

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901979715A1

Publication Date

20130319

Applicant

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

Title

PEPTIDI AVENTI EFFETTO PROTETTIVO NEI CONFRONTI DELLA ATTIVITA
INFIAMMATORIA DEL PEPTIDE 31-43 DELLA A-GLIADINA NELLA MALATTIA
CELIACA

Peptidi aventi effetto protettivo nei confronti
dell'attività infiammatoria del peptide 31-43 dell'a-
gliadina nella malattia celiaca

La presente invenzione concerne peptidi aventi effetto protettivo nei confronti dell'attività infiammatoria del peptide 31-43 dell'a-gliadina nella malattia celiaca. In particolare, l'invenzione concerne peptidi aventi effetto protettivo nei confronti dell'attività infiammatoria del peptide 31-43 dell'a-gliadina nella malattia celiaca e che quindi possono essere impiegati a scopo preventivo e terapeutico mediante la loro somministrazione in soggetti ad alto rischio di sviluppare malattia celiaca e/o a soggetti celiaci appena prima di un pasto contenente glutine.

La malattia celiaca (MC) è un'enteropatia autoimmune permanente, scatenata nei soggetti geneticamente predisposti dall'ingestione del glutine. Il glutine è la porzione alcool-solubile di grano, segale ed orzo. La principale proteina del glutine del frumento è la gliadina, le rispettive prolamine dell'orzo e della segale sono l'ordeina e la secalina (1-3).

Negli ultimi anni, numerose evidenze sperimentali sono state prodotte relative al ruolo dell'immunità innata nell'innescare e sostenere l'infiammazione mucosale nell'intestino dei soggetti celiaci. In particolare, per permettere l'attivazione *in vitro* dei linfociti T CD4+ gliadina-specifici da parte dei peptidi della gliadina immunodominanti, quali l' α -9 e

α -2, è necessaria la pre-incubazione della mucosa duodenale celiaca con il peptide che contiene gli amminoacidi in posizione 31-43 nella sequenza della gliadina (p31-43). Inoltre, solo il peptide tossico 31-43, non i peptidi immunodominanti, ha mostrato la capacità di indurre *in vitro* una rapida espressione di IL-15, CD83, COX-2, apoptosi degli enterociti e attivazione della p38 MAP chinasi nella mucosa celiaca (4). Recentemente, è stato riportato che solo il peptide tossico 31-43, non i peptidi immunodominanti, è trattenuto nel sistema endosoma-lisosomiale degli enterociti e determina un aumento intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che inibiscono l'ubiquinitazione della TG2, che a sua volta, determina un aumento dei livelli e dell'attività di TG2. TG2 provoca, poi, cross-linking, l'ubiquinitazione e degradazione di PPAR γ (5).

L'unico trattamento attualmente disponibile per la MC è la dieta priva di glutine per tutta la vita. Si tratta di una terapia che limita notevolmente la qualità di vita dei soggetti celiaci, tuttavia è necessaria una stretta compliance da parte del paziente per prevenire le temibile conseguenze del consumo di glutine nei soggetti celiaci.

Alla luce di quanto esposto sopra è pertanto evidente l'esigenza di poter disporre di nuove strategie terapeutiche alternative alla dieta priva di glutine.

In passato è stato identificato nel digesto peptico-triptico del grano un decapeptide avente

sequenza QQPQDAVQPF (SEQ ID NO:1) (WO9727217), denominato in avanti come pDAV. Questo peptide si è mostrato in grado di prevenire l'agglutinazione delle cellule K562(S) da parte dei peptidi della gliadina; prevenire l'attivazione delle cellule epiteliali intestinale e inibire la risposta cellulare Th1 celiaca (6-9). Inizialmente si pensò che il peptide pDAV potesse essere utilizzato nel trattamento della MC, somministrando pDAV assieme al glutine per renderlo tollerato dai soggetti celiaci. Tuttavia, studi successivi non sono sinora riusciti ad identificare nel genoma del frumento il gene codificante per la proteina che contiene la sequenza pDAV. È possibile che la sequenza sia stata originata da una mutazione genica portata dalla specifica linea (in seguito non più moltiplicata) da cui fu estratto il campione di farina analizzato presso i laboratori dell'Istituto Superiore di Sanità nel 1997 nel quale fu identificato il peptide pDAV. Pertanto, l'ipotesi di utilizzare pDAV in terapia fu abbandonata in assenza di una prova certa della diffusione di tale peptide in natura. L'impiego di pDAV in terapia avrebbe infatti esposto i pazienti ad eventuali rischi conseguenti al trattamento con un peptide al quale la popolazione non è normalmente esposta.

Gli autori della presente invenzione hanno identificato una sequenza nucleotidica codificante un peptide simile a pDAV in termini di sequenza e funzionalmente equivalente a pDAV. Il nuovo peptide ha sequenza QQPQRPOQPF (SEQ ID NO: 2), d'ora in avanti

denominato pRPQ. pRPQ corrisponde alla posizione 218-227 della ω -secalina codificata dalla sequenza depositata presso la banca dati NCBI con l'accession number FJ823444. Lo stesso peptide è stato ritrovato anche nelle sequenze di ω -secalina FJ823438 (aminoacidi in posizione 186-195), FJ823439 (posizione 101-110), FJ823443 (posizione 85-94), FJ823441 (posizione 86-95), FJ823440 (posizione 85-94) e FJ823442 (posizione 157-166). Tutte le sequenze descritte sono state isolate dagli autori della presente invenzione a partire dalla varietà di frumento tenero Kavkaz. Lo stesso peptide è stato inoltre ritrovato in tre sequenze precedentemente depositate in banca dati (X60294 e X60295 codificanti per ω -secalina ed isolate da *Secale cereale* e AF000227 codificante per ω -secalina ed isolata da *Triticum aestivum*).

I peptidi pDAV e pRPQ condividono sette amminoacidi (QQPQQPF, SEQ ID NO: 3) (7mer) ed entrambi presentano l'inserzione di una tripletta di aminoacidi tra i domini QQPQ e QPF. E' importante osservare che il peptide 7mer è noto per essere tossico nella MC (10). Gli autori della presente invenzione hanno investigato se pRPQ avesse la stessa capacità protettiva di pDAV nei confronti del glutine nella MC e se lo spaziamento dei due domini QQPF e QPF nella sequenza del 7mer fosse sufficiente a determinare una capacità protettiva del peptide risultante. A tal fine è stato usato il modello dell'agglutinazione delle cellule K562(S) che è un sistema rapido e validato per lo studio della tossicità dei peptidi della gliadina

nella MC (11).

E' stato quindi verificato che il peptide pRPQ, la cui sequenza è naturalmente presente nelle varietà di grano tenero caratterizzate dall'introggressione di parte del braccio corto cromosoma 1R della segale, non solo non è tossico per i soggetti celiaci, ma ha anche un effetto protettivo nei confronti della tossicità del p31-43. Questo effetto è stato valutato su tre differenti sistemi *in vitro* di MC, tutti validati dalla letteratura, inclusa la coltura della mucosa intestinale, che è considerata il golden standard per la valutazione delle possibili terapie per la MC. E' stato, inoltre, trovato che l'effetto protettivo del peptide è dovuto alla spaziatura tra i due domini QQPF e QPF. Inoltre, maggiore è la spaziatura, maggiore è l'effetto protettivo del peptide. Il peptide ottenuto con l'inserimento di una W, un aminoacido di grosse dimensioni, nel p7mer mostra la stessa capacità protettiva di quello ottenuto con l'inserimento di tre G, un aminoacido piccolo. Un effetto protettivo intermedio è risultato dall'inserzione di GG o YYY. Pertanto, mentre nella domanda di brevetto WO9727217 si suggeriva che l'attività protettiva di pDAV fosse dovuta alla specifica sequenza di aminoacidi e veniva addirittura indicata un sequenza minima di 5 aminoacidi necessaria per ottenere effetto protettivo, gli autori della presente invenzione hanno trovato che in realtà l'effetto protettivo del peptide è dovuto alla spaziatura tra i domini QQPF e QPF e che maggiore è la spaziatura maggiore è l'effetto protettivo del

peptide. I peptidi dell'invenzione sono in grado di prevenire l'agglutinazione delle cellule K562(S), l'espressione di ICAM-1 nelle cellule T84, la fosforilazione di p42/44 e l'attività di TG2 nelle mucose duodenali. Pertanto, i peptidi dell'invenzione possono essere vantaggiosamente impiegati a scopo preventivo e terapeutico mediante la loro somministrazione in soggetti ad alto rischio di sviluppare MC e/o a soggetti celiaci appena prima di un pasto contenente glutine. Mediante la sovra espressione delle sequenze dell'invenzione nel genoma di grani si potrebbe, inoltre, ottenere un grano non tossico per i celiaci, ma che mantenga le proprietà reologiche e di pastificazione. Infatti, la mancanza di proprietà reologiche per la panificazione e la pastificazione è la principale limitazione dei prodotti alimentari gluten-free attualmente disponibili sul mercato. I cibi a base di farina di mais e riso, sebbene ben tollerati dai soggetti celiaci, non sono palatabili come i corrispondenti a base di frumento. Quindi, tale grano offrirebbe un'innovazione importante per i soggetti celiaci.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione un peptide consistente nella seguente sequenza:

QQPQ[X]_nQPF (SEQ ID No: 4)

in cui X è un qualsiasi amminoacido;

n è un numero intero uguale o maggiore di 1, gli amminoacidi X essendo uguali o diversi tra loro quando n è maggiore di 1, a condizione che [X]_n sia diverso da

DAV. Secondo alcuni esempi di realizzazione, il peptide secondo l'invenzione può essere scelto tra i peptidi di sequenza SEQ ID No: 4 in cui $[X]_n$ è RPQ, W, GGG, YYY, GG, preferibilmente RPQ.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione una sequenza nucleotidica che codifica per il peptide come definito sopra o un vettore comprendente detta sequenza nucleotidica. Inoltre, l'invenzione concerne microrganismi o probiotici comprendenti il vettore come definito sopra. Ad esempio i microrganismi possono essere batteri o lieviti utilizzati nella preparazione dei prodotti da forno.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione l'uso dei microrganismi o probiotici come definiti sopra per la preparazione di prodotti alimentari per celiaci.

L'invenzione concerne, inoltre, una composizione farmaceutica comprendente il o consistente in almeno un peptide come definito sopra o una sequenza nucleotidica o un vettore come definiti sopra, come principio attivo, in associazione con uno o più eccipienti e/o coadiuvanti farmaceuticamente accettabili. Inoltre, l'invenzione concerne un peptide comprendente o consistente nella seguente sequenza:

QQPQ $[X]_n$ QPF (SEQ ID No: 4)

in cui X è un qualsiasi amminoacido;

n è un numero intero uguale o maggiore di 1, gli amminoacidi X essendo uguali o diversi tra loro quando n è maggiore di 1, a condizione che $[X]_n$ sia diverso da DAV, o composizione farmaceutica comprendente il o

consistente in almeno detto peptide, o una sequenza nucleotidica che codifica per detto peptide o un vettore comprendente detta sequenza nucleotidica, come principio attivo, in associazione con uno o più eccipienti e/o coadiuvanti farmaceuticamente accettabili, detti peptide o composizione per l'uso come inibitore della tossicità del peptide dall'amminoacido 13 all'amminoacido 31-43 della gliadina in pazienti celiaci o in soggetti ad alto rischio di sviluppare malattia celiaca. Detti peptide e composizione farmaceutica possono essere somministrati ad esempio per via orale o intranasale. In particolare detti peptide e composizione farmaceutica possono essere somministrati prima dei pasti. Secondo alcuni esempi di realizzazione, il peptide secondo l'invenzione può essere scelto tra i peptidi di sequenza SEQ ID No: 4 in cui $[X]_n$ è RPQ, W, GGG, YYY, GG, preferibilmente RPQ.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione l'uso di varietà di piante, quali ad esempio grano, orzo, segale, avena, che esprimono naturalmente il peptide SEQ ID NO: 2 (peptide pRPQ) per la preparazione di prodotti alimentari per celiaci. Varietà di piante che esprimono naturalmente SEQ ID NO:2 sono, ad esempio, *Secale cereale* e *frumento tenero Kavzak*.

Tra le varietà di grano, possono essere impiegate ad esempio quelle portatrici della traslocazione 1BL/1RS dalla segale e che quindi esprimono naturalmente il peptide pRPQ quali, ad esempio,

Triticum aestivum 1R/1S, Barra, Carisma, Colledoro, Collerosso, Dorico, Geppetto, Geronimo, Marvao, Sibilla, Sirmione.

La presente invenzione concerne, inoltre, piante transgeniche, quali ad esempio grano, orzo, segale, avena, esprimenti un peptide come definito sopra e il loro uso per la preparazione di prodotti alimentari per celiaci.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati.

Figura 1. Allineamento delle 5 sequenze trovate nel database:

(<http://appliedbioinformatics.wur.nl/glutendb/tree.htm>) in seguito alla ricerca di sequenze contenenti il peptide QQPQDAVQPF (SEQ ID NO:1) descritto da Silano et al. (7). La ricerca ha individuato tre ω -secaline, due isolate da *Secale cereale* (numero di accesso X60924 e X60295) ed una da *Triticum aestivum* (AF000227) e due ω -gliadine isolate da *Aegilops tauschii* (AAT74547) e *Triticum aestivum* (AAG17702) contenente un decapeptide (ombreggiato in grigio) con similitudini strutturali rispetto alla sequenza query. Asterischi indicano identità di sequenza tra le cinque sequenze proteiche.

Figura 2. Albero filogenetico costruito con la sequenza rappresentativa delle famiglie proteiche delle gliadine (prolamine). Le sequenze usate sono indicate con il numero di accesso. Tra parentesi sono indicate le distanze albero.

Figura 3. Sequenza di allineamento multiplo tramite ClustalW2 delle 7 proteine di ω -secalina contenenti il motivo "QQPQRPPQPF" (SEQ ID NO:2) (sottolineato in grigio). Gli epitopi γ 1-Sec e Glia- γ 2 (Vader et al., 2003) sono indicati in grassetto corsivo e sottolineato, rispettivamente. Gli asterischi indicano identità di sequenza tra le sette sequenze proteiche.

Figura 4. Marcatore per PCR specifico per gli alleli contenenti il motivo RPQ. La coppia di primer RPQ F/R ha prodotto un frammento di 200 bp per il gene di RPQ. Linea 1 (*Secale cereale* cv. Askari) e linea 3 (*Triticum aestivum* 1R/1S cv. Kavkaz) e nessun frammento per RPQ linea 2 (*Triticum durum* cv. dell'Adamello) e 4 (*Triticum aestivum* cv. Bilancia).

Figura 5. Western blotting per espressione di ICAM-1 in cellule T84. L'incubazione con p31-43 ha determinato un aumento del livello di ICAM-1 in cellule T84 rispetto alle cellule incubate con solo medium. Nessun aumento significativo dell'espressione di ICAM-1 nelle cellule T84 è stato notato quando le cellule sono state esposte a pDAV e pRPQ da soli. L'incubazione con 7mer è risultata in un lieve aumento di ICAM-1 nelle cellule. L'esposizione simultanea delle T84 al peptide tossico p31-43 e pDAV e pRPQ, rispettivamente, ha determinato un livello di espressione intracellulare di ICAM-1 simile a quella delle cellule esposte al mezzo di coltura da solo. Al contrario, nessuna riduzione significativa dell'espressione di ICAM-1 è stata misurata quando le cellule sono state incubate con 7mer

e p31-43 contemporaneamente, rispetto alle cellule esposte a p31-43 da solo. Il pannello A è rappresentativo di un blot. I risultati sono espressi come media \pm SEM. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato per tre volte. I risultati sono stati confrontati con ANOVA. (Pannello B).

Figura 6. Espressione dei livelli di ICAM-1 e DR-3 nella mucosa dell'intestino tenue incubate solo con medium, digesto PT di gliadina da solo e contemporaneamente con pRPQ. Il peptide RPQ previene significativamente l'incremento gliadina-dipendente dell'espressione delle molecole infiammatorie ICAM-1 e HLA-DR.

Figura 7. Espressione dei livelli di Py99 e p42-44 nella mucosa dell'intestino tenue incubate con medium da solo, p31-43 da solo e contemporaneamente con pRPQ. Il peptide RPQ previene significativamente l'incremento gliadina-dipendente dell'espressione delle molecole infiammatorie Py99 e p42-44.

Figura 8. Attività di TG2 nella mucosa duodenale da pazienti celiaci. Il peptide RPQ previene significativamente l'aumento dell'attività di TG2 p31-43 indotta.

ESEMPIO 1: Studio sull'attività protettiva del peptide pRPQ contro la tossicità del peptide 31-43 dell'a-gliadina e sulla funzione della spaziatura tra i domini QQPQ e QPF del peptide 7mer (SEQ ID NO: 3)

MATERIALI E METODI

Grani e isolamento del RNA

Semi del cultivar Kavkaz di grano tenero (*Triticum*

aestivum L., genoma AABBDD) portatore della traslocazione 1BL/1RS dalla segale (*Secale cereale* L.) sono stati processati nel presente lavoro. Campioni dell'endosperma del seme sono stati raccolti 20 giorni dopo l'antesi e conservati a -80° C. RNA totale è stato estratto utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen), seguendo le istruzioni del produttore. Per evitare la contaminazione con l'amido, le endosperme macinate sono state trattate con un mezzo composto da 50 mM Tris pH 9,00, 200mM NaCl, 1% Sarcosyl, 20 mM EDTA, DTT 5mM e successiva estrazione fenolo-cloroformio-isoamilica (25:24:1). I campioni purificati sono stati poi dosati tramite spettrofotometria, 1 mg di RNA totale è stato oggetto di trascrizione inversa utilizzando 200U di SuperScript II RNasi H trascrittasi inversa (Invitrogen) e primer poli (T) seguendo le raccomandazioni del costruttore (volume finale di 20µl).

PCR

Sequenze di DNA noti (numeri di accesso X60294, X60295 e F000227) dei geni di ω -secaline sono stati utilizzati per disegnare primer oligonucleotidici. Forward primer :5'CACAAATCCAACATGAAGACCTTCC3' (SEQ ID NO:5) e reverse primer: 5'CCCGATGCCTATAACCACTACTACAA3' (SEQ ID NO:6) sono stati utilizzati per amplificare il DNA. Primer forward e reverse sono stati definiti come le sequenze che comprendevano da 12 nucleotidi a monte a 8 nucleotidi a valle del codone di start e stop del CDS, rispettivamente.

La PCR è stata effettuata in campioni di 25µl di

volume finale, contenente 1µg RNA totale, 1X tampone PCR (Promega) con 1,5 mM MgCl₂, 200 nM di ciascun primer, 200 mM dNTPs e 1U GoTaq™ DNA polimerasi (Promega). Il profilo termico consisteva in una fase iniziale di denaturazione a 94° C per 6 minuti, seguita da 30 cicli di 94 ° C per 1 min, 60° C per 30 s, 72° C per 2 min. E' stata applicata una fase finale a 72° C per 7 minuti.

Primer gene-specifici sono stati progettati specificamente per amplificare il gene della ω-secalina che codifica per la sequenza contenente RPQ:

RPQ/F 5'CCCTCACACCAACCATTTCAC3' (SEQ ID NO:7)

RPQ/R 5'CTACTACAAATGGTTGCTGGGGC3' (SEQ ID NO:8).

Il primer forward è stato disegnato sulla regione che codifica per il tripeptide RPQ. L'amplificazione di questi primers ha seguito le stesse condizioni di PCR sopra riportati ad eccezione della concentrazione di DNA pari a 50 ng.

Sistema di clonazione GATEWAY e analisi del sequenziamento

Il sistema GATEWAY™ è stato utilizzato per la clonazione direzionale dei prodotti di PCR nel vettore pDonor221 attraverso la reazione BP (Invitrogen). Il frammento di DNA di interesse è stato amplificato in un approccio in due fasi di PCR. La prima fase è stata eseguita con il primer sopra descritto modificato con l'aggiunta di tag attB al 5' :

forward 5'-aaaaagcaggctCACAAATCCAACATGAAGACCTTCC-3' (SEQ ID NO:9);

reverse agaaagctgggtCCCGATGCCTATAACCACTACTACAA-5'-

3' (SEQ ID NO:10).

La seconda amplificazione PCR è stata condotta con primer adattatore attB (Invitrogen) che riconoscono i tag attB:

5'-ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggct-3' (SEQ ID NO:11)

5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggt-3' (SEQ ID NO:12).

Il prodotto finale della PCR è stato poi clonato nel vettore pDonor221 attraverso la reazione BP per mezzo di enzimi BP clonasi. La reazione è stata bloccata dalla proteinasi K e il prodotto è mescolato con DH5 α cellule competenti (Invitrogen) per la trasformazione. La procedura è stata eseguita secondo il protocollo del produttore. Tutte le cellule sono state poste su piastra LB contenente 50 mg/ml di kanamicina.

I geni clonati sono stati sequenziati su entrambi i filamenti utilizzando l'ABI Prism TM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit con un sequenziatore ABI Prism 3130 Analyzer TM automatizzato (PE Applied Biosystems) con M13 forward e M13 reverse primer. Le sequenze sono state analizzate e tradotte in sequenze di amminoacidi tramite Vector NTI Explorer (versione 10). La predizione dei peptidi segnale è stata effettuata tramite programma SignalP 3,0 accessibile online (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Le sequenze riportate in questo studio sono visualizzabili nel database - NCBI - GenBank con numeri di accesso FJ816032 - FJ816047 e FJ823438 - FJ823444.

Peptidi

I seguenti peptidi della gliadina p31-43 sono stati sintetizzati da Primm (Milano, Italia) e la loro purezza è stata determinata da HPLC fase inversa:

pDAV: QQPQDAVQPF (SEQ ID NO: 1);

pRPQ: QQPQRPPQPF (SEQ ID NO: 2);

p7mer: QQPQQPF (SEQ ID NO: 3);

pGGG: QQPQGGGQPF (SEQ ID NO: 13);

pYYY: QQPQYYYQPF (SEQ ID NO: 14);

pW: QQPQWQPF (SEQ ID NO: 15).

hTPO (535-551)LDPLIRGILLARPAKL QV (SEQ ID NO: 16), peptide irrilevante di controllo.

Linee cellulari T84 e K562(S)

Cellule umane di carcinoma del colon T84 sono state coltivate in atmosfera al 5% CO₂ a 37° C in 50% DMEM, (Gibco, distribuito da Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e il 50% G12 contenente 4,5 g / L glucosio, 2 mM di L-glutamina, 50 U / mL di penicillina, 50 mg / ml streptomicina, 1% amino acidi essenziali, 1% HEPES e il 10% di siero siero fetale bovino (FBS). Cellule K562(S), un sottoclone immaturo di una linea da un paziente con leucemia mielogenica cronica in crisi blastica, sono state coltivate in atmosfera al 5% CO₂ a 37° C in RPMI (Gibco, distribuito da Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contenente 4,5 g / L di glucosio, con 2 mM di L-glutamina, 50 U / mL di penicillina, 50 mg / ml streptomicina, 1% amino acidi essenziali, 1% HEPES e il 10% di siero siero fetale bovino (FBS).

Coltura cellulare T84

Le cellule T84 sono state trattate con p31-43 in assenza e presenza di pRPQ, pDAV, p7mer (concentrazione

dei peptidi 20 µg/ml) e terreno di coltura da solo (come controllo negativo) per 24 ore a 37°C.

Coltura cellulare K562(S) e test di agglutinazione

Cellule K562(S) per il test di agglutinazione sono state raccolte per centrifugazione e lavate due volte in PBS senza calcio e magnesio. Poi le cellule sono state risospese ad una concentrazione di 10^8 cellule / ml in PBS; 25 ml di sospensione cellulare sono stati aggiunti a pozzetti di una multiwell da 96. Il peptide è stato aggiunto ad una concentrazione di 10 µg/ml. Il volume totale finale è stato 100 µl. La sospensione cellulare è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti. La velocità di agglutinazione è stata misurata utilizzando un lettore di piastre da 96 dotato di un agitatore. La torbidità della sospensione cellulare è stata letta a 600 nm (OD600 nm) sotto agitazione continua ai tempi 0 e dopo 30 min. La differenza di lettura tra T0 e T30 è stata calcolata come velocità di agglutinazione (CV).

Western blotting

Per l'analisi tramite WB, le cellule T84 sono state seminate ad una concentrazione di 1×10^5 / cellule per ml di terreno in una multiwell da 12 pozzetti e trattati poco prima di giungere a confluenza. Il trattamento è stato effettuato con 20 µg/ml di terreno per ogni peptide utilizzato (p31-43, p7mer, pDAV, pRPQ) per 24 ore. Al fine di testare l'effetto protettivo di pDAV e pRPQ verso l'effetto tossico di p31-43, è stata effettuata una pre-incubazione di 3 ore con questi peptidi prima

dell'esposizione al p31-43. Dopo l'incubazione, le cellule sono state trattate con un tampone contenente 150 mM NaCl, dodecilsulfate 0,05% di sodio (SDS) e l'1% Triton X-100. Questo è stato poi centrifugato per 5 minuti a 4° C. La concentrazione di proteine è stata misurata con il metodo Laemmli. Un SDS-elettroforesi su gel di poliacrilammide è stata effettuata con un gel al 4% e 7,5%. 30 mg di proteina sono stati caricati in ogni corsia del gel. In seguito, le proteine sono state trasferite ad una membrana di nitrocellulosa, (Biorad). Le membrane sono state incubate overnight con Ab monoclonali di topo contro ICAM-1 (Abcam, Cambridge, UK) diluito 1:250. Successivamente, dopo lavaggi, sono state incubate con anticorpo secondario (perossidasi HRP; 1:3000; Biorad). Le proteine presenti su membrane sono state rivelate mediante kit di rilevamento chemiluminescenza (Biorad), secondo le istruzioni del produttore. L'intensità delle bande proteiche sul blot è stata valutata mediante densitometro Biorad ChemiDoc.

Coltura di organo

Campioni mucosali di duodeno sono stati trattati in vitro per 3 ore o 24 ore con medium, digesto PT gliadina (500 µg/mL), p31-43 (20 µg/ml), pRPQ (10 µg/ml). P7mer e pTPO (10 µg/mL) sono stati utilizzati in tutti gli esperimenti come peptidi di controllo.

Immunolocalizzazione

Sezioni di 4 µm di spessore di tessuto congelato di campioni bioptici di pazienti celiaci sono stati fissati in acetone per 10 minuti. Le sezioni sono state poi incubate per 2 ore a temperatura ambiente con i

seguenti anticorpi: anti-fosfo-tirosina PY99 mAb (1:80, IgG2b; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), phospho-p42/p44 (1:500, policlonale Ig; Cell Technology Beverly, USA), ICAM1 (1:500, Abcam, Cambridge, MA, USA), HLA-DR (1:500, Abcam, Cambridge, MA, USA). L'espressione dell'antigene e la sua distribuzione nel campione bioptico sono state visualizzate in immunofluorescenza indiretta come descritto in precedenza. Isotipo di controllo monoclonale (IgG1 e IgG2) è stato utilizzato come controllo. I campioni sono stati analizzati mediante unità laser confocale a scansione Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Germania).

Determinazione in situ dell'attività di TG2

Sezioni di 7 µm di diametro sono state raccolte su vetrino, preincubate con buffer tampone (965 mL di 100 mmol/L di Tris-HCl, pH 7,4, 25 mL di 200 mmol/L CaCl₂) per 15 minuti, e poi preincubate con lo stesso buffer a cui è stato aggiunto 10 mL di 10 mmol/L biotinilato mono-dansylcadaverine (bio-MDC) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) per 1 ora a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata con 25 mmol/L di EDTA per 5 minuti, le sezioni sono state poi fissate in 4% paraformaldeide per 10 minuti. L'incorporazione di substrato marcato è stato visualizzato mediante incubazione con RPE-coniugato con streptavidina (1:50; Dako) per 30 minuti. Le sezioni sono state visualizzate in fluorescenza con un microscopio Axioxop Zeiss 2 Plus (Zeiss, Jena, Germania).

RISULTATI

Identificazione di pRPQ

Analisi del database

Un precedente studio (7) ha identificato un decapeptide nella frazione alcol-solubile di una varietà di grano duro (Adamello), decapeptide che è capace di prevenire l'attivazione dei linfociti periferici di celiaco da parte dei peptidi della gliadina. Partendo da ciò, una ricerca bioinformatica è stata condotta per identificare il gene che codifica per questa sequenza. La ricerca su un database del glutine (<http://appliedbioinformatics.wur.nl/glutendb/tree.html>) non ha trovato nessun ORF che codificasse per una sequenza proteica contenente il peptide in questione. L'analisi del database ha altresì identificato cinque sequenze con ORFs parzialmente sovrapponibile alla sequenza di pDAV (Figure 1). I numeri di accesso AAT74547 e AAG17702 codificano proteine della famiglia ω -gliadine di *Aegilops tauschii* (12) e *Triticum aestivum* (13). Entrambe le sequenze contengono una copia di QQPQQPQQPF (SEQ ID NO:17). Tre sequenze addizionali sono state identificate per la presenza di una singola copia del decamer QQPQRPPQQPF (SEQ ID NO: 2) X60294 and X60295 codificano per un ω -secalina isolata da *Secale cereale* (14), mentre la sequenza AF000227 per una ω -secalina isolata da un genotipo di grano tenero che porta la traslocazione grano-segale 1BL.1RS (15).

Il confronto tra il decapeptide pDAV e la sequenza QQPQRPPQQPF (SEQ ID NO: 2) sottolinea alcune omologie strutturali tra i due. R (arginina) e D (acido aspartico) sono entrambi aminoacidi polari, sebbene con cariche opposte (negativa per A, positiva per R) ed

entrambi sono in gradi di formare H-legami. P (prolina), Q (glutamina), A (alanina) e V (valina) sono tutti aminoacidi a carica neutra. Sulla base dell'ipotesi che queste omologie strutturali fossero sufficienti a conferire una capacità protettiva verso la MC anche al peptide pRPQ, ulteriori studi sono stati condotti per caratterizzare il gene di pRPQ e verificare l'attività di questo peptide nella MC.

Caratterizzazione molecolare del gene delle ω -secaline

In considerazione dei risultati dell'analisi del database, primers per la PCR sono stati disegnati sulle regioni altamente conservate delle ω -secaline che sono state trovate nel database e usate per clonare tutte le ω -secaline espresse nell'endosperma maturo del grano tenero Kavkaz, che porta la traslocazione grano-segale 1BL-1RS. I cDNA amplificati sono stati clonati e più di 100 cloni scelti a caso dalla libreria specifica delle ω -secaline sono stati sequenziati. Queste sequenze hanno identificato 23 geni non ridondanti.

Le ORFs delle sequenze di ω -secaline clonate variavano da 115 a 357 residui aminoacidici, il più lungo era corrispondente ad una sequenza già disponibile nel database con l'eccezione di poche sostituzioni aminoacidiche. Questa variabilità nella lunghezza delle sequenze delle ω -secalina è in accordo con quanto riscontrato negli studi precedenti (16). Le sequenze primarie delle ω -secaline clonate nel presente studio confermano la presenza di motivi ripetitivi ricchi in glutamina e prolina: PQQPFQQ (SEQ ID NO:18)

e QQPQQPF (SEQ ID NO:3), che sono molto comuni anche nelle ω -gliadine e nelle C-ordeine. La Figura 2 mostra gli alberi filogenetici costruiti dopo l'allineamento delle sequenze amminoacidiche delle famiglie delle gliadine, confermando un rapporto evolutivo più stretto tra la ω -secalina con le ω -prolamine, ω -gliadina e C-ordeina.

Tra le 23 ω -secaline identificate in questo lavoro, 7 proteine contengono la sequenza QQPQRPPQPF (SEQ ID NO:2). La ORF di queste sequenze variava tra 200 e 357 aminoacidi e condivide un elevato numero di sequenze con della ω -secaline presenti nel database NCBI. Dopo aver confrontato queste 7 sequenze con le ω -secaline, sono state identificate quattro principali regioni strutturali: (a) un peptide segnale di 19 amino acidi conservato, (b) una regione N-terminale di 27 aminoacidi, (c) una regione ripetitiva ricca in glutammina e prolina e (d) una regione C-terminale di 12 aminoacidi che termina con quattro residui di valina (Figura 3). La sequenza segnale e le regioni C-terminale e la N-terminale sono conservate in tutte le ω -secaline clonate con piccole differenze dovute a singole sostituzioni amminoacidiche. Le sequenze N-terminali che iniziano con RQL, una delle varianti conosciute e già descritte nelle ω -secaline, ω -gliadine e C-ordeine (17).

Sulla base della letteratura scientifica (11), due peptidi antigenici, Glia- γ 2 QQFEPQQPQQPFQ (SEQ ID No:19) e Sec- γ 1 PQQPQQSFPQQPQR (SEQ ID No:20) (che allineano con gli epitopi contenuti in Glia- γ 1), sono

stati identificati all'interno della sequenza dei geni delle ω -secaline che abbiamo clonato geni. Il primo epitopo (Glia- γ 2) è presente in 8 ω -secaline, mentre il secondo (Sec- γ 1) è presente in 5 sequenze. Inoltre, due geni delle ω -secaline contenenti la tripletta RPQ (FJ823444 e FJ8234438) contengono anche dei peptidi che si allineano con due epitopi del glutine (Glia- γ 2 e γ 1-Sec).

Sviluppo di un marcatore per l'identificazione dei genotipi portanti la sequenza RPQ

Un primer forward (RPQ/F) (RPQ/F 5'CCCTCACACCAACCATTTCAC3' -SEQ ID NO:7)) costruito in base alla regione che contiene il motivo RPQ nella sequenza FJ823444 presente nelle ω -secaline, è stato accoppiato con il primer reverse (RPQ/R) (5'CTACTACAAATGGTTGCTGGGGC3' -SEQ ID NO:8) e utilizzato per amplificare selettivamente gli alleli contenente il motivo RQP. Il genotipo RPQ ha prodotto un frammento di 200 bp. Questo marcatore dominante disponibile per la selezione al locus Sec-1 permette la discriminazione degli alleli contenenti RPQ rispetto a quelli non RPQ.

Agglutinazione delle cellule K562 (S)

E' stato usato il test di agglutinazione su cellule K562 al fine di testare e screenare l'attività protettiva nei confronti del p31-43 di pDAV peptidi e pRPQ e dei peptidi ottenuti aggiungendo una spaziatura tra i residui QQ in posizione 4 e 5 del p7mer QQPQQPF (SEQ ID NO:3). Come mostrato nella tabella 1 e come previsto, p7mer non solo non esercita alcun effetto protettivo nei confronti del p31-43, ma possiede anche

attività agglutinante nei confronti delle cellule K562. Sia pDAV e RPQ prevengono l'agglutinazione indotta dal p31-43, pDAV risulta essere più attivo in tal senso rispetto a pRPQ. La tabella 1 mostra l'attività agglutinante e protettiva dei peptidi testati. I risultati sono espressi come SEM \pm S.D. della differenza (Δ) di O.D. a 600 nm a 0 e 30 minuti \times 100 dopo l'incubazione delle cellule K562(S). * $p < 0.05$. Analisi statistica tramite Wilcoxon test.

Tabella 1

	(Δ) O.D
CTRL - medium	- 10 \pm 0.9
p31-43	1.8 \pm 0.3
p7mer	1.0 \pm 0.3
p31-43 + pDAV	-12 \pm 1.9
p31-43 + pRPQ	-9.8 \pm 1.7
p31-43 + pRPQ+ pDAV	-9.5 \pm 2.1
p31-43 + p7mer	1.5 \pm 1.1
P31-43 + pGGG	-7.9 \pm 1.4
P31-43 + pW	-9.1 \pm 2.3
P31-43 + pGG	-5.2 \pm 0.5
P31-43 + pYYY	-7 \pm 2.5

Peptidi con spaziatura di 3 aa (QQPQ[X]_nQPF in cui n=3)

I due peptidi ottenuti con l'inserimento di 3 residui all'interno della sequenza aminoacidica del p7mer hanno mostrato una attività protettiva nei

confronti dell'agglutinazione delle cellule K562 indotta da p31-43, il peptide YY presenta con un'attività protettiva di poco superiore rispetto a pGGG.

Peptidi con spaziatura di 2 aa (QQPQ[X]_nQPF in cui n=2)

Il peptide pGG previene significativamente la dell'agglutinazione delle cellule K562 indotta da p31-43, anche se questa attività risulta numericamente inferiore ai peptidi con spaziatura di 3 aminoacidi.

Peptidi con spaziatura di 1 aa (QQPQ[X]_nQPF in cui n=1)

Infine, il peptide ottenuto inserendo la spaziatura di in residuo W all'interno della sequenza del p7mer ha una attività protettiva superiore alcuni dei peptidi ottenuti inserendo 2 o 3 aminoacidi tra QQ.

I peptidi RPQ e DAV down-regolano l'aumento p31-43 dipendente di ICAM-1 nelle cellule epiteliali intestinali T84

E' stata confermata l'attività protettiva di alcuni peptidi selezionati in un modello *in vitro* di epitelio intestinale, le cellule T84. Queste cellule sono una linea di adenocarcinoma umano che presentano le caratteristiche istologiche ed enzimatiche degli enterociti umani. Si tratta di un modello diffuso e validato di infiammazione celiaca. L'infiammazione epiteliale è un evento fondamentale nella cascata di eventi che porta all'attivazione immunitaria nella mucosa duodenale di celiaco, pertanto la prevenzione di questo evento potrebbe essere una strategia terapeutica

per la MC, alternativa alla dieta priva di glutine. Nel contesto di questa risposta, un evento chiave è l'aumentata espressione di ICAM-1. Come mostrato in figura 5, ICAM-1 è una molecola proinfiammatoria, coinvolta anche in alcune pathway di signalling intracellulare e di regolazione di chinasi cellulari. L'esposizione al solo p31-43 up-regola l'espressione di questa molecola infiammatoria nelle cellule T84, mentre l'incubazione simultanea di queste cellule con p31-43 e pRPQ o pDAV, rispettivamente, si traduce in un livello di ICAM-1 simile a quella delle cellule esposte al solo mezzo di coltura. Coerentemente, p7mer non esercita alcun effetto antinfiammatorio, al contrario, aumenta i livelli intracellulari di ICAM-1.

Il peptide RPQ controlla la risposta mucosale indotta da p31-43 nel duodeno di celiaco

E' stato precedentemente dimostrato che il pDAV è capace di ridurre l'attivazione delle cellule T nei pazienti celiaci (8). Per indagare ulteriormente l'effetto biologico di pDAV e pRPQ e il meccanismo responsabile di questo effetto, è stato testato se il pRPQ fosse anche efficace nel controllare la risposta immunitaria indotta dai peptidi della gliadina nell'intestino celiaco. Quindi, biopsie intestinali da pazienti celiaci sono stati incubate con 500 µg/ml di digesto PT di gliadina in presenza o assenza di 10 µg/ml di pRPQ o il p7mer o pTPO (536-547) come peptide irrilevante di controllo. pRPQ, e non i peptidi di controllo, è stato in grado di controllare l'aumento

indotto dalla gliadina delle cellule T CD25+ all'interno della lamina propria (Figura 6A), così come l'espressione di ICAM1 (Figura 6B) e HLA-DR (Figura 6C), marcatori dell'attivazione immunitaria nella mucosa (18).

Inoltre, per valutare se la pRPQ ha un'attività inibitoria sulla risposta immune innata precoce precedentemente descritta (4, 5), biopsie di celiaci sono state incubate con p31-43 (20 µg/ml) con o senza il peptide pRPQ (10 µg/ml). La figura 7 mostra che pRPQ previene l'aumento dei parametri della risposta innata, come la fosforilazione di p42/44 indotta dal p31-43 (Figura 7A e B). Questi risultati indicano che pRPQ è in grado di interferire con la risposta innata precoce indotta dall'esposizione con gliadina. L'aumento dell'attività e della funzione di TG2 è una caratteristica dell'infiammazione celiaca (4) che promuove l'attivazione delle risposte immuni adattabili ed è una caratteristica chiave della attivazione precoce mucosale all'esposizione con gliadina. Quindi è stata testata la capacità del pRPQ di modulare l'attività di TG2 nelle biopsie intestinali di celiaci. L'incubazione con p31-43 induce una drammatica up-regolazione dell'attività di TG2 nelle biopsie celiache, mentre tale l'up-regolazione viene completamente inibita in seguito a co-incubazione con il pRPQ (Figura 8). Il peptide di controllo TPO è risultato essere privo di qualsiasi effetto protettivo contro l'attivazione indotta da gliadina o p31-43 mentre pRPQ è privo di attività stimolatoria l'immunità

mucosale in biopsie duodenali sia di soggetti celiaci sia di controlli sani (dati non mostrati).

BIBLIOGRAFIA

1. Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid LM. 2005. Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2005; 19: 373-87.
2. Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet.* 2003; 362: 383-91.
3. Jabri, B, Kasarda DD, Green PH. Innate and adaptive immunity: the yin and yang of celiac disease. *Immunol. Rev.* 2005; 206: 219-31.
4. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet.* 200; 362:30-7.
5. Luciani A, Vilella VR, Vasaturo A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, Guido S, Cexus ON, Peake N, Londei M, Quarantino S, Maiuri L. Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPARgamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut.* 2010; 59:311-9
6. De Vincenzi M, Gasbarrini G, Silano V. A small peptide from durum wheat gliadin prevents cell agglutination induced by prolamins-peptides toxic in coeliac disease. *Toxicology.* 1997; 120:207-13.

7. Silano M, Di Benedetto R, Trecca A, Arrabito G, Leonardi F, De Vincenzi M. A decapeptide from durum wheat prevents celiac peripheral blood lymphocytes from activation by gliadin peptides. *Pediatr Res.* 2007; 61 :67-71.
8. Silano M, Di Benedetto R, Maialetti F, De Vincenzi A, Calcaterra R, Trecca A, De Vincenzi M. A 10-residue peptide from durum wheat promotes a shift from a Th1-type response toward a Th2-type response in celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87: 415-23.
9. Silano M, Leonardi F, Trecca A, Mancini E, Di Benedetto R, De Vincenzi M. Prevention by a decapeptide from durum wheat of in vitro gliadin peptide-induced apoptosis in small-bowel mucosa from celiac patients. *Scand J Gastroenterol.* 2007; 42: 786-7.
10. De Vincenzi M, Stammati A, Luchetti R, Silano M, Gasbarrini G, Silano V. Structural specificities and significance for celiac disease of wheat gliadin peptides able to agglutinate or to prevent agglutination of K562(S) cells. *Toxicology.* 1998; 127: 97-106.
11. Silano M, Vincentini O, De Vincenzi M. Toxic, immunostimulatory and antagonist gluten peptides in celiac disease. *Curr Med Chem.* 2009;16:1489-98.
12. Hassani, M.E., Shariflou, M.R., Gianibelli, M.C., Sharp, P.J., Characterisation of a ω -gliadin gene in *Triticum tauschii*. *Journal of Cereal Science* 2008; 47: 59-67.

13. Hsia, C.C., Anderson, O.D., 2001. Isolation and characterization of wheat ω -gliadin genes. 2001; 103: 37-44.
14. Hull, G.A., Halford, N.G., Kreis, M., Shewry, P.R.. Isolation and characterization of genes encoding rye prolamins containing a highly repetitive sequence motif. Plant Molecular Biology 1991; 17: 1111-5.
15. Clarke, B.C., Mukai, Y., Appels, R. The *Sec-1* locus on the short arm of chromosome 1R of rye (*Secale cereale*). Chromosome 1996; 105 : 269-275.
16. Clarke, B.C., Apples, R.. Sequence variation at the *Sec-1* locus of rye, *Secale cereale* (*Poaceae*). Plant Systematics and Evolution 1991; 214: 1-14.
17. Kasarda, D.D., Autran, J.C., Lew, E.J.L., Nimmo, C.C., Shewry, P.R.. N-terminal amino acid sequences of ω -gliadins and ω -secalins. Implications for the evolution of prolamins genes. Biochimica et Biophysica Acta 1983; 747: 138-150.
18. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. Gastroenterology. 2000; 119:996-1006.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RIVENDICAZIONI

- 1) Peptide consistente nella seguente sequenza:
QQPQ[X]_nQPF (SEQ ID No: 4)
in cui X è un qualsiasi amminoacido;
n è un numero intero uguale o maggiore di 1, gli amminoacidi X essendo uguali o diversi tra loro quando n è maggiore di 1, a condizione che [X]_n sia diverso da DAV.
- 2) Peptide secondo la rivendicazione 1 in cui [X]_n è RPQ, W, GGG, YYY, GG, preferibilmente RPQ.
- 3) Sequenza nucleotidica che codifica per il peptide come definito in ognuna delle rivendicazioni 1-2.
- 4) Vettore comprendente la sequenza nucleotidica come definita nella rivendicazione 3.
- 5) Microrganismi o probiotici comprendenti il vettore come definito nella rivendicazione 4.
- 6) Uso dei microrganismi o probiotici come definiti nella rivendicazione 5 per la preparazione di prodotti alimentari per celiaci.
- 7) Composizione farmaceutica comprendente il o consistente in almeno un peptide come definito in ognuna della rivendicazioni 1-2 o una sequenza nucleotidica come definita nella rivendicazione 3 o un vettore come definito nella rivendicazione 4, come principio attivo, in associazione con uno o più eccipienti e/o coadiuvanti farmaceuticamente accettabili.
- 8) Peptide comprendente o consistente nella seguente sequenza:
QQPQ[X]_nQPF (SEQ ID No: 4)

in cui X è un qualsiasi amminoacido;
n è un numero intero uguale o maggiore di 1, gli amminoacidi X essendo uguali o diversi tra loro quando n è maggiore di 1, a condizione che $[X]_n$ sia diverso da DAV, o composizione farmaceutica comprendente il o consistente in almeno detto peptide, o una sequenza nucleotidica che codifica per detto peptide o un vettore comprendente detta sequenza nucleotidica, come principio attivo, in associazione con uno o più eccipienti e/o coadiuvanti farmaceuticamente accettabili, detti peptide o composizione per l'uso come inibitore della tossicità del peptide dall'amminoacido 13 all'amminoacido 31-43 della gliadina in pazienti celiaci o in soggetti ad alto rischio di sviluppare malattia celiaca.

9) Peptide o composizione farmaceutica come definiti nella rivendicazione 8 per l'uso come definito nella rivendicazione 8, in cui $[X]_n$ è RPQ, W, GGG, YYY, GG, preferibilmente RPQ.

10) Peptide o composizione farmaceutica come definiti in ognuna delle rivendicazioni 8-9 per l'uso come definito in ognuna delle rivendicazioni 8-9, in cui detto peptide o detta composizione farmaceutica sono somministrati per via orale o intranasale.

11) Peptide o composizione farmaceutica come definiti in ognuna delle rivendicazioni 8-9 per l'uso come definito in ognuna delle rivendicazioni 8-10, in cui detto peptide o detta composizione farmaceutica sono somministrati prima dei pasti.

- 12) Uso di varietà di piante che esprimono naturalmente il peptide SEQ ID NO: 2 per la preparazione di prodotti alimentari per celiaci.
- 13) Uso secondo la rivendicazione 12, in cui dette varietà di piante sono scelte tra grano, orzo, segale, avena.
- 14) Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 12-13, in cui dette varietà sono *Secale cereale* e frumento tenero *Kavzak*.
- 15) Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 12-13 in cui dette varietà sono varietà di grano portatrici della traslocazione 1BL/1RS dalla segale.
- 16) Uso secondo la rivendicazione 15, in cui dette varietà sono scelte tra *Triticum aestivum 1R/1S*, *Barra*, *Carisma*, *Colledoro*, *Collerosso*, *Dorico*, *Geppetto*, *Geronimo*, *Marvao*, *Sibilla*, *Sirmione*.
- 17) Piante transgeniche esprimenti un peptide come definito in ognuna delle rivendicazioni 1-2 o 8.
- 18) Piante transgeniche secondo la rivendicazione
- 19) 17 scelte tra grano, orzo, segale, avena.
- 20) Uso di piante transgeniche come definite in ognuna delle rivendicazioni 17-18 per la preparazione di prodotti alimentari per celiaci.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

CLAIMS

1) Peptide comprising or consisting of the following sequence:

QQPQ[X]_nQPF (SEQ ID No: 4)

wherein X is any amino acid;

n is an integer equal or higher than 1, the amino acids X being equal or different each other when n is higher than 1, with the proviso that [X]_n is different from DAV.

2) Peptide according to claim 1, wherein [X]_n is RPQ, W, GGG, YYY or GG, preferably RPQ.

3) Nucleotide sequence codifying the peptide as defined in anyone of the claims 1-2.

4) Vector comprising the nucleotide sequence as defined in claim 3.

5) Microorganisms or probiotics comprising the vector as defined in claim 4.

6) Use of microorganisms or probiotics as defined in claim 5 for the preparation of food products for celiac people.

7) Pharmaceutical composition comprising or consisting of at least one peptide as defined in anyone of the claims 1-2 or nucleotide sequence as defined in claim 3 or vector as defined in claim 4, as active principle, in association with one or more excipients and/or adjuvants pharmaceutically acceptable.

8) Peptide as defined in anyone of the claims 1-2 or pharmaceutical composition as defined in claim 7 for use as inhibitor of the toxicity of gliadin peptide from amino acid 13 to 31-43 in celiac patients or in

subjects having high risk to develop celiac disease.

9) Peptide as defined in anyone of the claims 1-2 or pharmaceutical composition as defined in claim 7 for use as defined in claim 8, wherein said peptide or said pharmaceutical composition is administered by oral or intranasal route.

10) Peptide as defined in anyone of the claims 1-2 or pharmaceutical composition as defined in claim 7 for use as defined in claim 8, wherein said peptide or said pharmaceutical composition is administered before meal.

11) Use of plant varieties naturally expressing SEQ ID NO: 2 for the preparation of food products for celiac people.

12) Use according to claim 11, wherein said plant varieties are chosen among wheat, barley, rye, oats.

13) Use according to anyone of claims 11-12, wherein said varieties are *Secale cereale* and *Kavzak* soft wheat.

14) Use according to anyone of the 11-12, wherein said varieties are wheat varieties with 1BL/1RS translocation from *Secale*.

15) Use according to claim 14, wherein said varieties are chosen among *Triticum aestivum* 1R/1S, *Barra*, *Carisma*, *Colledoro*, *Collerosso*, *Dorico*, *Geppetto*, *Geronimo*, *Marvao*, *Sibilla*, *Sirmione*.

16) Transgenic plants expressing a peptide as defined in anyone of the claims 1-2.

17) Transgenic plants according to claim 16 chosen among wheat, barley, rye, oats.

18) Use of transgenic plants as defined in anyone of

claims 16-17 for the preparation of food products for celiac people.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Fig. 1.

X60294	MKTFLIFVL-AMTMSIITARQLNPSEQELQSPQQ	-----PVPKE----QSY-PQQPY 47
X60295	MKTFLIFVL-AMTMSIITARQLNPSEQELQSPQQ	-----PVPKE----QSY-PQQPY 47
AF000227	MKTFLIFVL-AMTMSIITARQLNPSEQELQSPQQ	-----PVPKE----QSY-PQQPY 47
AAT74547	MKTFLIFVLLAMAMKIATAARELNPSNKELOSPQQ	SFSHQQQPFPQQPYQQPYPSQQPY 60
AAG17702	MKTFLIFVLLAMAMKIATAARELNPSNKELOSPQQ	SFSYQQQPFPQQPYQQPYPSQQPY 60
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * *	* * * * * * * * * * * * * * * * *
X60294	PSHQPFPTPQQYSPYQPQQPFPQPQQPTPIQPQQP	FPQRPOQP---FPQPQQQLPLQPQQ 104
X60295	PSHQPFPTPQQYSPYQPQQPFPQPQQPAPIQPQQP	FPQQPOQP---FPQPQQQLPLQPQQ 104
AF000227	PSHQPFPTPQQYSPYQPQQPFPQPQQPTPIQPQQP	FPQQPOQP---FSQPQQQLPLQPQQ 104
AAT74547	PSQQPFPTPQQQFQQSQPFTQPPQPTPLQPQQP	FPQQPQQPQQPFPQQPFPQPPWQPQQ 120
AAG17702	PSQQPFPTPQQQFPEQSQPFTQPPQPTPIQPQQP	FPQQPQQPQQPFPQQPFPQPPWQPQQ 120
	** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *	*** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *
X60294	SFPQPQHPIPQQPQQSFQQPQRPEQQ---FPQQ	PQQIIPQQTQQPFLQPQQPFPQQP 160
X60295	PFPPQQPIPQQPQQSFQQPQRPEQQ---FPQQ	PQQIIPQQTQQPFLQPQQPFPQQP 160
AF000227	PFPPQQPIPQQPQQSFQQPQRPEQQ---FPQQ	PQQIIPQQTQQPFLQPQQPFPQQP 160
AAT74547	PFPPQQSFPLQPQQPFPQQPQQPFPQPLFPQQ	SEQVIPQQPQQPFLQPQQPFPQQP 180
AAG17702	PFPPQQSFPLQPQQPFPQQPQQPFPQPLFPQQ	SEQIIPQQPQQPFLQPQQPFPQQP 180
	*** * * * * * * * * * * * * * * * * *	* * * * * * * * * * * * * * * * *
X60294	QRPFAQ--QPEQIISQQPFLQPQQ---PFSQPQQ	PFPPQQPGQIIPQQPQQPSPLQPQQP 215
X60295	QRSFAQ--QPKQIISQQPFLQPQQ---PFSQPQQ	PFPPQQPGQIIPQQPQQPSPLQPQQP 215
AF000227	QRPFAQ--QPEQIISQQPFLQPQQ---PFSQPQQ	PFPPQQPEQIIPQQPQQPSPLQPQQP 215
AAT74547	QQPFPQQPIPVQPQQSFQQSQSQSQPFAQPQQ	LFP-ELQQPIPQQPQQPFLQPQQP 239
AAG17702	QQPFPQQPIPVQPQQSFQQSQSQSQPFAQPQQ	LFP-ELQQPIPQQPQQPFLQPQQP 239
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	** * * * * * * * * * * * * * * * *
X60294	FSQQPQRFQQPQQPQQIIPQQPQQPFLQPQQP	VPQQPQRPFQQQPEQIISQRPQQPF 275
X60295	FSQQPQRFQQPQQPQQIIPQQPQQPFLQPQQP	VPQQPQRPFQQQPEQIISQRPQQPF 275
AF000227	FSQQPQRFQQPQQPQQIIPQQPQQPFLQPQQP	VPQQPQRPFQQQPEQIISQRPQQPF 275
AAT74547	FPQQ---PQQPFPQQPQQSFQQPQQPYP-QQQS	FPQQPQQPFPPTTTKPFPPQQPQQPF 295
AAG17702	FPQQ---PQQPFPQQPQQSFQQPQQPYP-QQQ--	----- 268
	* ** ***** * * * * * * * * * * * * *	
X60294	PLQPQQPFSQ-----PQQPFPQQP	GQIIPQQPQQPFLQPQQPFPQQPE 319
X60295	PLQPQQPFSQ-----PQQPLPQQP	GQIIPQQPQQPFLQPQQPFPQQSE 319
AF000227	LLQPQQPFSQ-----PQQPFLQQP	GQIIPQQPQQPFLQPQQPFPQQPE 319
AAT74547	PLRPQQPFPQQPQQSQSQSFLQPQQPQQPSILQP	QQPLPQQPQQPFP-QQPQQQLSQQPE 354
AAG17702	-----	-----
X60294	QIISQQPQQPFLQPQQPSPQQPQ-LPFPQPQQPF	VVVV 357
X60295	QIIPQQPQQPFLQPQQPSPQQPQ-LPFPQPQQPF	VVVV 357
AF000227	QIISEPQQPFLQPQQPSPQQPQ-LPFPQPQQPF	VVVV 357
AAT74547	QTISQQPQQPFPQQPHQPQQPYPQQQPYGSSLTSI	GGQ- 392
AAG17702	-----PYGSSLTSI	GGQ- 280

Fig. 2.

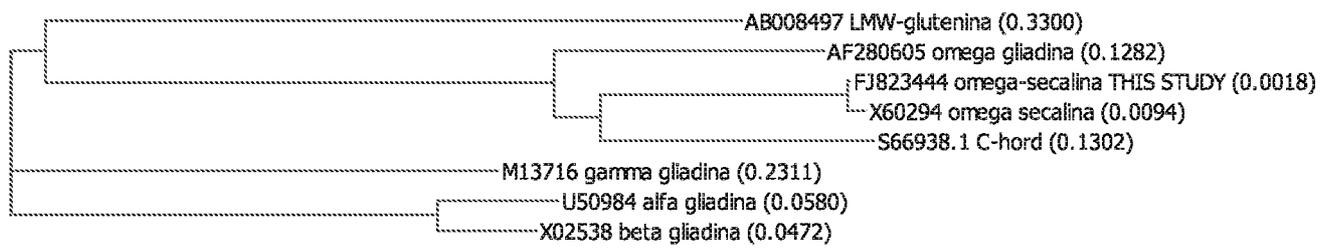


Fig. 4.

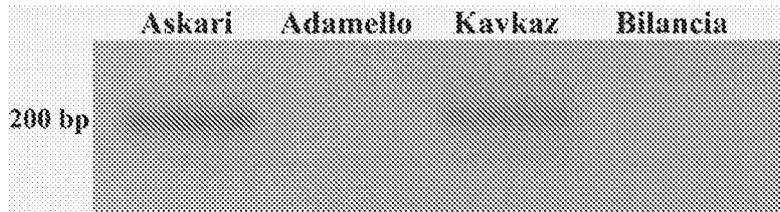
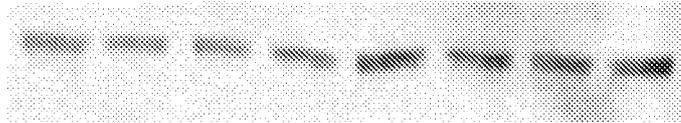


Fig. 5.

A



B

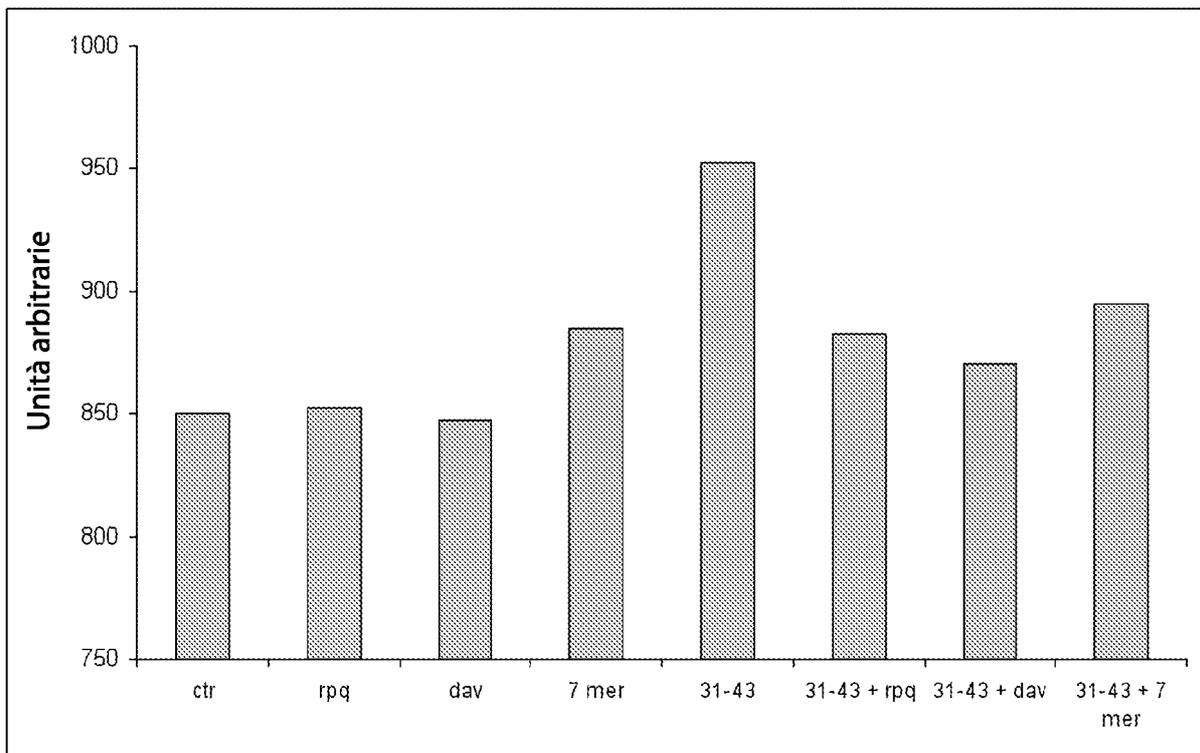
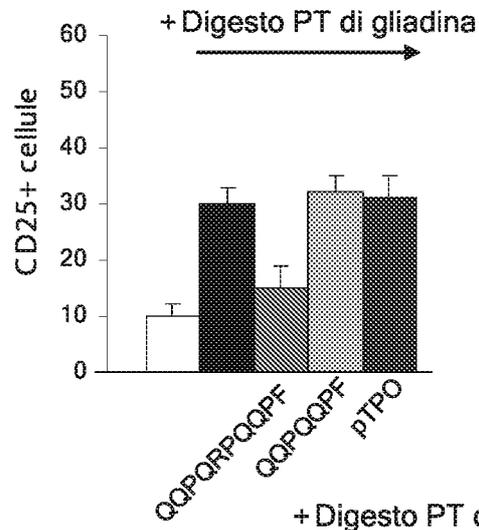
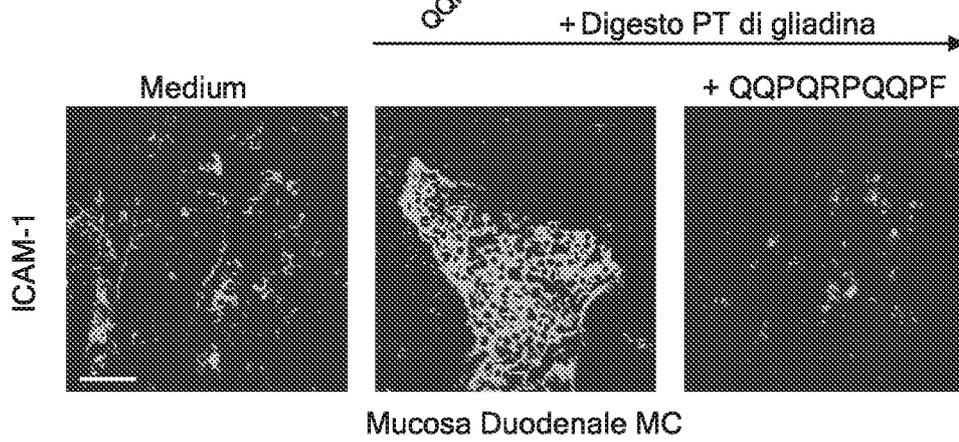


Fig. 6

A



B



C

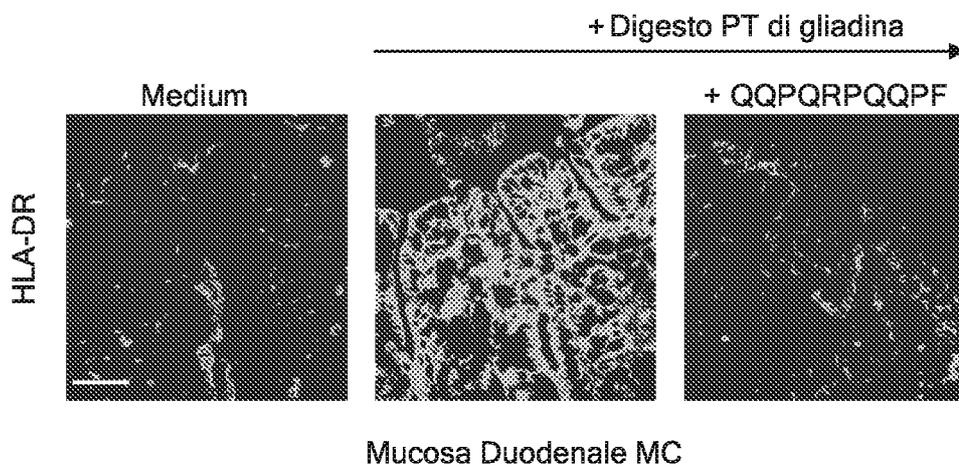


Fig.8

