Phe Ile Ser Pro Ser Asn Gly Leu Ile Cys Leu Ala Met				
	305		310		315
	Gly Ser Ser Ser Gln Gly Met Ser Ile Phe Gly Asn Ile Gln Gln Gln				
	325		330		335
	Asn Met Leu Val Val Tyr Asp Thr Gly Asn Ser Val Val Ser Phe Ala				
	340		345		350
	Ser Ala Gln Cys Gly Ala Ser				
	355				

5 <210> 22
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 883 347 T3

<400> 22

Met Lys Thr Phe Leu Ile Leu Ala Leu Leu Ala Ile Val Ala Thr Thr
1 5 10 15

Ala Thr Thr Ala Val Arg Val Pro Val Pro Gln Leu Gln Pro Gln Asn
20 25 30

Pro Ser Gln Gln Gln Pro Gln Glu Gln Val Pro Leu Val Gln Gln Gln
35 40 45

Gln Phe Pro Gly Gln Gln Gln Phe Pro Pro Gln Gln Pro Tyr Pro
50 55 60

Gln Pro Gln Pro Phe Pro Ser Gln Gln Pro Tyr Leu Gln Leu Gln Pro
65 70 75 80

Phe Pro Gln Pro Gln Pro Phe Pro Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
85 90 95

Gln Ser Phe Pro Pro Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Gln Gln Pro Gln Tyr
100 105 110

Leu Gln Pro Gln Gln Pro Ile Ser Gln Gln Gln Ala Gln Gln Gln Gln
115 120 125

Gln Ile Leu Gln Gln Ile
130 135 140

Leu Gln Gln Gln Leu Ile Pro Cys Arg Asp Val Val Leu Gln Gln His
145 150 155 160

Asn Ile Ala His Ala Ser Ser Gln Val Leu Gln Gln Ser Thr Tyr Gln
165 170 175

Leu Leu Gln Gln Leu Cys Cys Gln Gln Leu Leu Gln Ile Pro Glu Gln
180 185 190

Ser Gln Cys Gln Ala Ile His Asn Val Ala His Ala Ile Ile Met His

5 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 15 <400> 26
 Ala Val Arg Val Pro Val Pro Gln Leu
 1 5
 20 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 27
 Ala Val Arg Val Pro Val Pro Gln Leu Gln
 1 5 10
 30 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 28
 40 Ala Val Arg Val Pro Val Pro Gln Leu Gln Pro Gln
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 29
 50 Ala Val Arg Val Pro Val Pro Gln Leu Gln Pro Gln
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 60 <400> 30
 Ala Val Arg Val Pro Val Pro Gln Leu Gln Pro Gln
 1 5 10

5 <210> 31
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 31

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn
1												
					5							
										10		

15 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 32

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser
1														
						5							10	
														15

25 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 33

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser
1														
						5							10	
														15

35 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 34

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser
1														
						5							10	
														15

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 34

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser
1														
						5							10	
														15

50 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 35

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser
1														
						5							10	
														15

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 36

10

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser
1					5				10				15	

<210> 37

<211> 15

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20

<400> 37

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser
1					5				10				15	

25

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 38

35

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1					5				10				15	
---	--	--	--	--	---	--	--	--	----	--	--	--	----	--

Gln	Gln	Pro	Gln
		20	

40

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 39

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln
1					5				10				15		

Gln	Gln	Pro	Gln
		20	

50

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 40

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln
1					5				10					15	

5 Gln Gln Pro Gln
 20

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 41

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln
1					5				10					15	

 Gln Gln Pro Gln
 20

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 42

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln
1					5				10					15	

 Gln Gln Pro Gln
 20

30 <210> 43

<211> 20

<212> PRT

 <213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 43

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln
1					5				10					15	

 Gln Gln Pro Gln
 20

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 44

Ala	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln
1					5				10				15		

5 Gln Gln Pro Gln
 20

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 45

Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser
				1			5	

20 20

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 46

Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln
1				5					10				

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 47

Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln
1				5					10		

45 <210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 48

Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln
1				5					10		

55 <210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 49

Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln
1						5					10

10

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 50

20

Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln
1						5					10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 51

Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln
1					5				10

35

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 52

Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln
1					5				10

45

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 53

55

Pro	Gln	Glu	Gln	Val	Pro	Leu
1					5	

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

60

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 54

Pro Gln Glu Gln Val Pro Leu

1 5

10 <210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20 <400> 55

Pro Gln Glu Gln Val Pro Leu
1 5

25 <210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 56

Pro Gln Glu Gln Val Pro Leu
1 5

40 <210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 57

Pro Gln Glu Gln Val Pro Leu Val
1 5

55 <210> 58

<211> 9

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 58

Gln Val Pro Leu Val Gln Gln Gln Gln
1 5

60 <210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 59

Pro Leu Val Gln Gln Gln Gln Phe Pro
 1 5

10 <210> 60
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 60

Pro Leu Val Gln Gln Gln Gln Phe Pro Gly
 1 5 10

20 <210> 61
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 61

30 Pro Leu Val Gln Gln Gln Gln Phe Pro Gly
 1 5 10

<210> 62
 <211> 10

35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 62

Pro Leu Val Gln Gln Gln Gln Phe Pro Gly
 1 5 10

45 <210> 63
 <211> 18

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 63

55 Pro Leu Val Gln Gln Gln Gln Phe Pro Gly Gln Gln Gln Phe Pro
 1 5 10 15

Pro Gln

60 <210> 64
 <211> 18

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 64

Pro	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Gly	Phe	Pro	Gly	Gln	Gln	Gln	Gln	Phe	Pro	
1																15

10 Pro Gln

<210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 65

20 Val Gln Gln Gln Gln Phe Pro Gly
 1 5

<210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 66

Val	Gln	Gln	Gln	Gln	Phe	Pro	Gly	
1								5

30 <210> 67
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 67

Val	Gln	Gln	Gln	Gln	Phe	Pro	Gly	
1								5

40 <210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 68

Gln	Gln	Gln	Gln	Phe	Pro	Gly	
1							5

<210> 69

5 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 69
 15 Gln Gln Gln Gln Phe Pro Gly
 1 5
 <210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 70
 25 Gln Gln Gln Gln Phe Pro Gly
 1 5
 <210> 71
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 71
 35 Gln Gln Phe Pro Gly Gln Gln Gln Gln Phe Pro Pro Gln
 1 5 10
 <210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 72
 45 Gln Gln Gln Gln Phe Pro Pro Gln Gln
 1 5
 <210> 73
 <211> 10
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 55 <400> 7
 60 Gln Gln Gln Phe Pro Pro Gln Gln Pro Tyr
 1 5 10
 <210> 74
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 74

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

10 <210> 75
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 75

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

20 <210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 76

Pro	Gln	Gln	Pro	Tyr	Pro	Gln
1					5	

30 <210> 77
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 77

Pro	Gln	Gln	Pro	Tyr	Pro	Gln
1					5	

40 <210> 78
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 78

Pro	Gln	Gln	Pro	Tyr	Pro	Gln	Pro
1					5		

55 <210> 79
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 79

Pro	Gln	Gln	Pro	Tyr	Pro	Gln	Pro	Gln
1								
					5			

10

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 80

Pro	Gln	Gln	Pro	Tyr	Pro	Gln	Pro	Gln
1								
					5			

20

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 81

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

35

<210> 82

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 82

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

45

<210> 83

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 83

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

55

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 84

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

Tyr

10 <210> 85
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 85

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

20 <210> 86
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 86

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

30 <210> 87
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 87

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

40 <210> 88
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 88

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

<210> 89
 <211> 15

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 89

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

10 <210> 90
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 90

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

20 <210> 91
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 91

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

30 <210> 92
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 92

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

40 <210> 93
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 93

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

50 <210> 94
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 94

Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Gln
1								
					5			

10

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 95

Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Gln
1								
					5			

20

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 96

Leu	Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Gln
1							
					5		

35

<210> 97

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 97

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

45

<210> 98

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 98

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

55

<210> 99

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 99

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

10 <210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
<400> 100

Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln
1 5

20 <210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
<400> 101

30 Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln
1 5

35 <210> 102
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
<400> 102

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

45 <210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
<400> 103

Pro Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Gln Gln
1 5

55 <210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 104

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

10 <210> 105

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 105

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

20 <210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 106

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

30 <210> 107

<211> 10

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 107

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

45 <210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 108

Pro	Gln	Tyr	Leu	Gln	Pro	Gln
1					5	

55 <210> 109

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 109

Pro	Gln	Gln	Pro	Ile	Ser	Gln	Gln	Gln	Ala
1									

5

5

10

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 110

Pro	Gln	Gln	Pro	Ile	Ser	Gln	Gln	Gln	Ala
1									

5

10

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 111

Pro	Gln	Gln	Pro	Ile	Ser	Gln	Gln	Gln	Ala	Gln
1										

30

5

10

<210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 112

Pro	Gln	Gln	Pro	Ile	Ser	Gln	Gln	Gln	Ala	Gln
1										

5

10

<210> 113

<211> 14

45

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50

<400> 113

Pro	Gln	Gln	Pro	Ile	Ser	Gln	Gln	Gln	Ala	Gln	Gln	Gln
1												

5

10

55

<210> 114

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

<400> 114

Pro Gln Gln Pro Ile Ser Gln Gln Gln Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln
1 5 10 15

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
20 25

<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 115

Gln Gln Gln Ile Leu Gln Gln Ile Leu Gln Gln
1 5 10

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 116

Gln Gln Ile Leu Gln Gln Ile Leu Gln
1 5

<210> 117
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 117

Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln Gln Gln Gln
1 5 10

<210> 118
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 118

Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Ser
1 5 10

<210> 119
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 119

Leu	Gln	Pro	Ser	Ser							
1					5					10	

10 <210> 120

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 120

Gln	Pro	Ser								
1					5				10	

20 <210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

400> 121

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

30 <210> 122

<211> 10

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 122

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

45 <210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 123

Ser	Phe	Gln	Gln	Pro	Gln	Gln	Tyr
1				5			

55 <210> 124

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 124

Pro	Gln	Gln	Gln	Tyr	Pro	Ser	Ser	Gln	Val
1					5				10

5

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 125

Pro	Gln	Gln	Gln	Tyr	Pro	Ser	Ser	Gln	Val
1					5				10

20 <210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 126

Pro	Gln	Gln	Gln	Tyr	Pro	Ser	Ser	Gln	Val
1					5				10

30

<210> 127

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 127

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

45

<210> 128

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 128

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

55

<210> 129

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

<400> 129

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

Leu Asn Pro Gln
20

<210> 130
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 130

Gln Val Ser Phe Gln Pro Ser Gln Leu Asn Pro Gln
1 5 10

<210> 131
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 131

Phe Gln Pro Ser Gln Leu Asn Pro Gln Ala Gln Gly Ser Val Gln Pro
1 5 10 15

Gln

<210> 132
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 132

Pro Ser Gln Leu Asn Pro Gln Ala Gln Gly Ser Val Gln Pro Gln
1 5 10 15

<210> 133
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 133

Ser Gln Leu Asn Pro Gln Ala Gln Gly Ser Val Gln Pro Gln
1 5 10

<210> 134
<211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 134

Leu	Asn	Pro	Gln	Ala	Gln	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Gln
1					5						10

10

<210> 135
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 135

20

Asn	Pro	Gln	Ala	Gln	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Gln
1					5					10

<210> 136
 <211> 10

25

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 136

Pro	Gln	Ala	Gln	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Gln
1					5				10

35

<210> 137
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 137

Pro	Gln	Ala	Gln	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Gln
1					5				10

45

<210> 138
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55

<400> 138

Pro	Gln	Ala	Gln	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Gln
1					5				10

60

<210> 139
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 139

Pro	Gln	Ala	Gln	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Gln
1					5				10

10

<210> 140

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 140

Pro	Gln	Ala	Gln	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Gln
1					5				10

20

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 141

Pro	Gln	Gln	Leu	Pro	Gln	Phe
1				5		

35

<210> 142

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 142

Pro	Gln	Gln	Leu	Pro	Gln	Phe	Ala
1				5			

45

<210> 143

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 143

55

Pro	Gln	Phe	Ala	Glu	Ile	Arg	Asn
1				5			

60

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 144

Pro Gln Phe Ala Glu Ile Arg Asn Leu
 1 5

10 <210> 145
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 145

Pro Gln Phe Ala Glu Ile Arg Asn Leu Ala
 1 5 10

20 <210> 146
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 146

30 Pro Gln Phe Ala Glu Ile Arg Asn Leu Ala
 1 5 10

35 <210> 147
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 147

Glu Ile Arg Asn Leu Ala Leu Gln Thr Leu Pro
 1 5 10

45 <210> 148
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 148

Arg Asn Leu Ala Leu Gln Thr Leu Pro Ala
 1 5 10

55 <210> 149
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 149

5

Arg Asn Leu Ala Leu Gln Thr Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 150

<211> 8

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 150

Leu Ala Leu Gln Thr Leu Pro Ala
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende neprosina o una variante de la misma con al menos 85 % de homología de secuencia con la misma, y opcionalmente una enzima seleccionada del grupo que consiste en nepentesina I, nepentesina II, variantes de las mismas con al menos 85 % de homología de secuencia con las mismas y mezclas de las mismas, para uso en la atenuación o prevención de la inflamación intestinal debida a la presencia de antígenos alimentarios peptídicos en un intestino de un paciente.
- 10 2. La composición para uso de la reivindicación 1, donde el paciente padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en sensibilidad al gluten y enfermedad celíaca.
- 15 3. La composición para uso de la reivindicación 1, donde la nepentesina I, la nepentesina II, la neprosina, variantes de las mismas con al menos 85 % de homología de secuencia con las mismas o una mezcla de las mismas es una proteína recombinante.
- 20 4. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde una dosis unitaria de la composición farmacéutica comprende entre 1 mg y 25 g de la enzima.
- 25 5. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la composición farmacéutica está entre pH 5 y pH 8.
- 30 6. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la variante es una proteína que tiene una secuencia aminoacídica con al menos 85 % de homología de secuencia con una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 , SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.
- 35 7. Una composición farmacéutica que comprende neprosina y un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la neprosina es una proteína que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos 90 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1.
- 40 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, donde la secuencia aminoacídica de la neprosina comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos 90 % de homología de secuencia con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1 sin una secuencia señal.
- 45 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, que comprende además al menos una enzima de *Nepenthes* adicional o una variante de la misma con al menos 85 % de homología de secuencia con la misma.
- 50 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, donde la al menos una enzima de *Nepenthes* adicional o variante de la misma es nepentesina I, nepentesina II y/o una variante de las mismas con al menos 85 % de homología de secuencia con las mismas.
- 55 11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, que es una formulación de liberación prolongada.
- 60 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, donde la neprosina y/o una o más enzimas de *Nepenthes* comprenden un propéptido.
- 65 13. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde la composición se mantiene a pH neutro.
- 70 14. Una formulación farmacéutica que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7-13, donde la neprosina está presente en múltiples capas de tal manera que la neprosina se libera continuamente mientras la formulación está presente en el estómago.
- 75 15. Una formulación farmacéutica que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7-14, que comprende además un tampón farmacéuticamente aceptable, de tal manera que el pH de la neprosina permanece a pH 5 o 6 tras entrar en contacto con los ácidos en el estómago.

nep I de mirabilis -----MASSLYSFILLASIVTYTFVAPTHSTSR-TALNHHHEPKVAG-----FQIMLEHVDSGKNLTKEFLLERAVERGSRRLQR-----LEA
nep I de alata -----MASSLYSFILLASIVTYTFVAPTHSTSR-TALNHHHEPKVAG-----FQIMLEHVDSGKNLTKEFLLERAVERGSRRLQR-----LEA
nep I de gracilis -----MASSLYSFILLASIVTYTFVAPTHSTSR-TALNHHHEAKVTG-----FQIMLEHVDSGKNLTKFQLLERAJERGSRRLQR-----LEA
nep II de mirabilis -----MASPLHSEVULGLAIVSATAVAPTSSTSRTGTLIHHGOKRPOG-----LRAVLEQVDSGMNLTKYELIKRAIKGERMR-----TNA
nep II de gracilis -----MASPLHSEVULGLAIVSATAVAPTSSTSRTGTLIHHGOKRPOG-----LRAVLEQVDSGMNLTKYELIKRAIKGERMR-----TNA
nep II de mays -----MAFHSCSTIPASHHSSMSSSTSQMASLAVLVEIWICATLASGAASVRVGLTRIHSDPDTAPQFYVRDALRRDMHHRQRSRSFGRDRDRE
nep I de sativa -----MRGVSVVVLVLIACMLCGCPVAGEAAFAFG-----DIRVDLTHYDAGKELPKREIIRRAMQRSKARAALSWRNGGGF
nep II de sativa -----MADRITVLAIALLVLISLSPQMAWQKRAAGNTASPRPKQQQLGNFFKHKGSIDAGLFPRRHNGGSSGSGSYSGQAVPAD-----L
nep II de mays -----MAMMACNNTRPRKLSLPCRTRTFQALISTAVFLAASTAVVVGKEQPQPSSSGGCHYRFELTHDANLNLTDELMRRAYDRSRLRAAS-----L

nep I de mirabilis MLNGSGVETPVYAGD-----GEYLMLNSIG-----TAQPFSAIMDTGSDLINTWQFCNQSTPIFNP-----QGSSSFSTLPCCSQLCQAQLQSPT
nep I de alata MLNGSGVETPVYAGD-----GEYLMLNSIG-----TAQPFSAIMDTGSDLINTWQFCNQSTPIFNP-----QGSSSFSTLPCCSQLCQAQLQSPT
nep I de gracilis MLNGSGVETPVYAGD-----GEYLMLNSIG-----TAQPFSAIMDTGSDLINTWQFCNQSTPIFNP-----QGSSSFSTLPCCSQLCQAQLQSPT
nep II de mirabilis MLQSSSGIETPVYAGS-----GEYLMLNVAIG-----TAQASSLSAIMDTGSDLINTWQFCNQSTPIFNP-----QDSSSFSTLPCEQYCDLPSSET
nep II de gracilis MLQSSSGIETPVYAGD-----GEYLMLNVAIG-----TPDSSLSSAIMDTGSDLINTWQCEPC-----TQCFQSQTPPIFNP-----QDSSSFSTLPCEQYCDLPSSET
nep II de mays LAEDGRTSTTVSARTKDLNPGGYLMTLAIG-----TPLLPIYAADVDTGSDLINTWQCAPGTCFQEPAVYNP-----ASSTTSVLPCNSSLSMAGALA
nep I de sativa YGSIAQAREREREPMAYRASGDEYVLDLAVG-----TPPQPIITALLDTGSDLINTWQCDTC-----TACLQRDPDPLFSP-----RMSSSYEPMRCAGQLCGDILHHS
nep II de sativa GGENGGQQSQDPATN-----TGMYVALSFSVG-----TPPQWVTVGVIDITSDFWMMQCSACATCGADAATAAAPPFYAFLLSSTIREVRCANRGQCQLRVPQT
nep II de mays AAYSDRHEGRVSTPD-----ASYIITFYLGQRPEDNISAWDTGSDFTWTEKECSRSTKTRSMILPCCSP-----KCEQRASC CGCRSELKA

nep I de mirabilis -----CSNNISCOQYYTYGYGDSETQGSMGETTLTFGS-----VSIPNITFGGE-NNQGFGQGNGAGLYGMGRGP.SLPSQLDVTKFSYCMTPIGSS-
nep I de alata -----CSNNISCOQYYTYGYGDSETQGSMGETTLTFGS-----VSIPNITFGGE-NNQGFGQGNGAGLYGMGRGP.SLPSQLDVTKFSYCMTPIGSS-
nep I de gracilis -----CSNNFCQYYTYGYGDSETQGSMGETTLTFGS-----VSIPNITFGGE-NNQGFGQGNGAGLYGMGRGP.SLPSQLDVTKFSYCMTPIGSS-
nep II de mirabilis -----CYN-DCQYTYGYGDGSSTQGYMATETFET-----SSVPNTIAFGGE-DNQGFGQGNGAGLIGMGQGPLSLSQDVKFSYCMTPIGSS-
nep II de gracilis -----CYNNECQYYTYGYGDGSTQGYMATETFET-----SSVPNTIAFGGE-DNQGFGQGNGAGLIGMGQGPLSLSQDVKFSYCMTPIGSS-
nep I de mays GAAPPGCACMYQTYGTG-WTAGVQGSETFFGSSA-----ADQARVPGVAFGCSN-ASSSDWING-SAGLVGLGRGSLSLSQDVKFSYCMTPQDNTN
nep I de sativa ---CVRPDTCTRYSYGDGTTLGGYATERTFASSS-----GETQSYPLGFGGC GT-MNVG-SLNNASGTYVGFGRDPLSLSQDVKFSYCMTPYASS-
nep II de sativa CSADSPCGSYVYGGGAANTTAGLLAVDAFAFAT-----GETQSYPLGFGGC GT-MNVG-SLNNASGTYVGFGRDPLSLSQDVKFSYCMTPYASS-
nep II de mays EAEEKETKCTYAIITGGNANDSTAGWYEDKLTIVAVASKAVPSSQSFKEAVIGCTSATLKFKDPSIKGVFGLGRSATSLPRQLNFSKFSYCLSSYQEPD

FIGURA 1

nep I de mirabilis TSSTLLGLSANS-----VTAGSPNTTLLIES-----SQIPTFYITLNLGVGSTPLPIDPSVFKLNSNNNGTGGIITIDSGETTLTYFADNAYQAVROAFISQM	SEQ ID NO.: 5
nep I de alata NSSTLLGLSANS-----VTAGSPNTTLLIQS-----SQIPTFYITLNLGVGSTPLPIDPSVFKLNSNNNGTGGIITIDSGETTLTYFVDNAYQAVROAFISQM	SEQ ID NO.: 6
nep I de gracilis TPSNLLGLSANS-----VTAGSPNTTLLIQS-----SQIPTFYITLNLGVGSTPLRIDPSAFLNSNNNGTGGIITIDSGETTLTYFVNNAQYSVRODEFISQI	SEQ ID NO.: 7
nep II de mirabilis SPSTLALGSAASG-----VPEESPSTTLLIHS-----SLNPTYYITLQLGITYVGGDNLGIPISSSTFLQLQ-DDGTGGMIIIDSGETTLTYLPQDAYNAVAQAFTDQI	SEQ ID NO.: 8
nep II de gracilis SPSTLALGSAASG-----VPEESPSTTLLIHS-----SLNPTYYITLQLGITYVGGDNLGIPISSSTFLQLQ-DDGTGGMIIIDSGETTLTYLPQDAYNAVAQAFTDQI	SEQ ID NO.: 9
nep I de mays STSTLLGPAAL-----NGTGVRSRSTPEVASPARAPMSTYYNLTGTSLGAKALPISPGAFSLK-PDGTTGGLIIDSGETTITSLSLANAAYQQVRAAQSQI	SEQ ID NO.: 10
nep I de sativa RKSTLQFGSLADVGLYDDATGPVQTTPILQS-----AQNPITFYMAFTGTVGARRLRIPASAFAIR-PDGSGGVVILDSGTALTLPFVAVLAEVWRAFRSQL	SEQ ID NO.: 11
nep II de sativa VGSFILFLDDAKP-----RTSRAVSTPLVAS-----RASRSLYYVELAGIRVGDLEDIAIPRGTFDLQ-ADGSGGGVVLSTITPPVTFLDAGAYKAVROAMASKI	SEQ ID NO.: 12
nep II de mays LPSYLLTAAAPDMAATGAYGGGAAVATTALQP-----NSDYKTLYFVHQNISIGGTRPAVS-----TKSGGMIVDTGASFRTRLEGTVFAKLVTELDRI	SEQ ID NO.: 13
nep I de mirabilis N--LSVVNGS-SSGFDLCCFQMPSDQSN-----LQIPTFWMHEDG-GDLVLPSEN--YFISPSNGLICLAMGSSSQ-GMSIFGNITQQNLLVYVYDTGNS	-----
nep I de alata N--LSVVNGS-SSGFDLCCFQMPSDQSN-----LQIPTFWMHEDG-GDLVLPSEN--YFISPSNGLICLAMGSSSQ-GMSIFGNITQQNLLVYVYDTGNS	-----
nep I de gracilis N--LPVVNGS-SSGFDLCCFQTPSDPN-----LQIPTFWMHEDG-GDLVLPSEN--YFISPSNGLICLAMGSSSQ-GMSIFGNITQQNMLVYVYDTGNS	-----
nep II de mirabilis N--LSPVDES-SSGGLSTCFQLPSDGST-----VQVEPEISMQFEDG-GVNLGEEN--YLISPAEGVICLAMGSSSQGQISIFGNIQQQETQVLYDLQNL	-----
nep II de gracilis N--LPTVDES-SSGGLSTCFQPSDGST-----VQVEPEISMQFEDG-GVNLGEEN--YLISPAEGVICLAMGSSSQGQISIFGNIQQQETQVLYDLQNL	-----
nep I de mays VTTLPVDGSDSTGLDLCFAIAPTSAP-----PAVLPSMTLHFEDG-ADMVLPADS--YMWIGS-GWICLAMRNQTDGAMSTFGNYQQQNWHLYDRE	-----
nep I de sativa R--LPFANGS-SPDDGVCFAPAFAVAAAGGGMRQVAVPRMVFHFOQG-ADDLPREN--YVLEDHRRGHLCVLLGDSGDDGATIGNFQVQDMRVAYDLERE	-----
nep II de sativa E--LRAADGS-ELGLDLCYTSSESLATAK-----VPSNALVFAG-GAVMELEMGNYFYMDSTTGLEECLTLPSPAGDGSLLGSLIYGQTHMIYDISGS	-----
nep II de mays KERKYKEQPGGRNNQICYSPPSTADE-----SSKLIDMVHLFADSANMVLPWD-----YLWKTTSKLCLAYTSNTKGGTISVLGNFQMQNTHMLLDTGNE	-----
nep I de mirabilis WVSFLFAQCGAS-----WVSFLSAQCQGAS	-----
nep I de alata WVSFLSAQCQGAS-----WVSFLSAQCQGAS	-----
nep I de gracilis WVSFLSAQCQGAS-----WVSFLSAQCQGAS	-----
nep II de mirabilis AVSFVPTQCGAS-----AVSFVPTQCGAS	-----
nep II de gracilis AVSFVPTQCGAS-----AVSFVPTQCGAS	-----
nep I de mays TLSFAPAKCSTL-----TLSFAPAKCSTL	-----
nep I de sativa TLSFAPVEC-----TLSFAPVEC	-----
nep II de sativa RLVFESLEQAPPSSGSSRQSSRRSSAPPPLTSPAVVWVYMF-----KLSFVRADC SKV-----KLSFVRADC SKV	-----

FIGURA 1 (Continuación)

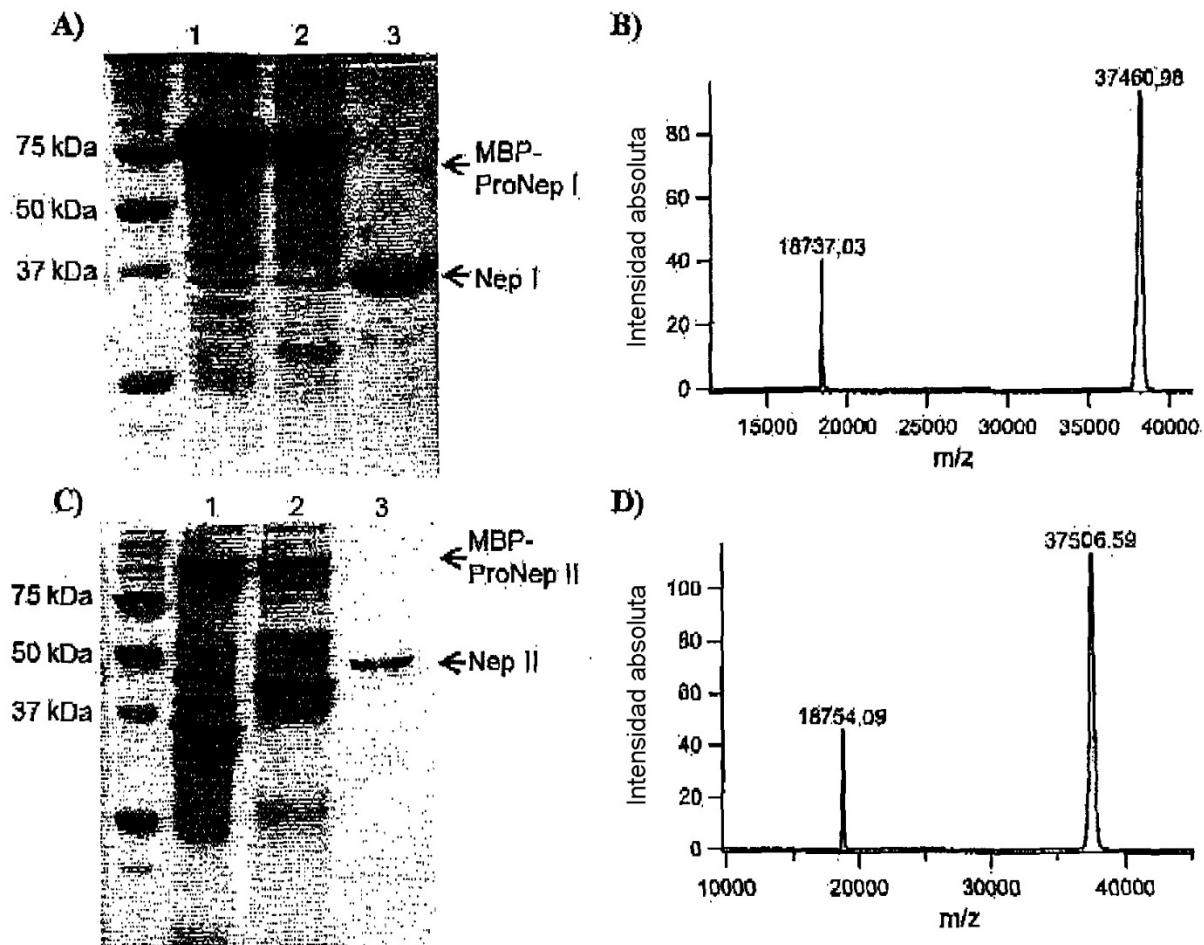
FIGURA 2

FIGURA 3

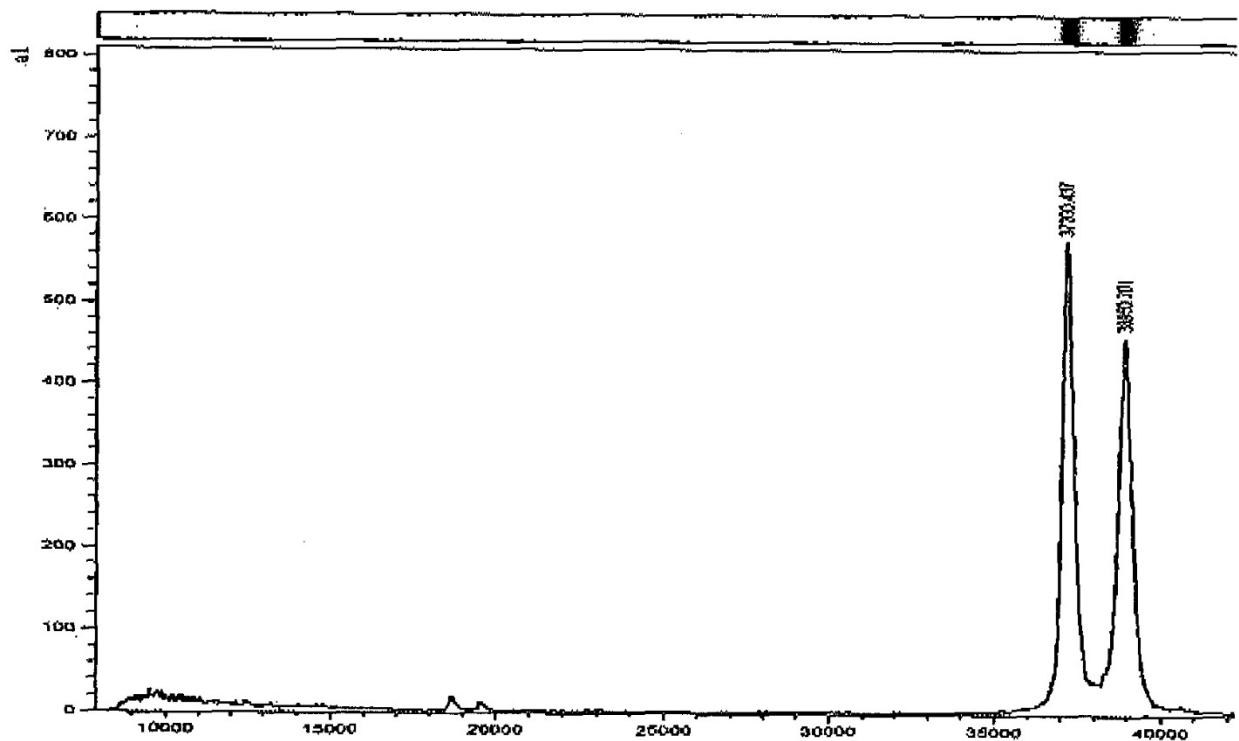


FIGURA 4

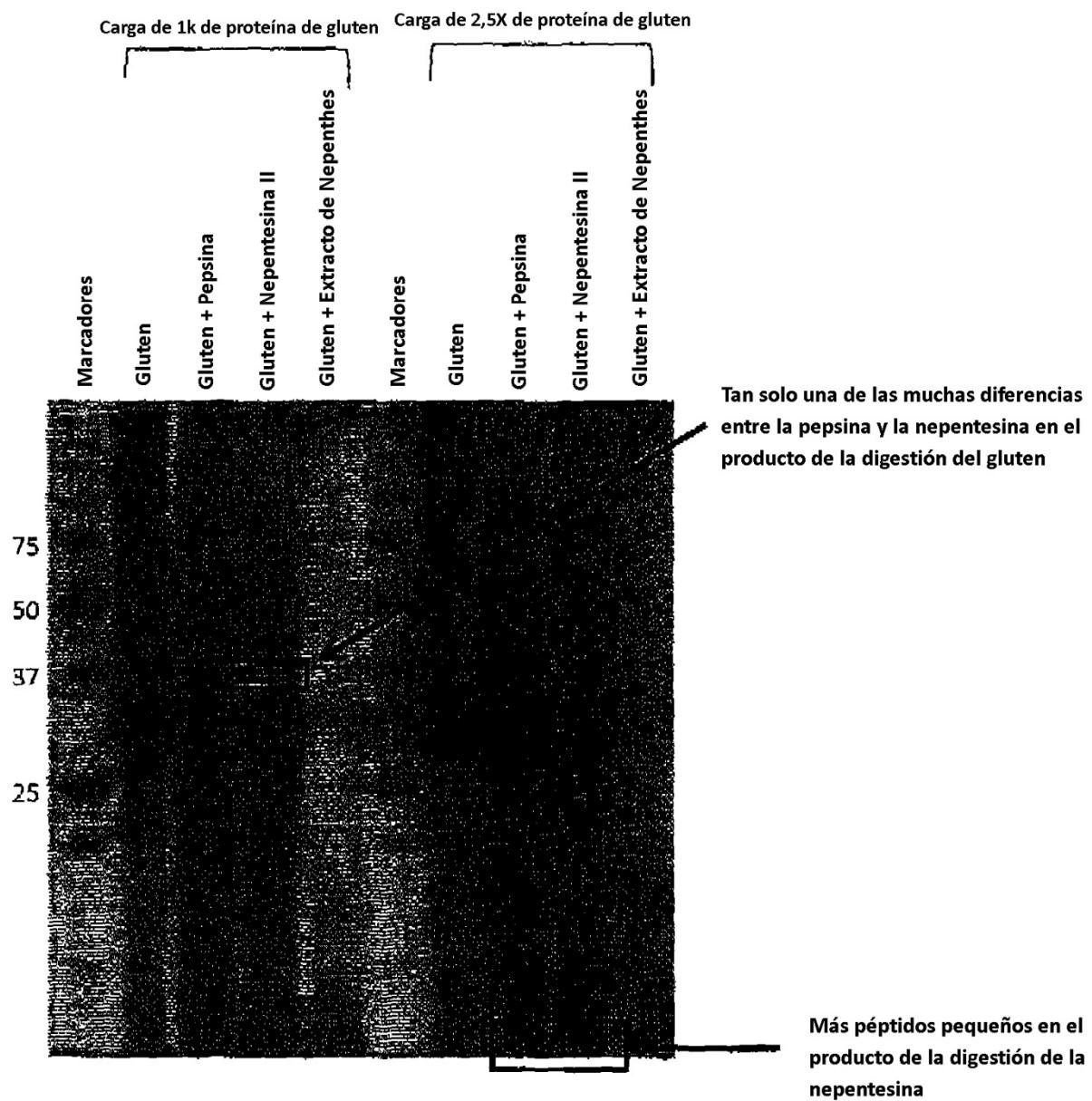


FIGURA 5A

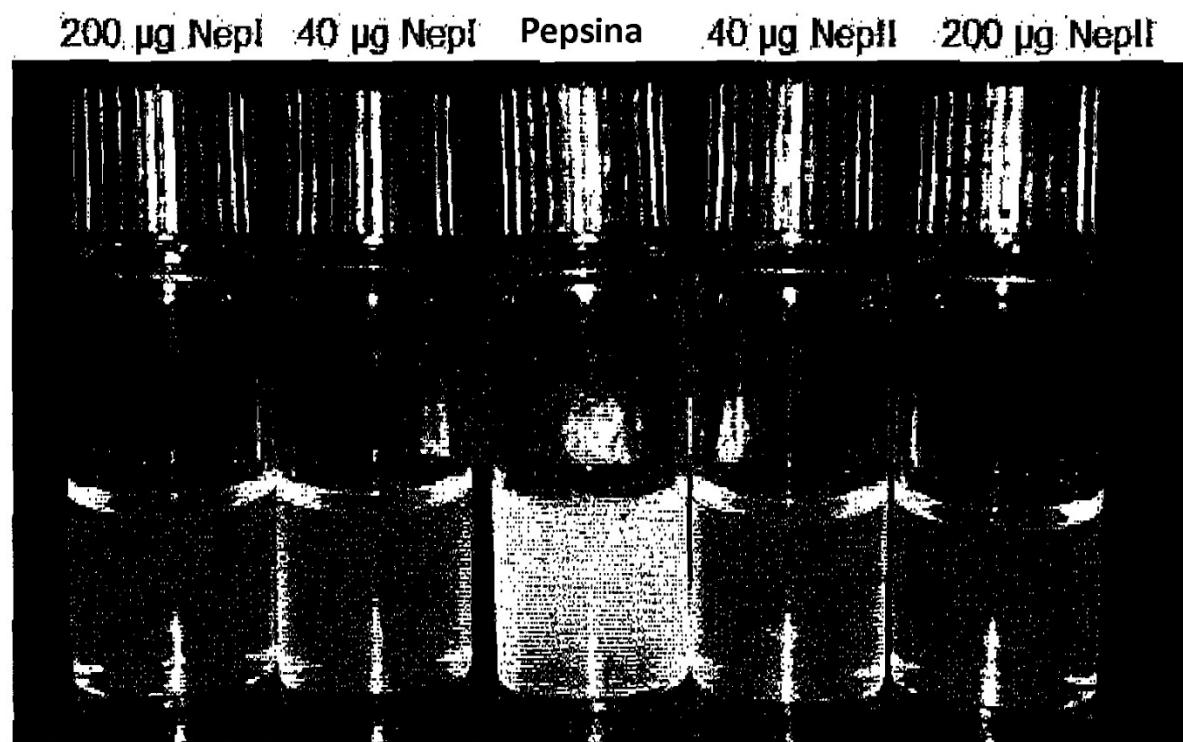
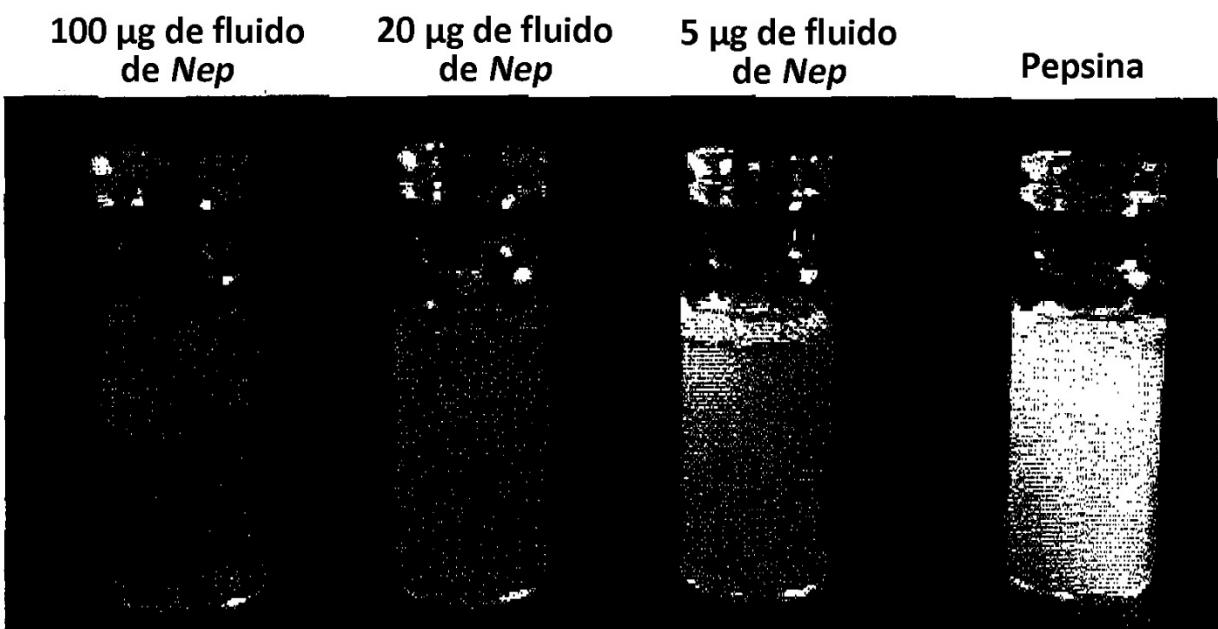


FIGURA 5B



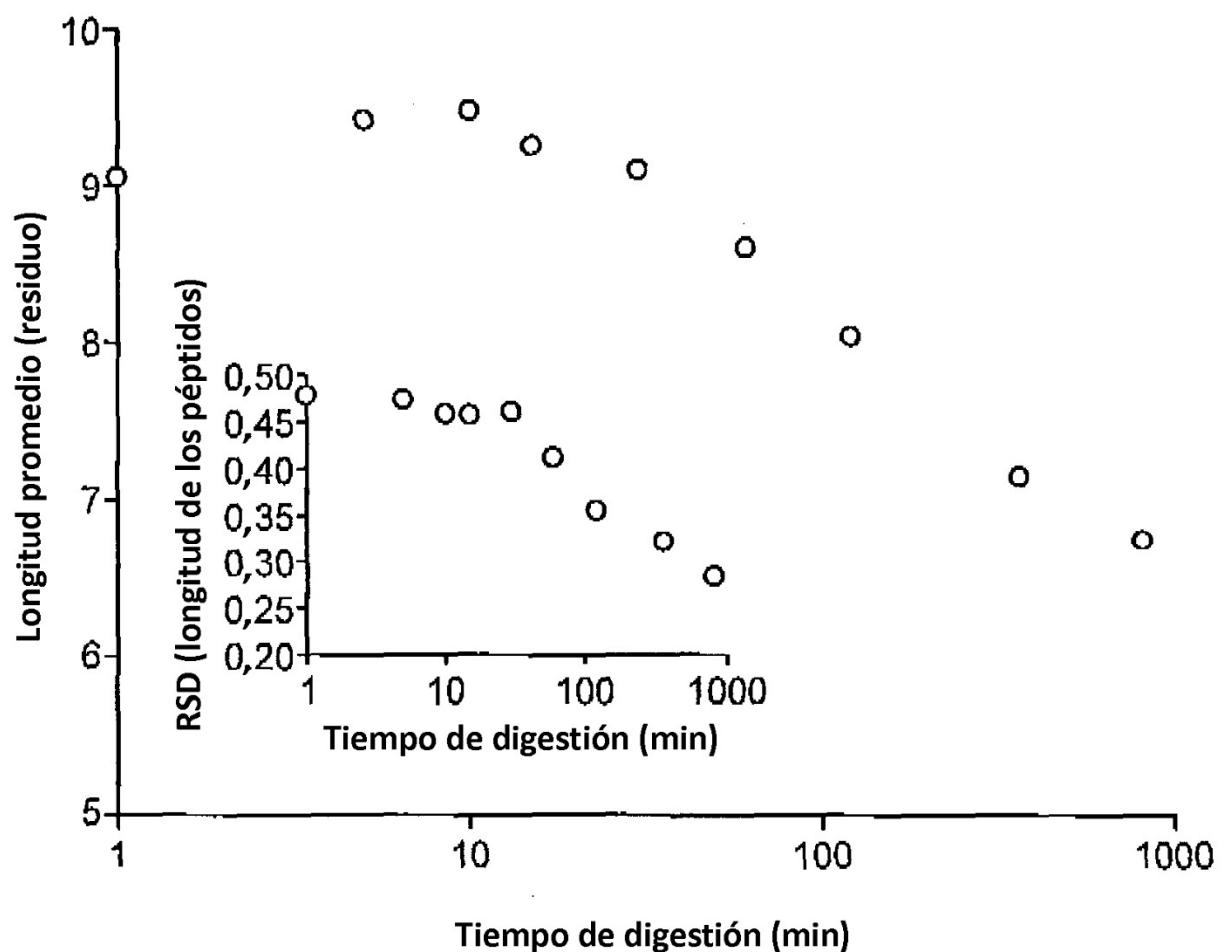


FIGURA 6

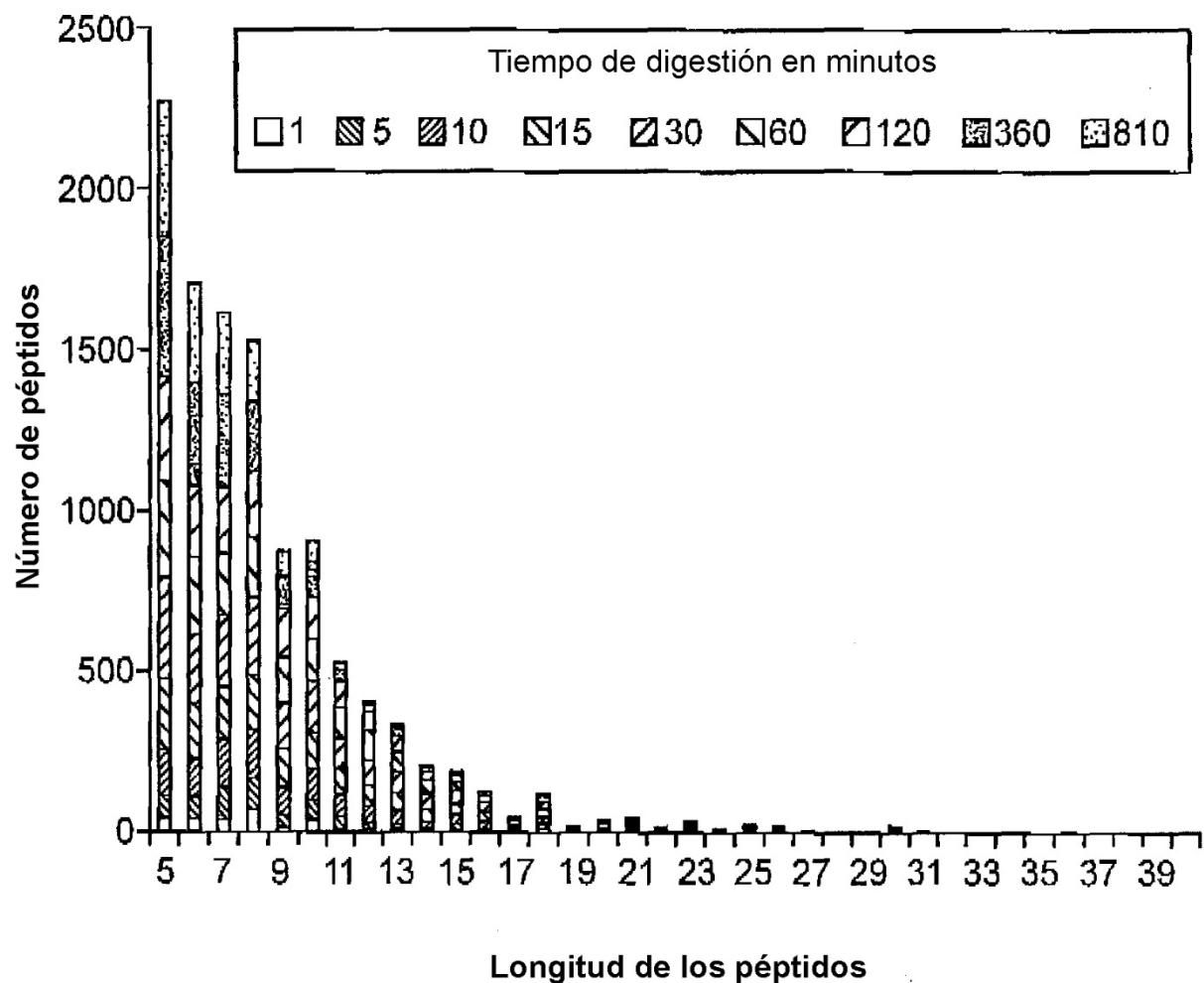


FIGURA 7

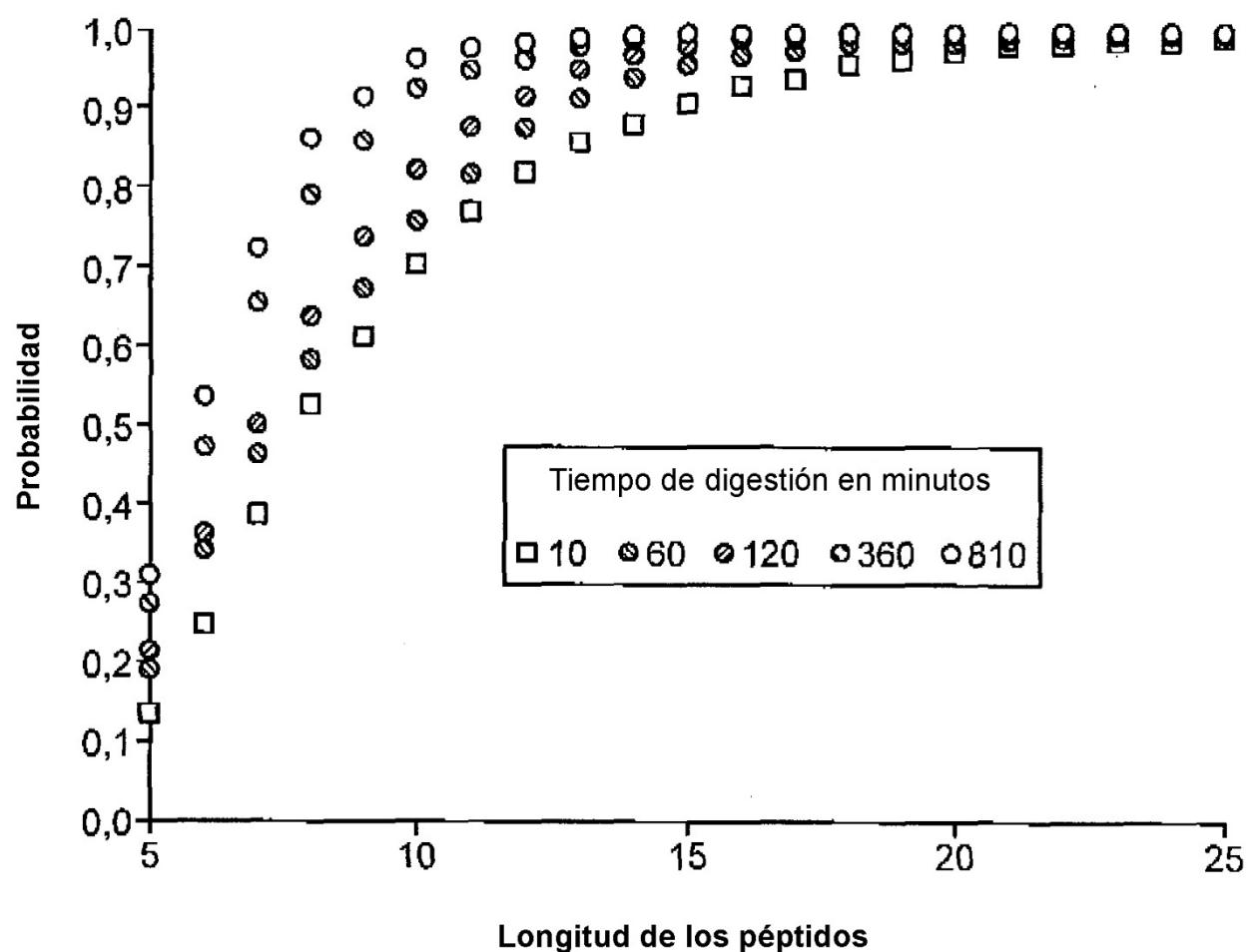


FIGURA 8

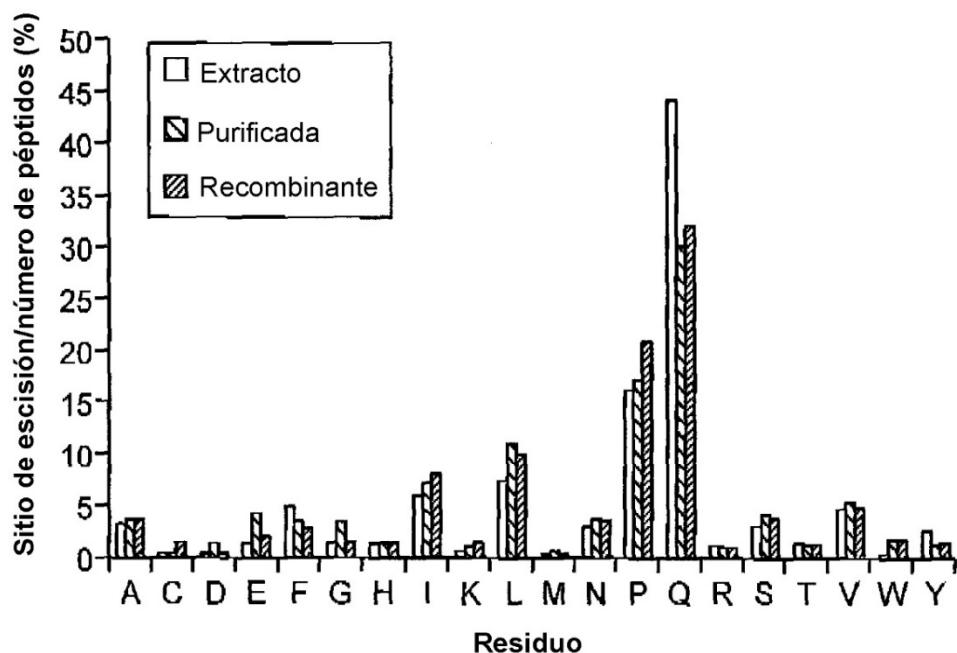
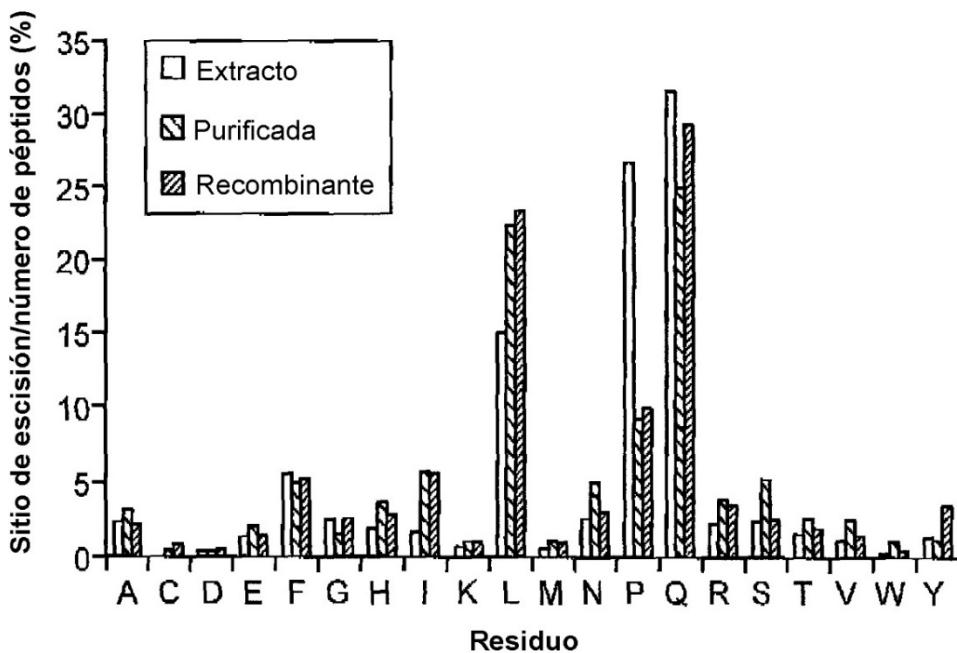
A**B**

FIGURA 9

FIGURA 10

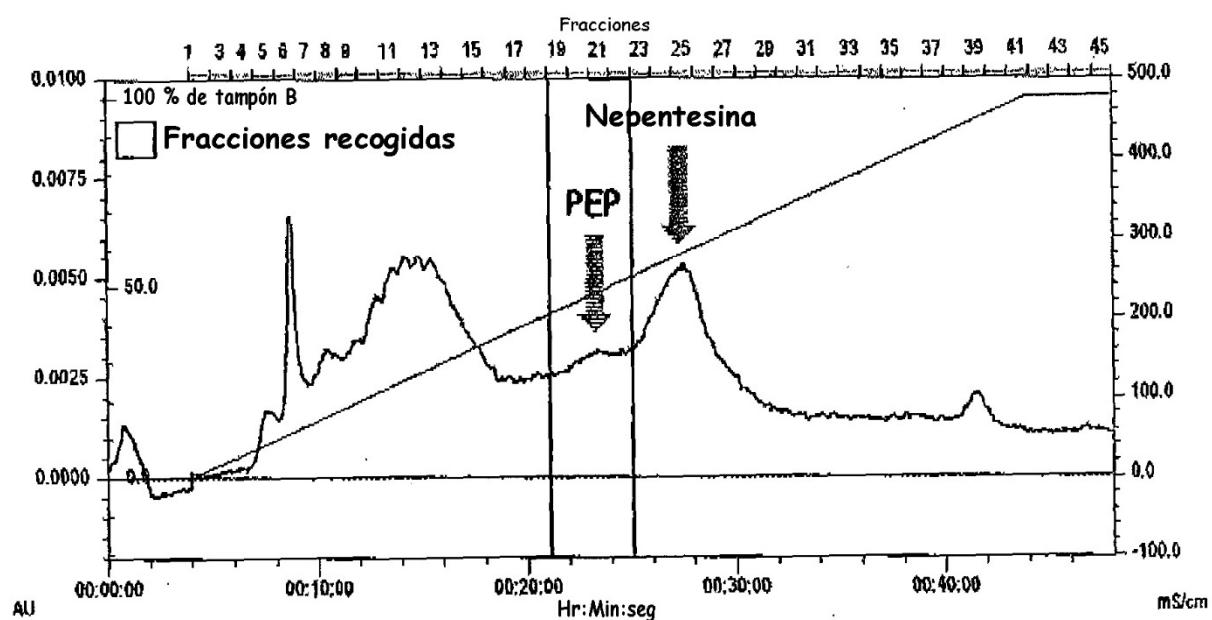


FIGURA 11

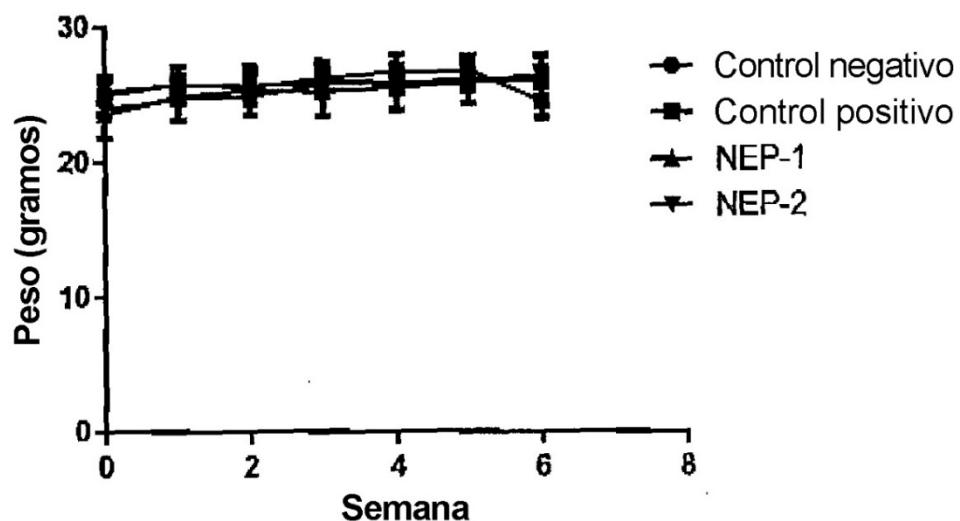


FIGURA 12

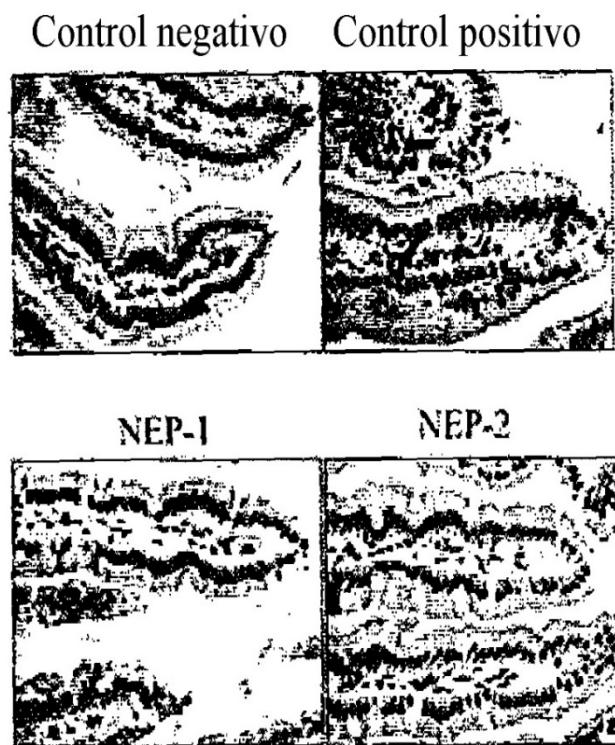
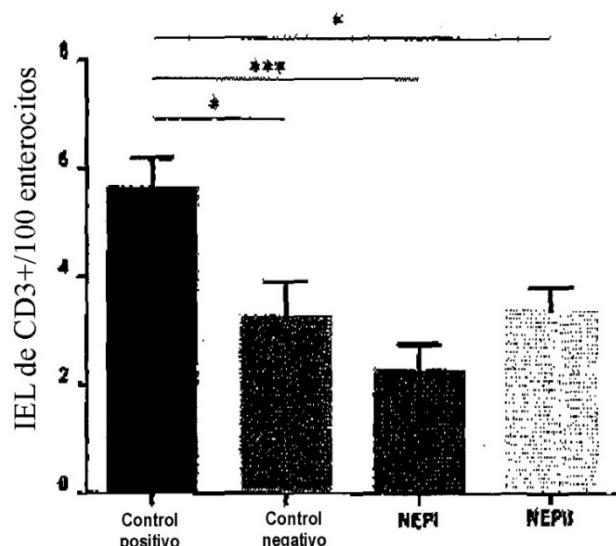


FIGURA 13



* p<0.05. *** p<0.001

FIGURA 14

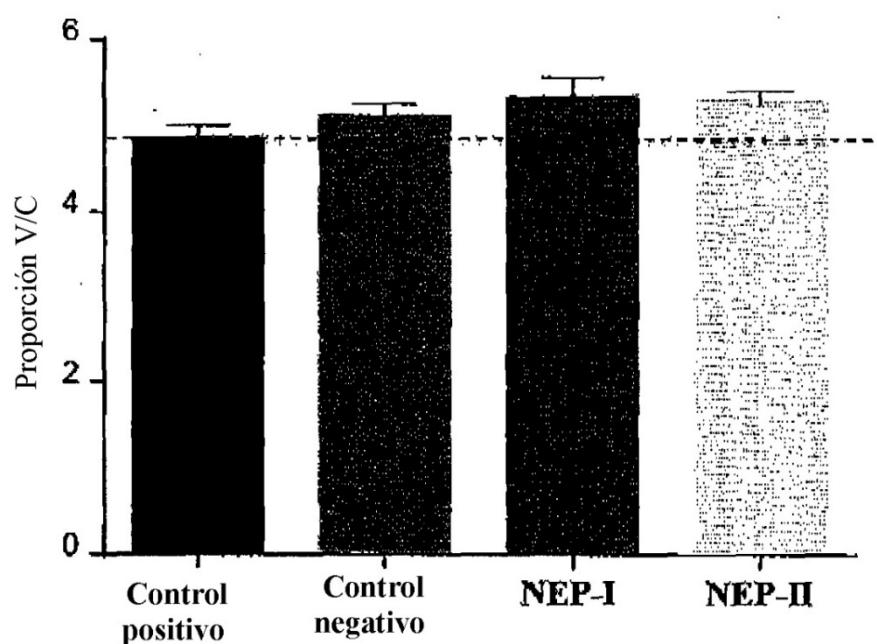


FIGURA 15A

Cobertura de la secuencia proteica: 61 %

Los péptidos coincidentes se muestran en rojo y en negrita

1 MKTFLILALL AIVATTATTA VRVPVPLQPF QNPSQQQFQE QVPLVQQQQF
51 PEGQQQQFFPQ QPYFPQPQPF PQQFYLQLQF FPPQPQPFPFQ LPYFPQPQSF
101 PQQPYPQQPF QYLQPPQPIIS QQQAQQQQQQ QQQQQQQQQI LQQILQQQLI
151 PCRDVVLQDH NIAHASSQVL QQSTYQLLQQ LCCQQQLQIP EQSQCQAIHN
201 VAHAIIIMHQQ QQQQQEQQKQQ LQQQQQQQQQ LQQQQQQQQQ QPSSQVSFQQ
251 PQQQYFSSQV SFQPSQLNPQ AQQSVQFQQL FQFAEIRNL AQTLPAMCNV
301 YIPPHCSTTI AEEFGISGTN

FIGURA 15B

Consulta	Inicio-Fin	Observada	Mr (esp.)	Mr (calc.)	ppm	M	Puntuación	Esperado	Categoría	Σ	Péptido
ef60	21 - 26	333.7101	665.4216	663.4225	-1.21	0	30	0.0011	1	1	A.VRVPVP.Q
ef61	21 - 26	333.7104	665.4222	663.4225	-0.31	0	30	0.0011	1	1	A.VRVPVP.Q
ef179	21 - 27	397.7472	793.4798	793.4810	-1.49	0	28	0.0018	1	1	A.VRVPVPQ.L
ef180	21 - 27	397.7476	793.4806	793.4810	-0.49	0	32	0.00064	1	1	A.VRVPVPQ.I
ef400	21 - 28	454.2698	906.5680	906.5651	-0.031	0	38	0.00016	1	1	A.VRVPVPQL.Q
ef891	21 - 30	566.8454	1131.6762	1131.6764	-0.17	0	35	0.00031	1	1	A.VRVPVPQLQP.Q
ef892	21 - 30	566.8456	1131.6766	1131.6764	0.19	0	37	0.00021	1	1	A.VRVPVPQLQP.Q
ef893	21 - 30	566.8456	1131.6766	1131.6764	0.19	0	37	0.0002	1	1	A.VRVPVPQLQP.Q
ef1126	21 - 31	630.8743	1259.7340	1259.7390	-0.77	0	30	0.0011	1	1	A.VRVPVPQLQP.Q.N
ef1445	21 - 33	491.2039	1470.8299	1470.8307	-0.57	0	24	0.0037	1	1	A.VRVPVPQLQPQNP.S
ef1446	21 - 33	736.4225	1470.8304	1470.8307	-0.17	0	37	0.00022	1	1	A.VRVPVPQLQPQNP.S
ef1447	21 - 33	491.2841	1470.8303	1470.8307	-0.16	0	24	0.004	1	1	A.VRVPVPQLQPQNP.P.S
ef1448	21 - 33	736.4227	1470.8308	1470.8307	0.098	0	38	0.00016	1	1	A.VRVPVPQLQPQNP.S
ef1449	21 - 33	736.4230	1470.8314	1470.8307	0.51	0	43	5.4e-003	1	1	A.VRVPVPQLQPQNP.S
ef1450	21 - 33	736.4232	1470.8318	1470.8307	0.78	0	37	0.00023	1	1	A.VRVPVPQLQPQNP.S
ef1946	21 - 38	680.7040	2039.0902	2039.0912	-0.52	0	30	0.0012	1	1	A.VRVPVPQLQPQNPSPQQP.Q
ef1947	21 - 38	680.7043	2039.0911	2039.0912	-0.478	0	25	0.0039	1	1	A.VRVPVPQLQPQNPSPQQP.Q
ef1948	21 - 38	680.7045	2039.0917	2039.0912	0.22	0	30	0.001	1	1	A.VRVPVPQLQPQNPSPQQP.Q
ef1949	21 - 38	680.7047	2039.0923	2039.0912	0.51	0	32	0.00075	1	1	A.VRVPVPQLQPQNPSPQQP.Q
ef1950	21 - 38	1020.5536	2039.0926	2039.0912	0.69	0	27	0.0022	1	1	A.VRVPVPQLQPQNPSPQQP.Q
ef1951	21 - 38	1020.5545	2039.0944	2039.0912	1.58	0	25	0.0036	1	1	A.VRVPVPQLQPQNPSPQQP.Q
ef1952	21 - 38	1020.5551	2039.0956	2039.0912	2.17	0	20	0.01	1	1	A.VRVPVPQLQPQNPSPQQP.Q
ef222	27 - 33	412.7167	823.4188	823.4188	0.049	0	24	0.0049	1	1	P.QLQPQNP.S
ef304	27 - 38	696.8469	1391.6792	1391.6793	-0.064	0	22	0.0086	1	1	P.QLQPQNPSPQQP.Q
ef926	29 - 38	576.2766	1150.5386	1150.5367	1.78	0	36	0.00033	1	1	L.QPQNPSPQQP.Q
ef927	29 - 38	576.2771	1150.5396	1150.5367	2.56	0	35	0.00058	1	1	L.QPQNPSPQQP.Q
ef928	29 - 38	576.2772	1150.5396	1150.5367	2.74	0	43	8.9e-003	1	1	L.QPQNPSPQQP.Q
ef929	29 - 38	576.2773	1150.5404	1150.5367	3.26	0	24	0.0066	1	1	L.QPQNPSPQQP.Q
ef434	31 - 38	463.7203	929.4260	929.4234	0.75	0	42	0.00017	1	1	P.QNPSQQP.Q
ef435	31 - 38	463.7204	929.4262	929.4234	0.97	0	34	0.00095	1	1	P.QNPSQQP.Q
ef4	39 - 43	300.6529	599.2912	599.2913	-0.40	0	17	0.018	1	1	P.QEQVP.L
ef5	39 - 43	300.6532	599.2918	599.2915	0.60	0	21	0.0082	1	1	P.QEQVP.L
ef6	39 - 43	300.6533	599.2920	599.2915	0.93	0	16	0.025	1	1	P.QEQVP.L
ef7	39 - 43	300.6533	599.2920	599.2915	0.93	0	20	0.01	1	1	P.QEQVP.I
ef89	39 - 44	357.1943	712.3740	712.3755	-2.11	0	26	0.0023	1	1	P.QEQVPL.V
ef197	42 - 48	406.2971	810.4396	810.4600	-0.39	0	26	0.003	1	1	Q.VPLVQO2.Q
ef363	44 - 50	445.7400	889.4654	889.4658	-0.37	0	16	0.03	1	1	P.IVQQQQF.P
ef384	44 - 51	494.2657	986.5160	986.5185	-1.71	0	16	0.023	1	1	P.IVQQQQF.P

FIGURA 15B (Continuación)

Consulta	Inicio-Fin	Observada	Mr. (esp.)	Mr. (calc.)	ppm	M	Puntuación Esperada	Categoría	Clasificación	Péptido
d585	44 - 51	494.2664	986.5182	986.5185	-0.29 0	23	0.0055	1	P.	LVQQQQFP.G
d586	44 - 51	494.2665	986.5184	986.5185	-0.092 0	24	0.0042	1	P.	LVQQQQFP.G
d1886	44 - 59	633.3234	1896.9484	1896.9483	0.052 0	30	0.0012	1	P.	LVQQQQPPGQQQQQFPP.Q
d1887	44 - 59	633.3239	1896.9499	1896.9483	0.84 0	18	0.021	1	P.	LVQQQQFEGQQQQQFPP.Q
d164	46 - 51	388.1900	774.3654	774.3661	-0.79 0	20	0.022	1	V.	QQQQFP.G
d168	46 - 51	388.1901	774.3656	774.3661	-0.53 0	22	0.013	1	V.	QQQQFP.G
d167	46 - 51	388.1903	774.3660	774.3661	-0.013 0	22	0.016	1	V.	QQQQFP.G
d49	47 - 51	324.1609	646.3072	646.3075	-0.36 0	19	0.047	1	Q.	QQQFP.G
d50	47 - 51	324.1609	646.3072	646.3075	-0.36 0	18	0.056	1	Q.	QQQFP.G
d51	47 - 51	324.1609	646.3072	646.3075	-0.36 0	21	0.029	1	Q.	QQQFP.G
d129	49 - 59	651.3184	1300.6222	1300.6201	1.69 0	17	0.024	1	Q.	QFPQQQQQFPP.Q
d324	54 - 60	436.7183	871.4180	871.4188	-0.89 0	14	0.16	2	Q.	QQQQFP.Q
d542	55 - 62	485.2424	968.4716	968.4716	-1.38 0	20	0.058	1	P.	QQQQPQQP.Y
d543	55 - 62	485.2426	968.4706	968.4716	-0.97 0	14	0.24	2	Q.	QQQQPQQP.Y
d545	55 - 62	485.2428	968.4710	968.4716	-0.56 0	20	0.069	1	Q.	QQQQPQQP.Y
d33	60 - 64	316.6554	631.2962	631.2966	-0.51 0	21	0.044	1	P.	QQYP.P.Q
d34	60 - 64	316.6556	631.2964	631.2966	-0.19 0	25	0.021	1	P.	QQYP.P.Q
d140	60 - 65	380.6855	759.3564	759.3551	1.71 0	17	0.053	1	P.	QQYPQ.P.Q
d302	60 - 66	429.2106	856.4066	856.4079	-1.48 0	15	0.11	1	P.	QQYPQP.Q
d303	60 - 66	429.2112	856.4078	856.4079	-0.076 0	23	0.019	2	P.	QQYPQP.Q
d298	60 - 68	541.7669	1081.5192	1081.5193	-0.0083 0	33	0.0016	1	P.	QQYEQPQP.Q.F
d1077	60 - 69	615.3012	1228.5878	1228.5877	0.14 0	26	0.0055	1	P.	QQYPQPQP.Q.F
d1350	60 - 71	707.3434	1412.6722	1412.6725	-0.16 0	40	0.00034	1	P.	QQYPQPQPFFS.Q
d1802	60 - 74	683.9276	1765.8404	1765.8424	-0.99 0	28	0.0027	1	P.	QQYEQPQPQFQFQF.Q
d2935	65 - 74	577.2856	1132.5566	1132.5564	0.23 0	17	0.067	2	P.	QQQFQFSQQP.Y
d437	67 - 74	464.7300	927.4454	927.4450	0.44 0	28	0.0045	1	P.	QQFFSQQP.Y
d436	67 - 74	464.7302	927.4456	927.4450	0.87 0	30	0.0026	1	P.	QQFFSQQP.Y
d1594	72 - 64	528.6124	1882.8154	1882.8144	0.63 0	23	0.0046	1	S.	QQYPLQLQPFQFQ.P.Q
d1597	72 - 84	792.4166	1582.8186	1582.8144	2.70 0	19	0.012	1	S.	QQYPLQLQPFQFQ.P.Q
d1416	73 - 84	728.3838	1454.7530	1454.7538	-1.89 0	16	0.046	1	Q.	QPYLQLQPFQFQ.P.Q
d1079	75 - 84	615.6306	1229.6466	1229.6445	1.78 0	41	0.00011	1	P.	YIQLQPFQFQ.P.Q
d1080	75 - 84	615.6311	1229.6476	1229.6445	2.60 0	29	0.0018	1	P.	YIQLQPFQFQ.P.Q
d764	76 - 84	534.2983	1066.5820	1066.5811	0.86 0	33	0.0007	1	Y.	LOLQPFQFQ.P.Q
d227	76 - 84	413.7264	825.4382	825.4385	-0.30 0	33	0.00063	1	Q.	LOPFQFQ.P.Q
d228	76 - 84	413.7272	825.4398	825.4385	1.64 0	34	0.00078	1	Q.	LOPFQFQ.P.Q
d98	79 - 84	357.1844	712.3542	712.3544	-0.26 0	21	0.051	1	L.	QPFQFQ.P.Q
d1155	79 - 89	640.3262	1278.6378	1278.6397	-1.47 0	39	0.0003	1	U.	L.QPFQFQPFQFPP.Q
d1156	79 - 89	640.3268	1278.6410	1278.6397	1.66 0	31	0.0018	1	U.	L.QPFQFQPFQFPP.Q
d1307	81 - 92	696.8708	1391.7270	1391.7236	2.34 0	14	0.077	1	U.	PPQDQQPFPQFQLE.Y
d371	90 - 96	421.7240	841.4334	841.4334	0.063 0	20	0.03	1	P.	QLPYEQP.Q
d272	90 - 96	421.7242	841.4338	841.4334	0.54 0	20	0.025	1	P.	QLYPEQF.Q
d1327	90 - 101	699.8577	1397.7008	1397.6980	2.07 0	16	0.042	1	P.	QLYTPDQGQFQFQF.Q
d556	102 - 108	444.7143	887.4140	887.4137	0.36 0	36	0.00035	1	P.	QQPYEQQ.Q
d957	102 - 110	559.2696	1112.5246	1112.5251	-0.38 0	49	2.6e-005	1	P.	QQPYEQQ.Q
d858	102 - 110	557.2698	1112.5250	1112.5251	-0.020 0	54	5e-006	1	P.	QQPYEQQ.Q
d577	103 - 110	493.2399	984.4632	984.4665	-3.30 0	25	0.0085	2	Q.	QPYEQQ.Q
d578	103 - 110	493.2394	984.4642	984.4665	-2.38 0	22	0.014	3	Q.	QPYEQQ.Q
d52	111 - 118	324.6718	647.3290	647.3279	1.83 0	15	0.065	1	U.	QYLPQD.Q
d506	116 - 123	478.7443	955.4740	955.4723	1.82 0	14	0.076	1	P.	QQPLSQQQA.A
d507	116 - 123	478.7444	955.4742	955.4723	2.03 0	28	0.0032	1	P.	QQPLSQQQA.A
d681	116 - 124	514.2623	1026.5100	1026.5094	0.62 0	30	0.0013	1	B.	QQPLSQQQA.A
d682	116 - 124	514.2626	1026.5106	1026.5094	1.20 0	33	0.00082	1	P.	QQPLSQQQA.A
d1347	116 - 127	706.3503	1410.6860	1410.6852	0.64 0	21	0.015	1	P.	QDPLSQQQA.Q
d2068	115 - 138	940.7863	2819.3271	2819.3295	2.69 0	22	0.009	1	P.	QDPLSQQQA.Q
d751	138 - 146	556.3278	1110.6410	1110.6397	1.22 0	14	0.13	1	Q.	QQLLQLQ.L.Q
d701	139 - 145	428.2692	854.5238	854.5225	1.53 0	24	0.004	1	Q.	QILQLQ.L.Q
d697	227 - 234	514.7601	1027.5056	1027.5047	0.95 0	16	0.077	1	Q.	QQQLQDQD.Q
d1314	232 - 242	698.8342	1395.6539	1395.6491	3.40 0	15	0.039	1	L.	QQQQQQQQQQ.Q
d1464	232 - 243	742.3493	1482.6840	1482.6811	1.96 0	17	0.02	1	L.	QQQQQQQQQQ.Q
d1140	233 - 242	634.8032	1267.5918	1267.5905	1.04 0	13	0.055	1	Q.	QQQQQQQQ.Q
d819	244 - 251	460.7264	919.4382	919.4400	-1.86 0	32	0.00068	1	S.	SVVSFQF.Q
d420	244 - 251	460.7265	919.4384	919.4400	-1.64 0	49	1.6e-005	1	S.	SVVSFQF.Q
d7391	248 - 254	452.2192	902.4238	902.4246	-0.87 0	22	0.0058	1	S.	SVVSFQF.Q
d533	252 - 259	483.2206	964.4266	964.4250	1.69 0	18	0.018	1	P.	QQQYPSQ.Q
d534	252 - 259	483.2208	964.4270	964.4250	2.10 0	24	0.0042	1	P.	QQQYPSQ.Q
d535	252 - 259	483.2208	964.4270	964.4250	2.10 0	17	0.021	1	P.	QQQYPSQ.Q
d1520	252 - 264	762.3586	1522.7046	1522.7082	-0.38 0	14	0.11	1	U.	QQQYPSQ.Q
d1616	252 - 265	805.8761	1609.7376	1609.7373	0.24 0	36	0.00099	1	U.	QQQYPSQ.Q
d1962	252 - 269	698.3322	2061.9740	2061.9756	-0.39 0	46	5.1e-005	1	U.	QQQYPSQ.Q
d867	260 - 269	558.7892	1115.5618	1115.5611	0.65 0	27	0.002	1	U.	QVSPQDQSLN.P.Q
d586	263 - 277	789.8979	1577.7812	1577.7798	0.93 0	28	0.0026	1	U.	QSPQLNEQAGGSVQ.P.Q
d1261	265 - 277	677.3416	1352.6686	1352.6684	0.15 0	36	0.00036	1	U.	QSPQLNEQAGGSVQ.P.Q
d1138	266 - 277	633.8250	1265.6384	1265.6364	-0.76 0	80	1.5e-008	1	S.	QSPQLNEQAGGSVQ.P.Q
d674	268 - 277	513.2538	1024.4930	1024.4930	-0.71 0	54	8e-006	1	L.	NPQDAQGSVQ.P.Q
d410	269 - 277	486.2332	910.4518	910.4509	1.10 0	42	0.00011	1	N.	NPQDAQGSVQ.P.Q
d202	270 - 277	407.7059	813.3992	813.3981	1.43 0	15	0.094	1	P.	QAGGSVQ.P.Q
d203	270 - 277	407.7071	813.3996	813.3981	1.92 0	39	0.00038	1	P.	QAGGSVQ.P.Q

FIGURA 15B (Continuación)

Consulta	Inicio-Fin	Observada	Mr (esp.)	Mr (calc.)	ppm	MPuntuación	Espereado	Categoría	Clasifi-	Péptido
d204	270 - 277	407.7072	813.3998	813.3981	2.16 0	26	0.006	1	P.	QAGGSVQP.Q
d205	270 - 277	407.7072	813.3998	813.3981	2.16 0	37	0.00047	1	P.	QAGGSVQP.Q
d206	270 - 277	407.7072	813.3998	813.3981	2.16 0	38	0.00038	1	P.	QAGGSVQP.Q
d17	278 - 282	307.1591	612.3236	612.3231	0.86 0	15	0.11	1	P.	QQLPQ.P
d141	278 - 283	380.7031	759.3916	759.3915	0.14 0	24	0.0099	1	P.	QQLPQF.A
d143	282 - 287	382.2074	762.4002	762.4024	-2.05 0	37	0.0002	1	P.	QFAEIR.N
d331	282 - 288	439.2299	876.4452	876.4453	-0.11 0	32	0.00068	1	P.	QFAETRN.L
d601	282 - 289	495.7718	989.5290	989.5294	-0.36 0	37	0.00019	1	E.	QFAETRNL.A
d602	282 - 289	495.7720	989.5294	989.5294	0.044 0	28	0.0017	1	P.	QFAETRNL.A
d708	286 - 294	521.3239	1040.6332	1040.6342	-0.92 0	36	0.00024	1	E.	IRNLALQTL.P
d319	288 - 295	435.2585	868.5024	868.5018	0.74 0	21	0.0072	1	R.	NLALQTL.P
d320	288 - 295	435.2585	868.5024	868.5018	0.74 0	33	0.00051	1	R.	NLALQTL.P
d41	290 - 295	321.6943	641.3740	641.3740	-1.20 0	25	0.0032	1	L.	ALQTL.P

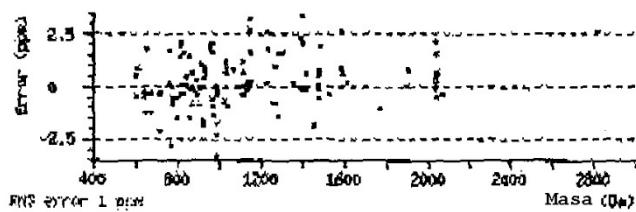


FIGURA 16

NVEN	1	MQAKFFTEVILSSVFYFNYPLAE [REDACTED] SIQARLANKPKG [REDACTED]	53
**			
NVEN	54	[REDACTED]	113
* * *			
NVEN	114	[REDACTED] IAYFYGNASLQGANATINIWEPNLKNPNGDFSLTQ	173
** * *			
NVEN	174	IWISAGSGSSLNTIEAGWQVYPGRTGDSOPRFFLYWTADGYTSTGCYDLTCPGFVOTNNY	233
^ *			
NVEN	234	YAIGMALQPSVYGGQQYELNESIQRDPATGNWWLYLWGTVVGWPASIYNSITNGADTV	293
^			
NVEN	194	WGGETIYDSSGTGGEHTTOMGSGHFPTEGYKASYVRDL	332
** ^ * ^ * *			
NVEN	333	QCVDTYGNVISPTANSFOGIAPAPNCNNYOFQQGSSELYLFYGGPGCQ	380

^ Similar; * No similar, diferencias

[REDACTED] - [REDACTED] -enlazador- DUF239 (156-387)

Evidencia de polimorfismos:

21/380 = 5,5% Total

14/380 = 3,7% no similar, diferencias