

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 771**

51 Int. Cl.:

C12N 9/50 (2006.01)

A23L 33/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 1/14 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/CA2014/000258**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14138927**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14763905 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020** **EP 3004340**

54 Título: **Tratamiento de la intolerancia al gluten y afecciones relacionadas**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313843369

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

27.04.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SCHRIEMER, DAVID;
MAN, PETR;
MRAZEK, HYNEK y
REY, MARTIAL

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 821 771 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la intolerancia al gluten y afecciones relacionadas

5 Campo de la invención

En la presente descripción se proporcionan composiciones para usar en el tratamiento o inhibición de la intolerancia al gluten y afecciones relacionadas, tal como la enfermedad celíaca.

10 Antecedentes de la invención

La ingestión de trigo, cebada, centeno y posiblemente avena, que contienen gluten, puede causar respuestas autoinmunes anormales, tales como enfermedad celíaca, alergia al trigo y dermatitis herpetiforme, en individuos intolerantes al gluten. El gluten es una mezcla de moléculas de proteína de prolamina y glutenina ricas en glutamina y prolina. La mayoría de los individuos que tienen respuestas autoinmunes anormales expresan las moléculas DQ2 o DQ8 del antígeno leucocitario humano (HLA). Las reacciones autoinmunes resultan en el desarrollo de atrofia de las vellosidades de la mucosa del intestino delgado con hiperplasia de la cripta 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, distensión abdominal, anemia, así como también, un riesgo sustancialmente mayor para el desarrollo de osteoporosis y neoplasias intestinales (linfoma y carcinoma).

El tratamiento para la intolerancia al gluten comúnmente implica una dieta estricta sin gluten de por vida. Sin embargo, la dieta sin gluten es inconveniente, restrictiva y el gluten es difícil de evitar. Por lo tanto, se necesitan tratamientos alternativos efectivos para la intolerancia al gluten.

25 Se sabe que varias especies bacterianas causan infección del tracto gastrointestinal. Aunque el tratamiento actual para tales infecciones depende en gran medida de los antibióticos, se encuentra que un número creciente de infecciones bacterianas son resistentes al menos a algunos antibióticos. Además, algunas especies de bacterias forman endosporas que las hacen especialmente difíciles de erradicar. Las proteasas gástricas tal como la pepsina generalmente no pueden matar las endosporas, por ejemplo, debido a la incapacidad de romper la capa proteica que protege la endospora. Por lo tanto, se necesitan tratamientos alternativos efectivos para la infección bacteriana. Rey y otros (2016) Scientific Reports 6, 20980 aborda la eficiencia proteolítica en la terapia de degradación enzimática para la enfermedad celíaca. Kadek y otros (2014) Protein Expression and Purification 95, 121-128 describe la expresión y caracterización de la proteasa aspártica vegetal nepentesina-1 de *Nepenthes gracilis*. Athauda y otros (2004) Biochem J 381, 295-306 describe la caracterización enzimática y estructural de la nepentesina. Takahashi (2012) Handbook of Proteolytic Enzymes Vol 1 y 2, 3ra Edición páginas 125-128 proporciona una visión general de la nepentesina. Kubota y otros (2010) Bioscience Biotechnology Biochemistry 74 (11), 2323-2326 describe los perfiles de estabilidad de la nepentesina en urea y clorhidrato de guanidina. Hatano y otros (2008) Journal of Proteome Research 7 (2), 809-816 describe el análisis de proteoma del fluido de la jarra de la planta insectívora *Nepenthes alata*. Rey y otros (2012) Molecular & Cellular Proteomics 12 (2), 464-472 describe la nepentesina de las copas de mono para la espectroscopía de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio. An y otros (2002) Planta 214 (5), 661-667 describe la expresión de proteinasas aspárticas en las jarras de la planta carnívora *Nepenthes alata*. Mazorra-Manzano y otros (2010) Phytochem 71 (5-6), 515-523 describe la caracterización de la estructura-función de la proteínasa A1 aspártica recombinante de *Arabidopsis thaliana*. Stepniak y otros (2006) Am J Physiol 291, G621-G629 describe la degradación del gluten con una prolil endoproteasa recientemente identificada. El documento US 2012/225050 describe métodos para mejorar la salud intestinal. El documento EP 2 090 662 describe un proceso para la producción de un producto químico fino en un organismo. Takahasji y otros (2005) Curr Prot Pep Sci 6, 513-525 describe las características enzimáticas y estructurales de la nepentesina.

50 Resumen de la invención

Esta invención se refiere al descubrimiento de que la enzima nepentesina posee una alta actividad proteolítica para escindir proteínas y oligopéptidos (incluido el gluten), especialmente a pH bajo (por ejemplo, aproximadamente 2 a 3). La nepentesina (EC 3.4.23.12) es una proteasa aspártica de origen vegetal que puede aislarse o concentrarse a partir de una variedad de fuentes vegetales, tales como las secreciones de la jarra de *Nepenthes*, una planta carnívora insectívora, comúnmente conocida como copas de mono en regiones tropicales. Tokes y otros, Digestive Enzymes Secreted by the Carnivorous Plant *Nepenthes macfarlanei* L., Planta (Berl.) 119, 39-46 (1974). Se ha encontrado que la actividad de la nepentesina es aproximadamente 1000 veces mayor que la de la pepsina (EC 3.4.23.1), una enzima presente en el estómago de los humanos, en parte responsable de la degradación de las proteínas de los alimentos en péptidos. También se ha encontrado que la nepentesina tiene una especificidad mucho más relajada que la pepsina, escindiendo eficientemente después de la mayoría de los residuos de aminoácidos con la excepción de los residuos de aminoácidos G, S, T, V, I y W. Notablemente, escinde después de los residuos de aminoácidos K, R y P. En comparación, la pepsina presenta una escisión de alta eficiencia para los residuos de aminoácidos hidrofóbicos F, L y M, pero la escisión después de los residuos de aminoácidos P, H, K y R está esencialmente prohibida.

65

La nepentesina tiene dos isoformas conocidas: nepentesina I (se sabe que tiene dos variantes: nepentesina Ia y nepentesina Ib) y II. Se encuentra que ambas isoformas tienen una mayor afinidad de escisión por los aminoácidos P y Q que la pepsina. Sorprendentemente, se ha descubierto que la combinación de nepentesina I y nepentesina II tiene una afinidad de escisión ligeramente diferente a la nepentesina I sola. Específicamente, el extracto que comprende nepentesina I y nepentesina II escinde más eficientemente después del aminoácido Q en el lado N-terminal de la gliadina y el aminoácido P en el lado C-terminal de la gliadina que la nepentesina I sola.

La intolerancia al gluten y las afecciones y síntomas asociados, tales como la enfermedad celíaca y/o la dermatitis herpetiforme, son causadas por la respuesta inmune anormal del paciente al gluten en la mucosa del intestino delgado. Ciertos componentes del gluten son resistentes a la escisión por peptidasas gástricas y pancreáticas tales como la pepsina, la tripsina, la quimotripsina y similares. Si bien no desea estar sujeto a ninguna teoría, se contempla que la degradación del gluten a péptidos no tóxicos por la nepentesina antes de llegar al tracto intestinal de un paciente disminuye los niveles de proteínas o péptidos del gluten tóxico que ingresan al intestino delgado. Como la nepentesina es estable en ácido, es compatible con el pH del estómago y digiere el gluten para modular la intolerancia al gluten de un paciente o afecciones o síntomas relacionados.

Dada su alta actividad a pH bajo y su amplio espectro de actividad, la nepentesina es especialmente útil para digerir las proteínas del gluten en el estómago. La degradación del gluten a péptidos no tóxicos también se conoce como desintoxicación del gluten. Si bien no desea estar sujeto a ninguna teoría, se contempla que la degradación del gluten, que se compone de proteínas ricas en prolina y glutamina, a péptidos no tóxicos puede lograrse de manera más eficiente con la nepentesina que con enzimas estomacales tal como la pepsina.

Esta descripción se refiere además al uso de la nepentesina, tal como la nepentesina I y/o nepentesina II y derivados de las mismas en el tratamiento de infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal. Dada su alta actividad a pH bajo y su amplio espectro de actividad, la nepentesina es útil en el tratamiento de infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal. Sin limitarse a la teoría, se cree que la nepentesina es más eficiente que las enzimas estomacales para alterar las paredes celulares bacterianas y las capas de endosporas.

En un aspecto, se proporciona una composición para usar en el tratamiento o inhibición de la intolerancia al gluten en donde dicha composición comprende nepentesina recombinante seleccionada de nepentesina I recombinante, nepentesina II recombinante, una sal de la misma, o cualquier combinación de las mismas. En una modalidad, la nepentesina I recombinante se administra a dicho paciente. En una modalidad, la nepentesina II recombinante se administra a dicho paciente. En una modalidad, se administra una mezcla de nepentesina I recombinante y nepentesina II recombinante a dicho paciente.

En una modalidad de la descripción, la nepentesina, tal como la nepentesina I y/o la nepentesina II o un derivado de la misma, se administra como un aditivo alimentario de tal manera que la nepentesina o el derivado de la misma se combina con alimentos que contienen gluten para modular o inhibir las afecciones asociadas con la intolerancia al gluten. La nepentesina o un derivado de la misma puede usarse solo o en combinación con dicho alimento. En un aspecto de la descripción, se usa nepentesina I o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, se usa nepentesina II o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, se usa una mezcla de nepentesina I y nepentesina II o derivados de las mismas.

En una modalidad, dicha intolerancia al gluten da como resultado enfermedad celíaca, alergia al trigo, sensibilidad al gluten y/o dermatitis herpetiforme. En un aspecto de la descripción, la nepentesina I o un derivado de la misma se administra a dicho paciente. En un aspecto de la descripción, la nepentesina II o un derivado de la misma se administra a dicho paciente. En un aspecto de la descripción, se administra una mezcla de nepentesina I y nepentesina II o derivados de las mismas a dicho paciente.

En cualquier caso, la nepentesina, tales como la nepentesina I y/o la nepentesina II o un derivado de la misma, puede administrarse al paciente antes, simultáneamente o poco después del consumo de un alimento que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten. En un aspecto de la descripción, la nepentesina I o un derivado de la misma se administra a dicho paciente. En un aspecto de la descripción, la nepentesina II o un derivado de la misma se administra a dicho paciente. En un aspecto de la descripción, se administra una mezcla de nepentesina I y nepentesina II o derivados de las mismas a dicho paciente.

En otro aspecto de la descripción, se proporcionan métodos para modular la intolerancia al gluten o una afección asociada, tal como enfermedad celíaca, alergia al trigo, sensibilidad al gluten o dermatitis herpetiforme, en un paciente que lo necesite, que comprende tratar un alimento que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten con una cantidad efectiva de nepentesina antes del consumo por parte del paciente. En un aspecto de la descripción, dicho alimento se trata con una cantidad efectiva de nepentesina I o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, dicho alimento se trata con una cantidad efectiva de nepentesina II o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, dicho alimento se trata con una cantidad efectiva de una mezcla de nepentesina I y nepentesina II o derivados de las mismas.

En otro aspecto de la descripción, se proporcionan alimentos o composiciones que comprenden nepentesina, tales como nepentesina I y/o nepentesina II o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, dicho alimento o composición comprende nepentesina I o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, dicho alimento o composición comprende nepentesina II o un derivado del mismo. En un aspecto de la descripción, dicho alimento o composición comprende una mezcla de nepentesina I y nepentesina II o derivados de las mismas.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición para optimizar la escisión de una proteína del gluten en un residuo de prolina, que comprende una mezcla de nepentesina I recombinante y nepentesina II recombinante. En un aspecto de la descripción, se proporciona una composición para optimizar la escisión de una proteína del gluten en un residuo de glutamina, que comprende una mezcla de nepentesina I recombinante y nepentesina II recombinante.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición que comprende gluten fragmentado, en donde la composición se enriquece en fragmentos del gluten producidos por escisión del gluten en un residuo de prolina del gluten. En un aspecto de la descripción, se proporciona una composición que comprende gluten fragmentado, en donde la composición se enriquece en fragmentos del gluten producidos por escisión del gluten en un residuo de glutamina.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para digerir proteínas que comprende gluten, el método que comprende poner en contacto dichas proteínas con una cantidad efectiva de nepentesina I y/o nepentesina II.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para producir nepentesina recombinante, tal como nepentesina I y/o nepentesina II o un derivado de la misma, el método que comprende expresar en un organismo huésped elegido una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha nepentesina u homólogo de la misma y la secuencia de ácido nucleico se ha insertado en un vector diseñado adecuadamente; para obtener dicha nepentesina o un homólogo de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es nepentesina I o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es nepentesina II o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es una mezcla de nepentesina I y nepentesina II o derivados de las mismas.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición que comprende nepentesina recombinante o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es nepentesina I recombinante o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es nepentesina II recombinante o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es una mezcla de nepentesina I recombinante y nepentesina II recombinante o derivados de las mismas.

En otro aspecto de la descripción, se proporcionan métodos para prevenir o tratar infecciones bacterianas o parasitarias del tracto gastrointestinal en un paciente, el método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de nepentesina, tal como nepentesina I y/o nepentesina II o un derivado de la misma a dicho paciente. En un aspecto de la descripción, la nepentesina I o un derivado de la misma se administra a dicho paciente. En un aspecto de la descripción, la nepentesina II o un derivado de la misma se administra a dicho paciente. En un aspecto de la descripción, se administra una mezcla de nepentesina I y nepentesina II o derivados de las mismas a dicho paciente.

Estos y otros aspectos de la invención se describirán adicionalmente en el texto que sigue.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las preferencias de escisión de la nepentesina en (A) el lado P1 o N-terminal del sitio de escisión y en (B) el lado P1' o C-terminal del sitio de escisión. Los datos se agrupan de acuerdo con el tipo de aminoácido y se comparan con una representación similar de los datos de la pepsina de Hamuro y otros. Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. Rapid Communications in Mass Spectrometry 22(7):1041-1046 (2008). Las barras negras indican la digestión con nepentesina y las barras grises la digestión con pepsina. El % de escisión representa el número de divisiones observadas en el residuo dado, con relación al número total de residuos dados en el conjunto. Los datos de la nepentesina se obtuvieron a partir de digestiones de seis proteínas desnaturalizadas, como se describió en el Ejemplo 2.

La Figura 2 muestra un mapa de la secuencia del péptido compuesto XRCC4, organizado de acuerdo con el tipo de dominio. Los péptidos se obtuvieron mediante el uso de digestión con pepsina a cuatro diferentes relaciones enzima:sustrato (65:1 a 520:1, gris claro/juego de barras superior), y mediante el uso de digestión con nepentesina a cuatro diferentes relaciones enzima:sustrato (0,0075: 1 a 0,38: 1, conjunto de barras gris oscuro/inferior).

La Figura 3 muestra la puntuación promedio de MASCOT de los péptidos obtenidos después de la digestión con nepentesina, agrupados por aminoácidos C-terminales. El número de péptidos usados para cada cálculo está asociado con el aminoácido terminal, arriba de la barra. Los péptidos se obtuvieron de las digestiones de seis proteínas

desnaturalizadas, como se describió en el Ejemplo 2.

La Figura 4 muestra los cromatogramas de iones peptídicos (PIC) de XRCC4 digeridos con (A) nepentesina y (B) pepsina en un intervalo de relaciones enzima:sustrato (que se muestra en la leyenda). Los PIC para la digestión enzimática se generaron a partir de la misma carga de masa del sustrato en la columna.

La Figura 5 muestra la longitud promedio de todos los péptidos identificados a partir de una digestión con nepentesina de gliadina del trigo, mediante el uso de LC-MS/MS, después de 1, 5, 10, 15, 30, 60, 130, 360 u 810 minutos a 37 °C. Se usó un límite de confianza del 95 % ($p < 0,05$) en las puntuaciones para eliminar la identificación de falsos positivos. La desviación estándar relativa de la longitud del péptido se muestra en la figura insertada.

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

La Figura 7 muestra los mismos datos que la Figura 5, como una probabilidad de obtener una cierta longitud después de una digestión de 10, 60, 120, 360 u 810 minutos a 37 °C.

La Figura 8 muestra las preferencias de escisión de la nepentesina en (A) el lado P1 o N-terminal del sitio de escisión y en (B) el lado P1' o C-terminal del sitio de escisión. Las barras de la izquierda para cada residencia indican la digestión con extracto de nepentesina, las barras del medio indican la digestión con extracto de nepentesina purificado y las barras de la derecha con nepentesina recombinante I. El % de escisión representa el número de divisiones observadas en el residuo dado, en relación con el número total de péptidos presentes. Los datos de nepentesina se obtuvieron a partir de digestiones de gliadina, como se describió en el Ejemplo 9.

La Figura 9 muestra una alineación de las secuencias de proteínas para la nepentesina I de *Nepenthes mirabilis*, *Nepenthes gracilis*, *Nepenthes alata*, *Zea mays* y *Oryza sativa*, y nepentesina II de *Nepenthes mirabilis*, *Nepenthes gracilis*, *Zea mays* y *Oryza sativa*.

La Figura 10 muestra un árbol filogenético que indica la relación de las proteínas nepentesina entre diferentes especies.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder dicha descripción en virtud de una invención anterior.

La práctica de la presente descripción emplea, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas convencionales de biología molecular (que incluye técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la habilidad de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, por ejemplo, en las siguientes publicaciones. Véase, por ejemplo, Sambrook y Russell eds. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ra edición (2001); la serie CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel y otros. eds. (2007)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc., N.Y.); PCR 1: A PRACTICAL APPROACH (M. MacPherson y otros. IRL Press at Oxford University Press (1991)); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)); ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL (Harlow and Lane eds. (1999)); CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE (R.I. Freshney 5ta edición (2005)); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M. J. Gait ed. (1984)); Mullis y col. Patente de Estados Unidos Núm. 4.683.195; NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984)); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (M.L.M. Anderson (1999)); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. (1984)); IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press (1986)); B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J. H. Miller y M. P. Calos eds. (1987) Cold Spring Harbor Laboratory); GENE TRANSFER AND EXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS (S.C. Makrides ed. (2003)) IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London (1987)); WEIR'S HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY (L.A. Herzenberg y otros. eds (1996)).

Como se usa en la descripción y las reivindicaciones, la forma singular "un", "una" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera.

Como se usa en la presente descripción, el término "que comprende" pretende significar que las composiciones y métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa para

definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación. Por ejemplo, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definió en la presente descripción no excluiría otros elementos que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. "Consiste en" significará excluir más que pequeñas cantidades de otros ingredientes y pasos sustanciales del método recitados. Las modalidades definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

Como se usa en la presente descripción, el término "gluten" generalmente se refiere a las proteínas presentes en el trigo o especies de granos relacionadas, incluidas la cebada y el centeno, que tienen un efecto nocivo potencial 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 una mezcla altamente heterogénea de agregados de subunidades de alto peso molecular y subunidades de bajo peso molecular mantenidas juntas por enlaces disulfuro. Se han caracterizado muchas proteínas del gluten de trigo, véase, por ejemplo, Woychik y otros, Amino Acid Composition of Proteins in Wheat Gluten, J. Agric. Food Chem., 9(4), 307-310 (1961). El término gluten, como se usa en la presente descripción, también incluye oligopéptidos que pueden derivarse de la digestión humana normal de proteínas del gluten a partir de alimentos que contienen gluten y causan una respuesta inmune anormal. Algunos de estos oligopéptidos son resistentes a las enzimas digestivas normales. Se cree que el gluten, incluidas las proteínas y los oligopéptidos mencionados anteriormente, actúan como antígenos para las células T en la celiaquía en pacientes con intolerancia al gluten.

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 y variantes de nepentesina tales como nepentesina I y nepentesina II, y nepentesina recombinante, y sus sales. Las sales se refieren a aquellas sales formadas por nepentesina con una o más bases o uno o más ácidos que retienen la efectividad biológica y las propiedades de la nepentesina libre, y que no son biológicamente o de otra manera indeseables. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero que no se limitan a, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero que 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, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, N-piperidina, piperidina, piperidina, piperidina, epiperidina y similares. Los ácidos que pueden formar sales incluyen, pero que 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 derivados de la nepentesina de la descripción incluyen equivalentes biológicos, fragmentos y nepentesina extendida, y sus sales, que retienen la actividad proteolítica. En algunas modalidades de la descripción, los derivados de la nepentesina incluyen equivalentes biológicos de la nepentesina. Los "equivalentes biológicos" incluyen aquellos que tienen al menos aproximadamente 80 % de homología o identidad o alternatively, al menos aproximadamente 85 %, o alternatively al menos aproximadamente 90 %, o alternatively al menos aproximadamente 95 %, o alternatively 98 % de homología con la nepentesina, o alternatively un polipéptido o proteína codificado por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos que codifica la nepentesina o su complemento, mientras mantiene la estructura deseada y exhibe al menos parte de la actividad proteolítica de la nepentesina.

En algunas modalidades de la descripción, el derivado de la nepentesina es un fragmento de nepentesina que tiene al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos de la proteína de nepentesina completa, o al menos aproximadamente 50 aminoácidos contiguos, o que comprende 100 o más aminoácidos contiguos, hasta la proteína completa de nepentesina. Los derivados de la nepentesina de la descripción también incluyen la nepentesina que tiene secuencias adicionales.

En algunas modalidades de la descripción, un derivado de nepentesina tiene al menos aproximadamente 10 % de la actividad proteolítica de la nepentesina, o al menos aproximadamente 50 %, o al menos aproximadamente 70 %, o al menos aproximadamente 90 % de la actividad proteolítica de la nepentesina o 100 % o más de la actividad proteolítica de la nepentesina.

Como se usa en la presente descripción, el término "equivalente biológico del mismo" pretende ser sinónimo de "equivalente del mismo" que, cuando se refiere a una proteína, anticuerpo, polipéptido o ácido nucleico de referencia, pretende aquellos que tienen una homología mínima mientras mantienen la estructura o funcionalidad deseada. En una modalidad alternativa de la descripción, el término "equivalente biológico de" un polinucleótido se refiere a uno que hibrida en condiciones rigurosas con el polinucleótido de referencia o su complemento. A menos que se mencione específicamente en la presente descripción, se contempla que cualquier polinucleótido, polipéptido o proteína mencionado en el presente documento también incluya sus equivalentes. Por ejemplo, un equivalente pretende al

menos aproximadamente el 80 % de homología o identidad y, alternativamente, al menos aproximadamente el 85 %, o alternativamente al menos aproximadamente el 90 %, o alternativamente al menos aproximadamente el 95 %, o alternativamente el 98 % por ciento, o alternativamente el 99 % por ciento homología o identidad de secuencia y exhibe actividad biológica sustancialmente equivalente a la proteína de referencia, polipéptido o ácido nucleico.

Un polinucleótido o una región polinucleotídica (o un polipéptido o región polipeptídica) que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando está alineado, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son iguales en la comparación de las dos secuencias. La alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse mediante el uso de programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y otros, Eds. 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, los parámetros predeterminados se usan para la alineación. Un programa de alineación es el BLAST, mediante el uso de parámetros predeterminados. Los ejemplos de los programas incluyen BLASTN y BLASTP, mediante el uso de los siguientes parámetros predeterminados: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambos; corte = 60; expectativa = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS traducciones + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgibin/BLAST.

Los vectores de expresión adecuados incluyen vectores capaces de expresar un polinucleótido unido operativamente a un elemento regulador, tal como una región promotora y/o un potenciador que es capaz de regular la expresión de tal ADN. Por lo tanto, un vector de expresión se refiere a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula huésped apropiada, da como resultado la expresión del ADN insertado. Los vectores de expresión apropiados incluyen aquellos que son replicables en células eucariotas y/o células procariotas y aquellos que permanecen episomales o aquellos que se integran en el genoma de la célula huésped.

Como se usa en la presente descripción, el término "vector" se refiere a un ácido nucleico no cromosómico que comprende un replicón intacto de modo que el vector puede replicarse cuando se coloca dentro de una célula, por ejemplo, mediante un proceso de transformación. Los vectores pueden ser virales o no virales. Los vectores virales incluyen retrovirus, adenovirus, herpesvirus, papovirus o virus modificados de forma natural. Los ejemplos de vectores no virales para llevar ácido nucleico incluyen ADN desnudo; ADN en complejo con lípidos catiónicos, solos o en combinación con polímeros catiónicos; liposomas aniónicos y catiónicos; complejos y partículas de ADN-proteína que comprenden ADN condensado con polímeros catiónicos tales como polilisina heterogénea, oligopéptidos de longitud definida y polietiliminina, en algunos casos contenidos en liposomas; y el uso de complejos ternarios que comprenden un virus y polilisina-ADN.

El vector no viral puede incluir un plásmido que comprende un polinucleótido heterólogo capaz de ser liberado a una célula diana, *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. El polinucleótido heterólogo puede comprender una secuencia de interés y puede estar operativamente unido a uno o más elementos reguladores y puede controlar la transcripción de la secuencia de ácido nucleico de interés. Como se usa en la presente descripción, un vector no necesita ser capaz de replicarse en la célula o sujeto diana final. El término vector puede incluir vector de expresión y vector de clonación.

"Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología puede determinarse al comparar una posición en cada secuencia que puede alinearse para fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40 % de identidad, o alternativamente menos del 25 % de identidad, con una de las secuencias de la presente descripción.

"Hibridación" se refiere a reacciones de hibridación que pueden realizarse en condiciones de diferente "rigurosidad". Las condiciones que aumentan la rigurosidad de una reacción de hibridación son ampliamente conocidas y publicadas en la técnica: véanse, por ejemplo, las ediciones de Sambrook y Russell. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra edición. Los ejemplos de condiciones relevantes incluyen (en orden de rigurosidad creciente): temperaturas de incubación de 25 °C, 37 °C, 50 °C y 68 °C; concentraciones de tampón de 10 X SSC, 6 X SSC, 1 X SSC, 0,1 X SSC (donde SSC es 0,15 M de NaCl y 15 mM de tampón citrato) y su equivalente mediante el uso de otros sistemas de tampón; concentraciones de formamida de 0 %, 25 %, 50 % y 75 %; tiempos de incubación de 5 minutos a 24 horas y lavados de duración creciente, frecuencia creciente o concentraciones de tampón decrecientes.

En una modalidad de la descripción, "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de un compuesto que da como resultado la prevención o mejora de los síntomas en un paciente o un resultado biológico deseado, por ejemplo, signos clínicos mejorados, inicio tardío de la enfermedad, etc. La cantidad efectiva puede ser determinada por un experto en la técnica. El nivel de dosificación seleccionado puede depender de la gravedad de la afección a tratar, y la afección y el historial médico previo del paciente a tratar. Sin embargo, está dentro de la habilidad de la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado.

La "administración concurrente" o tratamiento conjunto, como se usa en la presente descripción, incluye la administración de los agentes juntos, o antes o después de cada uno.

5 El término "modular" o "modulación" significa cualquier tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto, tal como un mamífero, que incluye:

- prevenir o proteger contra la enfermedad o trastorno, es decir, al causar que la reacción biológica anormal o los síntomas no se desarrollen;
- 10 • inhibir la enfermedad o trastorno, es decir, detener o suprimir el desarrollo de reacciones biológicas anormales y/o síntomas clínicos; y/o
- aliviar la enfermedad o trastorno que es, causar la regresión de reacciones biológicas anormales y/o síntomas clínicos.

15 Como se usa en la presente descripción, el término "prevenir" se refiere al tratamiento profiláctico de un paciente que lo necesita. El tratamiento profiláctico puede lograrse al proporcionar una dosis apropiada de un agente terapéutico a un sujeto en riesgo de sufrir una dolencia, lo que evita así sustancialmente la aparición de la enfermedad.

20 Como se usa en la presente descripción, el término "afección" se refiere a un estado de enfermedad para el que se usan los compuestos, composiciones y métodos proporcionados en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, el término "paciente" o "sujeto" se refiere a mamíferos e incluye humanos y mamíferos no humanos. En modalidades particulares de la descripción en la presente descripción, el paciente o sujeto es un ser humano.

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

30 II. Métodos

En un aspecto de la descripción, se proporcionan los métodos para modular la intolerancia al gluten en un paciente con intolerancia al gluten, el método que comprende administrar una cantidad efectiva de nepentesina, tal como nepentesina I y/o nepentesina II, o un derivado de la misma a dicho paciente.

35 En una modalidad de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma se administra como un aditivo alimentario de manera que la nepentesina o un derivado de la misma se combina con alimentos que contienen gluten para modular o inhibir las afecciones asociadas con la intolerancia al gluten. La nepentesina o un derivado de la misma puede usarse solo o en combinación con dicho alimento.

40 En otro aspecto de la descripción, se proporcionan los métodos para modular una afección mediada por intolerancia al gluten en un paciente, el método que comprende administrar una cantidad efectiva de nepentesina o un derivado de la misma a dicho paciente. Tales afecciones incluyen, a modo de ejemplo, solo la enfermedad celíaca, la alergia al trigo, la sensibilidad al gluten y la dermatitis herpetiforme. La nepentesina o un derivado de la misma puede administrarse al paciente antes de, simultáneamente con, o poco después de la ingestión de un alimento que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten.

45 En algunas modalidades, la nepentesina, tal como la nepentesina I y/o la nepentesina II o un derivado de la misma, se administra al paciente antes de la ingestión por parte del paciente del alimento que comprende gluten o sospechoso de comprender gluten. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma se administra dentro de un período en el que la nepentesina o el derivado de la misma es al menos parcialmente efectiva (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 50 %, 70 %, 90 % de la actividad original) en la degradación del gluten en los alimentos que el paciente ingiere. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma se administra no más de aproximadamente 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora o 30 minutos antes de que el paciente ingiera los alimentos.

50 En algunas modalidades, la nepentesina o un derivado de la misma se administra al paciente simultáneamente con la ingestión por parte del paciente del alimento que comprende gluten o sospechoso de comprender gluten. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma se administra con el alimento, tal como un ingrediente o aditivo al alimento. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma se administra por separado del alimento.

55 En algunas modalidades, la nepentesina o un derivado de la misma se administra al paciente poco después de la ingestión por parte del paciente del alimento que comprende gluten o sospechoso de comprender gluten. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma se administra dentro de un período en el que al menos parte (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 50 %, 70 %, 90 %) del gluten en el alimento está todavía en el estómago del paciente. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de

la misma se administra no más de 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora o 30 minutos después de la ingestión del alimento por parte del paciente.

En otro aspecto de la descripción, se proporcionan los métodos para prevenir o tratar infecciones bacterianas o parasitarias del tracto gastrointestinal en un paciente, el método que comprende administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de nepentesina o un derivado de la misma a dicho paciente. Solo a modo de ejemplo, tales infecciones bacterianas pueden ser causadas por bacterias tales como *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Shigella*, *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulin*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*. En un aspecto de la descripción, dicha composición comprende nepentesina I o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, dicha composición comprende nepentesina II o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, dicha composición comprende una mezcla de nepentesina I y nepentesina II o derivados de las mismas.

C. difficile son flora intestinal natural en un pequeño subconjunto de la población. Sin embargo, la mayoría de las personas están expuestas a *C. difficile* como pacientes en un hospital, hogar de ancianos o centro similar al ingerir esporas de la bacteria. *C. difficile* puede invadir el tracto gastrointestinal en afecciones oportunistas, generalmente debido al tratamiento con un antibiótico de amplio espectro que destruye la flora intestinal normal. La bacteria libera toxinas que pueden causar hinchazón, diarrea y dolor abdominal intenso. Las infecciones por *C. difficile* son la causa más común de colitis pseudomembranosa, que en casos raros progresan a megacolon tóxico potencialmente mortal. La tasa de *C. difficile* es adquirida por un número significativo de pacientes con estadías prolongadas en el hospital: se estima que la adquisición es del 13 % en pacientes con estadías hospitalarias de hasta dos semanas y del 50 % en aquellos con estadías hospitalarias de más de cuatro semanas. Clabots, CR; Johnson, S; Olson, MM; Peterson, LR; Gerding, DN (septiembre de 1992). "Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection". *Journal of Infectious Diseases* 166 (3): 561-7.

Se ha encontrado que *Helicobacter* vive en el revestimiento del tracto gastrointestinal superior, así como también en el hígado de mamíferos y algunas aves. *H. pylori* infecta hasta el 50 % de la población humana y puede ser patógeno para los humanos. *H. pylori* está fuertemente asociada con úlceras pépticas, gastritis crónica, duodenitis y cáncer de estómago. Otras especies de *Helicobacter* también se han asociado con estas afecciones, incluidas *H. suis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii* y *H. salomonis*.

En un aspecto de la descripción, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención a un paciente que se sabe que tiene o se sospecha que tiene una infección del tracto gastrointestinal. En otro aspecto de la descripción, la composición se administra a un paciente en riesgo de infectarse, por ejemplo, un paciente con una hospitalización prolongada y/o un paciente al que se le receta un antibiótico de amplio espectro.

Típicamente, la nepentesina tal como la nepentesina I y/o la nepentesina II o un derivado de la misma se administra en una cantidad que es segura y suficiente para producir el efecto deseado de la desintoxicación del gluten o el tratamiento de la infección bacteriana. La dosis de los compuestos de nepentesina o derivados la misma puede variar en dependencia de muchos factores, tales como la nepentesina particular o sus derivados administrados, la sensibilidad del paciente al gluten, la cantidad y los tipos de alimentos ingeridos que contienen gluten, las propiedades farmacodinámicas, el modo de administración, la edad, la salud y el peso del receptor, la naturaleza y la extensión de los síntomas, la frecuencia del tratamiento y el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, y la tasa de depuración del compuesto. Un experto en la técnica puede determinar la dosis apropiada en función de los factores anteriores. Los compuestos pueden administrarse inicialmente en una dosis adecuada que puede ajustarse según sea necesario, en dependencia de la respuesta clínica. La cantidad de nepentesina tal como nepentesina I y/o nepentesina II o un derivado de la misma que será efectiva en el tratamiento de una enfermedad correlacionada o causada por una infección con bacterias patógenas, por ejemplo, puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar basadas en la presente descripción. Además, los ensayos *in vitro* pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar rangos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del profesional y las circunstancias de cada sujeto.

La dosificación o el régimen de dosificación de un paciente adulto puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes, y también puede ajustarse para otra administración u otros formatos, en proporción, por ejemplo, al peso molecular o la respuesta inmune. La administración o los tratamientos pueden repetirse a intervalos apropiados, a discreción del médico.

En general, la nepentesina o un derivado de la misma se administra cuando es necesario, tal como cuando el paciente consumirá o está consumiendo o ha consumido un alimento que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten, o si tiene o se sospecha que tiene una infección bacteriana. Alternativamente, una composición farmacéutica que comprende nepentesina o un derivado de la misma puede administrarse a un paciente que la necesite. En cualquier caso, puede administrarse en dosis de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 g por dosis para una persona promedio. En algunas modalidades, la nepentesina o un derivado de la misma puede administrarse a 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 50, 100, 500 o 1000 mg/kg de peso corporal por día, y oscila entre dos de estos valores (incluidos los puntos finales). En

algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma puede administrarse 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 oscila entre dos de estos valores (incluidos los puntos finales). En algunas modalidades de la descripción, puede administrarse una, dos, tres veces, etc. al día, en dependencia de la cantidad de veces que el paciente ingiera un alimento que contenga gluten, o en dependencia del tipo, la gravedad o el riesgo de infecciones bacterianas o parasíticas.

Los compuestos de esta invención pueden administrarse como el único agente activo o pueden administrarse en combinación con otros agentes (simultáneamente, secuencialmente o por separado, o mediante formulación conjunta), incluidos otros compuestos que demuestran la misma o similar actividad terapéutica y que se determina que son seguros y eficaces para tal administración combinada.

En algunas modalidades, la nepentesina o un derivado de la misma se administra con otra enzima, tal como una proteasa gástrica (por ejemplo, pepsina y pepsinógeno), otra proteasa aspártica, tal como las descritas por Chen y otros, 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 la prolil endopeptidasa (PEP), dipeptidil peptidasa IV (DPP IV), y dipeptidil carboxipeptidasa (DCP) o cisteína peptisasa B descritas en la Petente de EE.UU Núm. 7,910,541.

En algunas modalidades, la nepentesina se administra al paciente con otro agente. Los ejemplos no limitantes de agentes que pueden administrarse con la nepentesina incluyen los inhibidores de la transglutaminasa tisular, agentes antiinflamatorios tales como inhibidores de la HMG-CoA reductasa (por ejemplo, compactina, lovastatina, simvastatina, pravastatina y atorvastatina), antagonistas de los receptores de leucotrienos (por ejemplo, montelukast y zafirlukast), inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib y rofecoxib), inhibidores de la p38 MAP quinasa (por ejemplo, BIRB-796); agentes estabilizadores de mastocitos tale como el cromoglicato de sodio (cromolina), pemirolast, proxicromil, repirinast, doxantrazol, amlexanox, nedocromil y probicromil, agentes antiulcerosos, agentes antialérgicos tales como agentes antihistamínicos (por ejemplo, acrivastina, cetirizina, desloratadina, ebastina, fexofenadina, levocetirizina, loratadina y mizolastina), inhibidores de la transglutaminasa 2 (TG2), agentes anti-TNFA y antibióticos.

En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina se administra conjuntamente con un antibiótico, tal como una penicilina, una cefalosporina, un carbapenem, una polimixina, una rifamicina, una lipiarmicina, una quinolona, una sulfonamida, un β -lactama, una fluoroquinolona, un glucopéptido, un cetólido, una lincosamida, una estreptogramina, un aminoglucósido, un macrólido, una tetraciclina, un lipopéptido cíclico, una glicilciclina o una oxazolidinona. Los antibióticos en estas clases son conocidos en la técnica.

En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina se administra conjuntamente con un agente antiinfeccioso (por ejemplo, un triazol o anfotericina antifúngica). Estos pueden incluir carbapenems, por ejemplo, meropenem o imipenem, para ampliar la efectividad terapéutica.

También se describe en la presente descripción el uso de la nepentesina o un derivado de la misma en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una de las afecciones y enfermedades mencionadas anteriormente.

Composiciones

La nepentesina tal como la nepentesina I y/o la nepentesina II o un derivado de la misma puede administrarse en una variedad de composiciones solas o con portadores o diluyentes o ingredientes dietéticos apropiados farmacéuticamente aceptables.

En consecuencia, en otro aspecto de la descripción, se proporciona en la presente descripción una composición que comprende nepentesina o un derivado de la misma. En algunas modalidades de la descripción, la composición es una composición comestible. En algunas modalidades de la descripción, la composición es un suplemento dietético. En algunas modalidades de la descripción, la composición es una composición farmacéutica. En algunas modalidades de la descripción, la composición es un alimento o aditivo alimentario. Las composiciones pueden formularse en formas sólidas, semisólidas o líquidas, tales como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, inyecciones, geles y microesferas. La administración de la nepentesina o un derivado de la misma puede lograrse de varias maneras, por ejemplo, por administración oral.

En algunas modalidades de la descripción, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad particular de la descripción, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos.

Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva de nepentesina o un derivado de la misma, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada del portador para proporcionar la forma de administración adecuada al sujeto. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

Para la administración oral, la nepentesina o un derivado de la misma puede usarse sola o en combinación con los aditivos apropiados para hacer tabletas, polvos, gránulos, cápsulas, jarabes, líquidos, suspensiones, etc. Por ejemplo, las formas orales sólidas de nepentesina o un derivado de la misma pueden estar preparadas con aditivos convencionales, desintegradores, lubricantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes y agentes aromatizantes. Los ejemplos no limitantes de excipientes incluyen lactosa, manitol, almidón de maíz, almidón de papa, celulosa cristalina, derivados de celulosa, acacia, almidón de maíz, carboximetilcelulosa de sodio, talco, estearato de magnesio, sabores y colores. En algunas modalidades de la descripción, la formulación libera nepentesina o un derivado de la misma en el estómago del paciente, de manera que el gluten puede ser degradado por la nepentesina o derivado de la misma.

La nepentesina o un derivado de la misma puede liofilizarse a partir de una solución acuosa opcionalmente en presencia de tampones apropiados (por ejemplo, tampones de fosfato, citrato, histidina, imidazol) y excipientes (por ejemplo, crioprotectores tales como sacarosa, lactosa, trehalosa). Los pasteles liofilizados pueden mezclarse opcionalmente con excipientes y hacerse en diferentes formas.

En otro aspecto de la descripción, se proporcionan los métodos para tratar la intolerancia al gluten o una afección asociada, tal como enfermedad celíaca, alergia al trigo, sensibilidad al gluten y dermatitis herpetiforme, en un paciente que lo necesite, que comprende tratar un alimento que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten con una cantidad efectiva de nepentesina o un derivado de la misma antes del consumo por parte del paciente. En algunas modalidades de la descripción, el alimento se combina con una cantidad efectiva de nepentesina o un derivado de la misma durante su preparación, preferentemente después de cualquier etapa de calentamiento.

En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma se administra como un aditivo alimenticio junto con un alimento que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten, tal como pan, pasta, cereal y similares, hechos de trigo, centeno y cebada, etc. En algunas modalidades de la descripción, se agrega nepentesina o un derivado de la misma como ingrediente en dicho alimento. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma se dispersa en un alimento antes del consumo, opcionalmente a un pH donde está inactivo, tal como un pH de aproximadamente 5 o superior. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma puede prepararse o incorporarse en un polvo, un producto para untar, un aerosol, una salsa, un baño, una crema batida, etc., que puede aplicarse al alimento que contiene gluten cuando la comida está siendo consumida por un paciente. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma puede convertirse en formas que apelan al apetito propio, tales como caramelos, chicles, suplementos dietéticos, jarabes, etc. para una fácil administración. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o un derivado de la misma puede mezclarse con alimentos comunes, tales como azúcar, sal, aderezos para ensaladas, especias, queso, mantequilla, margarinas, productos para untar, mantequilla, mantecas para freír, mayonesas, productos lácteos, mantequillas de nueces, mantequillas de semillas, mantequillas de almendra, mantequilla de maní, etc. Preferentemente, los alimentos o aditivos que comprenden nepentesina no requieren calentamiento antes de ser ingeridos por un paciente, de manera que la posible pérdida de actividad de la nepentesina o un derivado de la misma debido a la temperatura elevada pueda ser minimizada.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un producto alimenticio que comprende nepentesina o un derivado de la misma. En algunas modalidades de la descripción, el producto alimenticio comprende gluten o se sospecha que comprende gluten, tal como productos de panadería (por ejemplo, pasteles, magdalenas, rosquillas, pasteles, panecillos y pan), pastas, galletas, chips de tortilla, cereales, etc. hechos de trigo, centeno y cebada. En algunas modalidades de la descripción, el producto alimenticio puede consumirse con otro producto alimenticio que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten. Los ejemplos no limitantes de tales alimentos incluyen un polvo, un producto para untar, un aerosol, una salsa, una crema batida, dulces, goma de mascar, jarabe, azúcar, sal, aderezo para ensaladas, especias, queso, mantequilla, margarinas, productos para untar, mantequilla, manteca para freír, mayonesas, productos lácteos, mantequillas de nueces, mantequillas de semillas, mantequillas, mantequilla de maní, etc.

En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina o derivado de la misma se mezcla con alimentos, o se usa para tratar previamente alimentos que contienen gluten. La nepentesina presente en los alimentos puede ser enzimáticamente activa para reducir el nivel del gluten en los alimentos antes o durante la ingestión.

En algunas modalidades de la descripción, la composición (tal como la composición farmacéutica o composición comestible) o producto alimenticio 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 nepentesina. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina en la composición (tal como la composición farmacéutica o composición comestible) o producto alimenticio 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 el 85 %, aproximadamente el 90 %, o aproximadamente el 95 % de la composición total o producto alimenticio, o un rango entre dos de los valores (incluidos los puntos finales).

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición para optimizar la escisión de una proteína del gluten en un residuo de prolina, que comprende una mezcla de nepentesina I recombinante y nepentesina II recombinante. En un aspecto de la descripción, se proporciona una composición para optimizar la escisión de una proteína del gluten en un residuo de glutamina, que comprende una mezcla de nepentesina I recombinante y nepentesina II recombinante. En algunas modalidades de la descripción, la composición es al menos aproximadamente 20 %, 50 %, 2 veces, 5 veces o 10 veces más efectiva para escindir una proteína del gluten en un residuo de prolina en comparación con una composición que comprende una misma cantidad o concentración de ya sea nepentesina I o nepentesina II sola. En algunas modalidades de la descripción, la composición es al menos aproximadamente 20 %, 50 %, 2 veces, 5 veces o 10 veces más efectiva para escindir una proteína del gluten en un residuo de glutamina en comparación con una composición que comprende una misma cantidad o concentración de ya sea nepentesina I o nepentesina II sola.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición para optimizar la escisión de una proteína en un residuo de aminoácido, tal como H, K, R, D, E, S, T y/o N. En algunas modalidades de la descripción, la composición es al menos aproximadamente 20 %, 50 %, 2 veces, 5 veces o 10 veces más efectiva para escindir una proteína en un residuo o aminoácidos de aminoácidos dados en comparación con una composición que comprende una misma cantidad o concentración de nepentesina I o nepentesina II sola. En algunas modalidades de la descripción, la composición es al menos aproximadamente 10 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, 1400 veces, o 2000 veces o más, más efectiva en la escisión de una proteína en un residuo de aminoácido dado en comparación a una composición que comprende una misma cantidad o concentración de pepsina. En algunas modalidades de la descripción, el residuo es un residuo que puede escindirse con pepsina. En algunas modalidades de la descripción, el residuo es un residuo que no es escindido eficientemente por la pepsina.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición que comprende gluten fragmentado, en donde la composición se enriquece en fragmentos del gluten producidos por escisión del gluten en un residuo de prolina del gluten. En un aspecto de la descripción, se proporciona una composición que comprende gluten fragmentado, en donde la composición se enriquece en fragmentos del gluten producidos por escisión del gluten en un residuo de glutamina. En algunas modalidades de la descripción, los fragmentos del gluten producidos por la escisión del gluten en un residuo de prolina del gluten son al menos 2 veces, 5 veces o 10 veces los fragmentos del gluten producidos por la escisión del gluten en un residuo de prolina del gluten por una composición que comprende una misma cantidad o concentración de nepentesina I o nepentesina II sola. En algunas modalidades de la descripción, los fragmentos del gluten producidos por la escisión del gluten en un residuo de glutamina del gluten son al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces los fragmentos del gluten producidos por la escisión del gluten en un residuo de glutamina del gluten por una composición que comprende una misma cantidad o concentración de nepentesina I o nepentesina II sola.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición para optimizar la escisión de una proteína en otros residuos de aminoácidos, tal como H, K, R, D, E, S, T y/o N. En algunas modalidades de la descripción, los fragmentos de proteína producidos por la escisión de la proteína en un residuo o residuos de aminoácidos dados de la proteína son al menos 2 veces, 5 veces o 10 veces los fragmentos de proteína producidos por la escisión de la proteína en el residuo de aminoácido dado de la proteína mediante una composición que comprende una misma cantidad o concentración de nepentesina I o nepentesina II sola. En algunas modalidades de la descripción, los fragmentos de proteína producidos por la escisión de la proteína en un residuo de aminoácido dado de la proteína son al menos aproximadamente 10 veces, 50 veces, 500 veces, 1000 veces, 1400 veces o 2000 veces o mayor de los fragmentos de proteína producidos por la escisión de la proteína en el residuo de aminoácido dado de la proteína por una composición que comprende una misma cantidad o concentración de pepsina. En algunas modalidades de la descripción, el residuo es un residuo que puede escindirse con pepsina. En algunas modalidades de la descripción, el residuo es un residuo que no es escindido eficientemente por la pepsina.

Métodos de Preparación

La nepentesina puede concentrarse (o extraerse) o purificarse mediante métodos conocidos, tales como filtración o purificación por afinidad basada en pepstatina inmovilizada, de una fuente natural, tal como las secreciones de la jarra de plantas insectívoras tal como *Nepenthes*. La nepentesina I y II se encuentra en cantidades relativamente pequeñas en las secreciones naturales de las plantas. La producción de nepentesina I y/o nepentesina II puede aumentarse, por ejemplo, mediante el uso de tecnologías de bioingeniería para crear plantas transgénicas que expresen y/o secreten cantidades aumentadas de nepentesina I o nepentesina II, o un derivado de la misma.

Además de aislarse de una fuente vegetal, la nepentesina tal como la nepentesina I y/o la nepentesina II o un derivado de la misma puede prepararse por síntesis química. La síntesis química puede lograrse mediante el acoplamiento de los aminoácidos de acuerdo con la secuencia de la nepentesina. Varios métodos de acoplamiento de péptidos y aparatos sintéticos de péptidos comerciales están disponibles para sintetizar péptidos o proteínas, por ejemplo, sintetizadores automáticos de Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, Beckman y otros fabricantes.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para preparar nepentesina mediante el uso de sistemas de producción recombinantes mediante la transformación o transfección de una célula con el ADN y/o el ARN mensajero de la nepentesina para que la célula sea capaz de producir nepentesina. Por ejemplo, la nepentesina puede producirse mediante el establecimiento de sistemas huésped-vector en organismos tales como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Lactobacillus*, Bacilli, Aspergilli y cultivos de células vegetales, tal como células de tabaco, etc.

También se describen los vectores y células huésped, tales como *E. coli*, que comprenden polinucleótidos y composiciones que contienen cualquiera de los polinucleótidos o polipéptidos.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para producir nepentesina recombinante tal como nepentesina I y/o nepentesina II o un derivado de la misma que comprende expresar en un organismo huésped elegido una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha nepentesina u homólogo de la misma, e insertar la secuencia de ácido nucleico en un vector diseñado apropiadamente. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es nepentesina I o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es nepentesina II o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es una mezcla de nepentesina I y nepentesina II o derivados 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 un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es nepentesina I o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es nepentesina II o un derivado de la misma. En un aspecto de la descripción, la nepentesina recombinante es una mezcla de nepentesina I y nepentesina II o derivados de las mismas.

La nepentesina tiene dos isoformas conocidas: nepentesina I (se sabe que tiene dos variantes, nepentesina Ia y nepentesina Ib) y II. Las secuencias de la nepentesina y la secuenciación de nucleótidos del ADNc que codifica la nepentesina son conocidas en la técnica, por ejemplo, descritas en Athauda SB y otros, Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases, *Biochem. J.* 381:295-306 (2004). Se han descrito secuencias de ARNm de la nepentesina I de varias especies, por ejemplo, *Nepenthes mirabilis* (Número de Acceso de GenBank JX494401), *Nepenthes gracilis* (Número de Acceso de GenBank AB114914) y *Nepenthes alata* (Número de Acceso de GenBank AB266803). Se han descrito secuencias de ARNm de la nepentesina de varias especies, por ejemplo, *Nepenthes mirabilis* (Número de Acceso de GenBank JX494402), *Nepenthes gracilis* (Número de Acceso de GenBank AB114915) y *Zea mays* (Número de Acceso de GenBank NM_001147869). Se han descrito secuencias de proteínas de la nepentesina I de varias especies, por ejemplo, *Nepenthes mirabilis* (Número de Acceso de GenBank k AFV26024), *Nepenthes gracilis* (Número de Acceso de GenBank BAD07474), *Nepenthes alata* (Número de Acceso de GenBank BAF98915) y *Zea mays* (Secuencia de Referencia NCBI: NP_001150925). Se han descrito secuencias de proteínas de la nepentesina II de varias especies, por ejemplo, *Nepenthes mirabilis* (Número de Acceso de GenBank AFV26025), *Nepenthes gracilis* (Número de Acceso de GenBank BAD07475) y *Zea mays* (Secuencia de Referencia NCBI: NP_001149229). Se ha descrito una proteína nepentesina I putativa para *Oryza sativa* (Número de Acceso de GenBank BAD38020). Se ha descrito una proteína nepentesina II putativa para *Oryza sativa* (Número de Acceso de GenBank BAD82000).

La alineación de secuencia de las proteínas nepentesina conocidas (y las proteínas putativas) se muestra en la Figura 9, con las puntuaciones de alineación por pares correspondientes en la Tabla 1. En la Figura 10 se muestra un árbol filogenético que representa los datos. Athauda y col. además, compara las nepentesinas con las proteasas aspárticas típicas relacionadas. Athauda y col. predijo la estructura del esqueleto de la nepentesina Ia basándose en la estructura de la pepsina porcina A (se predijo que la nepentesina Ib y II serían esencialmente las mismas que la nepentesina Ia). Los residuos putativos catalíticos de ácido aspártico se conservaron con base a este análisis.

En algunas modalidades de la descripción, la biosíntesis de nepentesina puede lograrse al transformar una célula con un vector que comprende un ADNc que codifica la nepentesina I, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1, Número de Acceso de GenBank JX494401, Número de Acceso de GenBank AB114914 o Número de Acceso de GenBank AB266803. En algunas modalidades de la descripción, la biosíntesis de nepentesina puede lograrse al

transformar una célula con un vector que comprende una secuencia homóloga a un ADNc que codifica la nepentesina I, cuya secuencia codifica una proteína con actividad de proteasa. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 60 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 70 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 80 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 85 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 90 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 95 % de homología a un ADNc que codifica la nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 96 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 97 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 98 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina I. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 99 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina I.

En algunas modalidades de la descripción, la biosíntesis de nepentesina puede lograrse al transformar una célula con un vector que comprende un ADNc que codifica la nepentesina II, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del Número de Acceso de GenBank JX494402 o del Número de Acceso de GenBank AB114915. En algunas modalidades de la descripción, la biosíntesis de nepentesina puede lograrse al transformar una célula con un vector que comprende una secuencia homóloga a un ADNc que codifica la nepentesina II, cuya secuencia codifica una proteína con actividad de proteasa. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 60 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 70 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 80 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 85 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 90 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 95 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 96 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 97 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 98 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina II. La secuencia puede tener al menos aproximadamente 99 % de homología con un ADNc que codifica la nepentesina II.

La nepentesina sintética tal como la nepentesina I y/o la nepentesina II o un derivado de la misma puede concentrarse o purificarse de acuerdo con métodos conocidos, tales como aquellos para aislar la nepentesina o un derivado de la misma del líquido de la planta insectívora.

En algunas modalidades de la descripción, el producto proteico aislado de una fuente natural o una fuente sintética comprende al menos 20 % en peso de nepentesina o un derivado de la misma. En algunas modalidades de la descripción, el producto de proteína aislado comprende al menos aproximadamente 50 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % en peso de nepentesina o un derivado de la misma. En algunas modalidades de la descripción, el producto de proteína aislado comprende al menos el 99 % en peso de nepentesina o un derivado de la misma.

En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende sustancialmente solo nepentesina I. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende sustancialmente solo nepentesina II. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 100:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 90:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 70:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 60:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 50:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 40:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 30:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 20:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 10:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 5:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 4:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 3:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 2:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:1. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina recombinante comprende una relación de nepentesina I a nepentesina II de al menos aproximadamente 1:2. En algunas modalidades de la descripción, la nepentesina

II. En algunas modalidades de la descripción, el producto proteico comprende la nepentesina o un derivado de la misma con al menos aproximadamente 40 % de la actividad de proteasa original de la nepentesina II. En algunas modalidades de la descripción, el producto proteico comprende la nepentesina o un derivado de la misma con al menos aproximadamente 50 % de la actividad de proteasa original de la nepentesina II. En algunas modalidades de la descripción, el producto proteico comprende la nepentesina o un derivado de la misma con al menos aproximadamente el 60 % de la actividad de proteasa original de la nepentesina II. En algunas modalidades de la descripción, el producto proteico comprende la nepentesina o un derivado de la misma con al menos aproximadamente el 70 % de la actividad de proteasa original de la nepentesina II. En algunas modalidades de la descripción, el producto proteico comprende la nepentesina o un derivado de la misma con al menos aproximadamente el 80 % de la actividad de proteasa original de la nepentesina II. En algunas modalidades de la descripción, el producto proteico comprende la nepentesina o un derivado de la misma con al menos aproximadamente 90 % de la actividad de proteasa original de la nepentesina II. En algunas modalidades de la descripción, el producto proteico comprende la nepentesina o un derivado de la misma con más de aproximadamente el 100 % de la actividad de proteasa original de la nepentesina II.

III. Ejemplos

A menos que se indique de cualquier otra manera, las abreviaturas usadas en toda la descripción tienen los siguientes significados:

g = gramo
kDa = kiloDalton
kg = kilogramo
l = litro
LC = cromatografía líquida
mg = miligramo
min = minuto
ml = mililitro
mM = milimolar
MS = espectrometría de masas
nM = nanomolar
pM = picomolar
s.d. = desviación estándar
μCi = microcurie
μg microgramo
μL = microlitro
μM = micromolar
μm = micrómetro
°C = grado Celsius

Estos símbolos de una letra tienen el siguiente significado 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
L = Leucina
K = Lisina
M = Metionina
F = Fenilalanina
P = Prolina
S = Serina
T = Treonina
W = Triptófano
Y = Tirosina
V = Valina

Ejemplo 1

Preparación del Extracto de Nepentesina

Sustancias Químicas

El agua y el acetonitrilo, el HPLC de Burdick y Jackson, se compraron de VWR. El ácido fórmico, Tris, glicina se compraron de Sigma Aldrich.

Cultivo de plantas

Los trasplantes de *Nepenthes rafflesiana*, *Nepenthes ampularia*, *Nepenthes mirabilis* y *Nepenthes globosa* se compraron de Keehns Carnivores (<http://www.keehnscarnivores.ca>). Estos fueron en macetas con corteza de madera, perlita, turba y humus (40, 35, 10, 5 % respectivamente). Las condiciones de crecimiento implicaron 14 horas de luz por día, 80 % de humedad y temperatura en el intervalo de 23-28 °C con 2 a 3 riegos por semana. Tras la madurez de la planta insectívora, las plantas se alimentaron con una o dos *Drosophila* por jarra y el fluido de la jarra se cosechó una semana después. Las jarras y sus secreciones se dejaron recuperar durante una semana antes de una segunda ronda de alimentación y extracción.

Preparación del extracto

Se colectó el fluido de la jarra de las cuatro especies de plantas y se combinó. El fluido crudo de la jarra se clarificó primero a través de un filtro de 0,22 µm, luego se concentró de 80 a 100 veces mediante el uso de un filtro con valor corte de 10 kDa de peso molecular Amicon Ultra centrífugo (ambos de Millipore). Antes de su uso en digestiones, el concentrado se activó con ácido con 100 mM de Glicina HCl (pH 2,5) durante 3 horas, luego se lavó 3 veces con 100 mM de Glicina HCl (pH 2,5) en el dispositivo de filtración, mediante el uso de un volumen de fluido 10X para cada lavado). El aislado final se volvió a diluir a una concentración de 11X con base en el muestreo original del fluido de la jarra.

Caracterización del extracto del fluido de la Jarra

Las secreciones fluidas de la planta insectívora se concentraron y las enzimas de digestión se activaron por reducción de pH (pH 2,5). El impacto del proceso de enriquecimiento y la activación en el proteoma del fluido se determinó mediante el uso de métodos proteómicos. Primero, para confirmar la presencia de la enzima nepentesina, el concentrado inactivo se separó por SDS-PAGE. Siete zonas de gel contiguas con tinción muy débil de coomassie se digirieron con tripsina y se analizaron mediante nanoLCMS/MS mediante el uso de métodos estándar. No se espera que sea un catálogo completo del proteoma fluido activado, pero el análisis confirmó la presencia de la proteasa aspártica nepentesina I/II, así como también una glucanasa, quitinasa, carboxipeptidasa y peroxidasa de origen vegetal, más niveles modestos de *Drosophila* y contaminación bacteriana. La baja complejidad del proteoma del fluido es consistente con 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 (Epub 15 de Junio de 2012), pero la nepentesina-I se encontró distribuida en un intervalo de masas mucho más amplio en este análisis (40-70 kDa). El fluido activado con ácido se procesó y analizó de manera similar. El proceso de activación redujo el rendimiento proteico global y también pareció simplificar la composición. Además de nepentesina-I, solo se evidencia una contaminación menor de queratina y actina. Estos análisis apuntan a la baja complejidad del fluido enriquecido, donde la nepentesina es el componente principal. La concentración de proteína total del fluido activado y enriquecido 80X se midió mediante un ensayo de BCA para ser 22 ng/µL. Este valor es consistente con un estudio anterior que describe el enriquecimiento del fluido. Tokes ZA, y otros, Digestive Enzymes Secreted by Carnivorous Plant *Nepenthes-Macfarlanei*-L. *Planta* 119(1):39-46 (1974).

Ejemplo 2

Mapeo de las Digestiones de Proteínas por Extracto de Pepsina y Nepentesina

Mapeo de la digestión de nepentesina por espectrometría de masas

El extracto de nepentesina se preparó como en el Ejemplo 1.

Las digestiones de proteínas se llevaron a cabo en solución mediante el uso de un sistema de muestreo automático y dispensador LEAP HTX-PAL diseñado para aplicaciones de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX), y los datos se colectaron con un espectrómetro de masas AB Sciex Triple-TOF 5600 QqTOF. Los péptidos se identificaron mediante el uso de Mascot (v2.3) a partir de datos de MS/MS. Brevemente, se mezclaron 8 µL de proteína 8 µM (dominios XCTCC4, XLF, Ligasa IV-tándem BRCT, PNK, mioglobina o citocromo C) con 10 µL de fluido concentrado 11x durante 2 minutos a 10 °C. La mioglobina y el citocromo C se compraron de Sigma. Después de la dilución a una concentración de sustrato de 1 µM, se inyectaron 15 µL en el sistema de LC de fase reversa frío (4 °C) conectado al espectrómetro de masas. Los péptidos quedaron atrapados en una identificación de 5 cm y 200 µm i.d. Columna monolítica Onyx C18 (Phenomenex Inc.) y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo del 3 % al 40 % en 10 minutos. Los péptidos detectados en estos análisis se seleccionaron para la fragmentación por CID en adquisiciones múltiples dependientes de información de espectros MS/MS, similar a la estrategia de fraccionamiento en fase gaseosa. Blonder J, y otros, Proteomic investigation of natural killer cell microsomes using gas-phase fractionation by mass spectrometry.

Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 1698(1):87-95 (2004). Se buscaron espectros frente a una base de datos en miniatura que contenía las secuencias para las seis proteínas. Los resultados de la secuencia fueron verificados manualmente.

5 Resultados

Se digirieron una serie de proteínas con el fluido enriquecido bajo condiciones adecuadas para experimentos HDX-MS. La especificidad de la digestión del concentrado se caracterizó en las posiciones PI y P1' (Figura 1), para respaldar una comparación con estudios similares aplicados a la pepsina. Hamuro Y, y otros, Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. Rapid Communications in Mass Spectrometry 22(7):1041-1046 (2008). En este ejemplo, la relación enzima/sustrato fue 1:85 con base en el supuesto de que toda la proteína medida en el fluido enriquecido es la nepentesina, a pesar de que algunas proteínas contaminantes estaban obviamente presentes.

Los datos de la nepentesina representan una evaluación de 1612 residuos y, aunque no son tan extensos como los datos de correspondientes de la pepsina (13 766 residuos), la diversidad de secuencias es suficientemente alta en el conjunto de proteínas para garantizar una comparación a nivel de las posiciones PI y P1'. La mayor especificidad para la pepsina parece estar en la posición PI. Presenta una escisión de alta eficiencia para los residuos hidrofóbicos F, L y M, pero la escisión después de P, H, K y R está esencialmente prohibida. La nepentesina se escinde después de la mayoría de los residuos con la excepción de G, S, T, V, I y W. Es compatible con una alta tasa de escisión después de los residuos esperados de pepsina P1, pero también en los residuos prohibidos en la digestión de pepsina, especialmente K, R y P En la posición P1', la pepsina muestra una preferencia por los residuos hidrofóbicos en general, incluido cualquier residuo con aromaticidad. Por el contrario, la nepentesina demuestra poca selectividad en la posición P1', excepto quizás contra G, P y H. En general, la nepentesina demuestra una especificidad significativamente relajada en la posición PI en relación con la pepsina, y proporciona una indicación de muy alta eficiencia.

25 Ejemplo 3

Mapeo de las Digestiones de la Proteína Multidominio, XRCC4, por Extracto de Pepsina y Nepentesina

30 Intercambio de HD de un complejo involucrado en la reparación de daños en el ADN

El extracto de nepentesina se preparó como en el Ejemplo 1.

Las soluciones de reserva de XRCC4 (1-200) con BRCT y XRCC4 (longitud total) con BRCT se diluyeron en tampón (10 mM de Tris-HCl, pH 7,5) a concentraciones equimolares (10 μ M) y se incubaron a 4 °C durante un mínimo de 30 min para promover la formación del complejo. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta el análisis HDX. Las alícuotas se deuteraron durante 2 min a 20 °C con la adición de D₂O (25 % v/v). Luego se digirieron alícuotas de dos maneras. En la primera estrategia de digestión, la deuteración de proteínas se inactivó al agregar la muestra para enfriar a 100 mM de glicina-HCl (pH 2,5), y la solución de proteína inactivada se inyectó en un microrreactor de pepsina. Este microrreactor se instaló en el sistema HTX-PAL entre la válvula del inyector y la columna C18. Las proteínas digeridas se capturaron en la columna capilar monolítica C18 y se eluyeron en el espectrómetro de masas. Todos los elementos fluidicos, incluido el microrreactor, se enfriaron a 4 °C para minimizar el intercambio de deuterio durante el tiempo de análisis (<15 min). En la segunda estrategia de digestión, una cantidad equivalente de proteína deuterada fue apagada y digerida simultáneamente con 3 o 5 μ L de fluido nepentes 11X durante 3 o 5 minutos, respectivamente, a 10 °C. La muestra se inyectó en el sistema LC frío conectado al espectrómetro de masas.

Se realizaron mediciones de desplazamiento de masa por réplicas (4 o más) y se hizo referencia a ellas para controlar los estados proteicos: XRCC4 libre (1-200), XRCC4 libre (longitud total) y LigIV-BRCT libre. El nivel promedio de deuterio para cada péptido se determinó mediante el uso de Mass Spec Studio (manuscrito en preparación), que es una reconstrucción de Hydra v1.5. Slys GW, y otros, Hydra: software for tailored processing of H/D exchange data from MS or tandem MS analyses. BMC Bioinformatics 10 (2009). Las perturbaciones en los cambios de masa se consideraron significativas si (a) pasaron una prueba t de dos colas ($p < 0,05$) mediante el uso de las desviaciones estándar agrupadas de los análisis de cada estado, (b) pasaron un análisis de distribución para evitar la superposición espectral y (c) excedieron un valor de cambio de umbral (± 2 s.d.) con base en una medición del ruido de cambio y asumiendo su distribución normal Bennett MJ, y otros, Discovery and Characterization of the Laulimalide-Microtubule Binding Mode by Mass Shift Perturbation Mapping. Chemistry & Biology 17(7):725-734 (2010).

Resultados

Para determinar si la especificidad relajada se traduce en una mejora en el mapeo de las secuencias para aplicaciones HDX-MS, se perfiló XRCC4 de longitud completa, una proteína que contiene un dominio globular y un tallo helicoidal extendido, y un C-terminal largo desordenado. Hammel M, y otros, XLF Regulates Filament Architecture of the XRCC4. Ligase IV Complex. Structure 18(11):1431-1442 (2010); y Junop MS, y otros, Crystal structure of the Xrcc4 DNA repair protein and implications for end joining. Embo J 19(22):5962-5970 (2000). Tales proteínas multidominio son difíciles de abarcar en un solo protocolo de digestión y, en particular, las regiones intrínsecamente desordenadas tienden a digerir mal con pepsina, ya que están relativamente agotadas en residuos hidrofóbicos y enriquecidas en prolina y

residuos cargados. Dunker AK, y otros. Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 19(1):26-59 (2001). Los mapas de la pepsina y la nepentesina para esta proteína se muestran en la Figura 2. En esta comparación, se realizó un mapeo exhaustivo para ambas enzimas, mediante el uso de un intervalo de diferentes cantidades de proteasas, y experimentos recursivos de MS/MS. La nepentesina proporciona una cobertura superior de la proteína de longitud completa: 357 péptidos para la nepentesina (barras de color gris oscuro) en comparación con 187 para la pepsina (barras de color gris claro). (La longitud promedio del péptido de 11 residuos fue la misma para ambas enzimas). Ambas enzimas representan las regiones globular y del tallo con una gran cantidad de péptidos superpuestos, pero la complementariedad proporcionada por la nepentesina es evidente. Por ejemplo, la nepentesina ofrece una cobertura considerablemente más profunda de una región de lámina β en el dominio globular (residuos 1-30). La región C-terminal desordenada también está cubierta en mayor medida y a un nivel de redundancia considerablemente más alto. Cada residuo en esta región de cola desordenada recibe una cobertura de 16X mediante el uso de la nepentesina y solo una cobertura de 4,7X con la pepsina.

La existencia de cualquier sesgo en la detección de los péptidos se explora al seleccionar la puntuación promedio de búsqueda como la métrica (Figura 3). El enfoque enfatiza la confianza en la identificación de la secuencia como el medio principal por el cual se definen los mapas de secuencia. Un delineador es R. Las puntuaciones más altas para los péptidos que terminan en R probablemente reflejan una combinación de mayor intensidad promedio de péptidos y mejor fragmentación, lo cual es consistente con lo que sabemos de la proteómica ascendente basada en tripsina. Warwood S, y col. Guanidination chemistry for qualitative and quantitative proteomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20(21):3245-3256 (2006).

Ejemplo 4

Digestión de XRCC4 con Varias Relaciones de Enzima a Sustrato

La eficiencia de la enzima se examinó con mayor detalle. En la Figura 4 se muestra el grado en que el mapa de masa peptídica podría variarse o ajustarse simplemente al alterar la relación enzima/sustrato. La carga de nepentesina se varió en un intervalo de 50 veces para las digestiones en solución. Para el experimento con la pepsina, se usó pepsina inmovilizada en un formato de suspensión en lugar de pepsina libre para evitar una extensa autólisis de la pepsina. La carga enzimática se varió en un intervalo de 8 veces; cantidades menores condujeron a intensidades peptídicas pobres y cantidades mayores no tuvieron efecto en el mapa. Se descubrió que la nepentesina generaba un perfil de autólisis muy bajo incluso en las cargas más altas. Se usó un cromatograma de iones peptídicos agregados (PIC) como medida de la digestión efectiva. La comparación de las distribuciones relativamente similares encontradas en 0,38:1 (nepentesina: sustrato) con 520:1 (pepsina:sustrato) representa una mejora notable de 1400 veces en la eficiencia de la nepentesina sobre la pepsina en aplicaciones similares a HDX.

La digestión de la nepentesina podría ajustarse más fácilmente de fragmentos grandes a pequeños al variar la carga enzimática y generar una representación variable de XRCC4. Esto se demuestra en la Figura 4A por la transición en el PIC de tiempos de retención largos a baja carga a tiempos de retención cortos a alta carga. Esta transición se correlacionó con la longitud media del péptido para los péptidos más abundantes que cambian de >12 a baja carga enzimática a 10 a alta carga enzimática. Por el contrario, la carga variable de pepsina no alteró significativamente el PIC o la longitud promedio del péptido (Figura 4B). Un microrreactor de pepsina de flujo forzado puede mejorar la sintonización, pero probablemente no generará fragmentos más pequeños.

Ejemplo 5

Digestión de Gliadina por Extracto de Nepentesina

Las digestiones de gliadina por la nepentesina se realizaron en solución mediante el uso de un automuestreador LEAP HTX-PAL y un sistema de dispensación diseñado para aplicaciones de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX). Los datos se colectaron mediante el uso de un espectrómetro de masas AB Sciex Triple-TOF 5600 QqTOF. Los péptidos se identificaron mediante el uso de Mascot (v2.3) a partir de datos de MS/MS. En resumen, se mezclaron 12 pmoles de gliadina cruda (comprada en Sigma Aldrich) con 2 μ L de extracto concentrado 100x, producido como se describió en el Ejemplo 1. Después de la digestión, se inyectó todo el volumen en un sistema LC de fase reversa conectado al espectrómetro de masas. Los péptidos quedaron atrapados en una identificación de 7 cm y 150 μ m i.d. Columna Magic C18 y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo del 10 % al 40 % de 10 o 30 minutos. Los péptidos detectados en estos análisis se seleccionaron para la fragmentación de CID en adquisiciones múltiples dependientes de información de espectros MS/MS. Se buscaron espectros en una base de datos en miniatura que contenía las secuencias de todas las proteínas gliadina de trigo (α , β , γ , ω) identificadas más la glutenina de bajo y alto peso molecular. La Figura 5 muestra la longitud promedio de todos los péptidos identificados a partir de la digestión con la nepentesina de la gliadina del trigo, mediante el uso de LC-MS/MS, después de 1, 5, 10, 15, 30, 60, 130, 360 u 810 minutos a 37 °C. Se usó un límite de confianza del 95 % ($p < 0,05$) en las puntuaciones para eliminar la identificación de falsos positivos. La desviación estándar relativa de la longitud del péptido se muestra en la figura insertada.

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

La Figura 7 muestra los mismos datos que la Figura 5, como una probabilidad de obtener una cierta longitud después de una digestión de 10, 60, 120, 360 u 810 minutos a 37 °C.

5 Ejemplo 6

Purificación del Extracto de Nepentesina

Purificación del extracto

10 La pepstatina inmovilizada con sefarosa en una columna ID de 50 x 2 cm se equilibró en 20 mM de Glicina-HCl, pH 2,5-3. El fluido de la jarra filtrado (preparado como se describió en el Ejemplo 1) se sometió a un ciclo dos veces a través de la columna, y la columna se lavó con 100 ml de tampón de equilibrio (20 mM de glicina HCl, pH 2,5). La columna se eluyó con bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8,7 y se colectaron las fracciones. Para preservar la actividad enzimática máxima, el pH se redujo a 4 justo después de la recolección de la fracción con glicina HCl 2 M, pH 2,5. La actividad se verificó mediante el uso de un ensayo de digestión, y las fracciones más activas se combinaron y concentraron hasta aproximadamente 80x, con base al volumen de fluido original.

20 Ejemplo 7

Nepentesina I Recombinante

El gen para la nepentesina I (véase la SEQ ID NO: 1; que codifica los residuos de aminoácidos 20-413, de *N. gracilis*, sin la secuencia señal de la planta) se preparó a partir del ADNc de la nepentesina I, y se colocó entre los sitios de restricción NdeI y HindIII. Esta secuencia se clonó en el pET21a, mediante el uso de la ADN ligasa T4 (1 U) (New England Bio, NEB), el tampón de la ADN ligasa T4 (NEB), ATP (0,5 mM) (NEB), 0,5 µg de vector pET21a y 2 µg del ADNc de la nepentesina I. Esto 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 por choque térmico (45 segundos a 42 °C, luego inmediatamente en hielo, con 1 ml de medio LB) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C, y se sembraron en placa con antibióticos (tetraciclina y ampicilina). Después de confirmar la presencia del gen en varias colonias blancas, se eligió una colonia representativa para maxiprep. El plásmido recombinante resultante pET21a/R.NepI se transformó en *E. coli* C41 por choque térmico como anteriormente, para expresión bajo inducción por IPTG. Aquí, las células se hicieron crecer hasta un OD₆₆₀ de 0,6 y se indujeron con 0,1 mM de IPTG durante cuatro horas a 37 °C. La proteína expresada fue a cuerpos de inclusión.

35 Los cuerpos de inclusión se aislaron de la siguiente manera. Se centrifugaron las células, se añadió tampón de lisis de sacarosa (25 % sacarosa, 50 mM de TrisCl pH 7,4, 1 mM de EDTA, 1 mM de NaN₃, e inhibidores de proteasas), y las células se sometieron a cuatro rondas de congelación/descongelación y sonicación. Esto fue seguido por la adición de ADNasa y ARNasa durante 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. La preparación 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 Tritón (50 mM de TrisCl pH 7,4, 10 mM de NaCl, 1 mM de β-mercaptoetanol, 1 mM de NaN₃, 0,5 % de Tritón X100 + inhibidores de proteasas) y sonicación realizada en hielo. Esto se centrifugó una vez más, para sedimentar los cuerpos de inclusión, y el sedimento se lavó dos veces sobre hielo (con mezcla y sonicación) en un tampón libre de Tritón (50 mM de TrisCl, pH 7,4, 10 mM de NaCl, 1 mM de β-mercaptoetanol, 1 mM de NaN₃, inhibidores de proteasas).

El sedimento de proteínas se sometió luego a plegamiento de nuevo. Se suspendió 1 g de cuerpos de inclusión en 1 l de 50 mM de CAPS pH 10,5, 8 M de urea, 1 mM de EDTA, 1 mM de glicina, 500 mM de NaCl, 300 mM de β-mercaptoetanol y se agitó durante 1 hora. La suspensión se dializó contra 50 mM de Tris, pH 11, dos veces durante 1 hora a la vez, seguido de un día de diálisis contra 50 mM de Tris, pH 7,5, y finalmente, diálisis contra tampón fosfato con 300 mM de NaCl, pH 7,0.

La solución se centrifugó a alta velocidad (10 000 x g durante 15 minutos) para eliminar cualquier 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 plegada activada, que comienzan desde 1 l de cultivo celular.

Ejemplo 8

60 Nepentesina II Recombinante

El ADNc de la nepentesina II (de *N. gracilis*, sin la secuencia señal de la planta) se usó para preparar el ADNc de la nepentesina II. Esta secuencia se clonó en el pET21a entre los sitios de restricción NdeI y HindIII, mediante el uso de la ADN ligasa T4 (1 U) (New England Bio, NEB), el tampón de ADN ligasa T4 (NEB), ATP (0,5 mM) (NEB), 0,5 µg del vector pET21a y 2 µg del ADNc de la nepentesina II. Esto 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 por choque térmico (45 segundos a 42 °C, luego inmediatamente en hielo, con 1 ml de medio LB) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C, y se sembraron en placa con antibióticos (tetraciclina y ampicilina). Después de confirmar la presencia del gen en varias colonias blancas, se eligió una colonia representativa para maxiprep. El plásmido recombinante resultante pET21a/R.Nepl se transformó en *E. coli* C41 por choque térmico como anteriormente, para expresión bajo inducción por IPTG. Aquí, las células se hicieron crecer hasta un OD₆₆₀ de 0,6 y se indujeron con 0,1 mM de IPTG durante cuatro horas a 37 °C. La proteína expresada fue a cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión se aislaron de la siguiente manera. Se centrifugaron las células, se añadió tampón de lisis de sacarosa (25 % de sacarosa, 50 mM de TrisCl pH 7,4, 1 mM de EDTA, 1 mM de NaN₃, e inhibidores de proteasas), y las células se sometieron a cuatro rondas de congelación/descongelación y sonicación. Esto fue seguido por la adición de ADNasa y ARNasa durante 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. La preparación 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 Tritón (50 mM de TrisCl pH 7,4, 10 mM de NaCl, 1 mM de β-mercaptoetanol, 1 mM de NaN₃, 0,5 % de Tritón X 100 + inhibidores de proteasas) y la sonicación se realizó en hielo. Esto se centrifugó una vez más, para sedimentar los cuerpos de inclusión, y el sedimento se lavó dos veces sobre hielo (con mezcla y sonicación) en un tampón libre de Tritón (50 mM de TrisCl, pH 7,4, 10 mM de NaCl, 1 mM de β-mercaptoetanol, 1 mM de NaN₃, inhibidores de proteasas).

El sedimento de proteínas se sometió luego a plegamiento de nuevo. Se suspendió 1 g de cuerpos de inclusión en 1 l de 50 mM de CAPS pH 10,5, 8 M de urea, 1 mM de EDTA, 1 mM de glicina, 500 mM de NaCl, 300 mM de β-mercaptoetanol y se agitó durante 1 hora. La suspensión se dializó contra 50 mM de Tris pH 11 dos veces durante 1 hora a la vez, seguido de un día de diálisis contra 50 mM de Tris pH 7,5, y finalmente, diálisis contra tampón fosfato con 300 mM de NaCl, pH 7,0.

La solución se centrifugó a alta velocidad (10 000 x g durante 15 minutos) para eliminar cualquier 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 plegada activada, que comienzan desde 1 l de cultivo celular.

Ejemplo 9

Mapeo de las Digestiones de Gliadina por la Nepentesina

El extracto de nepentesina se preparó como se describió en el Ejemplo 1. El extracto de nepentesina purificado se preparó como se describió en el Ejemplo 6. La nepentesina recombinante I se preparó como se describió en el Ejemplo 7.

La digestión con gliadina se realizó como se describió en el Ejemplo 5, excepto que la relación de sustrato a enzima fue de aproximadamente 1000:1. La gliadina se digirió a 37 °C durante 2 horas con extracto de nepentesina, extracto de nepentesina purificado o nepentesina I recombinante.

La gliadina es una clase de proteínas que se encuentran en el trigo y otros granos de cereales. Las gliadinas están altamente enriquecidas en residuos de prolina y glutamina. Se determinó que la nepentesina I recombinante digiere la proteína gliadina de manera muy efectiva a pH 2-3. La preferencia de escisión por PI de la nepentesina I recombinante es muy similar a la del extracto fluido concentrado, así como también a la fracción purificada del extracto (Figura 8A). Sorprendentemente, el extracto mostró una mayor preferencia por la glutamina que el extracto purificado o la nepentesina I recombinante.

La preferencia de escisión por PI de la nepentesina I recombinante es muy similar a la del extracto fluido concentrado, así como también a la fracción purificada del extracto (Figura 8B). Sorprendentemente, el extracto mostró una mayor preferencia por la prolina que el extracto purificado o la nepentesina I recombinante.

El extracto contiene tanto nepentesina I como II, pero la estrategia de purificación recupera la nepentesina II mucho menos activa que la nepentesina I. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que la escisión aumentada en la posición P1 de glutamina y la posición P1' de prolina por el extracto se debe a la nepentesina II y/o a la sinergia entre la nepentesina I y la nepentesina II.

Ejemplo 10

Comparación de proteínas nepentesina

Las secuencias conocidas y putativas de proteínas de las proteínas nepentesina se alinearon mediante el uso de Clustal 2.1 Multiple Sequence Alignment. Las secuencias de la nepentesina I fueron: *Nepenthes mirabilis* (Número de Acceso de GenBank AFBV26024), *Nepenthes gracilis* (Número de Acceso de GenBank BAD07474), *Nepenthes alata* (Número de Acceso de GenBank BAF98915), *Zea mays* (Secuencia de Referencia de NCBI: NP_001150925) y *Oryza sativa* (Número de Acceso de GenBank BAD38020). Las secuencias de la nepentesina II fueron: *Nepenthes mirabilis*

(Número de Acceso de GenBank AFV26025), *Nepenthes gracilis* (Número de Acceso de GenBank BAD07475), *Zea mays* (Secuencia de Referencia de NCBI: NP_001149229) y *Oryza sativa* (Número de Acceso de GenBank BAD82000). La alineación resultante se muestra en la Figura 9. La Figura 10 muestra un árbol filogenético que indica la relación de las proteínas nepentesina entre diferentes especies. La Tabla 1 muestra las puntuaciones de la alineación por pares entre cada secuencia.

Tabla 1

	Secuencia 1	Secuencia 2	Puntuación
10	Nepentesina I de N. mirabilis	Nepentesina II de N. mirabilis	65
	Nepentesina I de N. mirabilis	Nepentesina I de N. gracilis	94
15	Nepentesina I de N. mirabilis	Nepentesina II de N. gracilis	66
	Nepentesina I de N. mirabilis	Nepentesina I de N. alata	99
	Nepentesina I de N. mirabilis	Nepentesina I de O. sativa	39
20	Nepentesina I de N. mirabilis	Nepentesina II de O. sativa	24
	Nepentesina I de N. mirabilis	Nepentesina I de Z. mays	39
	Nepentesina I de N. mirabilis	Nepentesina II de Z. mays	26
25	Nepentesina II de N. mirabilis	Nepentesina I de N. gracilis	64
	Nepentesina II de N. mirabilis	Nepentesina II de N. gracilis	96
	Nepentesina II de N. mirabilis	Nepentesina I de N. alata	65
30	Nepentesina II de N. mirabilis	Nepentesina I de O. sativa	37
	Nepentesina II de N. mirabilis	Nepentesina II de O. sativa	24
	Nepentesina II de N. mirabilis	Nepentesina I de Z. mays	36
35	Nepentesina II de N. mirabilis	Nepentesina II de Z. mays	23
	Nepentesina I de N. gracilis	Nepentesina II de N. gracilis	66
	Nepentesina I de N. gracilis	Nepentesina I de N. alata	94
40	Nepentesina I de N. gracilis	Nepentesina I de O. sativa	40
	Nepentesina I de N. gracilis	Nepentesina II de O. sativa	25
	Nepentesina I de N. gracilis	Nepentesina I de Z. mays	38
45	Nepentesina I de N. gracilis	Nepentesina II de Z. mays	26
	Nepentesina II de N. gracilis	Nepentesina I de N. alata	66
	Nepentesina II de N. gracilis	Nepentesina I de O. sativa	38
50	Nepentesina II de N. gracilis	Nepentesina II de O. sativa	27
	Nepentesina II de N. gracilis	Nepentesina I de Z. mays	39
	Nepentesina II de N. gracilis	Nepentesina II de Z. mays	23
55	Nepentesina I de N. alata	Nepentesina I de O. sativa	39
	Nepentesina I de N. alata	Nepentesina II de O. sativa	25
	Nepentesina I de N. alata	Nepentesina I de Z. mays	39
60	Nepentesina I de N. alata	Nepentesina II de Z. mays	26
	Nepentesina I de O. sativa	Nepentesina II de O. sativa	28
	Nepentesina I de O. sativa	Nepentesina I de Z. mays	35
65	Nepentesina I de O. sativa	Nepentesina II de Z. mays	23
	Nepentesina II de O. sativa	Nepentesina I de Z. mays	24

(continuación)

Secuencia 1	Secuencia 2	Puntuación
Nepentesina II de O. sativa	Nepentesina II de Z. mays	15
Nepentesina I de Z. mays	Nepentesina II de Z. mays	26

Los datos expuestos en los ejemplos anteriores demuestran que la nepentesina, ya sea como una mezcla o como componentes purificados o recombinantes de la misma, digieren eficientemente el gluten, mientras que la pepsina no. En consecuencia, esta descripción proporciona un método para permitir la digestión del gluten en una proteína que comprende gluten mediante el uso de una mezcla de nepentesina o componentes purificados o recombinantes de la misma.

Listado de secuencia

<110> SCHRIEMER, DAVID MAN, PETR MRAZEK, HYNEK REY, MARTIAL

<120> TRATAMIENTO DE LA INTOLERANCIA AL GLUTEN Y AFECCIONES RELACIONADAS

<130> 16411-21

<150> 13/843,369

<151> 2013-03-15

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1234

<212> ADN

<213> Nepenthes gracilis

<400> 1

```

acgtcaagaa cagctctcaa tcaccgtcac gaagccaaag taacgggctt tcagataatg      60
cttgaacatg ttgattcggg caaaaactta accaaattcc agctcttaga acgtgctatc      120
gaaaggggta gtcgtagatt gcagaggctc gaagccatgt taaatggccc ctccggtgtg      180
gaaacttccg tctacgccgg agatggcgaa tatctgatga acttatcgat tggaaactccg      240
gcacaacctt tctccgcaat catggatacc ggtagcgatc ttatctggac gcagtgccag      300
ccttgcactc agtggtttta tcaatcaacg cccatattta atcctcaagg atcatcctcc      360
ttctccaccc tcccttgctc aagccaactc tgtcaagccc tttcaagccc gacatgctct      420
aataatttct gccaatcacac ctacgggtat ggggacgggt ccgaaaccca aggatccatg      480
ggcactgaga ctctcacttt cgggtcgggt tccatcccta atatcacatt cggctgcggg      540
gaaaacaacc aagggttttg gcaaggaaac ggggcaggct tgggtgggat gggtcggggc      600
cctctgtcgc ttcttctca actcgtcgtg accaaattct cttactgcat gacccccatt      660
ggtagctcaa cccctagcac tcttctattg ggatcaactg ctaattctgt caccgcgggt      720
agtcctaata caacccta atccaaagctct caaataccaa ctttctatta tattactctc      780
aacgggttga gtgttggttc aactcgtttg cccattgatc cgagtgtttt tgcaactaat      840
agcaataatg gaacaggagg gataataata gactctggaa cgacacttac ttacttcggt      900
aacgcttatc aatctgtaag gcaagagttc atctcccaga ttaatctacc cgtcgtaaat      960
ggttcctcct ccggctttga tctgtgcttc cagacgcctt ctgatccgtc aaacctgcag      1020
ataccacact ttgtgatgca ttttgacggg ggagatttgg agttgcccag tgagaattat      1080
ttcatctccc caagcaacgg gctgatttgc ttggcgatgg ggagttcgtc gcaggggatg      1140
tccatttttg ggaatattca gcagcaaac atgctagtgc ttacgacac cggaatttcg      1200
gtggtttcat tcgcttctgc tcaatgtggt gcgtt                1234

```

<210> 2

<211> 341

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 821 771 T3

<400> 2

5	Gly 1	Pro	Leu	Gly 5	Ser 5	Met	Glu	Arg	Lys 10	Ile 10	Ser	Arg	Ile	His 15	Leu 15	Val
	Ser	Glu	Pro	Ser 20	Ile	Thr	His	Phe	Leu 25	Gln	Val	Ser	Trp	Glu 30	Lys	Thr
10	Leu	Glu	Ser 35	Gly	Phe	Val	Ile	Thr 40	Leu	Thr	Asp	Gly	His 45	Ser	Ala	Trp
	Thr	Gly 50	Thr	Val	Ser	Glu	Ser 55	Glu	Ile	Ser	Gln	Glu 60	Ala	Asp	Asp	Met
15	Ala 65	Met	Glu	Lys	Gly 70	Lys	Tyr	Val	Gly	Glu	Leu 75	Arg	Lys	Ala	Leu 80	Leu
	Ser	Gly	Ala	Gly 85	Pro	Ala	Asp	Val	Tyr	Thr 90	Phe	Asn	Phe	Ser	Lys 95	Glu
20	Ser	Cys	Tyr	Phe 100	Phe	Phe	Glu	Lys	Asn 105	Leu	Lys	Asp	Val	Ser	Phe	Arg
	Leu	Gly	Ser	Phe 115	Asn	Leu	Glu	Lys	Val 120	Glu	Asn	Pro	Ala	Glu	Val	Ile
25	Arg 130	Glu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Cys 135	Leu	Asp	Thr	Ile	Ala 140	Glu	Asn	Gln	Ala
	Lys 145	Asn	Glu	His	Leu	Gln	Lys 150	Glu	Asn	Glu	Arg	Leu 155	Leu	Arg	Asp	Trp 160
30	Asn	Asp	Val	Gln 165	Gly	Arg	Phe	Glu	Lys 170	Cys	Val	Ser	Ala	Lys	Glu 175	Ala
	Leu	Glu	Thr	Asp 180	Leu	Tyr	Lys	Arg	Phe 185	Ile	Leu	Val	Leu	Asn 190	Glu	Lys
35	Lys	Thr	Lys 195	Ile	Arg	Ser	Leu	His	Asn 200	Lys	Leu	Leu	Asn 205	Ala	Ile	Cys
	Glu	Arg	Glu	Lys	Asp	Ile	Lys 210	Gln	Glu	Gly	Glu	Thr	Ala 220	Ile	Cys	Ser
40	Glu 225	Met	Thr	Ala	Asp	Arg	Asp 230	Pro	Val	Tyr	Asp	Glu	Ser	Thr	Asp	Glu 240
	Glu	Ser	Glu	Asn 245	Gln	Thr	Asp	Leu	Ser	Gly	Leu	Ala	Ser	Ala	Ala	Val
45	Ser	Lys	Asp	Asp 260	Ser	Ile	Ile	Ser	Ser 265	Leu	Asp	Val	Thr	Asp	Ile	Ala
	Pro	Ser	Arg	Lys 275	Arg	Arg	Gln	Arg	Met 280	Gln	Arg	Asn	Leu	Gly	Thr	Glu
50	Pro	Lys	Met	Ala 290	Pro	Gln	Glu	Asn	Gln 295	Leu	Gln	Glu	Lys	Glu	Asn	Ser
	Arg	Pro	Asp	Ser	Ser	Leu	Pro	Glu	Thr	Ser	Lys 305	Lys	Glu	His	Ile	Ser 320
55	Ala	Glu	Asn	Met	Ser 325	Leu	Glu	Thr	Leu	Arg	Asn 330	Ser	Ser	Pro	Glu	Asp
	Leu	Phe	Asp	Glu	Ile											

<210> 3

<211> 437

<212> PRT

<213> *Nepenthes mirabilis*

<400> 3

ES 2 821 771 T3

	Met	Ala	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser	Ile	Val	Tyr
	1				5				10					15		
5	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				
10	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	
15	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			
20	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	
25	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			
30	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
35					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			
40	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	
45	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	Ser	Gly	Phe
				340					345					350		Asp
	Leu	Cys	Phe	Gln	Met	Pro	Ser	Asp	Gln	Ser	Asn	Leu	Gln	Ile	Pro	Thr
50			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	
55	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		
60	Gln	Cys	Gly	Ala	Ser											
			435													

<210> 4

<211> 437

<212> PRT

<213> Nepenthes alata

ES 2 821 771 T3

<400> 4

	Met	Ala	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser	Ile	Val	Tyr
	1				5					10					15	
5	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			
10	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
15					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			
20	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	
25	Pro	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser	Cys	Gln	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Gly	Tyr	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
30				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	
35	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			
40	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
45	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			
50	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					
55	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			
60	Gln	Cys	Gly	Ala	Ser											
				435												

<210> 5

<211> 437

<212> PRT

65 <213> Nepenthes gracilis

ES 2 821 771 T3

<400> 5

	Met	Ala	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser	Ile	Val	Tyr
	1				5				10					15		
5	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			
10	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	
15	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			
20	Cys	Phe	Asn	Gln	Ser	Thr	Pro	Ile	Phe	Asn	Pro	Gln	Gly	Ser	Ser	Ser
							135						140			
	Phe	Ser	Thr	Leu	Pro	Cys	Ser	Ser	Gln	Leu	Cys	Gln	Ala	Leu	Ser	Ser
	145					150					155				160	
25	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		
30	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	
35	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		
40	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	
45	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		
50	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				
55	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
60				420					425					430		
	Gln	Cys	Gly	Ala	Ser											
				435												

<210> 6

<211> 437

65 <212> PRT

<213> *Nepenthes mirabilis*

ES 2 821 771 T3

<400> 6

5	Met	Ala	Ser	Pro	Leu	His	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	Val	Leu	Glu	Gln
			35				40						45			
10	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		
15	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			
20	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
					150						155				160	
	Ser	Glu	Ser	Cys	Tyr	Asn	Asp	Cys	Gln	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Gly	Asp
25					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			
30	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
35					245					250				255		
	Ala	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Glu	Gly	Ser	Pro	Ser	Thr	Thr	Leu	Ile	His
				260					265					270		
	Ser	Ser	Leu	Asn	Pro	Thr	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Leu	Gln	Gly	Ile	Thr	
			275				280					285				
40	Val	Gly	Gly	Asp	Asn	Leu	Gly	Ile	Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Gln	Leu	Gln
		290				295						300				
	Asp	Asp	Gly	Thr	Gly	Gly	Met	Ile	Ile	Asp	Ser	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr
		305			310						315				320	
45	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			
50	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
					390						395				400	
55	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											
60				435												

<210> 7

<211> 438

<212> PRT

<213> Nepenthes gracilis

65

<400> 7

ES 2 821 771 T3

	Met	Ala	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Gly	Leu	Ala	Ile	Val	Ser
	1				5					10				15		
5	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			
	Val	Asp	Ser	Gly	Lys	Asn	Leu	Thr	Lys	Tyr	Glu	Leu	Ile	Lys	Arg	Ala
		50				55					60					
10	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		
15	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			
20	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		
25	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			
30	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		
35	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			
40	Thr	Val	Gly	Gly	Asp	Asn	Leu	Gly	Ile	Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Gln	Leu
		290				295							300			
	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	
45	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			
50	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	Gln	Glu
				405						410				415		
55	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> 8
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 8

ES 2 821 771 T3

	Met	Ala	Phe	His	Ser	Cys	Thr	Ile	Ile	Pro	Ala	Ser	His	His	Ser	Ser
	1				5					10					15	
5	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
10		50					55					60				
	Val	Arg	Asp	Ala	Leu	Arg	Arg	Asp	Met	His	Arg	Gln	Arg	Ser	Arg	Ser
	65					70					75					80
	Phe	Gly	Arg	Asp	Arg	Asp	Arg	Glu	Leu	Ala	Glu	Ser	Asp	Gly	Arg	Thr
					85					90					95	
15	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			
20	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
25					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			
30	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
35					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			
40	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
45	Gly	Ala	Lys	Ala	Leu	Pro	Ile	Ser	Pro	Gly	Ala	Phe	Ser	Leu	Lys	Pro
					325					330					335	
	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			
50	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
55	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		
60	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			
65						465						470				

ES 2 821 771 T3

<211> 453
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

5	<400> 9	
		Met Arg Gly Val Ser Val Val Leu Val Leu Ile Ala Cys Trp Leu Cys
		1 5 10 15
10		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
15		Val Val Arg Asn Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Ile Ala Gln Ala Arg
		65 70 75 80
		Glu Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Ala Val Arg Ala Ser Gly Asp Leu
		85 90 95
20		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
25		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
30		Ser Tyr Gly Asp Gly Thr Thr Thr Leu Gly Tyr Tyr Ala Thr Glu Arg
		180 185 190
		Phe Thr Phe Ala Ser 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
35		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
40		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
45		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
50		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 Gly Arg Met Ala Arg Gln Val Ala Val
		370 375 380
55		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
60		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
65		Ala Pro Val Glu Cys
		450

<210> 10

ES 2 821 771 T3

<211> 486
<212> PRT
<213> Oryza sativa

5	<400> 10	
		Met Ala Asp Arg Ile Thr Val Leu Ala Ile Ala Leu Leu Val Leu Ile
		1 5 10 15
10		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 Gln Leu Gly Asn Phe Phe Lys Lys
		35 40 45
15		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 Gly Gln Ser Gln Asp Pro Ala Thr Asn Thr Gly Met
		85 90 95
20		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
25		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
30		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
35		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
40		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
45		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
50		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
		Gly Ser Glu Leu Gly Leu Asp Leu Cys Tyr Thr Ser Glu Ser Leu Ala
55		355 360 365

60

65

ES 2 821 771 T3

	Thr	Ala	Lys	Val	Pro	Ser	Met	Ala	Leu	Val	Phe	Ala	Gly	Gly	Ala	Val
	370						375					380				
5	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		
10	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				
15	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> 11															
20	<211> 471															
	<212> PRT															
	<213> Zea mays															
	<400> 11															
25	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		
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	Gly	Cys	His	Tyr	Arg	Phe	Glu	Leu	Thr	His
		50				55						60				
35	Val	Asp	Ala	Asn	Leu	Asn	Leu	Thr	Ser	Asp	Glu	Leu	Met	Arg	Arg	Ala
	65				70					75						80
	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		
40	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				
45	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		
50	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				
55	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		
60	Pro	Asp	Leu	Pro	Ser	Tyr	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Ala	Pro	Asp	Met	Ala
			275					280					285			
	Thr	Gly	Ala	Val	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln
65																

ES 2 821 771 T3

	290		295		300												
	Pro	Asn	Ser	Asp	Tyr	Lys	Thr	Leu	Tyr	Phe	Val	His	Leu	Gln	Asn	Ile	
	305					310					315					320	
5	Ser	Ile	Gly	Gly	Thr	Arg	Phe	Pro	Ala	Val	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Gly	
					325					330					335		
	Asn	Met	Phe	Val	Asp	Thr	Gly	Ala	Ser	Phe	Thr	Arg	Leu	Glu	Gly	Thr	
				340					345					350			
	Val	Phe	Ala	Lys	Leu	Val	Thr	Glu	Leu	Asp	Arg	Ile	Met	Lys	Glu	Arg	
			355					360				365					
10	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	
15	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	
20			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										
25	465					470											

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para el uso en el tratamiento o inhibición de la intolerancia al gluten en donde dicha composición comprende la nepentesina recombinante seleccionada de nepentesina I recombinante, nepentesina II recombinante, una sal de las mismas, o cualquier combinación de las mismas.
- 10 2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha nepentesina recombinante se administra en dosis de 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal por día.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha nepentesina recombinante se administra en dosis de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 50, 100, 500 o 1000 mg/kg de peso corporal por día.
- 15 4. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se administra con otro agente seleccionado de: un inhibidor de la transglutaminasa tisular, un agente antiinflamatorio, un antagonista del receptor de leucotrienos, un inhibidor de la COX-2, un inhibidor de la MAP quinasa p38, un agente estabilizador de mastocitos, un agente antiulcerosos, un agente antialérgico, un inhibidor de transglutaminasa 2 (TG2), un agente anti-TNF- α y un antibiótico.
- 20 5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se administra con otra enzima seleccionada de una proteasa gástrica, una proteasa aspártica y una prolil endopeptidasa, dipeptidil peptidasa IV (DPP IV), dipeptidil carboxipeptidasa (DCP) y cisteína proteinasa B.
- 25 6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha intolerancia al gluten da como resultado enfermedad celíaca, alergia al trigo, sensibilidad al gluten y/o dermatitis herpetiforme.
- 30 7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la nepentesina recombinante es una mezcla de nepentesina I y nepentesina II recombinantes.
8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la nepentesina recombinante es nepentesina recombinante I.
- 35 9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la nepentesina recombinante es nepentesina II recombinante.
10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la administración de dicha composición es por administración oral.
- 40 11. La composición para el uso de la reivindicación 10, en donde dicha composición se administra antes de la ingestión de un alimento que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten; con la ingestión de un alimento que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten; o después de la ingestión de un alimento que comprende gluten o se sospecha que comprende gluten.

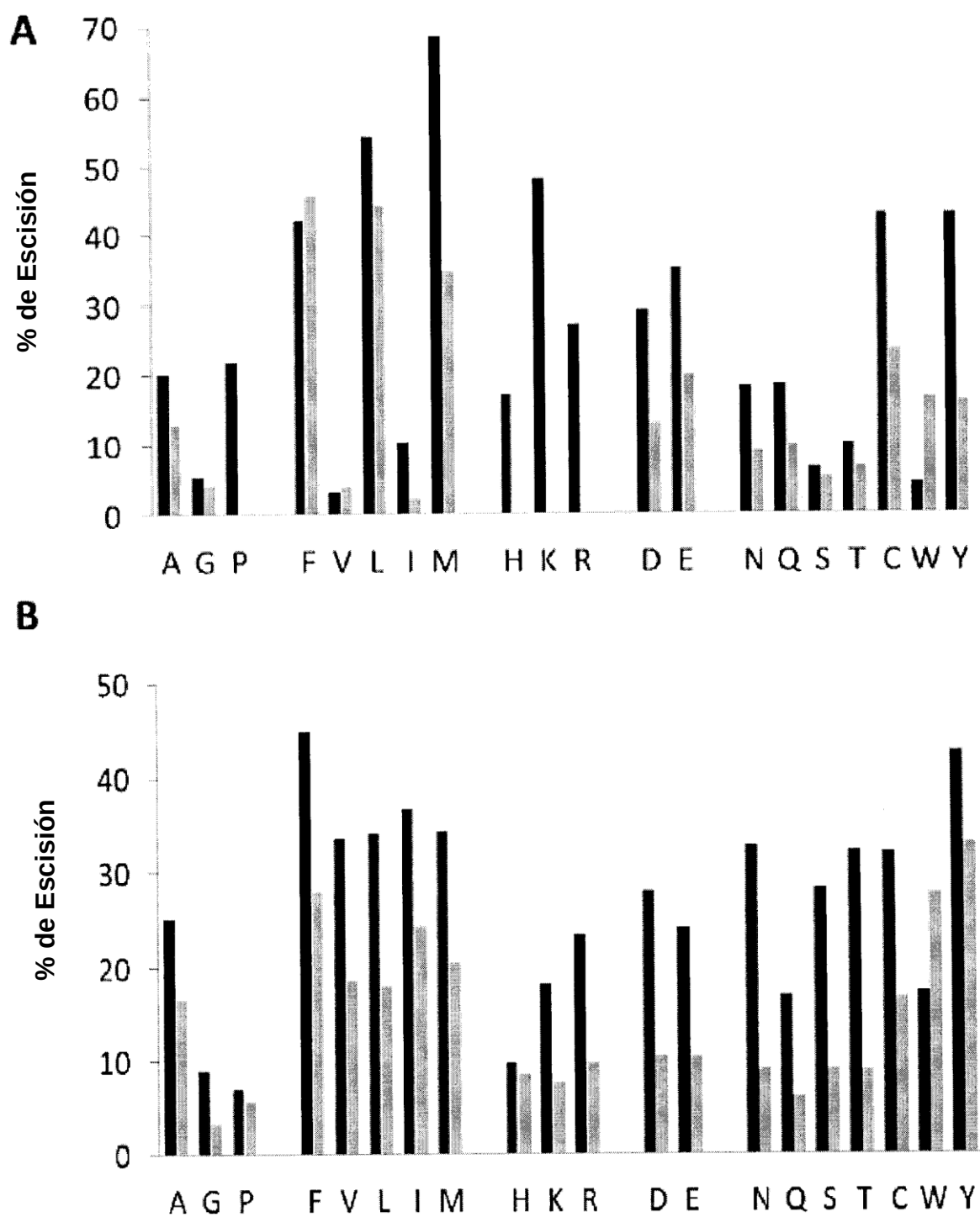


Figura 1

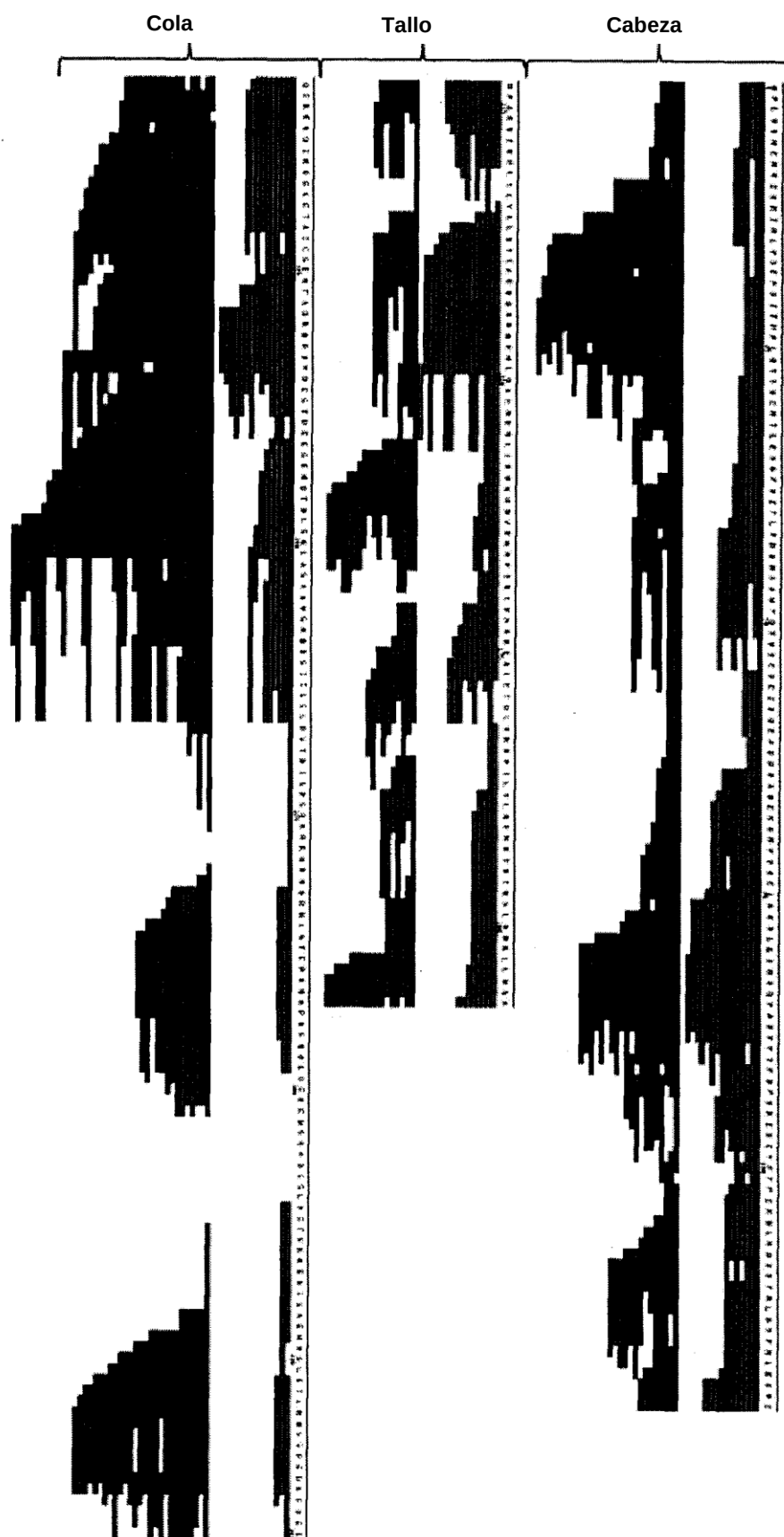


Figura 2

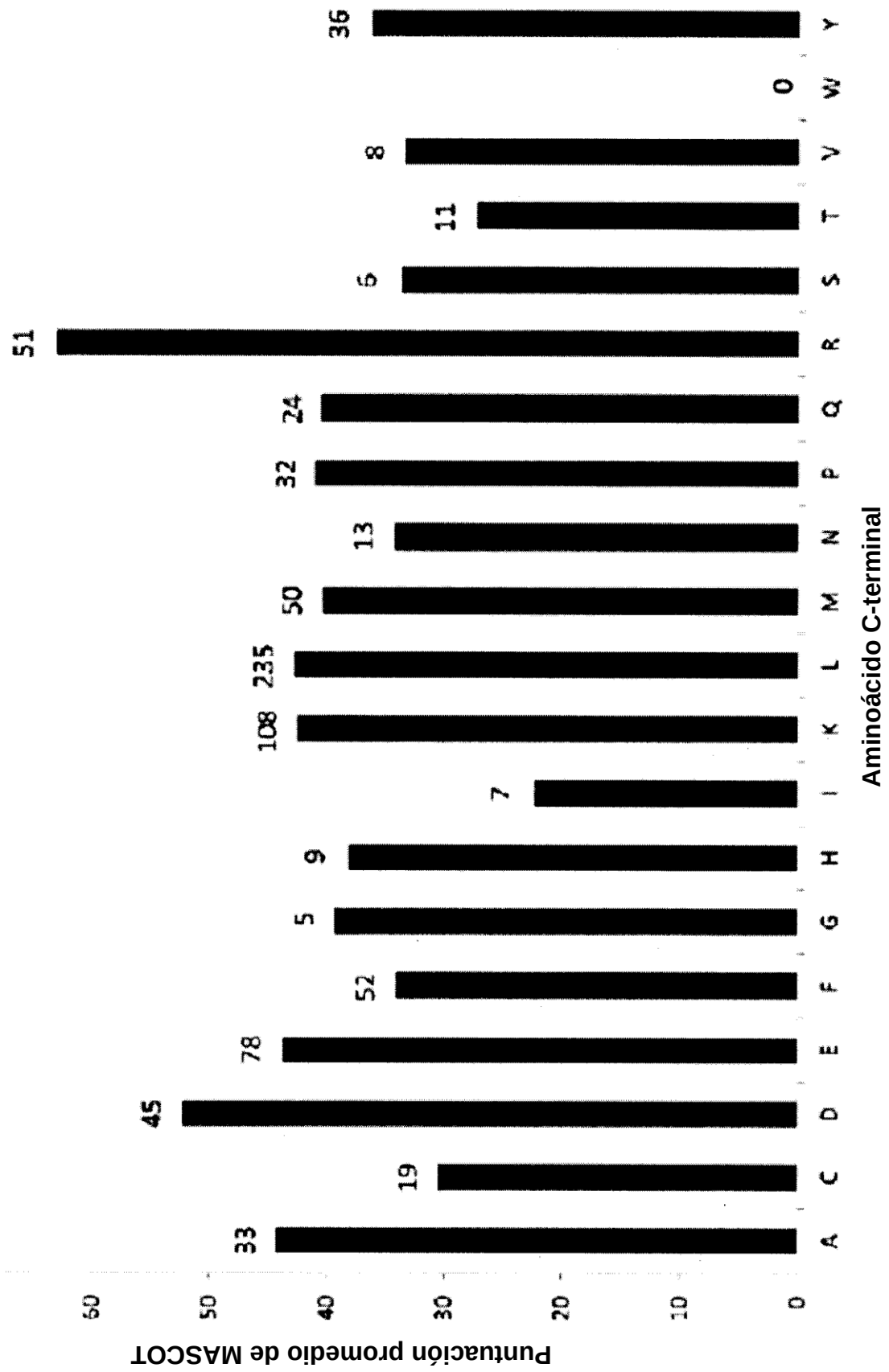


Figura 3

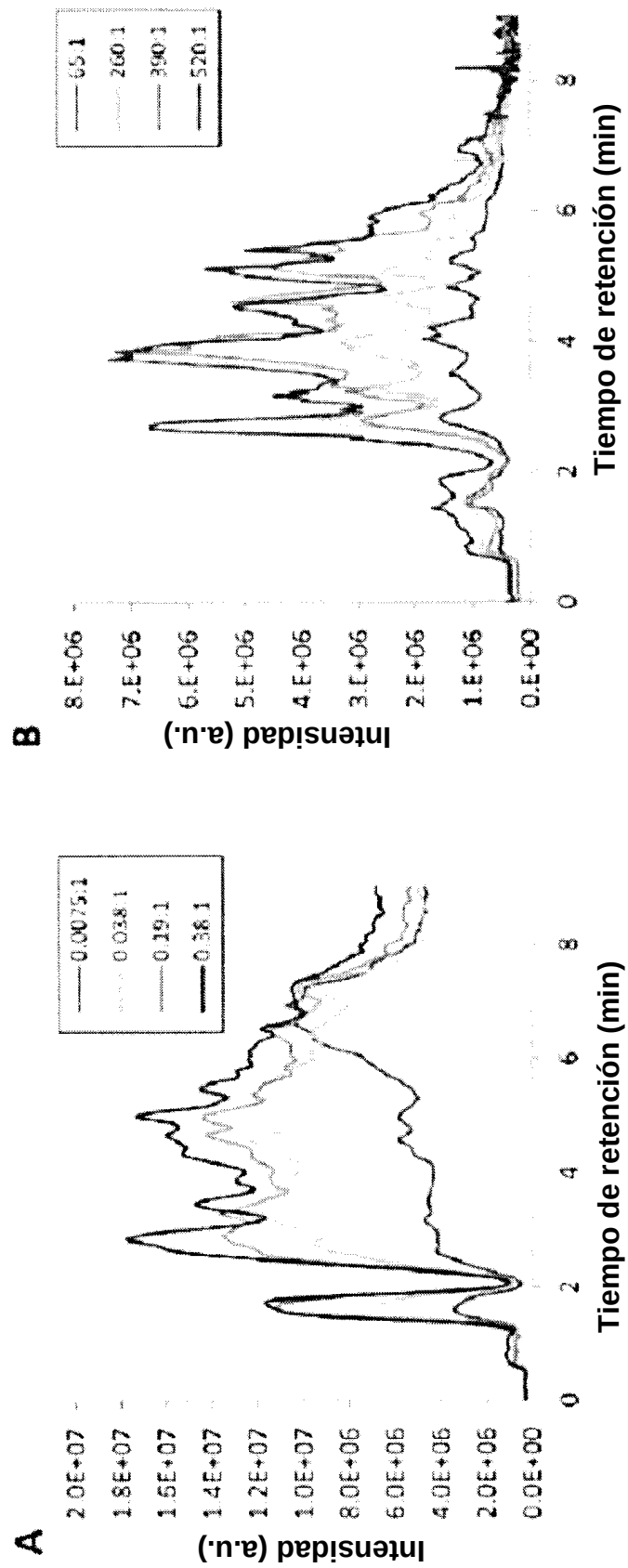


Figura 4

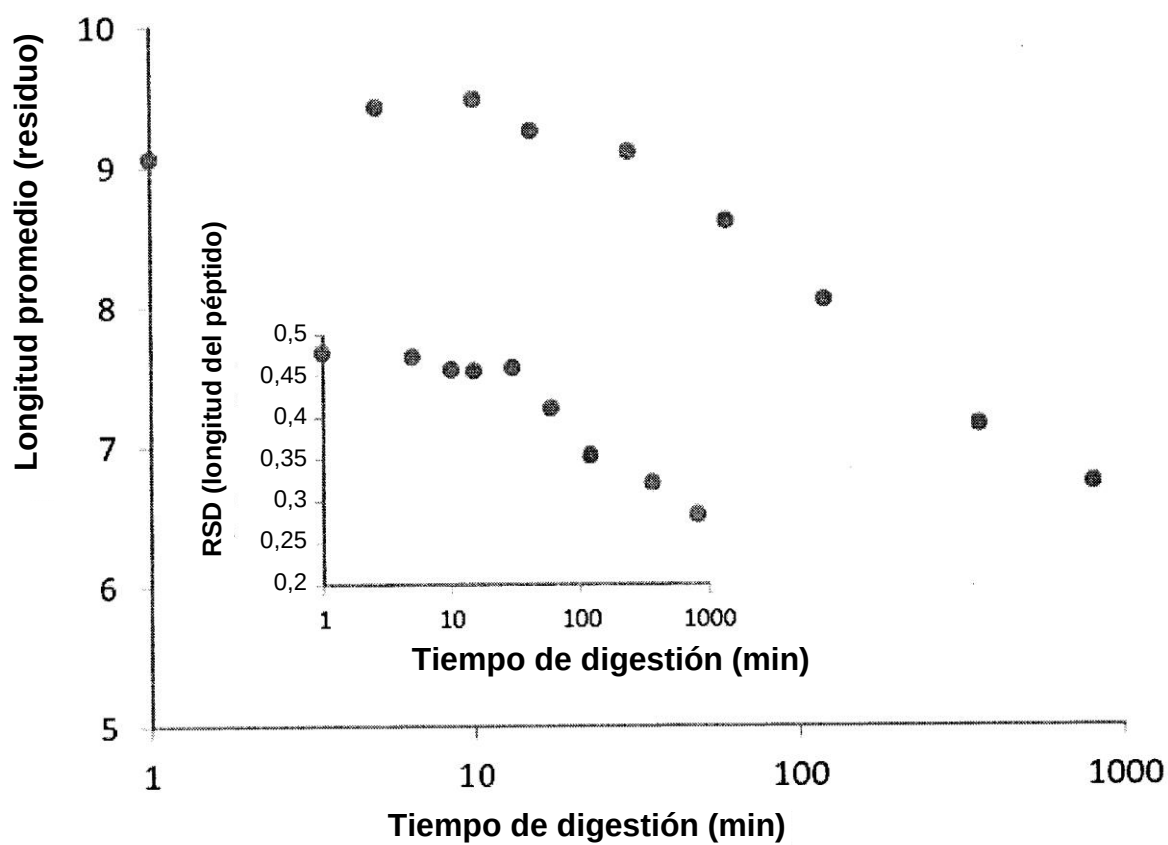


Figura 5

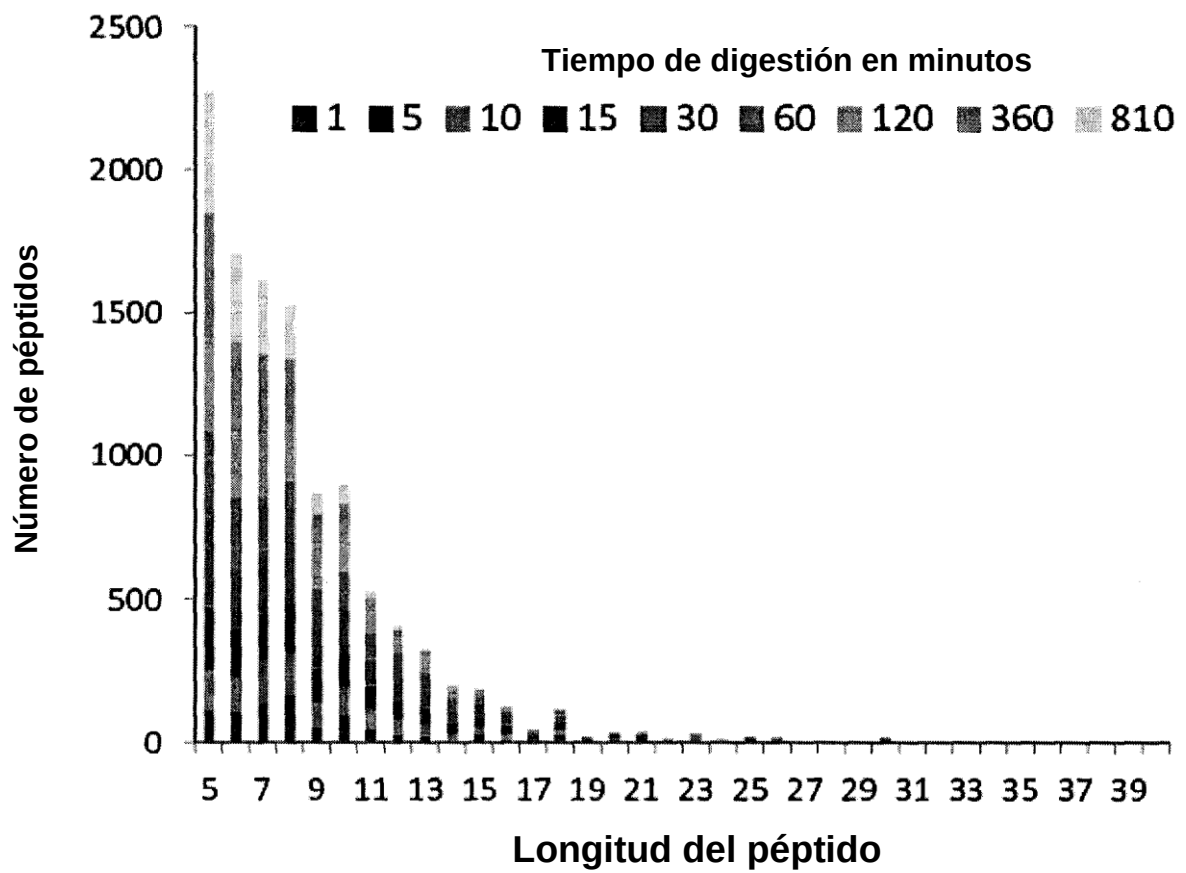


Figura 6

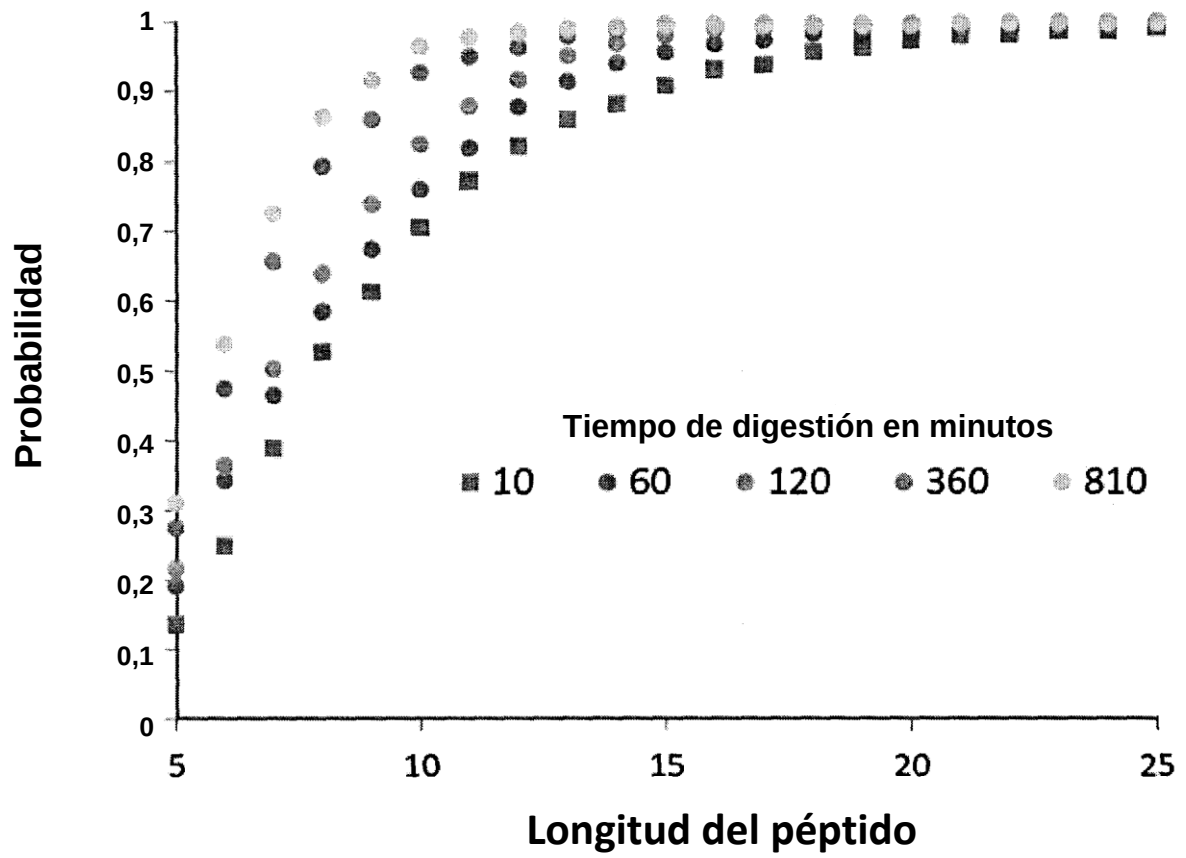


Figura 7

Figura 8

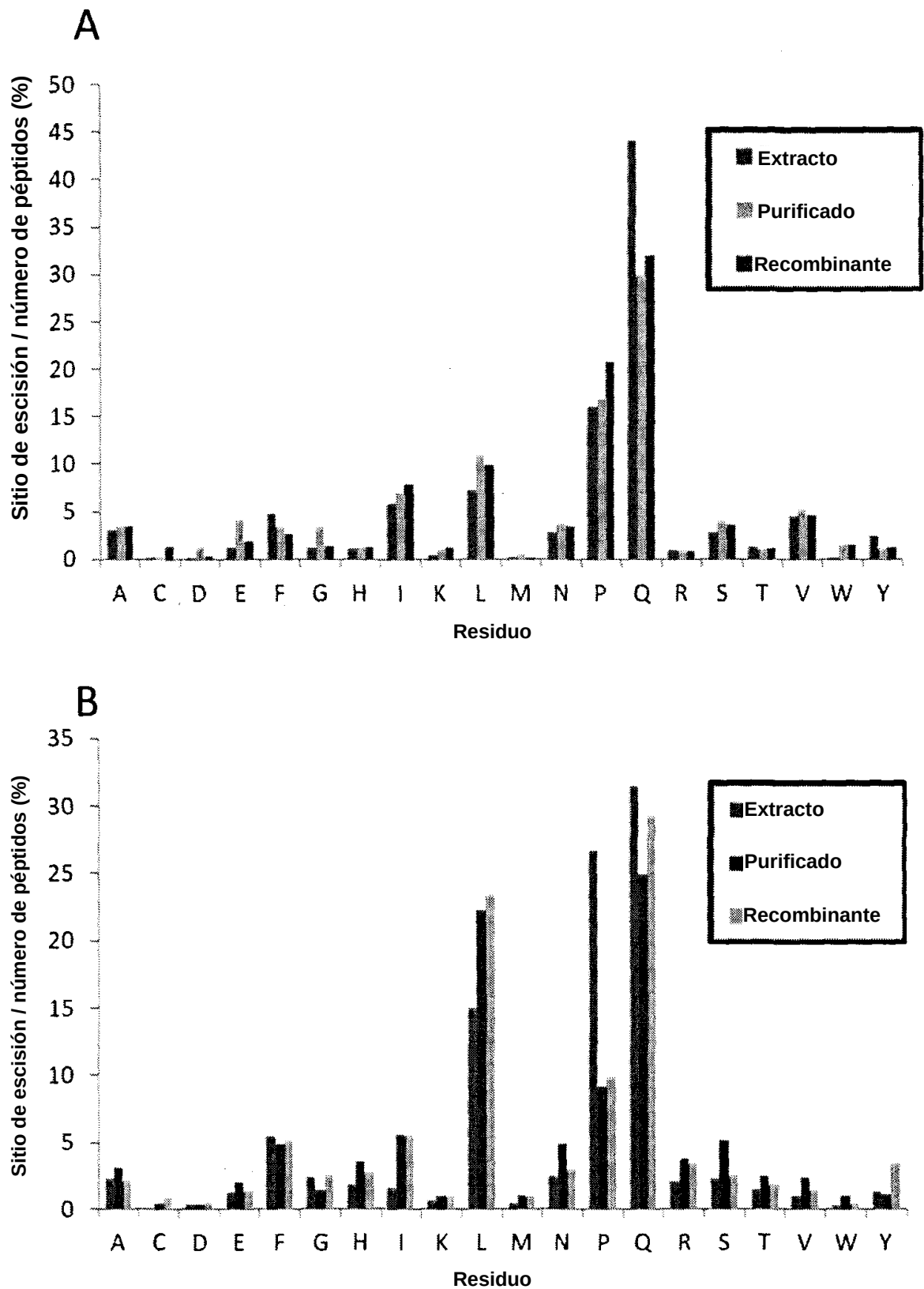


Figura 9

```

nep I de N. mirabilis -----MASSLYSFLALSIYVIFVAPHTSTSR-TALNHHHEPKVAG---FQIMLEHVDSGKNLTKFELLERAVERGSRRLQR-----LEA
nep I de N. alata -----MASSLYSFLALSIYVIFVAPHTSTSR-TALNHHHEPKVAG---FQIMLEHVDSGKNLTKFELLERAVERGSRRLQR-----LEA
nep I de N. gracilis -----MASSLYSFLALSIYVIFVAPHTSTSR-TALNHRHEAKVTG---FQIMLEHVDSGKNLTKFOLLERAIERGSRRLQR-----LEA
nep II de N. mirabilis -----MASPLHSVVLGLAIVSAIVAPTSTSRGTLHHGQKRQPG---LRVVLEQVDSGMNLTKYELIKRAIKRGERRMRS-----INA
nep II de N. gracilis -----MASPLYSVVLGLAIVSAIVAPTSTSRGTLHHGQKRQPG---LRVDLEQVDSGKNLTKYELIKRAIKRGERRMRS-----INA
nep I de Z. mays -----MAFHSCTIIPASHSSMSSTSQMASLAVLVFLVVCATLASGAASVRVGLTRIHSDPDTIAPQFVRDALRRDMHQRQSRSFGRDRDRE
nep I de O. sativa -----MRGVSVVLVLIAACWLCCGPVAGEAAAFAG---DIRVDLTHVDAGKELPKRELIRRAMQRSKARAAALSVVRNGGGF
nep II de O. sativa -----MADRITVLAIALLVLILSPQMAVQGGKPAAGNTASPRPKQQQLGNFFKKHGSDIAGLFPRHRNGGSSGSYSQGAVPAD
nep II de Z. mays MAMMACNTRPRKLSLPCRTRTFQALILSTAVFLAASTAVVVGKEPQPPSSSGGGCHYRFELTHVDANLNLSDLELMRRAYDRSRLRAAS-----L

MLNGPSGVETPVYAGD-----GEYLMNLSIG--TPAQPFSAIMDTGSDLIWTQCQPC-TQCFNQSTPIFNP---QGSSSF5TLPCSSQLCQALQSPT
MLNGPSGVETPVYAGD-----GEYLMNLSIG--TPAQPFSAIMDTGSDLIWTQCQPC-TQCFNQSTPIFNP---QGSSSF5TLPCSSQLCQALQSPT
MLNGPSGVETSVYAGD-----GEYLMNLSIG--TPAQPFSAIMDTGSDLIWTQCQPC-TQCFNQSTPIFNP---QGSSSF5TLPCSSQLCQALQSPT
MLQSSSGIETPVYAGS-----GEYLMNVAIG--TPASSLSAIMDTGSDLIWTQCEPC-TQCFNQSTPIFNP---QDSSSF5TLPCESQYQCDLPSES
MLQSSSGIETPVYAGD-----GEYLMNVAIG--TPDSSFSAIMDTGSDLIWTQCEPC-TQCFNQSTPIFNP---QDSSSF5TLPCESQYQCDLPSET
LAESDGRSTSTVSARTRKDLPNGGEYLMNLAIG--TPPLPYAAVADTGSDLIWTQCPCGTQCFEQAPLYNP---ASSTTF5VLPNCSLSMCAGALA
YGSIAQAREREREPGMVAVRASGDLEYVLDLAVG--TPPQPTALLDTGSDLIWTQCDC-TACLRQPDPLFSP---RMSSSYEPMRCAGQLCGDILHHS
GGENGSGGQSQDPATN-----TGMVYLSFVSG--TPPQVVTGLDITSDFVMMQCSACATCGADAPAAAT SAPPFYAFLSSTIREVRCANRGQRRLVPQT
AAYSDDRHEGRVSIPO-----ASYITTFVLGNRDMNLSAVDVTGSDIFWTTEKESRSKTRSMPLPCCSP-----KCEQRACSGCGRSELKA

----CSNNSCQYTYGYDGSSETQGSMTETLTFGS-----VSIPNITFGCGE-NNQFGQGNGAGLVGMGRGPLSLPSQLDVTKFSYCHTPIGSS-
----CSNNSCQYTYGYDGSSETQGSMTETLTFGS-----VSIPNITFGCGE-NNQFGQGNGAGLVGMGRGPLSLPSQLDVTKFSYCHTPIGSS-
----CSNNFCQYTYGYDGSSETQGSMTETLTFGS-----VSIPNITFGCGE-NNQFGQGNGAGLVGMGRGPLSLPSQLDVTKFSYCHTPIGSS-
----CYN-DCQYTYGYDGSSTQGYMATETFTFET-----SSVPNIAFGCGE-DNQFGQGNGAGLIGMGWGPLSLPSQLGVGGQFSYCHTSSGSS-
----CNNECQYTYGYDGSSTQGYMATETFTFET-----SSVPNIAFGCGE-DNQFGQGNGAGLIGMGWGPLSLPSQLGVGGQFSYCHTSSGSS-
GAAPPPGCACMYQTYGTG-WTAGVQGSSETFTFGSSA---ADQARVPGVAFGCSN-ASSSDWNG-SAGLVGLGRGSLSLVSQLGAGRFYCLTFFQDTN
---CVRPDTCTYRYSYDGTTLGYATERTFASSS---GETQSVPLGFGCGT-MNVG-SLNNASGIVGGRDPLSLVSQLSIRRFYCLTPYASS-
CSADSPCGYSYVYGGGAANTTAGLLAVDAFAT-----VRADGVI FGCAV-ATEG---DIGGVI GLGRSATLSPRQLNFKSFSYCLSSYQEPD
EAEKTKCTYAIYVGGNANDTAGVMYEDKLTIVAVASKAVPSQSFKVAIGCSTSATLKFKDPSIKGVFLGRSATLSPRQLNFKSFSYCLSSYQEPD

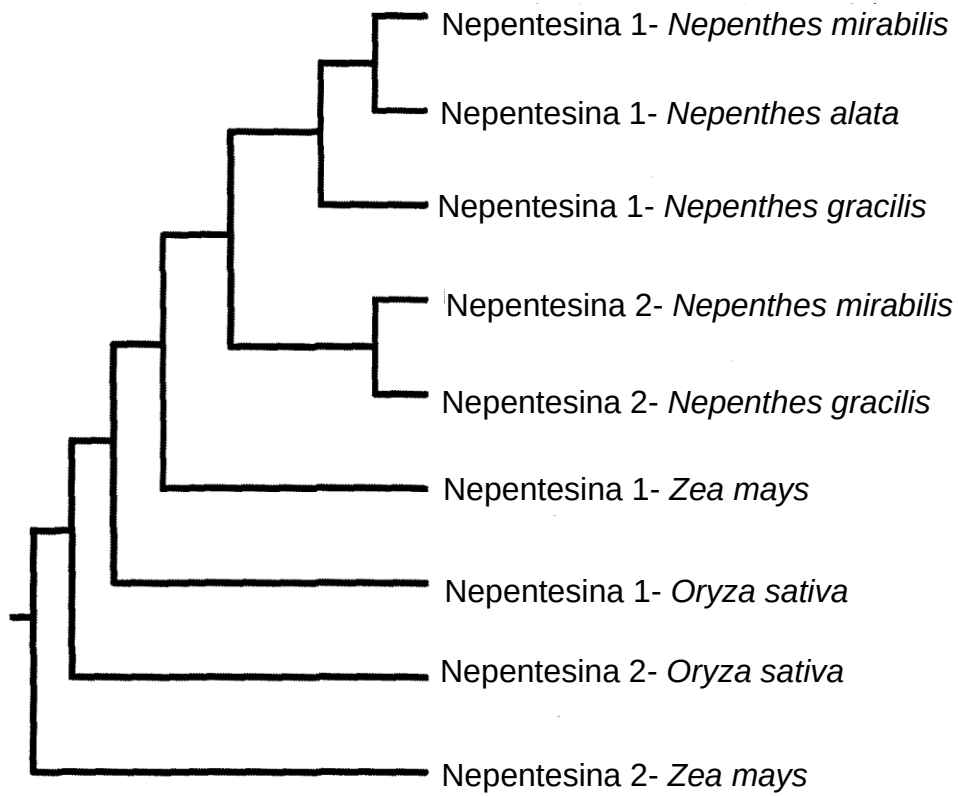
TSSTLLGLSLANS-----VTAGSPNTTLIES---SQIPTFYITLNLGLSVGSTPLPIDPSVFKLNSNNGTGGIIDS GTTLTYFADNAYQAVRQAFISQM
NSSTLLGLSLANS-----VTAGSPNTTLIQS---SQIPTFYITLNLGLSVGSTPLPIDPSVFKLNSNNGTGGIIDS GTTLTYFADNAYQAVRQAFISQM
TPSNLLGLSLANS-----VTAGSPNTTLIQS---SQIPTFYITLNLGLSVGSTPLPIDPSAFALNSNNGTGGIIDS GTTLTYFVNAYQSVRQEFISQI
SPSTLALGSAASG-----VPEGSPSTTLIHS---SLNPTYYYITLQGITVGGDNLGIPSSFTQLQ-DDGTGGMIIDS GTTLTYLPQDAYNAVAQAFTDQI
SPSTLALGSAASG-----VPEGSPSTTLIHS---SLNPTYYYITLQGITVGGDNLGIPSSFTQLQ-DDGTGGMIIDS GTTLTYLPQDAYNAVAQAFTDQI
STSTLLGPSAAL-----NGTVRSTPFFVASPARAPMSTYYLNLGTGSLGAKALPI SPGAFSLK-PDGTGGIIDS GTTITSLANAAYQVRAAVKSQL
RKSTLQFGLADVGLYDDATGPVQTTPILQS---AQNPITYYYAFTGVTGARRLRI PASAFALR-PDGSGGVIIDS GTALTLPVAVLAEVVRRAFRSQL
VGSFILFLDDAKP-----RTSRVSTPLVAS---RASRSLYYVELAGIRVDGEDLAI PRGTFDLQ-ADGSGGVVL SITIPVTFDAGAYKVVRAQAMASKI
LPSVLLLTAAPOMATGAVGGGAAVATTALQP---NSDYKTLFVYHLQNTSIGGTRFPAYS-----TKSGGNMFVDTGASFTRLEGTVFAKLYTELDRIM

N--LSVVNGS--SSGFDLCFQMPSDQSN-----LQIPTFVMHFDG-GDLVLPSEN--YFISPSNGLICLAMGSSSQ-QMSIFGNIQQNNLLVVYDTGNS
N--LSVVNGS--SSGFDLCFQMPSDQSN-----LQIPTFVMHFDG-GDLVLPSEN--YFISPSNGLICLAMGSSSQ-QMSIFGNIQQNNLLVVYDTGNS
N--LPVVNGS--SSGFDLCFQTPSDPSN-----LQIPTFVMHFDG-GDLVLPSEN--YFISPSNGLICLAMGSSSQ-QMSIFGNIQQNNMLVVYDTGNS
N--LSPVDES--SSGLSTCFQLPSDGS-----VQVPEISMQFDG-GVLNLGEEN--VLISPAEGVICLAMGSSSQGIGSIFGNIQQQETQVLYDLQNL
N--LPTVDES--SSGLSTCFQQPSDGS-----VQVPEISMQFDG-GVLNLGEEN--VLISPAEGVICLAMGSSSQGIGSIFGNIQQQETQVLYDLQNL
VTTLPVDSSTGLDL CFALPAPT SAP---PAVLPSMTLHFDG-ADMVLPADS---YMISGS-GVWCLAMRNTQDGAMSTFGNYQQNMHILYDVREE
R--LPPFANGS--SPDGVCFAPAAVAAGGGRMARQVAVPRMVHFPG-ADLDLPREN--YVLEDHRRHGLCVLLDGSDDGATTGNFVQDDMRVVYDLERE
E--LRAADGS--ELGLDLCYTSSESLATAK-----VPSMALVFAG-GAVMELEMGNFYMDSTTGLECLTILPSPAGDGLSGLSLIQVGTGHIYDISES
KERKYKQEPGRNNGQICYSPPSTADE-----SSKLPDMNLFHFDASNMVLPWDS--YWLKTTSKLCLATYKSNKGGISVLGNFQMNTHMLDGTGNE

VVSFLFAQCGAS-----
VVSFLSAQCGAS-----
VVSFASAQCGAS-----
AVSFVPTQCGAS-----
AVSFVPTQCGAS-----
TL SFAPAKCSTL-----
TL SFAPVE-----
RLVFESLEQAPPPSGSSSRQSSRRRSSAPPPLTSPAVVVIHMLVVVYML
KLSFVRADCSKVI-----

```

Figura 10



EA
EA
VA
VA
4E
SF
AD
-L

PT
PT
PT
ES
ET
LA
+S
2T
<A

S-
S-
S-
S-
FN
S-
VD
PD

3M
3M
2I
2I
2I
2L
2L
2L
2I
IM

VS
VS
VS
VL
VL
EE
4E
SS
VE