

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2005.02.23	(73) Titular(es): THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY 1705 EL CAMINO REAL PALO ALTO, CA 94306- 1106 US
(30) Prioridade(s): 2004.04.26 US 565668 P 2004.10.19 US 969314	ALVINE PHARMACEUTICALS, INC. US
(43) Data de publicação do pedido: 2007.01.10	(72) Inventor(es): LU SHAN US MICHAEL BETHUNE US CHAITAN KHOSLA US JONATHAN GASS US
(45) Data e BPI da concessão: 2013.10.16 230/2013	(74) Mandatário: JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES RUA CASTILHO, 167 - 2.º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROPIl ENDOPEPTIDASE (PEP) E ENDOPROTASE DE GLUTAMINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA CELÍACA**

(57) Resumo:

A ADMINISTRAÇÃO DE UMA DOSE EFICAZ DE GLUTENASE A UM PACIENTE CELÍACO OU COM DERMATITE HERPETIFORME REDUZ OS NÍVEIS DE OLIGOPÉPTIDOS DE GLÚTEN TÓXICOS, ATENUANDO OU ELIMINANDO, ASSIM, OS EFEITOS NOCIVOS DO GLÚTEN.

RESUMO

PROPIIL ENDOPEPTIDASE (PEP) E ENDOPROTASE DE GLUTAMINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA CELÍACA

A administração de uma dose eficaz de glutenase a um paciente celíaco ou com dermatite herpetiforme reduz os níveis de oligopéptidos de glúten tóxicos, atenuando ou eliminando, assim, os efeitos nocivos do glúten.

DESCRIÇÃO

PROPIL ENDOPEPTIDASE (PEP) E ENDOPROTASE DE GLUTAMINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA CELÍACA

Em 1953, foi reconhecido pela primeira vez que a ingestão de glúten, uma proteína alimentar comum presente no trigo, cevada e centeio causa a doença em indivíduos sensíveis. O glúten é uma mistura complexa de glutenina rica em glutamina e prolina e moléculas de prolamina, que se pensa ser responsável pela indução da doença. A ingestão de tipo de proteínas por indivíduos sensíveis produz um achatamento do forro epitelial do tipo tapete, normalmente luxuoso, do intestino delgado, conhecido por ser responsável pela digestão eficaz e terminal extensiva de peptídeos e de outros nutrientes. Os sintomas clínicos da doença celíaca incluem fadiga, diarreia crónica, má absorção de nutrientes, perda de peso, distensão abdominal, anemia, bem como um risco substancialmente maior para o desenvolvimento de osteoporose e doenças malignas intestinais (linfoma e carcinoma). A doença tem uma incidência de cerca de 1 em 200 em populações europeias.

Uma doença relacionada é a dermatite herpetiforme, que é uma erupção crónica caracterizada por aglomerados de vesículas intensamente pruriginosas, pápulas e lesões do tipo urticária. Os depósitos de IgA ocorrem em quase todas as peles de aparência normal e perilesionais. Uma assintomática enteropatia sensível ao glúten é encontrada em 75 a 90% dos pacientes e em alguns de seus parentes. O início é geralmente gradual. A comichão e o ardor são graves, e coçar muitas vezes obscurece as lesões primárias com eczematização da pele nas proximidades, levando a um diagnóstico erróneo de eczema. Uma estrita adesão a uma dieta isenta de glúten por períodos prolongados pode

controlar a doença em alguns pacientes, eliminando ou reduzindo a necessidade de terapia medicamentosa. São prescritas, muitas vezes, dapsona, sulfapiridina e colchicina para o alívio da comichão.

A doença celíaca é, geralmente, considerada uma doença auto-imune e os anticorpos encontrados no soro dos pacientes suporta uma teoria de natureza imunológica da doença. Os anticorpos para a transglutaminase tecidular (tTG) e a gliadina aparecem em quase 100% dos pacientes com doença celíaca ativa, e a presença destes anticorpos, em particular da classe IgA, foi usada no diagnóstico da doença.

A grande maioria dos pacientes expressam moléculas HLA-DQ2 [DQ (a1*0501, b1*02)] e/ou DQ8 [DQ (a1*0301, b1*0302)]. Acredita-se que a lesão intestinal seja causada por interações entre os oligopeptídeos de gliadina específicos e o antigénio HLA-DQ2 ou DQ8, que, por sua vez, induzem a proliferação de linfócitos T nas camadas subepiteliais. As células T auxiliares e as citocinas desempenham, aparentemente, um papel importante no processo inflamatório local, conduzindo à atrofia de vilosidades do intestino delgado.

No momento, não existe nenhuma boa terapia para a doença, a não ser evitar completamente todos os alimentos que contenham glúten. Embora a abstinência de glúten tenha transformado o prognóstico para as crianças e melhorado, substancialmente, para os adultos, algumas pessoas ainda morrem da doença, principalmente os adultos que tiveram a doença grave no início. Uma importante causa de morte é a doença linforeticular (em especial linfoma intestinal). Não é conhecido se uma dieta sem glúten diminui este risco. A remissão clínica aparente é, frequentemente, associada à

recidiva histológica que é detetada, apenas, por biópsias de revisão ou pelo aumento dos títulos EMA.

O glúten é, amplamente, utilizado, por exemplo, em sopas comerciais, molhos, gelados, cachorros-quentes e outros alimentos, sendo que os pacientes precisam de listas detalhadas de alimentos a serem evitados e aconselhamento especializado por um nutricionista familiarizado com a doença celíaca. A ingestão de pequenas quantidades de glúten pode impedir uma remissão ou induzir uma recidiva. Também podem ser necessárias vitaminas suplementares, minerais e hematínicas, dependendo da deficiência. Alguns pacientes respondem mal ou nada à abstinência de glúten, ou porque o diagnóstico está incorreto ou porque a doença é refratária. Neste último caso, os corticosteróides orais (por exemplo, a prednisona, 10 a 20 mg bid) podem induzir uma resposta.

O pedido de patente refere-se à administração de uma dose eficaz de glutenase a um paciente celíaco ou com dermatite herpetiforme reduz os níveis de oligopéptidos de glúten tóxicos, atenuando ou eliminando, assim, os efeitos nocivos do glúten.

Tendo em conta a natureza séria e generalizada da doença celíaca, são necessários melhores métodos de tratamento ou melhoria dos efeitos da doença. A presente invenção soluciona essas necessidades.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona uma formulação para uso no tratamento da doença celíaca, compreendendo uma prolil endopeptidase (PEP) e uma endoprotease de glutamina, em conjunto com um excipiente farmacologicamente aceitável.

A PEP pode ser *Flavobacterium meningosepticum* PEP, *Myxococcus xanthus* PEP, *Sphingomonas capsulata* PEP, ou *Penicillium citrinum*. A endoprotease de glutamina pode ser protease de cisteína B a partir de *Hordeum vulgare*.

Outros aspetos da invenção são definidos nas reivindicações que a acompanham.

Também aqui descrito é a purificada *Myxococcus xanthus* PEP, os fragmentos biologicamente ativos ou seus derivados, e formulações farmacêuticas suas derivadas. A enzima pode ser expressa numa célula hospedeira heteróloga, *por exemplo*, uma bactéria heteróloga, e purificada por cromatografia de afinidade. Verificou-se que a enzima pode ser purificada, liofilizada e formulada em doses unitárias, tais como comprimidos, cápsulas com revestimento gastroresistente, *etc.*, mantendo substancialmente a atividade biológica. As formulações de interesse incluem formulações, nas quais a enzima está contida dentro de um revestimento gastroresistente que permite a libertação do agente ativo para o intestino e as formulações, nas quais os agentes ativos se encontram estabilizados para resistir à digestão em condições ácidas do estômago. A formulação pode compreender uma ou mais enzimas ou uma mistura ou "cocktail" de agentes com diferentes atividades.

A invenção é descrita em mais detalhe abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. Efeito do pH nos números de turnover (kcat) das FM PEP, MX PEP e SC PEP.

Figura 2. Resistência da FM PEP e da MX PEP à inativação por enzimas gástricas e pancreáticas. A

estabilidade da enzima pancreática foi avaliada por tratamento de 5 U/ml da FM PEP e da MX PEP com 1mg/ml com tripsina, 1 mg/ml de quimiotripsina, 0,2 mg/ml de elastase e de 0,2 mg/ml de carboxipeptidase A (40 mM de fosfato, pH=6,5). A estabilidade de pepsina foi testada por tratamento da FM PEP e da MX PEP (5 U/ml) com 1mg/ml de pepsina (pH=2, 20 mM HCl).

Figura 3. Especificidade local da hidrólise PQPQLPYQPQLP por PEPs individuais. Os traços HPLC-UV (215 nm) são mostrados para cada mistura de reação. Os fragmentos de clivagem inicial (100 mM (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYQPQLP, 0,1 mM de enzima, t = 5 minutos) foram identificados por espectrometria de massa em tandem. O material de partida (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYQPQLP e os fragmentos de clivagem A: (SEQ ID NO:11, aa. 1-8) PQPQLPY, B: (SEQ ID NO:11, aa 7-13) YPQQLP, C: (SEQ ID NO:12, aa 1-6) PQPQLP, D: (SEQ ID NO: 11, aa 2-6) QPQLP) são indicados nos traços.

Figuras 4A-4C. A hidrólise de (SEQ ID NO:12) LQLQPFPPQPQLPYQPQLPY QPQLPYQPQPF por FM PEP, MX PEP e SC PEP. (A) A dependência temporal de hidrólise na presença de 10 mM de substrato e 0,1 mM da enzima. O substrato aparece como um duplete com um tempo de retenção de cerca de 18 min, devido à presença de quantidades iguais de 32-mer, a partir do qual o N-terminal Leu é eliminado; a presença deste contaminantes não afeta a análise. A partir das áreas dos picos residuais, as taxas de desaparecimento do substrato (33-mer + 32-mer) foram calculadas como 2,3mM/min (FM PEP), 0,43 mM/min (MX PEP) e 0,07 mM/min (SC PEP). (B) Fragmentos de clivagem inicial observados devido à hidrólise pela FM PEP (t = 1 min) e MX PEP (t = 5 min.) (C) Síntese dos fragmentos de

clivagem inicial da hidrólise catalisada FM PEP e MX PEP do substrato de 33-mer.

Figuras 5A-5C. Proteólise competitiva de (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP e (SEQ ID NO:12) LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF por cada PEP. 10 mM do péptido mais longo e 50 mM do péptido mais curto foram co-incubados com 0,1 mM de (A) FM PEP, (B) MX PEP; (C) SC PEP.

Figuras 5A-5C. Proteólise competitiva de (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP (50 mM) e (SEQ ID NO:12) LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (10 mM) na presença de 30 mg/ml de glúten tratado com pepsina. Esta mistura complexa de substratos foi tratada sob condições fisiológicas com uma mistura de enzimas pancreáticas (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase, elastase), enzimas de membrana de borda em escova (derivadas de intestino delgado de ratos) e de (A) FM PEP ou (B) MX PEP.

Figura 7. (SEQ ID NO:12) Proteólise de LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (5 mM) co-perfundido com PEPs individuais (0,1 mM) no pequeno lúmen intestinal lumen de um rato anestesiado. Cada mistura de substrato de enzima foi introduzida através de um catéter no interior de um segmento de 15-20 cm do jejuno superior. As amostras foram recolhidas na outra extremidade do segmento, e analisadas por UV-HPLC (215 nm). O controlo sem qualquer PEP é mostrado no traçado superior.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO

As enzimas de glutenase e as formulações de enzimas

são úteis no tratamento da intolerância ao glúten. As enzimas diminuem os níveis de oligopéptidos de glúten tóxicos em produtos alimentares, quer antes ou após a ingestão por um paciente. As enzimas de interesse incluem propil endopeptidases (PEP), por exemplo, a *Myxococcus xanthus* PEP; e as endoproteases, por exemplo, *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* EPB2. Alguns oligopéptidos de glúten conhecidos por serem resistentes à clivagem por enzimas gástricas e pancreáticas são digeridos por estas enzimas, prevenindo ou aliviando, assim, os seus efeitos tóxicos em pacientes. A intolerância ao glúten está, principalmente, associada à doença celíaca e dermatite herpetiforme, no entanto, também é conhecida na arte por ser encontrada em outros pacientes, por exemplo, associados ao autismo. Esses pacientes, também, podem ser tratados com os métodos aqui descritos.

Em alguns pacientes, esses métodos e composições permitem que o paciente ingira glúten sem consequências graves para a saúde, o que os indivíduos não sofram de qualquer uma destas condições. Em algumas formas de realização, as formulações da invenção compreendem uma glutenase contida num revestimento gastroresistente que permite a libertação do(s) agente(s) ativo(s) para o intestino; em outras formas de realização, o(s) agente(s) ativo(s) encontram-se estabilizados para resistir à digestão em condições ácidas do estômago. Em alguns casos, os(s) agente(s) ativo(s) têm atividade hidrolítica sob condições de pH ácidas, e podem, portanto, iniciar o processo proteolítico de sequências de glúten tóxicas dentro do próprio estômago. Os métodos alternativos de administração proporcionados pela invenção incluem a modificação genética das células do paciente, por exemplo, enterócitos, para expressar níveis elevados de glutenases; e a introdução de microrganismos que expressam tais

glutenases de modo que transientemente ou permanentemente colonizem o trato intestinal do paciente. Tais células do paciente modificadas (que incluem células que não são derivadas a partir do paciente, mas que não são imunologicamente rejeitadas quando administradas ao paciente) e os microrganismos são, em algumas formas de realização, formulados num excipiente farmacologicamente aceitável, ou introduzidos nos alimentos. Também aqui descritos são os alimentos pretratados ou combinados com uma glutenase e métodos para o tratamento de alimentos para remover os oligopéptidos de glúten tóxicos.

As composições da invenção podem ser usadas para fins profiláticos como também terapêuticos. Tal como aqui utilizado, o termo "tratamento" refere-se tanto à prevenção da doença e ao tratamento de uma doença ou de uma condição preexistente. A invenção proporciona um avanço significativo no tratamento da doença em curso, para estabilizar ou melhorar os sintomas clínicos do paciente. Este tratamento é, desejavelmente, realizado antes da perda de funções nos tecidos afetados, mas também pode ajudar a restaurar as funções perdidas ou evitar a perda de funções. A evidência do efeito terapêutico pode ser qualquer diminuição na gravidade da doença, em especial tal como medida pela gravidade de sintomas, tais como fadiga, diarreia crónica, má absorção de nutrientes, perda de peso, distensão abdominal, anemia e outros sintomas de doença celíaca. Outros indícios da doença incluem a presença de anticorpos específicos para glúten, a presença de anticorpos específicos para a transglutaminase tecidual, a presença de células T proinflamatórias e de citocinas, danos para a estrutura das vilosidades do intestino delgado, tal como evidenciado por exame histológico ou outro exame, permeabilidade intestinal aumentado, e afins.

Os pacientes que podem ser tratados com as composições da invenção incluem aqueles com diagnóstico de doença celíaca através de um ou mais dos testes serológicos, *por exemplo*, anticorpos de antigliadina, anticorpos de antitransglutaminase, anticorpos antiendomisial; avaliação endoscópica, *por exemplo*, para identificar lesões celíacas; avaliação histológica da mucosa do intestino delgado, *por exemplo*, para detetar atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas, infiltração de linfócitos intraepiteliais; e quaisquer sintomas GI dependentes da inclusão de glúten na dieta.

Dada a segurança de proteases orais, estas, também, encontram um uso profilático em populações de alto risco, como diabéticos do Tipo I, membros da família dos pacientes diagnosticados com doença celíaca, indivíduos positivos HLA-DQ2 e/ou pacientes com sintomas associados a glúten que ainda não tenham sido submetidos a diagnóstico formal. Tais pacientes podem ser tratados com a enzima de dose regular ou dose regular (10-50% da dose regular). Do mesmo modo, o uso temporário de alta dose de um agente deste tipo também está previsto para doentes em recuperação de enteropatia mediada com glúten, na qual a função intestinal ainda não retornou ao normal, *por exemplo*, tal como avaliado por ensaios de gordura nas fezes.

Os pacientes que podem beneficiar da presente invenção podem ser de qualquer idade, e incluem adultos e crianças. As crianças, em particular, beneficiam de tratamento profilático, tal como a prevenção de exposição precoce aos peptídeos de glúten tóxicos pode impedir o desenvolvimento inicial da doença. As crianças adequadas para a profilaxia podem ser identificadas por testes de predisposição genética, *por exemplo*, por tipagem de HLA; por história familiar, por ensaio de células T ou por outros meios

médicos. Como é conhecido na arte, as dosagens podem ser ajustadas para uso pediátrico.

A invenção, bem como os ensaios para determinar a sua eficácia num paciente ou numa aplicação particular, pode ser efetuada em conformidade com os preceitos aqui explicitados, utilizando procedimentos convencionais na arte. Assim sendo, a prática da presente invenção pode empregar técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica e imunologia, no âmbito dos especialistas na arte. Tais técnicas são completamente explicadas na literatura, tais como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edição (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis et al., eds., 1994); and "Current Protocols in Immunology" (J.E. Coligan et al., eds., 1991); abem como edições atualizadas ou revistas de todo o exposto.

Tal como aqui utilizado, o termo "glutenase" refere-se a uma enzima útil nos métodos da presente invenção que é capaz, por si só ou em combinação com enzimas endógenos ou adicionadas exogenamente, de oligopéptidos tóxicos de clivagem de proteínas de glúten de trigo, cevada, aveia e centeio em fragmentos não-tóxicos. O glúten é a fração de proteína de massa de cereais, que pode ser subdividida em gluteninas e prolaminas, que são subclassificadas como gliadinas, secalinas, hordeínas e aveninas do trigo,

centeio, cevada e aveia, respetivamente. Para uma discussão mais aprofundada de proteínas do glúten, consulte a revisão por Wieser (1996) *Acta Paediatr Suppl.* 412:3-9.

ENZIMAS

A identificação baseada em homologia (por exemplo, por uma análise da sequência de PILEUP) de propil endopeptidases pode ser realizada rotineiramente por os especialistas na arte aquando da contemplação da presente divulgação para identificar PEPs adequadas para utilização nos métodos da presente invenção. As PEPs são produzidas em microorganismos, plantas e animais. As PEPs pertencem à super família da protease de serina de enzimas e têm uma tríade catalítica conservada de composto de resíduos de Ser, His e Asp. Alguns destes homólogos foram caracterizados, por exemplo, as enzimas a partir de *F. meningoscepticum*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas punctata*, *Novosphingobium capsulatum*, *Pyrococcus furiosus* e de fontes de mamíferos são PEPs caracterizadas bioquimicamente. Outras, tais como as enzimas *Nostoc* e *Arabidopsis* são suscetíveis de serem PEPs, mas não foram totalmente caracterizadas até à data. Homólogos das enzimas de interesse podem ser encontrados em bases de dados de sequências disponíveis ao público, e os métodos da invenção incluem tais homólogos. As enzimas candidatas são expressas utilizando tecnologias de expressão heterólogas padrão, e as suas propriedades são avaliadas utilizando os ensaios aqui descritos.

Numa forma de realização da invenção, a glutenase é *Flavobacterium meningosepticum* PEP (GenBank ID # D10980). Em relação à enzima *F. meningoscepticum*, a identidade de sequência de pares desta família de enzimas encontra-se no intervalo de 30-60%. Assim, as PEPs incluem enzimas

possuindo identidade >30% de identidade com a enzima *F. meningoscepticum* (como nas enzimas *Pyrococcus*), ou tendo >40% de identidade (como nas enzimas *Novosphingobium*), ou tendo >50% de identidade (como nas enzimas *Aeromonas*) com a enzima *F. meningoscepticum*. Uma variedade de ensaios têm verificado uma utilidade terapêutica desta PEP. *In vitro*, esta enzima tem demonstrado clivar rapidamente vários péptidos de glúten tóxicos, incluindo um 33-mer altamente inflamatório, (SEQ ID NO:12) LQLQPFPPQQLPYPPQQLPYPPQQLPYPPQPF. *In vivo*, atua sinergisticamente com as peptidases da membrana de borda em escova do intestino, de modo que rapidamente desintoxique estes péptidos, bem como glúten que tenha sido pretratado com proteases gástricas e pancreáticas. Tem uma especificidade larga do comprimento da cadeia, tornando-a especialmente adequada para a composição de péptidos longas ricas em prolina libertadas no duodeno do estômago. A enzima tem um pH ótimo em torno do pH7, e tem uma atividade específica elevada em condições que imitam o ambiente fracamente ácido do intestino delgado superior. A *Flavobacterium* PEP podem clivar todos os epítomos de células T em glúten que foram testados até à data. Tem especial preferência para os epítomos imunodominantes encontrados em alfa-gliadina. Quando o glúten de supermercado é tratado com esta PEP, uma diminuição rápida na sua antigenicidade pode ser observada, conforme avaliado pela análise LC-MS e os testes contra linhas de células T policlonais derivadas de biópsias intestinais de pacientes com doença celíaca. A proteína desnaturada é não-alérgica em roedores, coelhos e seres humanos. É relativamente estável à destruição por proteases pancreáticas, uma característica importante uma vez que, sob condições fisiológicas, será esperado que aja em conjunto com essas enzimas.

Outra enzima de interesse é a *Sphingomonas capsulata* PEP (Genbank ID # AB010298). Esta enzima é comparável com a enzima *Flavobacterium* e *Myxococcus*. Tem especificidade de sequência mais ampla do que a *Flavobacterium* ou a *Myxococcus* PEP, e pode, portanto, ser capaz de destruir o maior número possível de epítomos antigénicos. Como a enzima *Myxococcus*, também é bem expressa na *E. coli*.

Outra enzima de interesse é a *Penicillium citrinum* PEP (Genbank ID# D25535). Esta enzima tem demonstrado possuir atividade PEP com base na sua capacidade para clivar eficazmente um número de ligações Pro-Xaa em péptidos, tais como dinorfina A e a substância P. A metaloprotease putativa tem as vantagens de possuir um tamanho pequeno e um perfil de pH que a torna adequada para trabalhar em conjunto com as enzimas pancreáticas no duodeno. Como tal, é um bom candidato para o tratamento da doença celíaca.

Outra enzima de interesse é a *Lactobacillus helveticus* PEP (Genbank ID# 321529). Ao contrário das PEPs acima, esta PEP é uma enzima de zinco. Esta pode eficazmente proteolizar substratos peptídicos longos, tais como os peptídeos de caseína YQEPVLG-PVRGPFPIIV e RPKHPIKHQ. A proteólise ocorre em todos os sublocais PV e PI, sugerindo que a PEP prefere resíduos hidrofóbicos na posição S1', já que são frequentemente encontrados no glúten. Uma vez que a estirpe produtora de *L. helveticus* CNRZ32 é comumente utilizada na fabricação de queijos, esta enzima tem propriedades desejáveis como uma enzima de grau alimentar.

Outra enzima de interesse é a *Myxococcus xanthus* PEP (Genbank ID# AF127082). Esta enzima possui muitas das vantagens da *Flavobacterium* PEP. Esta é capaz de clivar a 33-mer em pequenos péptidos não-tóxicos. Considerando que a enzima *Flavobacterium* parece ter uma preferência

relativamente rigorosa para títulos PQ em peptídeos de gliadina, a enzima *Myxococcus* pode clivar em títulos PQ, PY e PF, um recurso que permite que lhe proteolizar uma ampla gama de epítomos de glúten. Em comparação com a enzima *Flavobacterium*, tem uma estabilidade equivalente às proteases pancreáticas e uma estabilidade superior relativamente a ambientes ácidos. A enzima *Myxococcus* é bem expressa na *E. coli*, o que torna possível produzir essa enzima de uma forma mais barata.

Os fragmentos da glutenase da enzima de interesse incluem fragmentos de, pelo menos, cerca de 20 aminoácidos contíguos, mais usualmente, pelo menos, cerca de 50 aminoácidos contíguos, e pode compreender 100 ou mais aminoácidos até à proteína completa, e pode estender-se ainda mais para compreender sequências adicionais. Em cada caso, o critério principal é se o fragmento conserva a capacidade de digerir os oligopéptidos tóxicos que contribuem para os sintomas da doença celíaca.

Modificações de interesse que não alteram a sequência primária incluem derivação química de proteínas, incluindo, por exemplo, a acilação, *por exemplo*, grupos de laurilo, estearilo, mirsitilo, decilo, etc., PEGuilação, esterificação ou amidação. Tais modificações podem ser usadas para aumentar a resistência da enzima em relação à proteólise, por exemplo, por ligação de cadeias laterais PEG ou grupos de laurilo a lisinas de superfície. Também estão incluídas as modifications de glicosilação, *por exemplo*, as efetuadas por modificação dos padrões de glicosilação de uma proteína durante a sua síntese e processamento ou noutros passos de processamento, *por exemplo*, expondo a proteína a enzimas que afetem a glicosilação, tais como a glicosilação de mamíferos ou desglicosilação de enzimas. Também abraçadas são as

sequências que tenham resíduos de aminoácidos fosforilados, *por exemplo*, fosfotirosina, fosfoserina ou fosfotreonina.

A sequência de aminoácidos de uma glutenase, *por exemplo*, uma glutenase que ocorra naturalmente, pode ser alterada de várias maneiras conhecidas na arte, para gerar alterações específicas na sequência e enzimas da glutenase adicionais úteis nas formulações e composições da invenção. Tais variantes serão tipicamente variantes funcionalmente conservadas, que diferem entre si, geralmente, em sequência, a partir da correspondente proteína nativa ou original, mas ainda assim retêm a atividade biológica desejada. As variantes também incluem fragmentos de uma glutenase que retem a atividade enzimática. Vários métodos conhecidos na arte podem ser usados para gerar alterações específicas, *por exemplo*, exibição de fagos em combinação com mutações aleatórias e orientadas, introdução de mutações de varredura, e semelhantes.

Uma variante pode ser substancialmente semelhante a uma sequência nativa, *ou seja*, diferindo em, pelo menos, um aminoácido, e pode diferir em, pelo menos, dois, mas, geralmente, não mais do que cerca de dez aminoácidos (o número de diferenças dependendo do tamanho da sequência nativa). As alterações das sequências podem ser substituições, inserções ou eliminações. As mutações de varredura que introduzem sistematicamente alanina, ou outros resíduos, podem ser utilizadas para determinar os aminoácidos essenciais. As substituições de aminoácidos conservativas incluem tipicamente substituições dentro dos seguintes grupos: (glicina, alanina), (valina, isoleucina, leucina); (ácido aspártico, ácido glutâmico); (asparagina, glutamina); (serina, treonina); (lisina, arginina) e (fenilalanina, tiroseno).

Várias modificações podem ser feitas à sequência de enzimas. A MX PEP tem uma estrutura semelhante à do músculo ou cérebro dos suínos. A enzima consiste num domínio catalítico com um típico dobramento de hidrolase α/β , que está covalentemente ligada a um domínio de hélice em forma de tambor cilíndrico. O domínio catalítico é constituído por resíduos N-terminais 1-67 e os resíduos C-terminais 410-678; o domínio da hélice inclui os resíduos 71-406. Duas cadeias lineares formadas pelos resíduos 67-70 e 407-409 covalentemente ligam os dois domínios. Esta análise da M. xanthus PEP é útil na conceção de enzimas modificadas. Tipicamente, tais enzimas modificadas retêm a tríade catalítica (Ser 533, Asp 616 e His 651), bem como os resíduos Arg 618 conservados, que se espera que sejam importantes para a atividade. Os resíduos Asn534, Tyr453 e Arg618 são conservados na família da prolil endopeptidase, e esses resíduos podem também ser conservados na conceção de enzimas modificadas. Numa forma de realização, a região estendida do domínio da hélice é substituída com um ligante flexível curto, por exemplo, constituído por resíduos de 5-10 Gli, truncando a proteína e, assim, reduzir a sua suscetibilidade proteolítica à pepsina.

Por exemplo, têm sido efetuadas mutações V458 e G532, que estão perto da Ser533 catalítica na bolsa de ligação. Os seus mutantes mantêm a atividade do tipo selvagem em relação à suc-Ala-Pro-pNA, mas mostram uma atividade reduzida em relação à 13-mer. Outros mutantes, R572A/Q. Os 1575A e F229Y têm uma maior especificidade para um substrato mais longo.

As enzimas modificadas para fornecer uma característica específica de interesse podem ser ainda modificadas, por exemplo por muta-génese, *exon shuffling*, etc., como conhecido na arte, seguido de rastreio ou

selecção, de modo a otimizar ou restaurar a ctividade da enzima, *por exemplo*, para níveis de tipo selvagem.

Também útil na prática da presente invenção são as proteínas que foram modificados usando técnicas de biologia molecular e/ou química, de modo a melhorar a sua resistência à degradação proteolítica e/ou a condições ácidas, tais como as encontradas no estômago, e para otimizar as propriedades de solubilidade ou a torná-las mais adequadas como um agente terapêutico. Por exemplo, a espinha dorsal da peptidase pode ser ciclizada para melhorar a estabilidade (ver Friedler et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:23783-23789). Análogas a tais proteínas estão aqueles resíduos contidos diferentes dos L-aminoácidos que ocorrem naturalmente, *por exemplo*, D-aminoácidos, ou os aminoácidos sintéticos que não ocorrem naturalmente.

As proteínas da glutenase úteis na prática da presente invenção também podem ser isoladas e purificadas de acordo com métodos convencionais a partir de sistemas de produção recombinantes e a partir de fontes naturais. A produção da protease pode ser conseguida usando sistemas de hospedeiro-vector estabelecidos em organismos, tais como *E. Coli*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *Lactobacilli*, *Bacilli* e *Aspergilli*. Vectores integrativos ou auto-replicativos podem ser utilizados para esta finalidade. Em alguns desses hospedeiros, a protease é expressa como uma proteína intracelular e, subsequentemente, purificada, ao passo que, em outros hospedeiros, a enzima é segregada para o meio extracelular. A purificação da proteína pode ser realizada por uma combinação de cromatografia de permuta iónica, cromatografia de afinidade de Ni-afinidade(ou algum procedimento de cromatografia alternativa), cromatografia de interação hidrofóbica e/ou outras técnicas de

purificação. Tipicamente, as composições utilizadas na prática da presente invenção irão incluir, pelo menos, 20% em peso do produto desejado, mais usualmente, pelo menos, cerca de 50% em peso, preferencialmente, pelo menos, cerca de 85% em peso, pelo menos, cerca de 90%, e para fins terapêuticos, pode ser, pelo menos, cerca de 95% em peso, em relação a contaminantes relacionados com o método de preparação do produto e sua purificação. Geralmente, as percentagens serão baseadas na proteína total. As proteínas nessas composições podem estar presentes numa concentração de, pelo menos, cerca de 500 mg/ml; pelo menos, cerca de 1 mg/mg; pelo menos, cerca de 5 mg/ml; pelo menos, cerca de 10 mg/ml, ou mais.

Também aqui descrita é uma preparação purificada de uma glutenase. Tais enzimas podem ser produzidas por métodos recombinantes. Numa forma de realização, tais métodos utilizam um hospedeiro bacteriano para expressão, apesar de os sistemas de fungos e eucariotas encontrarem utilização para algumas finalidades. As sequências de codificação que contêm uma sequência de sinal, ou que são concebidas para conter uma sequência de sinal, podem ser segregadas para o espaço periplasmático de um hospedeiro bacteriano. Um protocolo de choque osmótico pode, então, ser utilizado para libertar as proteínas periplásmicas para o sobrenadante.

Quando a enzima é uma enzima citoplasmática, uma sequência de sinal pode ser introduzida para a secreção periplasmática, ou a enzima pode ser isolada a partir de um lisado citoplasmático. Os métodos para purificação incluem purificação por afinidade Ni-NTA, por exemplo, em combinação com a introdução de um marcador de histidina; e cromatografia de métodos conhecidos na arte, por exemplo, permuta catiónica, permuta aniónica, filtração em gel,

HPLC, FPLC, e semelhantes.

Para vários efeitos, tais como o armazenamento estável, a enzima pode ser liofilizada. A liofilização é, preferencialmente, realizada numa preparação inicialmente concentrada, por exemplo, de, pelo menos, cerca de 1 mg/ml. Pode ser adicionado um marcador para melhorar a estabilidade da enzima. Verificou-se que a MX PEP pode ser liofilizada sem perda de atividade específica. A enzima e os excipientes liofilizados são úteis na produção de cápsulas ou comprimidos com revestimento gastroresistente, por exemplo, uma única cápsula ou comprimido pode conter, pelo menos, cerca de 1 mg. A PEP, usualmente, pelo menos, cerca de 10 mg de PEP, e pode conter, pelo menos, 100 mg de PEP, pelo menos, cerca de 500 mg de PEP, ou mais. Tal como descrito em detalhe aqui, os revestimentos entéricos podem ser aplicados, sendo que uma fração substancial da atividade é retida, e é estável durante, pelo menos, cerca de 1 mês a 4°C. Também se verificou que a MX PEP retém a atividade de uma formulação de comprimidos.

Antes da presente invenção, não houve necessidade percebida de uma glutenase que pudesse ser ingerida por um ser humano ou misturada com um produto alimentar. Assim, antes da presente invenção, a maioria das glutenases não existiam numa forma isenta de contaminantes que pudessem ser prejudiciais para um humano em caso de ingestão. A presente invenção cria uma necessidade para tais preparações de glutenases e fornece os métodos para a sua preparação. Numa forma de realização relacionada, a presente invenção proporciona novos produtos alimentares que são derivados de produtos alimentares que contenham glúten mas que foram tratados para reduzir a concentração e quantidade dos oligopéptidos e sequências de oligopéptidos que se descobriu serem tóxicos para doentes com doença

celíaca. Embora tivessem sido produzidos alimentos sem glúten ou com glúten reduzido, os géneros alimentícios para uso na presente invenção diferem dos referidos produtos alimentares, não só pela maneira através da qual são preparados, pelo tratamento do produto alimentar com uma glutenase, mas também pelo seu conteúdo, já que os métodos da arte anterior resultam da alteração de componentes não-tóxicos para os pacientes com doença celíaca, resultando num gosto e composição diferentes. Os produtos alimentares da arte anterior incluem, por exemplo, o amido de trigo Codex Alimentarius, que se encontra disponível na Europa e tem <100 ppm de glúten. O amido é geralmente preparado por processos que tiram vantagem do facto de o glúten ser insolúvel em água, enquanto que o amido é solúvel.

Numa forma de realização, o termo "glutenase", tal como aqui utilizado, refere-se a uma protease ou a uma enzima de peptidase que satisfaz um ou mais dos critérios aqui proporcionados. Tais critérios também encontram utilização na avaliação de modificações enzimáticas, por exemplo, como uma ferramenta de rastreio após geração da modificação. Em algumas formas de realização, as modificações da sequência de aminoácidos MX PEP ou modificações não-peptídicas são avaliadas utilizando tais ensaios. Utilizando estes critérios, um especialista na arte pode determinar a adequação de uma enzima candidata ou modificação enzimática para utilização nos métodos da invenção. Muitas enzimas corresponderão a vários critérios, incluindo dois, três, quatro ou mais dos critérios, e algumas enzimas irá atender a todos os critérios. Os termos "protease" ou "peptidase" podem referir-se a uma glutenase e, tal como aqui utilizadas, descrevem uma proteína ou um seu fragmento com a capacidade de clivar ligações peptídicas, sendo que a ligação peptídica cindível pode ser terminal ou interna em oligopéptidos ou proteínas maiores.

As propil peptidases específicas são glutenases úteis na prática da presente invenção.

As glutenases incluem enzimas de protease e peptidase que têm, pelo menos, cerca de 20% de identidade da sequência ao nível de aminoácidos, mais usualmente, pelo menos, cerca de 40% de identidade da sequência e, preferencialmente, pelo menos, cerca de 70% de identidade da sequência com uma das seguintes peptidases: prolil endopeptidase (PEP) de *F. meningosepticum* (GenBank, número de acesso D10980), PEP de *A. hydrophila* (GenBank, número de acesso D14005), PEP form *S. capsulata* (GenBank, número de acesso AB010298), DCP I de coelho (GenBank, número de acesso X62551), DPP IV a partir de *Aspergillus fumigatus* (Genbank, número de acesso U87950), carboxipeptidase de *Aspergillus saitoi* (GenBank, ID# D25288), PEP de *Lactobacillus helveticus* *Lactobacillus* (Genbank, ID# 321529) ou proteinase de cisteína B de *Hordeum vulgare* (GenBank, número de acesso JQ1110).

Cada uma das proteases aqui descritos acima podem ser concebidas para melhorar as propriedades desejadas, tais como maior especificidade para sequências de gliadina tóxicas, melhorada tolerância para os substratos mais longos, estabilidade do ácido, resistência à pepsina, resistência à proteólise pelas enzimas pancreáticas e maior tempo de prateleira. A propriedade desejada pode ser manipulada através de métodos de engenharia de proteínas padrão.

Além da prolina, os resíduos de glutamina também são altamente prevalentes em proteínas de glúten. A toxicidade do glúten na doença celíaca foi diretamente correlacionada com a presença de resíduos Gin específicos. Portanto, as proteases específicas de glutamina são também benéficas

para o tratamento da doença celíaca. Uma vez que a aveia contém proteínas que são ricas em glutamina, mas não são, especialmente, ricas em resíduos de prolina, um benefício adicional de uma protease específica de glutamina é a melhoria da tolerância da aveia nos pacientes com doença celíaca que mostram uma leve intolerância à aveia. Um exemplo de uma protease desse tipo é a endoproteinase de cisteína em epígrafe a partir de glúten. Esta enzima cliva proteínas do glúten rapidamente com uma preferência distinta para a clivagem pós-Gln. Também de interesse é a endoprotease de *Hordeum vulgare* (GenBank, número de acesso U19384), que demonstrou para digerir eficientemente a α 2-gliadina. A enzima é ativa em condições ácidas, e é útil como um suplemento dietético administrado oralmente. Uma dieta contendo glúten pode ser suplementada com proEPB2 administrada por via oral, o que resulta na degradação eficaz dos peptídeos imunogênicos de glúten no estômago ácido, antes de estes peptídeos entrarem no intestino e serem apresentados ao sistema imunológico. Proteínas com elevada semelhança de sequências para esta enzima também são de interesse. Uma vantagem destas enzimas é que estas são consideradas seguras para o consumo humano por via oral, devido à sua presença na dieta sem glúten a partir de cevada.

A dipeptidil peptidase IV e a dipeptidil carboxipeptidase I são as enzimas limitantes de velocidade na desagregação de peptídeos de gliadina tóxicos do glúten. Estas enzimas são gargalos na digestão de glúten no intestino delgado de mamíferos porque (i) a sua atividade específica é relativamente baixa em comparação com outras amino e carboxi peptidases na borda em escova intestinal, e (ii), devido à sua forte sensibilidade para o comprimento da cadeia do substrato, estas clivam longos peptídeos imunotóxicos como a 33-mer de uma forma muito lenta. Ambos

os problemas podem ser melhorados através da administração de amino e carboxi peptidases específicas de prolina a partir de outras fontes. Por exemplo, a X-Pro dipeptidase a partir de *Aspergillus oryzae* (GenBank, ID# BD191984) e a carboxipeptidase de *Aspergillus saitoi* (ID GenBank ID# D25288) pode melhorar a digestão de glúten no intestino celíaco.

Uma glutenase inclui uma peptidase ou uma protease que tenha uma atividade específica de, pelo menos, 2,5 U/mg, preferencialmente 25 U/mg, e mais preferencialmente de 250 U/mg para a clivagem de um péptido que compreenda um ou mais dos motivos seguintes: Gly-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA (sendo que Z representa um grupo de benziloxicarbonilo), e Hip-His-Leu, sendo que "Hip" é o ácido hipúrico, pNA é para-nitroanilida, e 1 U é a quantidade de enzima necessária para catalisar o volume de 1 mmol de substrato por minuto. Substratos cromogénicos podem ser utilizados no rastreio, por exemplo, substratos, tais como Cbz-Gly-Pro-pNA ou Suc-Ala-Pro-pNA, permitem a identificação de proteases específicas de prolina. Substratos semelhantes também podem ser usados para identificar proteases específicas de glutamina. Estes ensaios podem ser monitorizados por métodos espectralfotométricos de UV-Vis.

Uma glutenase inclui uma enzima pertencente a qualquer uma das seguintes classificações de enzimas: EC 3.4.21.26, EC 3.4.14.5, or EC 3.4.15.1.

Uma glutenase inclui uma enzima com um k_{cat}/K_m de, pelo menos, cerca de $2,5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, geralmente, pelo menos, cerca de $250 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ e, preferencialmente, pelo menos, cerca de $25000 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para clivagem de qualquer um dos seguintes péptidos, incluindo os epítomos de células T conhecidos em glúten, sob condições ótimas: (SEQ ID NO: 1) QLQPFPPQQLPY or PFPQQLPY, (SEQ ID NO: 3) PQQQLPYPPQQLPY or PQQQLPYPPQ,

(SEQ ID NO: 13) QPQQSFPQQQ or PQQSFPQQQ, (SEQ ID NO: 14) QLQP-FPQPELPY, (SEQ ID NO: 15) PQPELPYPQPELPY, (SEQ ID NO: 16) QPQQSFPEQQ; (SEQ ID NO: 30) IQPQQPAQL; (SEQ ID NO: 31) QQPQQYPYQ; (SEQ ID NO: 32) SQPQG7QFPQ; (SEQ ID NO: 33) QQPFPQQPQ; or (SEQ ID NO: 34) PFSQQQQPV. A clivagem de péptidos gerados fisiologicamente mais longos contendo um ou mais dos epítomos acima também pode ser avaliada, por exemplo, a clivagem da 33-mer de alfa-gliadina, (SEQ ID NO: 12) LQLQPF (PQPQLPY)₃PQPQPF, e a 26-mer de gama-gliadina, (SEQ ID NO: 35) FLQPQQFPQQPQQYPQQPQQP-FPQ. Uma glutenase da invenção inclui peptidase ou protease com uma especificidade de $k_{cat}/K_m > 2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para o substrato fluorogénico arrefecido (SEQ ID NO: 36) Abz- OPQQP- Tyr (NO₂)- D. Estes testes podem ser monitorizados por HPLC ou espectroscopia de fluorescência. Para estes últimos testes, os fluoróforos adequados podem ser anexados aos amino- e carboxi-terminais dos péptidos.

Uma glutenase útil na prática da presente invenção pode ser identificada pela sua capacidade de clivar um substrato pré-tratado para remover os oligopéptidos de glúten tóxicos, em que um "substrato pretratado" é uma proteína de gliadina, hordeína, secalina ou avenina que tenha sido tratada com quantidades fisiológicas de proteases gástricas e pancreáticas, incluindo pepsina (1: 100 de proporção de massa), tripsina (1: 100), quimotripsina (1: 100), elastase (1: 500), e as carboxipeptidases A e B (1: 100. A digestão da pepsina pode ser realizada com pH 2 durante 20 min., para simular a digestão gástrica, seguida de posterior tratamento da mistura reacional com tripsina, quimotripsina, elastase e carboxipeptidase com pH 7 durante 1 hora, para simular a digestão duodenal por enzimas pancreáticas secretadas. O substrato pretratado compreende oligopeptídeos resistentes à digestão, *por exemplo*. sob condições fisiológicas. Uma

glutenase pode catalisar a clivagem do glúten tratado com pepsina-tripsina-quimotripsina elastase carboxipeptidase (PTCEC, de modo que menos de 10% dos produtos sejam mais longos do que (SEQ ID NO: 3, aa 1-9) PQQQLPYPQ (como julgado por tempos de retenção mais longa numa coluna de HPLC de fase inversa C18 monitorizada a A₂₁₅).

A capacidade de uma peptidase ou protease para clivar um substrato pretratado pode ser determinada pela medição da capacidade de uma enzima para aumentar a concentração de terminais NH₂ livres numa mistura de reação contendo 1 mg/ml de substrato pretratado e 10 mg/ml de peptidase ou de protease e incubada a 37°C durante 1 hora. Uma glutenase útil na prática da presente invenção irá aumentar a concentração dos terminais livres de aminos em tais condições, normalmente, pelo menos, cerca de 25%, mais usualmente, pelo menos, cerca de 50%, e preferencialmente, pelo menos, cerca de 100%. Uma glutenase inclui uma enzima capaz de reduzir a concentração molar residual de oligopéptidos superiores a cerca de 1000 Da em 1 mg/ml de "substrato pretratado" após uma incubação de 1 hora com 10 mg/ml de enzima em, pelo menos, cerca de 2 vezes, usualmente em, pelo menos, cerca de 5 vezes, e de preferencialmente em, pelo menos, cerca de 10 vezes. A concentração destes oligopéptidos pode ser estimada através de métodos conhecidos na arte, por exemplo cromatografia de exclusão de tamanho, e semelhantes.

Uma glutenase inclui uma enzima capaz de desintoxicação do glúten inteiro, tal como monitorizado por linhas de células T policlonais derivadas de biópsias intestinais de pacientes com doença celíaca; desintoxicação do glúten inteiro, tal como monitorizado por LC-MS-MS; e/ou desintoxicação do glúten inteiro, tal como monitorizado por testes de ELISA utilizando anticorpos monoclonais capazes

de reconhecer sequências específicas para gliadina.

Por exemplo, uma glutenase pode reduzir a potência, através da qual um "substrato pretratado" pode antagonizar a ligação da (SEQ ID NO: 17) PQPELPYPQP QLP a HLA-DQ2. A capacidade de um substrato para se ligar a HLA-DQ é indicativa da sua toxicidade; fragmentos mais pequenos do que cerca de 8 aminoácidos, geralmente não são estavelmente ligados a MHC classe II. O tratamento com uma glutenase que digere oligopéptidos tóxicos, através da redução da concentração dos oligopéptidos tóxicos, impede uma mistura evitando que compitam com um péptido de teste para a ligação MHC. Para testar se uma glutenase candidata pode ser utilizada para os fins da presente invenção, 1 mg/ml de solução do "substrato pretratado" pode ser, primeiro, incubado com 10 mg/ml da glutenase candidato, e a capacidade da solução resultante em deslocar a preligação radioativa (SEQ ID NO: 18) PQPELPYPQPQPLP às moléculas HLA-DQ2 pode, então, ser quantificada, com uma redução de deslocamento em relação a um controlo não-tratado; um indicação da utilidade nos métodos da presente invenção.

Uma glutenase inclui uma enzima que reduz a resposta dos anticorpos anti-tTG a uma dieta "desafio com glúten" num doente com doença celíaca, pelo menos, em cerca de 2 vezes, mais usualmente, pelo menos, cerca de 5 vezes, e de preferência em, pelo menos, cerca de 10 vezes. Uma "dieta desafio com glúten" é definida como o consumo de 100 g de pão por dia durante 3 dias por um paciente celíaca previamente com uma dieta isenta de glúten. A resposta dos anticorpos anti-tTG pode ser medida no sangue periférico utilizando técnicas de diagnóstico clínico padrão, tal como conhecido na arte.

Excluídas do termo "glutenase" estão as seguintes:

peptidases: pepsina humana, tripsina humana, chi-motripsina humana, elastase humana, papaína de mamão e bromelina do abacaxi e, normalmente, são excluídas as enzimas que contenham mais de 98% de identidade de sequência ao nível dos aminoácidos em relação a essas peptidases; mais habitualmente excluídas são as enzimas que têm mais do que 90% de identidade de sequência ao nível de aminoácidos em relação a essas peptidases, e de preferência são excluídas as enzimas que contenham mais de 70% de identidade de sequência ao nível de aminoácidos em relação a essas peptidases.

Entre as proteínas de glúten com potencial efeito nocivo para os pacientes com doença celíaca estão incluídas as proteínas de armazenamento de trigo, que incluem espécies de *Triticum aestivum*; *Triticum aethiopicum*; *Triticum baeoticum*; *Triticum militinae*; *Triticum monococcum*; *Triticum sinskajae*; *Triticum timopheevii*; *Triticum turgidum*; *Triticum urartu*; *Triticum vavilovii*, *Triticum zhukovskyi*; etc. Uma revisão dos genes que codificam as proteínas de armazenamento de trigo pode ser encontrada em Colot (1990) Genet Eng (N Y) 12:225-41. A gliadina é a fração de proteína solúvel em álcool de glúten de trigo. As gliadinas são geralmente ricas em glutamina e prolina, especialmente na parte N-terminal. Por exemplo, os primeiros 100 aminoácidos da gliadinas α e γ contêm ~35% e ~20% dos resíduos de glutamina e prolina, respectivamente. Muitas gliadinas do trigo foram caracterizadas, e uma vez que existem muitas linhagens de trigo e de outros cereais, antecipa-se que muitas mais sequências serão identificadas através de métodos de rotina de biologia molecular. Num aspeto da presente divulgação, as plantas geneticamente modificadas fornecidas diferem dos seus homólogos de ocorrência natural contendo proteínas de gliadina que possuem um teor reduzido de resíduos de glutamina e

prolina.

Exemplos de sequências de gliadina incluem, mas não estão limitadas a, sequências de alfa gliadina de trigo, por exemplo, tal como previsto no GenBank, números de acesso AJ133612; AJ133611; AJ133610; AJ133609; AJ133608; AJ133607; AJ133606; AJ133605; AJ133604; AJ133603; AJ133602; D84341.1; U51307; U51306; U51304; U51303; U50984 e U08287. Uma sequência da gliadina de ómega de trigo é estabelecida no GenBank número de acesso AF280605.

Para os fins da presente invenção, os oligopéptidos de gliadina tóxicos são os péptidos obtidos durante a digestão humana normal das gliadinas e proteínas de armazenamento relacionadas, tal como descrito acima, a partir de cereais alimentares, por exemplo, trigo, centeio, cevada, e semelhantes. Acredita-se que esses oligopéptidos atuem como antigénios para as células T em doença celíaca. Para a ligação das proteínas de MHC de classe II, os péptidos imunogénicos são normalmente de cerca de 8 a 20 aminoácidos de comprimento, mais normalmente entre cerca de 10 a 18 aminoácidos. Tais péptidos podem incluir motivos PXP, tais como o motivo PQPQLP (SEQ ID NO: 8). A determinação de se um oligopéptido é imunogénico para um paciente em particular é prontamente determinada pelo padrão de ativação de células T e outros testes conhecidos dos especialistas na arte.

Tal como aqui demonstrado, durante a digestão, os oligopéptidos resistentes à peptidase permanecem após a exposição do glúten, *por exemplo*, enzimas de gliadina a enzimas digestivas normais. Exemplos de oligopéptidos resistentes à peptidase são fornecidos, por exemplo, como descrito em SEQ ID NO: 5, 6, 7 e 10. Outros exemplos de oligopéptidos da gliadina imunogénicos são descritos em

Wieser (1995) Baillieres Clin Gastroenterol 9 (2) : 191-207.

A determinação de se uma enzima candidata irá digerir um oligopéptido de glúten tóxico, tal como discutido acima, pode ser determinada empiricamente. Por exemplo, um candidato pode ser combinado com um oligopéptido compreendendo um ou mais motivos Gli-Pro-pNA, Z-Gli-Pro-pNA, Hip-His-Leu, Abz-QLP-Tyr (NO₂)-PQ, Abz-PYPQPQ - Tyr (NO₂)POP-Lys (Abz)-LP-Tyr (NO₂)-PQPQLP, PQPQLP-Tyr (NO₂)-PQP-Lys (ABZ) - LP, com um ou mais dos oligopéptidos (SEQ ID NO: 1) QLQPFPPQPQLPY, (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY, (SEQ ID NO: 13) QPQQSFPQQQ, (SEQ ID NO: 14) QLQPFPPQPELPY, (SEQ ID NO: 15) PQPELPYPQPELPY, (SEQ ID NO: 16) QPQQSFPEQQ ou (SEQ ID NO: 12) LQLQPFPPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPFP; ou com um substrato pretratado compreendendo uma ou mais proteínas de gliadina, hordeína, secalina avenina que tenham sido tratadas com quantidades fisiológicas de proteases gástricas e pancreáticas. Em cada caso, o candidato é determinado para ser uma glutenase da invenção, se for capaz de clivar o oligopéptido. As glutenases que possuem uma baixa toxicidade para as células humanas e são ativos nas condições fisiológicas presentes na borda em escova intestinal são preferidas para a utilização em algumas aplicações da invenção, e por isso pode ser útil para o rastreio de tais propriedades em glutenases candidatas.

Os substratos de oligopéptidos ou de proteína para tais ensaios podem ser preparados de acordo com técnicas convencionais, tais como síntese, técnicas recombinantes, isolamento a partir de fontes naturais, ou semelhantes. Por exemplo, a síntese de péptidos em fase sólida envolve a adição sucessiva de aminoácidos para criar uma cadeia de péptidos linear (ver Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154). A tecnologia de DNA recombinante pode também

ser usada para produzir o peptído.

O grau de digestão do oligopeptído tóxico pode ser comparado a um valor de linha de base. O desaparecimento do material de partida e/ou a presença de produtos de digestão pode ser monitorizado por métodos convencionais. Por exemplo, o marcador detetável pode ser conjugado com um péptido, e a mudança no peso molecular relacionada com o marcador é então determinada, *por exemplo*. precipitação ácida, de exclusão de peso molecular, e similares. O valor da linha de base pode ser um valor para uma amostra de controlo ou um valor estatístico que seja representativo de uma população de controlo. Vários controlos podem ser realizados para assegurar que uma atividade observada é autêntica, incluindo a execução de reações paralelas, controlos positivos e negativos, de resposta de dosagem, e similares.

As glutenases ativas identificadas pelos métodos de rastreio aqui descritos podem servir como compostos de chumbo para a síntese de compostos análogos para identificar glutenases com propriedades melhoradas. A identificação de compostos análogos pode ser feita através da utilização de técnicas tais como análise de campo autoconsistentes (SCF), análise de interação de configuração (CI) e análise dinâmica de modo normal.

Uma propriedade desejável em glutenases é a estabilidade contra as condições gástricas (baixo pH e pepsina). Glutenases com estabilidade gástrica melhorada podem ser identificadas através de mutagénese, seguida de transferência de colónias para uma cultura líquida em formatos de rastreio de alto rendimento, tais como placas de 96 poços. Após o crescimento, pode ser lisada uma fração da cultura de células e o lisado incubado durante períodos

variáveis, sob condições gástricas simuladas (pepsina, pH 2). Depois disso, o lisado pode ser ensaiado com um substrato cromogénico adequado (por exemplo, Cbz-Succinil-Ala-Pro-PNA). Uma cor amarela intensa irá desenvolver-se na presença de extratos com estabilidade gástrica melhorada.

FORMULAÇÕES

Numa forma de realização da presente invenção, a um paciente com doença celíaca é, para além de lhe ser proporcionada uma glutenase ou alimentos tratados de acordo com os presentes métodos, fornecido um inibidor de transglutaminase tecidual, um agente antiinflamatório, um antiagente ulcelar, agentes estabilizadores de mastócitos e/ou um agente antialérgico. Exemplos de tais agentes incluem inibidores da redutase HMG-CoA com propriedades antiinflamatórias, tais como compactina, lovastatina, simvastatina, pravastatina e atorvastatina; antagonistas recetores H1 da histamina antialérgicos, tais como acrivastina, cetirizina, desloratadina, ebastina, fexofenadina, levocetirizina, loratadina e mizolastina; antagonistas recetores de leucotrienos, tais como montelukaste e zafirlucaste; inibidores da COX2, tais como celecoxib e rofecoxib, inibidores da quinase p38 MAP, tais como BIRB-796; e agentes estabilizadores de mastócitos, tais como cromoglicato de sódio (cromolina), pemirolasto, proxicromil, repirinast, doxantrazole, amlexanox, nedocromil e probicromil.

Tal como aqui usados, os compostos que estão "comercialmente disponíveis" podem ser obtidos a partir de fontes comerciais, incluindo, mas não se limitando a, Acros Organics (Pittsburgh PA), Aldrich Chemical (Milwaukee WI, including Sigma Chemical and Fluka), Apin Chemicals Ltd. (Milton Park UK), Avocado Research (Lancashire U.K.), BDH

Inc. (Toronto, Canada), Bionet (Cornwall, U.K.), Chemservice Inc. (West Chester PA), Crescent Chemical Co. (Hauppauge NY), Eastman Organic Chemicals, Eastman Kodak Company (Rochester NY), Fisher Scientific Co. (Pittsburgh PA), Fisons Chemicals (Leicestershire UK), Frontier Scientific (Logan UT), ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa CA), Key Organics (Cornwall U.K.), Lancaster Synthesis (Windham NH), Maybridge Chemical Co. Ltd. (Cornwall U.K.), Parish Chemical Co. (Orem UT), Pfaltz & Bauer, Inc. (Waterbury CN), Polyorganix (Houston TX), Pierce Chemical Co. (Rockford IL), Riedel de Haen AG (Hannover, Germany), Spectrum Quality Product, Inc. (New Brunswick, NJ), TCI America (Portland OR), Trans World Chemicals, Inc. (Rockville MD), Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond VA), Novabiochem e Argonaut Technology.

Os compostos úteis para coadministração com as glutenases e géneros alimentícios tratados da invenção também podem ser feitos por métodos conhecidos de um especialista na arte. Tal como aqui usados, os "métodos conhecidos de um especialista na arte" podem ser identificadas através de vários livros de referência e bases de dados. Livros de referência adequados que detalham a síntese de reagentes úteis na preparação de compostos da presente invenção, ou que fornecem referências aos artigos que descrevem a preparação, incluem, por exemplo, "Synthetic Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Inc., New York; S. R. Sandler et al., "Organic Functional Group Preparations," 2nd Ed., Academic Press, New York, 1983; H. O. House, "Modern Synthetic Reactions". 2a Ed., W. A. Benjamin, Inc. Menlo.Park, Calif. 1972; T. L. Gilchrist, "Heterocyclic Chemistry", 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1992; J. March, "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure", 4a Ed., Wiley-Interscience, New York, 1992. Reagentes específicos e

semelhantes também podem ser identificados através dos índices de produtos químicos conhecidos preparados pelo Chemical Abstracts Service da American Chemical Society, que estão disponíveis na maioria das bibliotecas públicas e universitárias, bem como através de bancos de dados online (a American Chemical Society, Washington, DC, www.acs.org pode ser contactada para mais detalhes). Produtos químicos que são conhecidos, mas que não estão disponíveis comercialmente nos catálogos, podem ser preparados através de estruturas de síntese química personalizadas, nas quais muitas das estruturas fornecedoras de produtos químicos padrão (por exemplo, aquelas listadas acima) oferecem serviços personalizados de síntese.

As proteínas da glutenase e/ou os compostos administrados com as mesmas são incorporadas numa variedade de formulações para administração terapêutica. Num aspeto, os agentes são formulados em composições farmacêuticas por combinação com transportadores ou diluentes adequados e farmaceuticamente aceitáveis, e são formulados em preparações, em formas sólidas, semisólidas, líquidas ou gasosas, sólidas, tais como comprimidos, cápsulas, pós, grânulos, unguentos, soluções, supositórios, injeções, inalantes, géis, microesferas, e aerossóis. Como tal, a administração da glutenase e/ou outros compostos pode ser conseguida de várias maneiras, geralmente por administração oral. A glutenase, e/ou outros compostos, podem ser sistémica após a administração ou pode ser localizada em virtude da formulação, ou pelo uso de um implante que atue para reter a dosagem ativa no local de implantação.

Em formas de dosagem farmacêutica, a glutenase e/ou outros compostos podem ser administrados sob a forma dos seus sais farmaceuticamente aceitáveis, ou podem também ser utilizados sozinhos ou em associação adequada, bem como em

combinação com outros compostos farmacêuticamente ativos. Os agentes podem ser combinados, como descrito anteriormente, para proporcionar uma mistura de atividades. Os seguintes métodos e excipientes são exemplificativos e não devem ser interpretados como limitando a invenção.

Para as preparações orais, os agentes podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com aditivos apropriados para fazer comprimidos, pós, grânulos ou cápsulas, por exemplo, com aditivos convencionais, tais como lactose, manitol, amido de milho ou amido de batata; com ligantes, tais como celulose cristalina, derivados de celulose, acácia, amido de milho ou gelatinas; com desintegradores, tais como amido de milho, amido de batata ou carboximetilcelulose de sódio; com lubrificantes, tais como talco ou estearato de magnésio, e, se desejado, com diluentes, agentes tamponantes, agentes humedecedores, conservantes e aromatizantes.

Numa forma de realização da invenção, as formulações orais compreendem revestimentos gastroresistentes, de modo que o agente ativo seja libertado para o trato intestinal. Um certo número de métodos estão disponíveis na arte para a administração eficaz de proteínas com revestimento gastroresistente no lúmen intestinal. A maioria dos métodos dependem de libertação de proteínas como um resultado do aumento brusco do pH, quando a comida é libertada a partir do estômago para o duodeno, ou dependendo da ação de proteases pancreáticas que são segregadas dentro do duodeno quando o alimento entra no intestino delgado. Para a administração de uma PEP e/ou de uma protease específica de glutamina, a enzima é geralmente liofilizada na presença de tampões adequados (por exemplo, fosfato, histidina, imidazol) e excipientes (por exemplo, agentes crioprotetores, tais como sacarose, lactose, trealose). Os

bolos liofilizados da enzima são misturados com excipientes, em seguida introduzidos em cápsulas, que possuem um revestimento gastroresistente com um revestimento polimérico que protege a proteína do ambiente ácido do estômago, bem como da ação da pepsina no estômago. Alternativamente, as micropartículas de proteína também pode ser revestidas com uma camada protetora. Exemplos de películas são ftalato de acetato de celulose, ftalato de acetato de polivinilo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose e succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulose, copolímeros de metacrilato e ftalato de acetato de celulose.

Outras formulações entéricas compreendem microesferas de polímero feitas de polímeros biologicamente erosíveis, que exibem interações adesivas fortes com muco gastrointestinal e revestimentos celulares e podem atravessar tanto o epitélio absorvente da mucosa e o epitélio folicular cobrindo o tecido linfoide das placas de Peyer. Os polímeros mantêm contacto com o epitélio intestinal por longos períodos de tempo e, na verdade, penetram através e entre as células. Ver, por exemplo, Mathiowitz et al. (1997) Nature 386 (6623) : 410- 414. Os sistemas de administração de medicamentos, também, podem utilizar um núcleo de hidrogéis superporosos (SPH) e compósitos SPH (SPHC), tal como descrito por Dorkoosh et al. (2001) J Control Release 71 (3) : 307- 18.

A desintoxicação do glúten para um indivíduo sensível ao glúten pode começar assim que o alimento entra no estômago, uma vez que o meio ácido (-pH 2) do estômago favorece a solubilização do glúten. Introdução de uma PEP estável ao ácido ou de uma protease específica de glutamina no estômago irá sinergizar com a ação da pepsina, levando à destruição acelerada de péptidos tóxicos a partir da

entrada de glúten nos intestinos delgados de pacientes com doença celíaca. Em contraste com uma PEP que atue no intestino delgado, as enzimas gástricas não necessitam de ser formuladas com revestimentos gastroresistentes. Com efeito, uma vez que várias proteases (incluindo a proteínase de cisteína em epígrafe a partir de cevada) ativa-se automaticamente por clivagem das correspondentes proproteínas sob condições ácidas. Numa forma de realização da invenção, a formulação compreende uma proenzima que é ativada no estômago.

Numa outra forma de realização, um microrganismo, por exemplo, uma cultura bacteriana ou de levedura, capaz de produzir glutenase é administrado a um paciente. Esta cultura pode ser formulada como uma cápsula entérica; por exemplo, ver a Patente dos Estados Unidos No. 6,008,027. Alternativamente, os microorganismos estáveis para a acidez do estômago podem ser administrados numa cápsula ou misturados com preparações alimentares.

Numa outra forma de realização, a glutenase é misturada com os alimentos ou utilizada para géneros alimentícios com pretratamento contendo glúten. A glutenase presente nos alimentos pode ser enzimaticamente ativa, antes ou durante a ingestão, e pode ser encapsulada, ou tratada de outro modo, para controlar o tempo de atividade. Alternativamente, a glutenase podem ser encapsulada para alcançar uma libertação temporizada após a ingestão, *por exemplo*, no trato intestinal.

As formulações são tipicamente fornecidas numa forma de dosagem unitária, em que o termo "forma de dosagem unitária" se refere a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para sujeitos humanos, contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de

glutenase numa quantidade calculada suficiente para produzir o efeito desejado em associação com um diluente farmacologicamente aceitável, transportador ou veículo. As especificações para as formas de dosagem unitária da presente invenção dependem do complexo particular empregue e do efeito a ser alcançado, e da farmacodinâmica associada a cada complexo no hospedeiro.

Os excipientes farmacologicamente aceitáveis, tais como veículos, adjuvantes, transportadores ou diluentes, estão disponíveis comercialmente. Além disso, as substâncias auxiliares farmacologicamente aceitáveis, tais como agentes de ajuste de pH e tamponantes, agentes de ajuste de tonicidade, estabilizadores, agentes molhantes e similares, estão disponíveis comercialmente. Qualquer composto útil nos métodos e nas composições da invenção pode ser fornecido como um sal de adição de base farmacologicamente aceitável. "Sal de adição de base farmacologicamente aceitável" refere-se aos sais que retêm a eficácia biológica e as propriedades dos ácidos livres, que não são biologicamente, ou de outro modo, indesejáveis. Estes sais são preparados a partir da adição de uma base inorgânica ou de uma base orgânica ao ácido livre. Os sais derivados de bases inorgânicas incluem, mas não estão limitados a, sais de sódio, potássio, lítio, amônio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre, manganês, alumínio e semelhantes. Os sais inorgânicos preferidos são os sais de amônio, sódio, potássio, cálcio e magnésio. Os sais derivados de bases orgânicas incluem, mas não estão limitados a, sais de amins primárias, secundárias e terciárias, amins substituídas incluindo amins substituídas que ocorrem naturalmente, amins cíclicas e resinas de permuta iônica básicas, tais como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, diciclohexilamina,

lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etileno-ediamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N -etilpiperidina, resinas de poliamina, e semelhantes. As bases orgânicas particularmente preferidas são isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, diciclohexilamina, colina e cafeína.

Dependendo do paciente e da condição a ser tratada e da via de administração, a glutenase pode ser administrada em dosagens de 0,01 mg a 500 mg/kg de peso corporal por dia, por exemplo, cerca de 20 mg/dia para uma pessoa média. A proteólise eficiente de glúten *in vivo* para um adulto pode necessitar de, pelo menos, cerca de 500 unidades de uma enzima terapeuticamente eficaz, normalmente pelo menos cerca de 1000 unidades, mais usualmente pelo menos cerca de 2000 unidades, e não mais do que cerca de 50000 unidades, geralmente não mais do que cerca de 20000 unidades, sendo que uma unidade é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 mmol de Cbz- Gli- Pro- pNA (para PEP) ou Cbz- Gli -Gln -pNA (para uma protease específica de glutamina) por minuto sob condições especificadas. A maioria das PEPs têm atividades específicas no intervalo de 5 - 50 unidades/mg de proteína. Será entendido por os especialistas da arte que a dosagem pode ser aumentada, mas que não podem ser obtidos benefícios adicionais se exceder a dosagem útil. As dosagens serão devidamente ajustadas para a formulação pediátrica. Em crianças, a dosagem eficaz pode ser mais baixa, por exemplo pelo menos cerca de 0,1 mg ou 0,5 mg. Na terapia de combinação, pode ser administrada uma dose comparável das duas enzimas; no entanto, a proporção será influenciada pela estabilidade relativa das duas enzimas em relação à inativação gástrica e duodenal.

Espera-se que o tratamento enzimático da doença celíaca seja mais eficaz quando administrado antes ou durante as refeições. Contudo, uma vez que o alimento pode residir no estômago durante 0,5-2 h, e se espera que o principal local de ação seja no intestino delgado, a enzima pode, também, ser administrada no prazo de 1 hora após uma refeição.

Pode, também, ser conseguida uma ótima desintoxicação de glúten *in vivo* através da combinação de uma protease gástrica apropriada com uma PEP que atua sobre os péptidos do glúten no duodeno, em conjunto com as enzimas pancreáticas. Isto pode ser conseguido por co-administração de duas dosagens de enzima, por exemplo, duas cápsulas/comprimidos; através da co-formulação de duas enzimas em quantidades apropriadas; etc. As partículas ou grânulos PEP duodenais liofilizadas podem ser protegidas por um revestimento gastroresistente polimérico adequado que promova a libertação de enzima apenas no duodeno. Em contraste, a libertação da protease gástrica irá ser iniciada imediatamente após o consumo da forma de dosagem. O tratamento de combinação envolvendo uma PEP e um agente terapêutico complementar, tais como um inibidor da transglutaminase tecidular da enzima, também é fornecido.

Em algumas formas de realização da invenção, as formulações compreendem um *cocktail* de proteases selecionadas. Tais combinações podem alcançar uma maior eficácia terapêutica. Numa formulação de combinação, a *Flavobacterium* PEP e a *Myxococcus* PEP são co-formuladas ou co-administradas para permitir a destruição de uma gama mais ampla de péptidos antigénicos de glúten. Do mesmo modo, a terapia de combinação com uma ou duas PEPs a partir da lista acima com uma PEP estável ao ácido ou uma endoprotease de glutamina pode levar uma proteólise de

glúten mais eficiente no estômago, facilitando, assim, a tarefa de assimilação de glúten no intestino delgado superior.

Numa outra forma de realização, a formulação ou o protocolo de administração combina um produto de protease e um inibidor da transglutaminase 2 (TG2). Essas formulações podem ter uma proteção adicional da enteropatia mediada por glúten, já que a TG2 demonstrou ter um efeito proinflamatório significativo em peptídeos de glúten no intestino celíaco. Em particular, os inibidores de TG2 contendo 'halo-di-hidroisoxazol, diazometilcetona ou porções de dioxoindole são úteis para esta finalidade.

Numa outra forma de realização, a protease ou um cocktail de protease é administrada e/ou formulada com um agente antiinflamatório, *por exemplo*, uma estatina; inibidor da quinase p38 MAP; agente anti-TNF α , etc.

Os especialistas compreenderão facilmente que os níveis de dosagem podem variar em função da enzima específica, a gravidade dos sintomas e da suscetibilidade do sujeito a efeitos secundários. Alguns das glutenases são mais potentes do que outras. As dosagens preferidas para uma determinada enzima são prontamente determináveis pelos especialistas na arte por uma variedade de meios. Um meio preferido é medir a potência fisiológica de um determinado composto.

Outras formulações de interesse incluem formulações de DNA codificando glutenases de interesse, de modo a atingir células intestinais para a modificação genética. Por exemplo, ver a Patente dos Estados Unidos No. 6,258,789, que descreve a modificação genética das células epiteliais intestinais.

MÉTODOS TERAPÊUTICOS

Os métodos da invenção são utilizados para tratar os alimentos a ser consumidos ou que são consumidos por pessoas que sofrem de doença celíaca e/ou dermatite herpetiforme, fornecendo uma dosagem eficaz de glutenase. Se a glutenase é administrada diretamente a um ser humano, em seguida, o(s) agente(s) ativo(s) estão contidos numa formulação farmacêutica. Alternativamente, os efeitos desejados podem ser obtidos por incorporação de glutenase em produtos alimentares ou por administração de organismos vivos que expressam glutenase, e afins. O diagnóstico dos pacientes apropriados podem utilizar uma variedade de critérios conhecidos dos especialistas na arte. Um aumento quantitativo em anticorpos específicos para gliadina e/ou transglutaminase tecidular é indicativo da doença. Histórias familiares e a presença dos HLA alelos HLA-DQ2 [DQ (a1*0501, b1*02)] e/ou DQ8 [DQ (a1*0301, b1*0302)] são indicativos de uma suscetibilidade à doença.

O efeito terapêutico pode ser medido em termos de resultados clínicos ou pode ser determinado por meio de testes imunológicos e bioquímicos. A supressão da atividade de células T deletérias pode ser medida pela contagem de células Th1 reativas, quantificando a libertação de citocinas nos locais das lesões, ou utilizando outros ensaios para a presença de células T autoimunes conhecidas na arte. Alternativamente, pode-se olhar para uma redução dos sintomas de uma doença.

Vários métodos de administração podem ser empregues, de preferência utilizando a administração por via oral, por exemplo, com as refeições. A dosagem da formulação terapêutica irá variar amplamente, dependendo da natureza da doença, da frequência de administração, do modo de

administração, da eliminação do agente a partir do hospedeiro, e semelhantes. A dosagem inicial pode ser maior, seguida de dosagens de manutenção menores. A dosagem pode ser administrada semanal ou bissemanalmente, ou mais frequentemente, fracionada em dosagens mais pequenas e administradas diariamente, com as refeições, semisemanalmente, ou de outro modo conforme necessário para manter um nível de dosagem eficaz.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes são postos adiante de modo a proporcionar aos especialistas com uma divulgação e uma descrição completa de como fazer e utilizar a presente invenção, e não se destinam a limitar o âmbito da invenção ou para representar que as experiências abaixo são todas ou as únicas experiências efetuadas. Foram feitos esforços para garantir a exatidão em relação aos números utilizados (por exemplo, quantidades, temperatura, e outros semelhantes), mas alguns erros experimentais e desvios podem estar presentes. Salvo indicação em contrário, as partes são partes em peso, o peso molecular é o peso molecular médio ponderado, a temperatura é em graus centígrados, e a pressão é a atmosférica ou próxima.

EXEMPLO 1

Comparação das Atividades PEP

Para obter *insights* sobre as semelhanças e diferenças entre o que as propil endopeptidases que ocorrem naturalmente, comparámos sistematicamente as propriedades de três PEPs homólogas de diferentes fontes de bactérias. Os nossos estudos utilizaram dois PEPs recombinantes conhecidas de *Flavobacterium meningosepticum* (FM) e

Sphingomonas capsulata (SC), respetivamente, e uma nova PEP a partir de *Myxococcus xanthus* (MX) que expressámos, pela primeira vez, como uma proteína recombinante heteróloga. As atividades enzimáticas dessas PEPs foram analisadas quantitativamente contra substratos modelo, bem como dois peptídeos de derivados de glúten com potencial relevância para a patogênese da doença celíaca. Em particular, investigámos a influência do comprimento da cadeia de substrato, o pH, as proteases pancreáticas e as peptidases de borda em escova intestinal na atividade de cada PEP. Tanto as experiências in vivo como ex vivo foram realizadas como parte destes estudos.

Procedimentos experimentais

Clonagem de genes PEP. Os genes PEP foram amplificados a partir do ADN genómico das estirpes bacterianas correspondentes (*F. meningosepticum*: ATCC 13253; *S. capsulata*: ATCC 14666; *M. xanthus*: ATCC 25232). A sequência da MX PEP putativa está disponível a partir da base de dados NCBI (Locus ID AAD31004). Os oligonucleótidos utilizados para amplificação por PCR foram: (SEQ ID NO:1) (1) FM primeira metade: 5'-AAC CAA TCA TAT GAA GTA CAA CAA ACT TTC TGT G (NdeI), (SEQ ID NO:2) 5'-GAT AAA AAC GGA AAG CTT GTA AGG GC (HindIII); FM segunda metade: (SEQ ID NO:3) 5'-GCC CTT ACA AGC TTT CCG TTT TTA TC (HindIII) and (SEQ ID NO:4) 5'- CCC TTA ATT TTC AAA TTT TAG CTC GAG TTT ATG ATT TAT A (SacI); (2) SC primeira metade: (SEQ ID NO:5) 5'-AGG ATA TCC ATA TGA AGA ACC GCT TGT GG (NdeI), (SEQ ID NO:6) 5'- GAC AAC CTC GAA TCC GTC GGC ATT G (HinfI); SC segunda metade: (SEQ ID NO:7) 5'-CAA TGC CGA CGG ATT CGA GGT TGT C (HinfI), (SEQ ID NO:8) 5'-CGC GGG GAC CTC GAG TAG AAA CTG (SacI); (3) MX: (SEQ ID NO:9) 5'-CT CCC CAT ATG TCC TAC CCG GCG ACC (NdeI) and (SEQ ID NO:10) 5' - GTG GCG GCG CAG GGC CGC AAG CTT CCC AAG CG (HindIII). Os genes amplificados

foram clonados num plasmídeo de pET28b (Novagen).

Expressão e purificação de PEPs. Os plasmídeos de expressão foram introduzidos por meio da transformação em células BL21 (DE3). Os transformantes cultivados a 37°C e induzidos na presença de 100 mM de IPTG a 22°C durante a noite. A indução de baixa temperatura foi encontrada para melhorar o rendimento da enzima ativa. Todos os passos de purificação foram realizados a 4°C, salvo indicação em contrário. Uma vez que as enzimas FM e SC PEP possuem naturalmente uma sequência de sinal, estas são segregadas para o espaço periplasmático de *E. coli*. Um protocolo de choque osmótico modificado (EMD Biosciences, CA), foi, portanto, utilizado para obter um lisado de proteína enriquecido contendo ambas as PEPs. As pelotas de células (4 L de cultura) foram ressuspensas em 30 ml de 30 mM Tris-HCl, pH 8, 20% de sacarose e 1 mM de EDTA, e agitou-se lentamente à temperatura ambiente durante 10 min. A suspensão foi centrifugada a 10.000 g durante 15 minutos, e o sedimento celular foi ressuspenso em gelada dH₂O e agitou-se lentamente em gelo durante 10 min. As células foram então centrifugadas chocados novamente 40,000-50000 g durante 30 min. O sobrenadante contendo as proteínas periplásmicas foi tratada durante 1-2 h com uma solução de 1 M de NaCl (a uma concentração final de 300 mM de NaCl), uma solução 1 M de imidazol (imidazol a uma concentração final de 5 mM) e 1 ml de resina Ni-NTA (Qiagen, CA). A proteína em bruto foi, em seguida, carregada numa coluna contendo mais 1 ml de resina Ni-NTA. Depois de completas as etapas de lavagem, utilizando o tampão de lavagem (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, pH 7,0) com 0-10 mM de imidazol, a PEP foi eluída com 150 mM de imidazol, 50 mM de fosfato, 300 mM NaCl 300 mM, pH 8. A FM PEP foi, ainda, purificada num sistema FPLC (Amersham Pharmacia, NJ), através de uma coluna de permuta catiónica HiTrap-SP. Antes

da aplicação na coluna de HTrap-SP, a proteína foi trocada em 20 mM de tampão de fosfato (pH 7). Após a injeção, a PEP foi eluída com um gradiente salino de 20 mM de fosfato, pH 7 (tampão A) e 20 mM de fosfato, 500 mM de NaCl, pH 7 (tampão B) a uma taxa de fluxo de 1 ml/min. A MX PEP, uma proteína citosólica, foi, inicialmente, purificada a partir de um lisado de células inteiras por meio de cromatografia de afinidade de Ni-NTA (conforme descrito acima). A proteína foi, ainda, purificada sobre uma coluna de filtração em gel Superdex 200 (Amersham) com um gradiente isocrático de 20mM de HEPES, 2 mM de DTT 2, pH 7,0 a 1 ml/min.

Ensaio de atividade. A atividade de clivagem posprolina foi medida usando Z-Gly-Pro-p-nitroanilida e succinil-Ala-Pro-p-nitroanilida (Bachem, CA). Z-Gly-Pro-pNA foi dissolvido numa PBS: água: dioxano (8: 1.2: 0.8) mistura de ensaio. A concentração de Z-Gly-Pro-pNA foi variada de 100 - 600 mM. Embora o substrato Z-Gly-Pro-pNA tenha sido eficaz na detecção da atividade enzimática, a sua insolubilidade em maiores concentrações impede medidas cinéticas sob condições de substrato saturadas. Em contraste, a succinil-Ala-Pro-pNA tinha a vantagem de alta solubilidade em água em todos os valores de pH testados, e era, portanto, um substrato preferencial para os estudos cinéticos. A hidrólise de suc-Ala-Pro-pNA pelas FM, SC e MX PEPs foi monitorizada numa mistura de reação (300 ml), contendo 30 ml de tampão 10X PBS, uma concentração final de 0,01 - 0,02 mM da enzima, e suc-Ala-Pro-pNA (5 mM estoque), em concentrações finais variando entre 100 mM e 4 mM. A libertação da p-nitroanilida foi detetada espectrofotometricamente num comprimento de onda de 410 nm. A velocidade inicial da reação foi determinada pelo aumento na absorvância a 410 nm, que foi usada para calcular os K_m e k_{cat} de acordo com a relação de Michaelis-Menten. Para a

medição da influência do pH sobre a atividade da enzima, uma série de soluções tampão de pH foram preparadas utilizando ácido cítrico e fosfato dissódico para valores de pH de 3,0 a 6,0, e fosfatos de sódio para valores de pH de 7,0 a 8,0. As misturas de reação (300 ml) consistiram em 30 ml de tampão de 10X pH, concentração final de 0,01 mM da enzima, e suc-Ala-Pro-pNA a concentrações finais entre 100 mM e 4 mM.

Estabilidade do pH. A capacidade de reter a atividade da enzima após exposição a ambientes ácidos foi determinada. As soluções de ácido clorídrico (10 ml) a valores de pH variando entre 1,5 e 4,0 foram misturadas com 1 ml da enzima durante 10-20 min. As misturas ácidas foram então neutralizadas com 40 ml de solução de 10X PBS, 60 ml de 5 mM de substrato para um volume final de 300 ml. A atividade da enzima recuperada foi medida espectralmente e comparada com controles não tratados com ácido, sob condições idênticas.

Estabilidade da protease gástrica e pancreática. Numa placa de 96 poços de fundo em L, foram colocados 5 mL de tampão de reação 2x (40 mM de Na_2HPO_4 , pH = 6,5 para enzimas pancreáticas ou 20 mM HCl para a pepsina), e foram adicionados 1 mL da enzima degradante (ou 1 mg/ml de pepsina ou um cocktail de 1 mg/ml de tripsina, 1 mg/ml de quimiotripsina, 0,2 mg/mL de elastase e 0,2 mg/ml de carboxipeptidase A), seguido por 4 ml da PEP (5 - 10 U/ml). A placa foi incubada a 37°C durante várias horas (por exemplo, 0,5, 10, 20 e 30 min), com a adição de 190 mL da solução de substrato da PEP (2 mL de Z-Gli-Pro-p-nitroanilida (16,8 mg/ml em dioxano), 14 ml de dioxano, 24 ml de água, 150 ml de 10 nM de tampão PBS, pH = 7,5) a cada poço. A absorção foi medida a 410 nm durante 1 a 2 minutos a cada 10 segundos para testar a atividade residual. Cada

tampão também continha 5 mg/ml de glúten. O glúten não tratado foi usado para a pepsina, enquanto que o glúten proteolísado anteriormente com pepsina (0,01 M HCl, pH = 2,0, 1: 50 w/w, 2 h, 37°C) foi utilizado para todas as outras enzimas. Os poços contendo ácido (pH = 2,0) foram neutralizados pela adição de 10 mL de 0,1 M de NaOH, antes da adição do substrato da PEP. As atividades enzimáticas estão expressas em percentagem da atividade máxima, tipicamente observada no ponto de tempo zero.

Especificidade do substrato. Para além dos substratos de referência acima mencionados, a especificidade da enzima também foi avaliada usando dois peptídeos imunogénicos derivados da sequência das proteínas de γ -gliadina em glúten. Ambos os péptidos foram sintetizados utilizando síntese de péptidos em fase sólida. O péptido (ID SEQ NO: 11) PQQQLPYPQQQLP contém o γ II-epítipo imunodominante, e é resistente à proteólise pela pepsina ou qualquer enzima pancreática. A especificidade da PEP para este substrato foi avaliada num ensaio competitivo, no qual 100 mM (SEQ ID NO: 12) PQQQLPYPQQQLP e 100 mM de suc-Ala-Pro-pNA foram misturados e feitos reagir com 0,02 mM de PEP, a 25°C. A velocidade inicial da clivagem de suc-Ala-Pro-pNA foi medida espectralmente, enquanto que a velocidade inicial (SEQ ID NO: 13) da hidrólise PQQQLPYPQQQLP foi determinada por HPLC. A especificidade aparente, k_{cat}/K_M , para a hidrólise de (SEQ ID NO: 14) PQQQLPYPQQQLP poderia ser determinada com base no conhecido k_{cat}/K_M da enzima para suc-Ala-Pro-pNA e as taxas de reação observadas dos dois substratos. Além de PQQQLPYPQQQLP, a especificidade da PEP para o péptido mais complexo mas fisiologicamente relevante (SEQ ID NO: 15) LQLQPFPPQQQLPYPQQQLPYPQQQLPYPQQQPF (33-mer) foi também avaliada. As reações da proteólise foram realizadas a 37°C em tampão PBS com 5 - 100 nM do péptido e 0,1 mM da PEP, por períodos de tempo de 1 min-4 h.

A redução da concentração do substrato, bem como o intermediário concomitante e a acumulação de produto foram monitorizados com a análise HPLC. A RP-HPLC foi realizada num sistema consistindo de Beckman ou Rainin Dynamax SD-200, num conjunto de deteção Varian 340 UV regulado a 215 nm e 280 nm. O solvente A era de H₂O com 0,1% de TFA e o solvente B era acetoneitrilo com 0,1% de TFA; gradiente utilizado: 0-5% de B em 0-15 min, 5-30% de B em 15-30', 30-100% de B em 30-35 min, 100% de B durante 5', fluxo 1 mL/min; a separação foi realizada numa coluna C-18 de fase inversa com 4,6 x 150 mm (Vydac, Hesperia, CA, EUA). As amostras foram centrifugadas durante 10 min a 13,400 g, antes da injeção de 10-100 µl. Ambas (SEQ ID NO: 11) PQQQLPYPQQQLP e 33-mer têm múltiplos sítios endoproteolíticos de posprolina. Assim, os péptidos múltiplos acumulam durante o decurso da reação, alguns dos quais são substratos da PEP secundários em si. Electropulverização-Ião Trap-MS-MS juntamente com um UV-HPLC (LCQ Classic/Surveyor, ThermoFinnigan, CA) foi utilizada para identificar os locais de clivagem preferidos nas (SEQ ID NO: 11) PQQQLPYPQQQLP e 33-mer.

Para uma avaliação suplementar da proteólise das 33-mer e (SEQ ID NO: 11) PQQQLPYPQQQLP no meio fisiológico adequado, o glúten (30 g/L) foi suspenso 0,01 M de HCl (pH = 2,0) e incubado na presença de pepsina (600 mg/L) durante 2 h a 37°C. A solução resultante foi neutralizada com 10 M de NaOH e diluída a 10 g/L num tampão de fosfato (40 mM, pH 6,5). 25 ml desta suspensão foram então suplementados com a 33-mer (0,1 mg/ml), (SEQ ID NO: 11) PQQQLPYPQQQLP (0,08 mM), com tripsina (0,1 mg/ml), quimotripsina (0,1 mg/ml), elastase (0,02 mg/mL), car-boxipeptidase A (0,02 mg/ml). Prolil endopeptidase (FM ou MX; 1x: 500 mU/ml; 5x: 2.5 U/ml; 10x: 5 U/ml) e membranas de superfície de borda em escova de intestinos de ratos (BB, 1x: 40 mU/ml, 2x: 80

mU/ml, atividade DPP IV) foram adicionados a um volume total de 150 ml. A mistura foi incubada a 37°C, e 25 ml de alíquotas foram tiradas aos 0, 5, 10, 30 e 60 min e o calor foi imediatamente desativado.

Para examinar a especificidade do comprimento da cadeia das PEPs individuais, realizámos as reações competitivas que contêm péptidos derivados de glúten, sujeitas à mistura da reação a RP-HPLC, e monitorizámos o desaparecimento de cada substrato como uma função do tempo. As áreas de pico das 33-mer (32,5 min) e (SEQ ID NO: 11) PQQQLPYPQQQLP (27,5 min) foram integradas.

Atividade da endopeptidase in vivo. Um rato adulto (feminino ou masculino) foi anestesiado e mantido a 36-37°C durante todo o procedimento cirúrgico. A cavidade peritoneal foi aberta, e uma pequena incisão feita no início e no final de um segmento do jejuno de 15-20 cm. Os cateteres de polietileno foram inseridos e fixados nas duas extremidades. O cateter foi ligado com a uma seringa a bomba cheia com uma solução. O segmento do jejuno foi perfundido inicialmente com tampão PBS para remover quaisquer detritos residuais a uma taxa de fluxo de 0,4 ml/min. As soluções peptídicas purificadas (a concentração variava entre 25-100 mM) foram então perfundidas a 0,4 ml/min através do segmento do jejuno, com um tempo de permanência de 10-40 minutos. No caso de uma coperfusão, o cateter de entrada está ligado com duas seringas simultâneas, uma com uma solução de péptido e outra com a solução de prolil endopeptidase (a concentração varia entre 50 e 500 mU/ml). O fluido do cateter de saída foi recolhido em tubos de centrífuga pequenos em gelo seco para análise subsequente. Os produtos de digestão recolhidos foram analisados por HPLC numa coluna C18.

Resultados

Expressão da proteína PEP. AS FM e SC PEPs têm as suas próprias sequências de sinal e, portanto, foram expressas como enzimas segregadas e solúveis no espaço periplasmático da *E. coli*. Um procedimento simples lise de congelamento e descongelamento levou à recuperação da proteína periplásmica sem contaminação significativa por proteínas citoplasmáticas. Em contraste, a MX PEP carece de uma sequência sinal nativa, e, portanto, foi expressa como uma proteína citoplasmática. A PEP foi purificada a partir de cada lisado por purificação de afinidade Ni-NTA, seguida por um segundo passo cromatográfico. Os rendimentos da FM, SC e MX PEPs ativas foram de 1 mg/L, 60 mg/L e 30 mg/L, respetivamente. O grau de pureza das várias PEPs foi determinado por SDS-PAGE, como sendo >90%.

Análise cinética com substratos de referência. A atividade de cada PEP foi inicialmente avaliada utilizando o substrato cromogénico padrão de succinil-Ala-Pro-pNA. A libertação de p-nitroanilina foi detetada a 410 nm, e os dados cinéticos foram equipados com a relação de Michaelis-Menten. Succinil-Ala-Pro-pNA foi selecionado como um substrato de referência, em vez do mais comumente utilizado Z-Gly-Pro-pNA, devido à baixa solubilidade do segundo substrato, o que implicou a utilização de cosolventes. Os valores de k_{cat} e K_M calculados das FM, MX e SC PEPs para o succinil-Ala-Pro-pNA estão tabelados (Tabela 1). Enquanto que estas enzimas apresentaram uma atividade de nível comparável à de uma serina-protease, a MX PEP tem uma maior especificidade do que a FM PEP, enquanto que a SC PEP tem um nível intermediário de especificidade (Tabela 2). A maior especificidade de MX pode ser atribuída, principalmente, à sua maior afinidade para o substrato, como refletido em K_M .

Tabela 1. Os parâmetros cinéticos para a hidrólise succinil-Ala-Pro-p-nitroanilida pela FM PEP, MX PEP e SC PEP.

	K_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	K_{cat}/K_M (mM^{-1}/s^{-1})
FM PEP	33	0,91	37
MX PEP	51	0,35	146
SC PEP	144	2,1	67

Tabela 2. Especificidade da FM PEP, MX PEP e SC PEP para o péptido de gladina imunogénico (SEQ ID NO:4) PQQQLPYPQQQLP.

	K_{cat}/K_M (mM^{-1}/s^{-1})
FM PEP	178
MX PEP	548
SC PEP	492

Atividade da enzima vs. pH. O ambiente luminal do duodeno é aproximadamente a pH 6. Portanto, uma PEP terapeuticamente útil deve reter a atividade específica elevada nesse pH. A taxa de volume no estado estacionário, k_{cat} , de cada PEP foi titulada em várias condições de pH usando 100 - 4000 mM de succinil-Ala-Pro-pNA, como mostra a Fig. 1. Ambas as FM PEP e MX PEP exibiu um local ativo pK_a em torno de pH 6, indicando uma atividade ótima no intervalo entre pH 6 e 8. A atividade diminuída de ambas as enzimas a pH 5 é consistente com o papel bem estabelecido de um resíduo de histidina como a base geral na tríade catalítica da protease de serina, mas alternativamente pode indicar uma mudança da conformação ativa da enzima para um estado inativo. Tais mudanças conformacionais foram implicadas no ciclo catalítico da PEP do cérebro de procina caracterizada estrutural. Curiosamente, a SC PEP, que tem o perfil de pH mais amplo, mostra um aumento significativo na máxima velocidade sob condições fracamente básicas.

Estabilidade da PEP. Embora as proteínas terapêuticas administradas por via oral possam ser formuladas para

protegê-las do ambiente ácido e proteolítico do estômago, a estabilidade ácida intrínseca de uma PEP é provável que seja uma característica desejável na sua utilização como um agente terapêutico para a doença celíaca. Portanto, avaliámos o grau em que a atividade de cada PEP permanece intata após 10 minutos de incubação para valores de pH selecionados entre 1,6 e 3,9. Dentro deste intervalo de pH, a FM PEP manteve 50-70% da sua atividade original, a MX PEP manteve uma 70-90% da sua atividade e a SC PEP manteve 30-80% da sua atividade. Assim, embora todas as PEPs pareçam ser moderadamente estáveis ao ácido, a MX PEP é mais versátil. Uma vez que a eficácia terapêutica exigiria uma PEP para agir em conjunto com as proteases de glúten que são secretadas para o duodeno, a resistência das FM PEP e MX PEP para ambas as enzimas gástricas e pancreáticas foi avaliada. Para isso, preincubámos as enzimas de quantidades fisiológicas de pepsina (pH 2), ou um cocktail compreendendo tripsina, chi-motripsina, elastase e carboxipeptidase A (a pH 6,5). Como pode ser visto na Fig. 2, a FM e a MX PEP eram altamente sensíveis à proteólise catalisada por prepsina, parecendo ser particularmente estáveis para a destruição na presença de quantidades fisiológicas das enzimas pancreáticas.

Análise cinética utilizando PQQQLPYPQQQLP como substrato. O peptído imunogénico PQQQLPYPQQQLP é uma sequência recorrente em γ -gliadinas, e é resistente à proteólise por proteases pancreáticas e gástricas. Também é altamente resistente à digestão por peptidases de borda em escova intestibal, com apenas dipeptidil carboxipeptidase I (DCP1) capaz de agir de acordo com isso. O tratamento deste péptido com resultados da PEP na clivagem em resíduos de prolina internos, que por sua vez gera novos locais de reconhecimento para as aminopeptidases de borda em escova. Assim, (SEQ ID NO: 11) PQQQLPYPQQQLP representa um bom

substrato de teste para testar a especificidade PEP de teste.

Os valores k_{cat}/K_M de cada PEP foram determinados numa mistura de ensaio contendo (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYQPQLP, bem como suc-Ala-Pro-pNA como um substrato concorrente. As taxas de desaparecimento de ambos os substratos foram determinadas por métodos de detecção independentes. A taxa inicial de desaparecimento da (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYQPQLP foi medida por HPLC, enquanto que a taxa de consumo da suc-Ala-Pro-pNA foi medida espectralmente. Ambas as FM e MX PEP apresentavam uma especificidade 5 vezes maior para o péptido de glúten em relação ao substrato cromogénico, enquanto que a SC PEP apresentava um aumento de 7 vezes na especificidade para o péptido de glúten (Tabela 2). Este aumento na especificidade sugere que os peptídeos mais longos podem proporcionar âncoras adicionais no local catalítico, uma hipótese que é consistente com a observação de que a ala-Pro-pNA (que carece de um grupo de succinilo N-terminal ou um grupo de carboxibenzil) não reagiu com nenhuma das PEPs.

Para analisar a regioespecificidade da hidrólise (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYQPQLP por PEPs individuais, as amostras correspondentes a pontos de tempo iniciais foram posteriormente analisadas por LC/MS/MS. Os resultados, apresentados na Fig. 3A-3D, revelam que cada PEP tem preferências sublocais únicas. Enquanto que o local preferido de clivagem pela FM PEP foi na (SEQ ID NO: 11) posição PQPQLPPYP|QPQLP, a MX PEP preferencialmente clivou o mesmo peptídeo na (SEQ ID NO: 11) posição PQPQLP|YPQPQLP. A SC teve preferência comparável para qualquer local de clivagem. Todas as enzimas preferencialmente clivaram o péptido a uma prolina localizada perto do meio da sequência, com destaque para a sua diferença funcional a

partir de exopeptidases específicas de prolilo, tais como DPP IV.

Cadeia de tolerância de comprimento e seletividade. Tem sido sugerido que as propil endopeptidases da família das serina-proteases são limitadas no que respeita aos comprimentos de cadeia de substratos potenciais. Para testar esta hipótese no contexto das três PEPs bacterianas estudadas aqui, comparámos as suas atividades hidrolíticas contra uma sequência de peptídeos da 33-mer fisiologicamente relevantes a partir de gliadina de trigo, LQLQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (Fig. 4A). A FM PEP (0,1 mM) foi capaz de hidrolisar 10 mM da 33-mer em cerca de 2-3 minutos, ao passo que a SC PEP necessitou de >1 h para atingir um ponto final comparável. Com base nas taxas iniciais, a FM PEP estava estimada para agir 5 vezes mais rapidamente na 33-mer do que a MX PEP, e >20 vezes mais rapidamente do que a SC PEP. Assim, a SC PEP parece ter uma severa limitação do comprimento da cadeia para substratos peptídicos longos.

Os compostos intermédios e os produtos da hidrólise da 33-mer pelas FM e MX PEP foram analisados por LC/MS/MS (Fig. 4B-C). Várias características são notáveis. Em primeiro lugar, mesmo em tempo relativamente cedo, os produtos digestivos da MX PEP eram fragmentos predominantemente pequenos, enquanto que a digestão FM PEP rendeu um conjunto significativo de intermediários longos como LQLQPFPPQQLPYQPQLP, LQLQPFPPQQLPYP e LQLQPFPPQQLP. Assim, embora ambas as PEPs são capazes de proteolizar eficazmente a 33-mer, estas têm padrões hidrolíticos distintos sobre este substrato complexo. Em particular, quer a MX PEP parece ser processiva (isto é, para cada molécula de substrato da 33-mer, cliva sequencialmente todos os locais preferidos na cadeia antes da libertação),

ou, alternativamente, a enzima tem uma forte tendência para substratos de cadeia mais curta. Também pode ser notado que os fragmentos dos C-terminais gerados pelas duas enzimas são diferentes (QPQPF FM para a FM PEP, e YPQPQPF para a MX PEP). Esta constatação é consistente com a preferência sublocal observada no caso de (SEQ ID NO: 11) digestão PQPQLPYQPQLP.

Para investigar diretamente a seletividade do comprimento da cadeia das três enzimas, co-incubámos a (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYQPQLP e a LQLQPFYPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF com cada PEP (Fig. 6A-C). Tanto a SC PEP como a MX PEP mostrou uma clara preferência para o péptido da 13-mer, enquanto que a PEP FM mostrou uma seletividade comparável para ambos os péptidos.

Para avaliar ainda mais os substratos preferenciais, a (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYQPQLP e a 33-mer foram misturadas com glúten tratado com pepsina, e permitiu reagir com as enzimas pancreáticas na presença da FM PEP ou a MX PEP. Como pode ser visto nos traços de HPLC (Fig. 6A-B), a 33-mer tinha o tempo de retenção mais longo, ao passo que a (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYQPQLP e outros péptidos de glúten de comprimento médio eluíram mais cedo. Aqui, também a FM PEP proteolizou (SEQ ID NO: 11) PQPQLPYQPQLP, a 33-mer e outros peptídeos de glúten a taxas comparáveis (Fig. 6A). Na digestão MX PEP, a PQPQLPYQPQLP e outros péptidos menores foram rapidamente desagregado (em 10 minutos), enquanto que a hidrólise da 33-mer ocorreu a uma taxa mais lenta (Fig. 6B).

Hidrólise in vivo. Para validar as implicações das observações bioquímicas acima para a digestão de péptidos no intestino delgado intacto, cada PEP foi co-perfundida no jejuno do rato com o substrato de péptido de 33-mer, e o

efluente recolhido a uma distância de 15-20 cm a partir da ponto de perfusão foi analisado. Neste modelo de animal vivo, o impacto da ação concertada da PEP (luminal) perfundido e as peptidades de borda em escova (superfície) são avaliadas. Como demonstrado por os resultados in vitro acima, enquanto que as enzimas BBM eram insuficientes para processar o 33-mer, a FM PEP promoveu a desagregação mais completa do 33-mer do que a MX e a SC PEP (Fig. 7). Num intervalo da dosagem PEP de 50-500 mU/ml, a extensão da hidrólise de 33-mer aumentou com o aumento da dosagem da PEP, demonstrando que as dosagens mais elevadas da PEP podem acelerar a desagregação do glúten no intestino do mamífero.

Tendo em conta as recentes descobertas que relacionavam a forte antigenicidade de péptidos da gliadina para a sua excecional resistência digestiva, as prolil endopeptidases foram identificadas como uma família de enzimas potencialmente interessantes para a terapia da doença celíaca por via oral. Compreender as propriedades enzimológicas destas enzimas é um prerequisite essencial para tal uso. No estudo acima, as prolil endopeptidases de três fontes bacterianas foram selecionadas e expressas na *E. coli* como proteínas recombinantes, e foram posteriormente purificadas e caracterizadas. Duas destas enzimas (a partir de *F. meningosepticum* e *S. capsulata*) foram relatadas anteriormente, enquanto que a terceira enzima (a partir de *M. xanthus*) representa um novo membro da família da prolil endopeptidase.

A fim de analisar as propriedades endoproteolíticas destas enzimas, é importante utilizar substratos de péptido com locais de clivagem internos. Embora os substratos de modelo, tais como Z-Gli-Pro-pNA ou Suc-Ala-Pro-pNA, tenham sido frequentemente utilizados para identificar e

caracterizar as propil endopeptidases, estes substratos sozinhos não fornecem informações adequadas para diferenciar as endopeptidases umas das outras ou de aminopeptidases específicas de prolina (tais como dipeptidil-peptidase IV (DPP IV)). No contexto da doença celíaca, dois péptidos (PQPQLPYQPQLP e LQLQPF-PQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF) foram reconhecidos como testes úteis para estudar as propriedades fundamentais das propil endopeptidases, bem como para o seu potencial para desintoxicar glúten. O péptido PQPQLPYQPQLP contém um epítipo encontrado nas γ -gliadinas que tem demonstrado ter um papel imunodominante na resposta mediada por células T ao glúten no intestino celíaco. Este não pode ser clivado por qualquer protease gástrica ou pancreática e também é altamente resistente à digestão através da membrana de borda em escova intestinal (BBM), com apenas carboxipeptidase de dipeptidil I capaz de agir de acordo a uma taxa muito limitada. Assim, espera-se que eficácia do metabolismo intestinal deste péptido melhore na presença de uma prolil endopeptidase exógena, tal como foi verificado neste estudo. O tratamento deste péptido com PEP resulta na clivagem em resíduos de prolina internos, que, por sua vez, gera novos locais de reconhecimento para as aminopeptidases de borda em escova. Assim, PQPQLPYQPQLP representa um bom teste para a especificidade PEP.

O peptído da gliadina da 33-mer LQLQPF-PQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF foi selecionado como uma sonda complementar para estes estudos, uma vez que é um produto estável, derivado fisiologicamente de digestão gástrica e pancreática da γ -gliadina e estimula fortemente a proliferação de células T reativas a partir de glúten a partir de praticamente todos os pacientes com doença celíaca testados até agora. Assim sendo, a degradação endoproteolítica deste peptído da 33-mer representa um

objetivo especialmente desafiador para uma PEP exógena. Como a maioria dos outros péptidos de glúten antigénicos, a 33-mer contém múltiplos resíduos de prolina, e espera-se que apresente mais do que um local de clivagem para uma PEP. Ao mesmo tempo, o seu carácter multivalente sugere que é a ação da PEP só por si não consiga eliminar toda a antigenicidade residual deste péptido. Consequentemente, é necessária uma ação combinada de uma PEP e peptidases endógenas da membrana de borda em escova intestinal para a neutralização imunológica e para a assimilação alimentar deste longo peptídeo rico em prolina.

As nossas investigações sobre os recursos de reconhecimento molecular de três PEPs bacterianas para dois peptídeos de gliadina revelaram, pelo menos, duas características interessantes e potencialmente importantes destas enzimas. Em primeiro lugar, embora todas as três PEPs testadas aqui tenham exibido uma elevada atividade específica contra substratos cromogénicos de referência (Tabela 1), estas mostraram diferenças notáveis na especificidade do comprimento da cadeia (Fig. 3A-C). Enquanto que a SC PEP e a MX PEP tiveram maior especificidade para a PQQQLPYPPQQQLP do que a FM PEP (Tabela 2), o inverso é verdade para o péptido de gliadina da 33-mer (Fig. 4A), especialmente no caso da SC PEP, que tinha uma atividade extremamente pobre contra a 33-mer.

A análise bioquímica e estrutural levou à proposta de que a atividade da PEP é limitada a substratos contendo menos de 30 resíduos de aminoácidos. Nessa perspetiva, a boa atividade da MX PEP e, especialmente, da FM PEP contra o peptídeo da 33-mer é surpreendente. A ampla tolerância do comprimento de cadeia da FM PEP é, claramente, demonstrada nos testes competitivos *in vitro* e *in vivo*, nos quais a FM PEP foi capaz de processar substratos mais longos e mais

curtos a taxas comparáveis. Em segundo lugar, a análise de sequência dos principais produtos proteolíticos derivados de ambos os substratos de gliadina demonstrou que as PEPs apresentaram uma especificidade sublocal distinta, bem como regiospecificidade no contexto da sequência repetitiva mais longa. Por exemplo, a FM PEP clivou preferencialmente na PQPQLPYP|QPQLP, ao passo que a MX PEP preferiu a PQPQLP|YPQPQLP, e a SC PEP tinha uma atividade comparável em relação a um outro local.

Da mesma forma, a análise de sequência de produtos hidrolíticos iniciais do peptído da 33-mer ressaltou diferenças regioquímicas entre a FM PEP e a MX PEP. Enquanto que o tratamento da MX PEP gerou principalmente fragmentos de 4-5 resíduos (presumivelmente processou sequencialmente a partir de ambos os terminais), a FM PEP rendeu intermediários mais longos (presumivelmente como resultado de uma clivagem preferencial perto do centro do péptido). Assim sendo, os locais ativos destas enzimas são claramente diferentes, o que por sua vez tem potenciais implicações para a utilização destas enzimas de desintoxicação de glúten para um paciente com doença celíaca.

Além de analisar a especificidade do substrato, também investigámos outras propriedades terapêuticas relevantes do nosso conjunto de três PEPs. Estas incluem a dependência do pH da atividade da enzima, a tolerância ácida da proteína e a resistência à inativação por proteases/peptidases gástricas, pancreáticas e intestinais. Todas as enzimas têm um perfil de atividade do pH que corresponde vem ao ambiente ligeiramente ácido do intestino delgado superior (pH 6-6,5). Estas também parecem ser moderadamente estáveis para a exposição ácida, bem como para a ação da protease pancreática (mas não da pepsina), com a MX PEP sendo a mais

estável. As enzimas também retêm atividade no pequeno lúmen intestinal intato de um rato; uma indicação da sua estabilidade em relação a ambas as secreções intestinais, bem como a peptidases de membrana de borda em escova. Por último, os níveis de expressão destas enzimas variam significativamente no recombinante *E. coli*. Especificamente, e em comparação com a FM PEP, os níveis de expressão da SC e da MX PEP foram substancialmente superiores.

A PEP do cérebro suíno tem uma arquitetura didomain, incluindo um domínio de β -hélice incomum que parece regular a proteólise. Os alinhamentos de sequências em pares entre esta PEP caracterizada estruturalmente e as FM, MX e SC PEPs revelam 39% (49%), 36% (45%) e 40% (48%) de identidade (similaridade), respetivamente. Estes alinhamentos também sugerem que as PEP bacterianas são compostas por um domínio catalítico e um de β -hélice. Uma vez que se prevê que os seus locais ativos se encontrem perto da interface entre os dois domínios, a mutagénese na interface entre os domínios pode alterar a dinâmica da proteína e, por sua vez, afetar a tolerância e a especificidade do substrato.

Os resultados acima proporcionam uma base para os esforços de engenharia de proteínas de enzimas PEP. Esta família de proteases de serina inclui vários outros homólogos putativos, cujas cDNAs foram sequenciadas, mas cujos produtos genéticos continuam a ser caracterizados. À luz das propriedades favoráveis da MX PEP, que foi expressa e caracterizada pela primeira vez como parte deste estudo, será útil analisar enzimas do tipo selvagem adicionais.

Exemplo 2

Expressão heteróloga da PEP em *Lactobacilli*

Numa forma de realização da presente invenção, um paciente com doença celíaca é fornecido com um organismo recombinante modificado para expressar uma PEP da invenção. O organismo recombinante é selecionado a partir desses organismos que podem colonizar a mucosa intestinal sem prejuízo para o paciente, proporcionando assim uma fonte endógena da PEP para o paciente. Como um exemplo, a *Lactobacilli* como a *L. Casei* e a *L. Plantarium* são capazes de colonizar a mucosa intestinal e segregar enzimas PEP localmente. Devido à sua ampla utilização na indústria alimentar, também podem ser usadas como uma fonte eficiente da PEP para uso industrial (para tratar géneros alimentícios) e médico (para preparar a PEP para formulação farmacêutica). As PEPs são expressas nessas *Lactobacilli* utilizando tecnologias padrão de tecnologias de ADN recombinantes. Por exemplo, Shaw et al. (Shaw, DM, Gaerthe, B; Leer, RJ, Van der Stap, JGMM, Smittenaar, C.; Den Bak-Glashouwer, Heijne, MJ, Thole, JER, Tielen FJ, Pouwels, PH, Havenith, CEG (2000) Immunology 100, 510-518) projetaram espécies de *Lactobacilli* para expressar a toxina tetânica intracelular e ligada à superfície. Os genes PEP intatos (incluindo sequências líderes de secreção bacteriana eficiente) são clonados em vetores de expressão, tais como pLP401 ou pLP503 sob o controlo do promotor da amilase (regulável) ou do promotor da desidrogenase de lactato (constitutivo), respetivamente. Alternativamente, as estirpes de *Lactobacilli* de grau alimentar recombinante são geradas por tecnologia de recombinação específica local (por exemplo, ver Martin MC, Alonso, JC, Suarez JE, and Alvarez MA Appl. Env. Microbiol. 66, 2599-2604, 2000). As condições de cultura padrão são usadas para a fermentação

de *Lactobacillus*, tais como as descritas por Martin et al.

Exemplo 3

Expressão heteróloga da PEP em leveduras

Ambas as células e organismos que ocorrem naturalmente e recombinantes são usadas para produzir as glutenases úteis na prática da presente invenção. As glutenases preferidas e as células produtoras incluem aquelas a partir de organismos conhecidos por serem geralmente consideradas como seguras, como *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Sphingomonas*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Xanthomonas*, *Pyrococcus*, *Bacillus* e *Streptomyces*. As enzimas da glutenase extracelulares podem ser obtidas a partir de microrganismos, tais como *Aspergillus oryzae* e *Lactobacillus casei*. As células preferidas incluem aquelas que já são utilizadas na preparação de géneros alimentícios, mas foram modificadas para expressar uma glutenase útil na prática da presente invenção. Como um exemplo, as estirpes de levedura, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, são úteis para a expressão de nível elevado de proteínas heterólogas secretadas. Os genes, que codificam qualquer uma das PEPs descritas acima (apenas proteína madura), são clonadas em plasmídeos de expressão concebidos para a produção ideal de proteínas secretadas. Um exemplo de uma tal estratégia de expressão heteróloga é descrita em Parekh, R.N. e Wittrup, K.D. (Biotechnol. Prog. 13, 117-122, 1997). Tanto vectores de autoreplicação (por exemplo, 2 microns) ou integrantes (por exemplo, pAUR101) podem ser usados. O promotor GAL1-10 é um exemplo de um promotor indutível, ao passo que o promotor ADH2 é um exemplo de um promotor constitutivo. O cDNA que codifica a PEP madura é fundido a jusante de uma sequência líder sintética contendo uma região pré-pró, que inclui um local de clivagem de

senal e um local de clivagem de Kex2p. *S. Cerevisiae* BJ5464 pode ser usada como um hospedeiro para a produção da peptidase. As condições de fermentação em frasco agitado são descritas por Parekh e Wittrup na referência acima citada. Em alternativa, a densidade celular elevada pode ser usada para a produção em larga escala das peptidases; um procedimento representativo para este efeito está descrito em Calado, C.R.C., Mannesse, M., Egmond, M., Cabral, J.M.S. e Fonseca, L.P. (Biotechnol. Bioeng. 78, 692-698, 2002).

Exemplo 4

Formulação da cápsula entérica da prolil endopeptidase

As cápsulas de gelatina são cheias com 100 mg de *Myxococcus xanthus* prolil endopeptidase e 10 mg de dióxido de silício. As cápsulas são revestidas com um polímero de Eudragit gastroresistente e colocadas numa câmara de vácuo durante 72 horas. As cápsulas são, então, mantidas a um intervalo de temperatura de 10°C a 37°C e a um nível de humidade controlada de 35-40%.

Exemplo 5

Estudos da formulação da cápsula entérica da prolil endopeptidase

Um estudo é realizado em pacientes com doença celíaca estão matriculados em uma semana de estudo de dois. Cápsulas de gelatina contendo 90% de *Myxococcus xanthus* prolil endopeptidase misturadas com 10% de dióxido de silício são utilizadas. As cápsulas são cheias manualmente com a mistura, em faixas, e revestidas com um revestimento entérico de 10% de Sureteric (um polímero de ftalato de

acetato de polivinila, desenvolvido pela subsidiária Canadiana da Merck & Company). As amostras são testadas com ácido por exposição do revestimento a 1 N HCL 1 durante uma hora, a fim de simular o ambiente ácido do estômago. As cápsulas são, depois, colocadas numa câmara de vácuo durante 72 horas.

Duas cápsulas de 100 mg são administradas a cada paciente, antes de cada refeição. Os pacientes são instruídos a comer todos os tipos de alimentos, sem abster-se daqueles que eram conhecidos por causar desconforto, *por exemplo*, inchaço, diarreia e cólicas.

Exemplo 6

Formulação da cápsula entérica da prolil endopeptidase

400 mg de ácido L-tartárico e 40 mg de óleo de rícino glicol-hidrogenado de polietileno (HCO-60) são dissolvidos em 5 ml de metanol. Esta solução é colocada num almofariz previamente aquecido até 30°C. À solução são adicionados 100 mg de *Myxococcus xanthus* prolil endopeptidase. Imediatamente após a adição da PPP, a mistura é agitada com um pilão sob uma corrente de ar quente (40°C) e, em seguida, colocada num exsiccador sob vácuo durante a noite para remover o solvente. A massa sólida resultante é pulverizada com o pilão e amassada com 30 mg de bicarbonato de sódio e uma pequena quantidade de etanol a 70%. A mistura é, então, dividida e moldada em comprimidos de cerca de 2 mm de tamanho e completamente secos. Os comprimidos secos recebem um revestimento de ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP-55) para se obter uma formulação entérica.

Exemplo 7

Atividade da endoprotease

O gene de uma endoprotease, (EPB2; PubMed número de acesso U19384, nt 94-1963) a partir de cevada (*Hordeum vulgare* subsp *vulgare*), foi subclonado num vector pET28b (Invitrogen), utilizando locais de inserção BamH1 e EcoR1; o plasmídeo resultante foi designado de pMTB1. Uma forma proproteína 43 kDa inativa foi expressa a partir de pMTB1 no citoplasma das células BL21 de *E. coli*. A proproteína foi solubilizada a partir dos corpos de inclusão, utilizando 7 M de ureia. A proteína solubilizada foi purificada numa coluna de Ni-NTA. A autoativação da proEPB2 na sua forma ativa madura foi conseguida por adição do tampão de citrato-fosfato, pH 3 (preparado por mistura de citrato de 0,1 M de sódio e 0,2 M de fosfato de sódio). Sob tais condições ácidas, a proEPB2 converte-se rapidamente numa forma madura com um peso molecular de 30 kDa (Fig. 2). Durante 72 horas, a forma madura EPB2 sofre autólise. A sequenciação N-terminal proporcionou uma sequência N-terminal que começa com VSDLP.

Sob condições ácidas, a forma madura EPB2 digere eficientemente a α 2-gliadina purificada, uma fonte de péptidos que são imunogénicos para pessoas que sofrem de doença celíaca. O inibidor da proteinase de cisteína, leupeptina, inibe esta atividade, confirmando o mecanismo como uma protease de cisteína. O pH ótimo de activação proEPB2 e a digestão da α 2-gliadina é 2,4-3,5, que pode, portanto, fornecer um tratamento para a doença celíaca que consiste na administração oral de proEPB2.

Exemplo 8

Formulação e análise da eficácia da *M. Xanthus* PEP

A liofilização de *M. Xanthus* PEP foi realizada como se segue. A PEP foi purificada como descrito no Exemplo 1, e concentrada para uma concentração inicial de 7,7 mg/ml por meio de filtração de fluxo tangencial (TFF), utilizando uma membrana de desfiltração de 10K MWCO Pellicon (Millipore, PLCGC10, 50 cm, Cat. No. PXC010C50). TFF (usando um LabScale TFF da Millipore, Cat. N ° 29751) foi realizada durante aproximadamente 12 horas (pressão de 50 psi (retentado) / 30 psi (permeante)), com a adição periódica do reservatório de 50 mM de fosfato de sódio, 3% de sacarose, pH 7,5. Depois disso, foi adicionada PEG-4000 com uma concentração alvo de 1%. A concentração da proteína final foi de 70-100 mg/ml. Este material foi centrifugado e depois liofilizado. A liofilização foi realizada em placas de petri quadradas (Cat Falcon Cat. No. 35-1112) num liofilizador DuraStop, utilizando parâmetros descritos na Tabela a seguir. Tipicamente, 0,7-0,85 mg da PEP estavam presentes por mg de material liofilizado. Não foi observada perda de atividade específica da PEP em liofilização.

Etapa	Temperatura	Pressão	Duração	Taxa de rampa
Congelamento 1	-50°C	Atmosférico	2 hrs	0,3°C/minuto
Recozimento	-35°C	Atmosférico	3 hrs	0,3°C/minuto
Congelamento 2	-50°C	Atmosférico	2 hrs	0,3°C/minuto
1° Secagem	-20°C	100 mTorr	16,9 hrs	0,5°C/minuto
2° Secagem	+25°C	100 mTorr	8,0 hrs	0,2°C/minuto
*P. Temp.=Médio Temp. produto no final da etapa. **1°=secagem primária. ***2°=secagem secundária				

A mistura da *M. Xanthus* PEP foi realizada como se segue. Os bolos liofilizados foram pulverizados a um pó

leve. Todas as amostras foram pesadas para a recuperação e armazenadas em frascos canônicos de 50 ml selados a 4°C. Uma mistura foi preparada tal como mostrado abaixo. Os excipientes foram selecionados para proporcionar um fluxo adequado e propriedades de desintegração para a mistura misturada.

Ordem de adição	Excipiente	Percentagem
1	Bolo/pó de enzima liofilizada	63%
2	Silicato de cálcio	12%
3	Talco	5%
4	Crospovidone	5%
5	Avicel	25%

A enzima liofilizada e os excipientes foram misturados num misturador-V durante várias horas. O material foi então usado para fazer cápsulas ou comprimidos com revestimento gastroresistente. 100-150 mg de *M. xanthus* PEP podem ser carregados numa única cápsula de gelatina dura, de tamanho 00 (Capsugel). Alternativamente, as cápsulas de vegetais VCaP (tamanho 00, Capsugel) também pode ser utilizadas sem nenhum impacto sobre a atividade da enzima.

Para o revestimento gastroresistente das cápsulas, uma solução de revestimento gastroresistente foi preparada como mostrado a seguir:

Ordem de adição	Excipiente	Quantidade adicionada
1	Água RODI	49,5 mL
2	Talco	8,1 g
3	Eudragit L50 D-55	111,0 mL
4	Citrato de trietilo	1,62 mL

O revestimento gastroresistente foi misturado

vigorosamente numa proveta sobre uma placa de agitação. A solução foi então decantada para uma garrafa de pulverização. As cápsulas de ratos foram cuidadosamente espalhadas sobre toalhas de papel em grupos de 20 e a solução de revestimento gastroresistente pulverizada para as cápsulas. O ar quente foi usada para secar parcialmente as cápsulas antes de as mover para uma toalha de papel seco, na qual estas secam ao ar durante 30 minutos antes de o próximo revestimento ser aplicado. Um total de 3 revestimentos foram aplicados a fim de cobrir todas as partes das cápsulas. Estas foram secas ao ar durante várias horas, antes de ser transferidas para um recipiente de armazenamento. Embora alguma atividade da PEP seja perdida como resultado do revestimento entérico, uma fração substancial da atividade é retida e é estável durante, pelo menos, 1 mês em armazenamento a 4°C.

Um método alternativo para formular a enzima para administração intestinal é como um comprimido com revestimento entérico. Os comprimidos têm a vantagem de dissolução mais rápida no meio fracamente ácido do intestino delgado superior. Outra vantagem da formulação de comprimidos é que mais enzimas podem ser compactadas para um volume menor do que para uma cápsula. A sua responsabilidade principal é que as proteínas desnaturam frequentemente sob altas pressões. Num método de preparação de comprimidos de *M. xanthus* PEP, a mesma mistura liofilizada como acima foi usada. Prepararam-se comprimidos a uma força de punção de 3000 psi durante 15 segundos. Nenhuma actividade foi perdida no processo, demonstrando a possibilidade de formulações em comprimidos desta enzima.

Para testar a eficácia da formulação de cápsulas orais com revestimento gastroresistente descrita acima, foram realizados dois tipos de testes. Os testes de dissolução *in*

vitro foram realizados num testador de dissolução Hanson SR8-Plus usando fluido gástrico simulado (SGF; 2 g/L de NaCl, pH 1,2, ajustado com g N de HCl) e fluido intestinal simulado (SIF; de 6 g/L de fosfato de potássio monobásico com ou sem 10 g/L de pancreatina, pH 6,8, ajustado com 5 N de NaOH). As cápsulas com revestimento entérico foram testadas para resistência à dissolução em SGF para durante até 2 h a 37°C. Não foi observada libertação de proteína. Subsequentemente, as cápsulas foram submetidas a testes de dissolução similares em SIF a 37°C. Uma fração substancial do material encapsulado foi libertado em 15 min. Durante 30 min, o material tinha sido completamente libertado.

Os testes *in vivo* das cápsulas foram realizados em ratos, utilizando cápsulas de gelatina rígida de tamanho menor (9 cápsulas, Torpac). Cerca de 16 mg da mistura de formulação liofilizada foram encapsulados em cada cápsula com revestimento entérico, correspondendo a ~7 mg da PEP.

Os ratos, que jejuaram durante a noite, foram administrados por via oral com uma cápsula da PPE ou de placebo, juntamente com uma quantidade medida (300 mg de glúten/kg de peso corporal) de xarope de glúten preparado como se segue. 300 g de farinha de glúten comercialmente disponível de trigo (Bob's Red Mill, Milwaukie OR) foram adicionadas a 10 L de uma solução de 0,01 M de solução HCl para atingir um pH de 2,0. Foi adicionada pepsina (6,0 g, American Laboratories). Após incubação a 37°C durante 1 h, o pH foi ajustado para 2,0 por adição de 35 ml de 1M HCl. Após a manutenção durante mais 2 h a 37°C, a solução foi neutralizada por adição de 35 g de Na₂ HPO₄, e o pH foi ajustado para 7,9 com 10 M NaOH (32,5 ml). A tripsina/quimotripsina em pó (3,75g) (Enzyme Development

Corp; 1000 USP/mg, em tripsina, 1000 USP/mg, quimotripsina) foi então adicionada, a reação mantida a 37°C durante 2 horas, pH 7,9 (o re-ajustamento do pH para 7.9, depois de 1 hora, com 10 M NaOH) e aquecida a 100°C durante 15 minutos para inativar as enzimas. A solução de glúten final foi filtrada através de tecido queijeiro para remover partículas residuais de grandes dimensões. Um animal administrado com uma cápsula de PEP e um animal administrada com uma cápsula simulada foram sacrificados após 45 min e 90 min cada, e os pequenos conteúdos intestinais foram analisados quanto ao teor de glúten através de HPLC C18 de fase reversa. Os cromatogramas foram normalizados para o teor de proteína total em cada amostra. Parte superior = 45 min, Bottom = 90 min. (verde = placebo, azul = cápsula PEP).

Os péptidos derivados de glúten eluem no intervalo de 20 - 30 min. Aos 45 min, bem como 90 min, o glúten tratado com pepsina-tripsina-quimotripsina foi minimamente metabolizado em animais administrados com placebo, enquanto parece ser extensivamente metabolizado. Juntos, estes resultados indicam que as cápsulas de PEP com revestimento entérico conseguem sobreviver no ambiente gástrico do estômago, e catalisam proteólise dos péptidos alimentares no intestino delgado.

A presente invenção tem sido descrita em termos de formas de realização particulares encontradas ou propostas pelo inventor para compreender os modos preferidos para a prática da invenção. Será apreciado por aqueles especialistas na arte que, à luz da presente divulgação, numerosas modificações e alterações podem ser feitas nas formas de realização particulares exemplificadas, sem sair do âmbito pretendido da invenção. Além disso, devido a considerações de equivalência funcionais biológicas, podem

ser feitas alterações nos métodos, estruturas e compostos sem afetar a ação biológica no tipo ou na quantidade.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora tenha sido tomado muito cuidado na compilação das referências, não se poderão excluir erros e omissões e o EPO nega qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

- WO 03068170 A [0007]
- US 6008027 A [0079]
- US 6258789 B [0090]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1989 [0026]
- Oligonucleotide Synthesis. 1984 [0026]
- Animal Cell Culture. 1987 [0026]
- Methods in Enzymology. Academic Press Inc, [0026]
- Handbook of Experimental Immunology [0026]
- Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells. 1987 [0026]
- Current Protocols in Molecular Biology. 1987 [0026]
- PCR: The Polymerase Chain Reaction. 1994 [0026]
- Current Protocols in Immunology. 1991 [0026]
- **WIESER.** *Acta Paediatr*, 1996, vol. 412, 3-9 [0027]
- **FRIEDLER et al.** *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 23783-23789 [0041]
- **COLOT.** *Genet Eng*, 1990, vol. 12, 225-41 [0061]
- **WIESER.** *Baillieres Clin Gastroenterol*, 1995, vol. 9 (2), 191-207 [0064]
- **MERRIFIELD.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0066]
- Synthetic Organic Chemistry. John Wiley & Sons, Inc,

[0072]

- **S. R. SANDLER et al.** Organic Functional Group Preparations. Academic Press, 1983 [0072]
- **H. O. HOUSE.** Modern Synthetic Reactions. W. A. Benjamin, Inc, 1972 [0072]
- **T. L. GILCHRIST.** Heterocyclic Chemistry. John Wiley & Sons, 1992 [0072]
- **J. MARCH.** Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure. Wiley-Interscience, 1992 [0072]
- **MATHIOWITZ et al.** *Nature*, 1997, vol. 386 (6623), 410-414 [0077]
- **DORKOOSH et al.** *J Control Release*, 2001, vol. 71 (3), 307-18 [0077]
- **SHAW, DM ; GAERTHE, B ; LEER, RJ ; VAN DER STAP, JGMM ; SMITTENAAR, C. ; DEN BAK-GLASHOUWER ; HEIJNE, MJ ; THOLE, JER ; TIELEN FJ ; POWELS, PH.** *Immunology*, 2000, vol. 100, 510-518 [0127]
- **MARTIN MC; ALONSO, JC; SUAREZ JE; ALVAREZ MA.** *Appl. Env. Microbiol.*, 2000, vol. 66, 2599-2604 [0127]
- **PAREKH, R.N.; WITTRUP, K.D.** *Biotechnol. Prog.*, 1997, vol. 13, 117-122 [0128]
- **CALADO, C.R.C; MANNESSE, M.; EGMOND, M. ; CABRAL, J.M.S. ; FONSECA, L.P.** *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, vol. 78, 692-698 [0128]

Lisboa, 26 de Novembro de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Uma formulação para uso no tratamento da doença celíaca, -com uma prolil endopeptidase (PEP), e com uma endoprotease de glutamina, em conjunto com um excipiente farmacêuticamente aceitável.
2. A formulação para uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a referida PEP ser *Flavobacterium meningosepticum* PEP, *Myxo-coccus xanthus* PEP, *Sphingomonas capsulata* PEP ou *Penicillium citrinum*.
3. A formulação para uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a referida prolil endopeptidase ser *Sphingomonas capsulata* PEP.
4. A formulação para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 1 a 3, **caracterizada por** a referida endoprotease de glutamina ser protease de cisteína B de *Hordeum vulgare*.
5. A formulação para uso de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada por** a referida protease de cisteína B ser uma forma proenzima que é ativada sob condições ácidas.
6. A formulação para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 1 a 5, **caracterizada por** a referida formulação ser adequada para administração.
7. A formulação para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 1 a 6, **caracterizada por** a referida formulação estar contida no interior de um revestimento gastroresistente.
8. A formulação para uso de acordo com a reivindicação 1,

caracterizada por a referida PEP ser purificada por cromatografia de afinidade.

9. A formulação para uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a referida PEP ser liofilizada.

10. A formulação para uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a referida PEP ser formulada numa forma de dosagem da unidade farmacológica.

11. A formulação de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, 9 e 10 para uso num método de tratamento da intolerância ao glúten num paciente.

12. A formulação para uso de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada por** a formulação ser misturada com alimentos.

13. A formulação para utilização de acordo com a reivindicação 11 ou 12, **caracterizada por** a referida intolerância ao glúten estar associada a doença celíaca.

14. A formulação para uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a PEP e a endoprotease de glutamina serem para administração sob a forma de duas dosagens de enzima, uma dose contendo a PEP e, uma outra dosagem contendo a endoprotease de glutamina.

Lisboa, 26 de Novembro de 2013

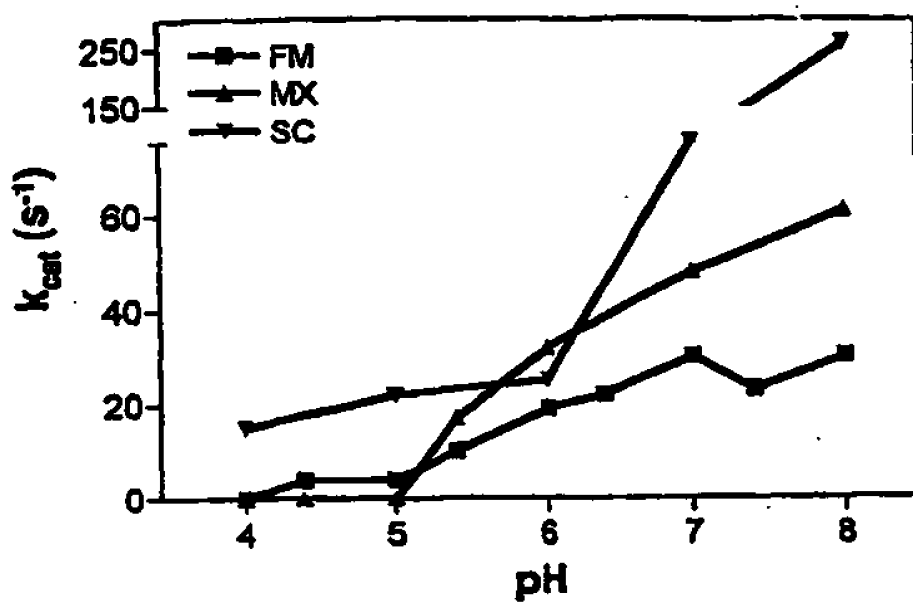


FIG. 1

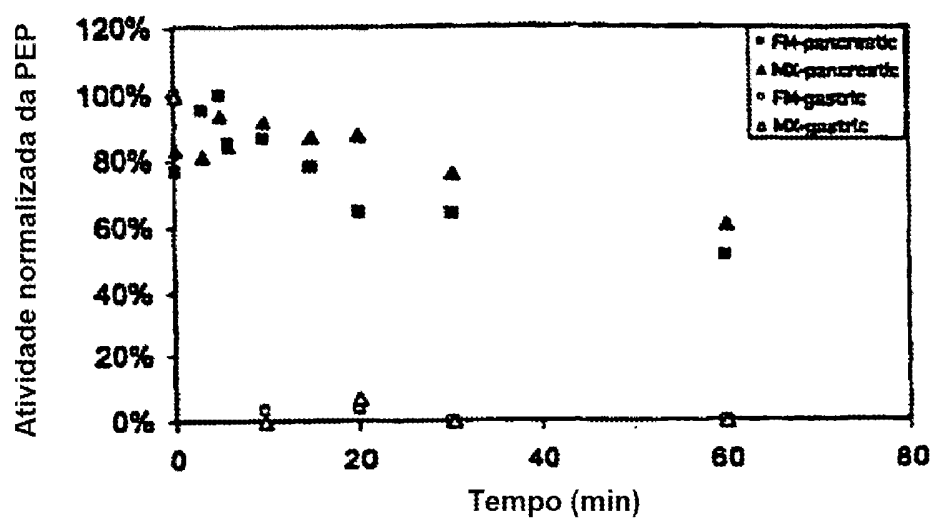


FIG. 2

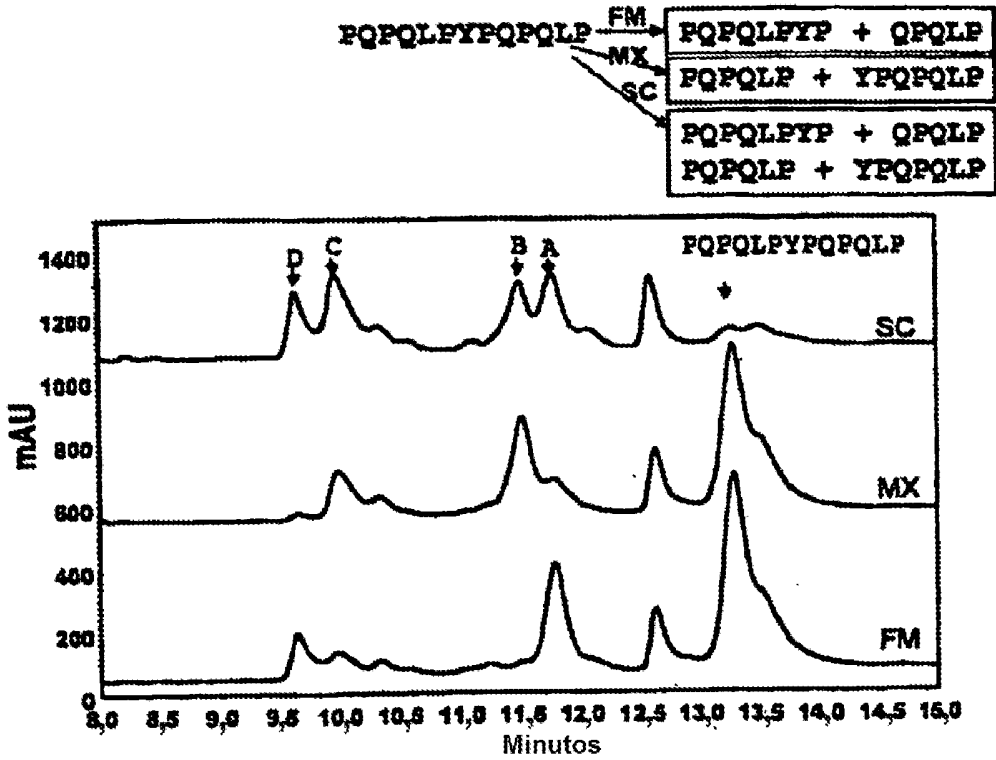


FIG. 3

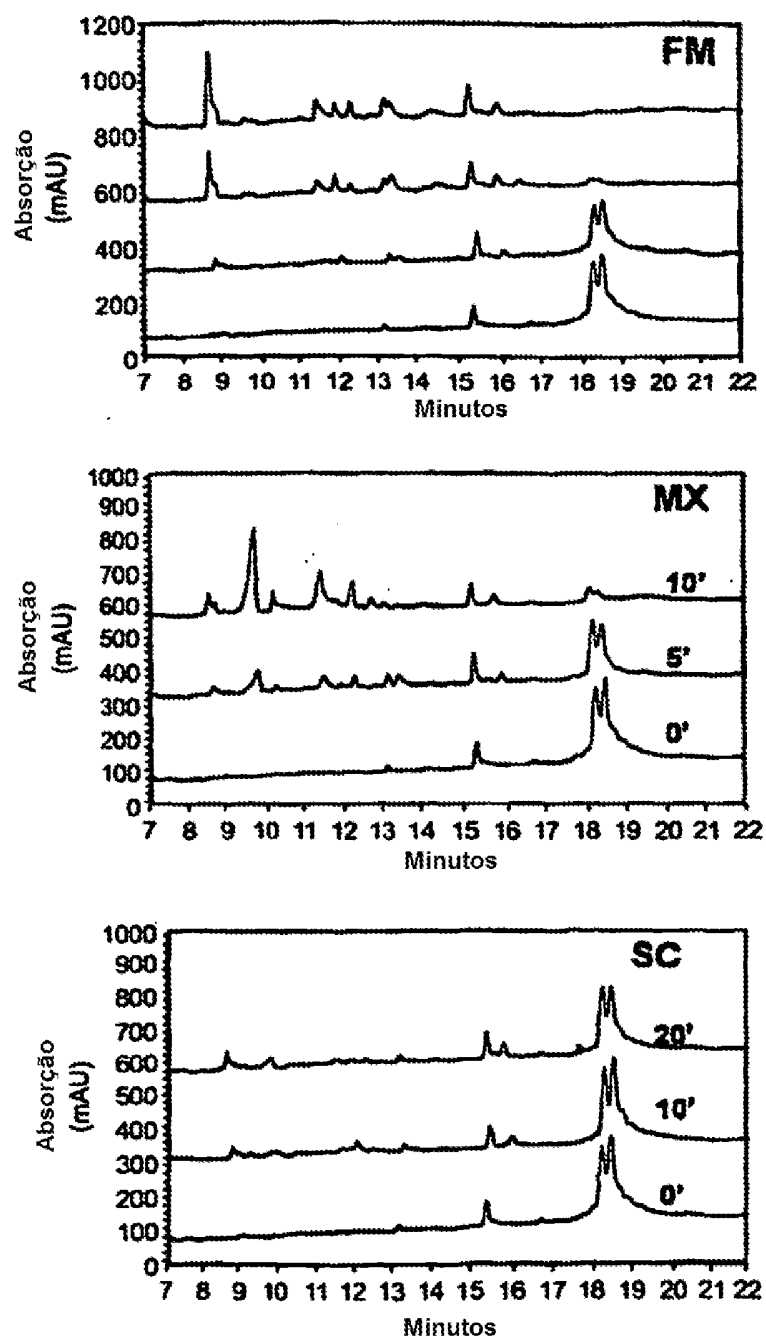


FIG. 4A

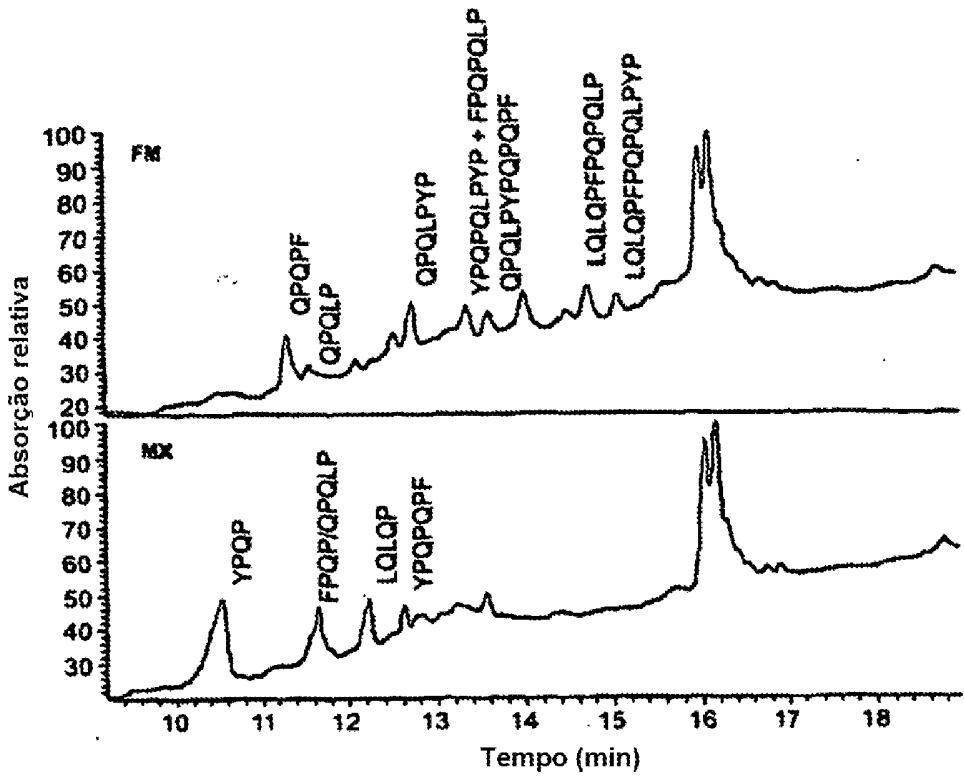


FIG. 4B

LQLQFFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	MN (FM)
QPQLF QPQLF QPQLF QPQLF	616,3
YPQPQLFYP	582,2
YPQPQLFYP	1102,5
QPQLFYP	842,4
QPQLFYPQPQPF	1439,7
LQLQFFP	842,3
LQLQFFPQPQLF	1405,6
LQLQFFPQPQLFYP	1665,7
LQLQFFPQPQLFYPQPQLF	2231,0

LQLQFFPQPQLFYPQPQLFYPQPQLFYPQPQPF	MN (MX)
YPQPQPF	876,4
QPQLF QPQLF QPQLF	616,3
LQLQF	582,2
FPQP	598,2
YPQP YPQP YPQP	488,2
	504,2

FIG. 4C

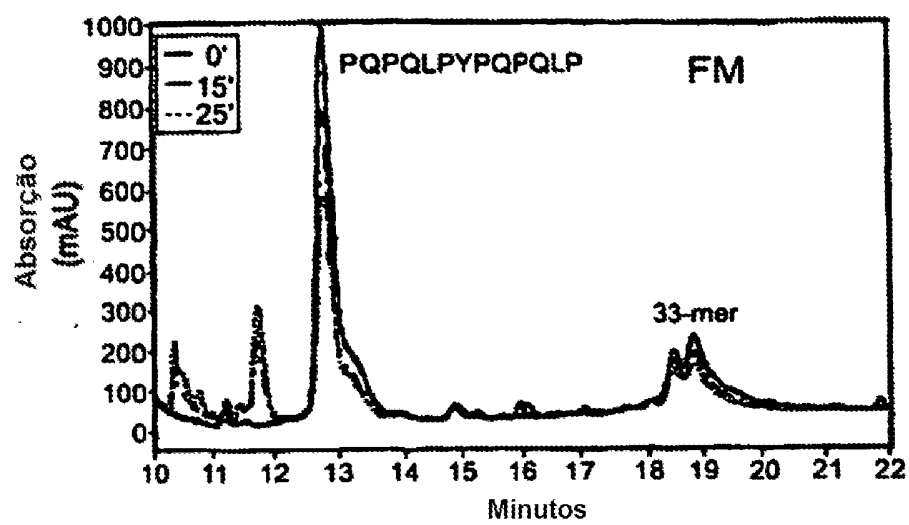


FIG. 5A

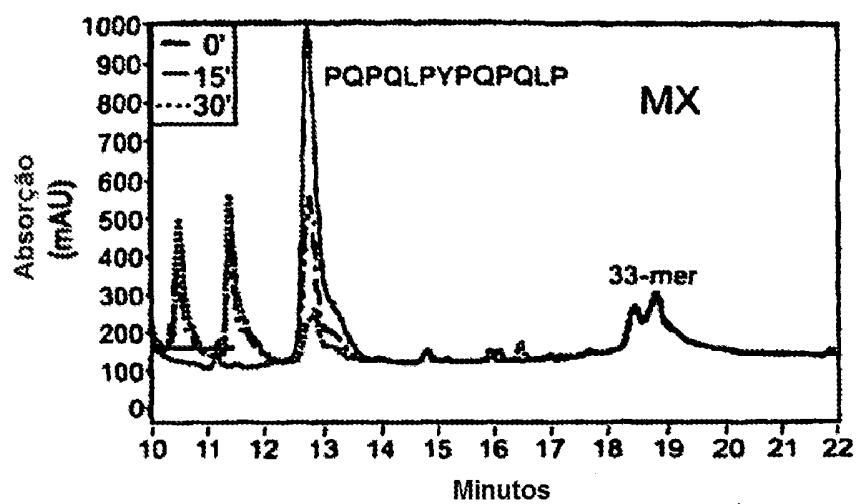


FIG. 5B

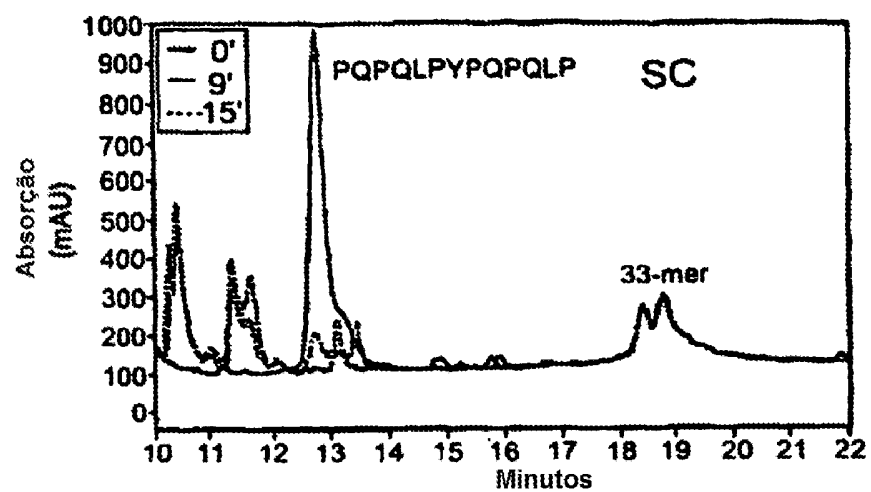
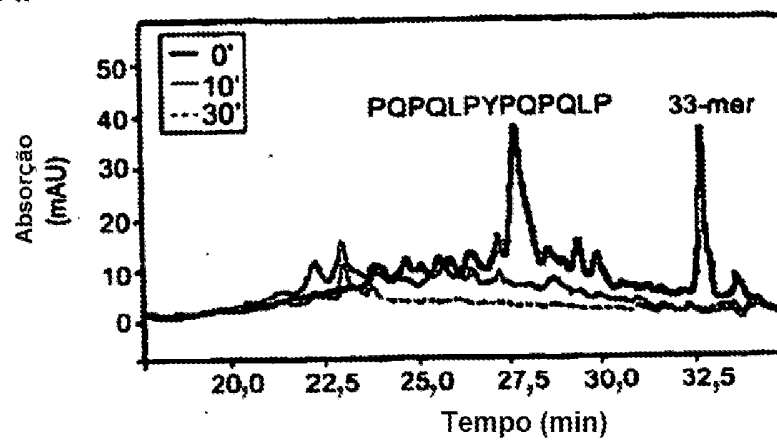


FIG. 5C

A.



B.

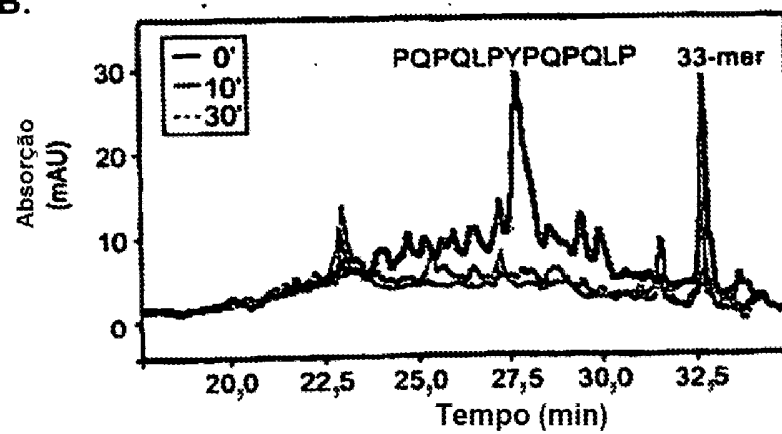


FIG. 6

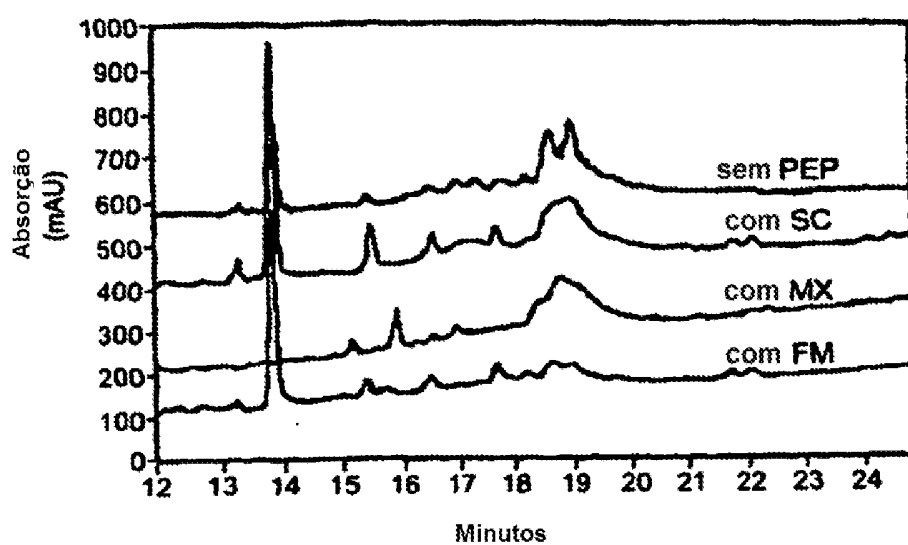


FIG. 7