Gluten binden und spalten – zwei neue adjuvante Therapieansätze für die Zöliakie

Simon Matoori, Gregor Fuhrmann, Jessica D. Schulz und Jean-Christophe Leroux
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Departement Chemie und Angewandte Biowissenschaften, ETH Zürich

Hintergrund

Zöliakie ist eine glutenbedingte chronische Enteropathie, die genetisch prädisponierte Personen betrifft und durch Veränderungen der Dünndarmschleimhaut sowie die Bildung von Autoantikörpern charakterisiert ist. Gluten ist als Kleberprotein vieler Getreidesorten (Weizen, Roggen, Gerste) omnipräsent in der westlichen Ernährung. Im Verdauungstrakt wird Gluten nicht vollständig abgebaut, da es durch die vielen Prolin- und Glutamineinheiten in seiner Aminosäurensequenz gegen menschliche Verdauungsenzyme resistent ist. Nach unvollständiger Verdauung passieren Glutenfragmente die Dünndarmwand und induzieren in Menschen mit Zöliakie eine Autoimmunantwort gegen die Dünndarmmukosa [1].

Patienten mit symptomatischer Zöliakie reagieren bereits auf kleine Glutenmengen mit gastrointestinalen (Diarrhöe, abdominale Schmerzen, Malabsorption) oder diversen extraintestinalen Symptomen (Anämie, Osteoporose, Depressionen, Dermatitis herpetiformis) [2, 3]. Asymptomatische Zöliakiepatienten zeigen keine Symptome, aber histologische Veränderungen im Dünndarm [2]. Eine neue Metastudie über die Langzeitfolgen der Zöliakie zeigte ein erhöhtes Krebsrisiko und eine generell höhere Sterblichkeit von Zöliakiepatienten [4].

Laut den Leitlinien der *British Society of Gastroenterology* müssen für eine positive Zöliakiediagnose sowohl zöliakiespezifische Antikörper (mittels hochspezifischen und hochsensitiven Tests) nachgewiesen werden, und zusätzlich müssen histologische Merkmale der Zöliakie (Entzündung der intestinalen Schleimhaut, Kryptenhyperplasie und villöse Atrophie) mit Hilfe einer Dünndarmbiopsie bestätigt werden (Stand: Juli 2012). Mit einer Prävalenz von ca. 1% ist die Zöliakie in der Schweiz sehr verbreitet [5].

Da es bisher keine pharmakologische Therapie gibt, bleibt Menschen mit Zöliakie nur der vollständige Verzicht auf Gluten. Oftmals erweist sich eine glutenfreie Ernährung jedoch als schwierig, weil Gluten nicht nur in Brot und Teigwaren, sondern auch als Zutat in vielen verarbeiteten Lebensmitteln verwendet wird (z.B. zum Binden von Suppen und Saucen). Zudem können von Natur aus glutenfreie Nahrungsmittel (z.B. Hirseflocken) verarbeitungsbedingt Kontaminationen enthalten. Für viele Zöliakiebetroffene ist eine glutenfreie Ernährung mit bedeutenden Mehrkosten (200 CHF pro Monat laut IG Zöliakie der Deutschschweiz) und einer verschlechterten Lebensqualität verbunden, die sich besonders auf das Auswärtsessen, Reisen, Familien- und Arbeitsleben auswirkt [6]. Ein knappes Fünftel der Schweizer Zöliakiebetroffenen ernährt sich nicht vollständig glutenfrei; unter den Jugendlichen (15–18 Jahre) ist es sogar fast ein Drittel [7]. Die daraus entstehenden Komplikationen sind mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert [1].

Simon Matoori

J.-C. Leroux ist der Erfinder und Patentinhaber vom Polymer P(HEMA-*co*-SS), das von der Université de Montréal an BioLineRx lizenziert wurde. J.-C. Leroux hat einen wissenschaftlichen Beratungsvertrag mit BioLineRx.

Zielsetzung und Hypothese

Für Personen, die sich glutenfrei ernähren müssen, wäre es äusserst vorteilhaft, wenn kleine Glutenmengen sicher eingenommen werden könnten (z.B. bei Restaurantbesuchen oder auf Reisen). Dazu erforschen wir zwei adjuvante Therapieansätze: die polymervermittelte Bindung und den enzymatischen Abbau von Gluten. Würden diese glutendetoxifizierenden Substanzen gleichzeitig mit potenziell glutenhaltigen Speisen eingenommen, fiele die Autoimmunreaktion schwächer aus oder im Idealfall ganz weg.

Methodik und wichtigste Ergebnisse

Glutenbindende Polymere

Mit Poly(hydroxyethylmethacrylat-*co*-styrolsulfonat) [P(HEMA-*co*-SS)] haben wir ein Polymer entwickelt, das gezielt an Gluten und Glutenspaltprodukte bindet und Aggregate bildet, die mit den Fäzes eliminiert werden [8, 9]. Nach *In-vitro*-Inkubation von Gluten mit Verdauungsenzymen und P(HEMA-*co*-SS) konnte mittels Flüssigkeitschromatographie resp. Massenspektrometrie gezeigt werden, dass sich die Bildung von Glutenabbauprodukten mit bekanntem immunogenem Potential in Anwesenheit des Polymers um bis zu 80% verringert hatte. Ausserdem wurde die Durchlässigkeit des Darmepithels, die von Gluten allein erhöht wird, in einem zöliakieähnlichen Mausmodell durch Polymergabe normalisiert. Auch pathologische Veränderungen in der Morphologie des Mausdarmepithels, die nach chronischer Glutenexposition auftreten, gingen zurück, wenn vor der Glutengabe P(HEMA-*co*-SS) verabreicht worden war. Bei der Untersuchung von Dünndarmbiopsieproben von Zöliakiepatienten wurde festgestellt, dass Gluten in Kombination mit P(HEMA-*co*-SS) im Gegensatz zu Gluten allein keine detektierbare Freisetzung des Entzündungsmediators TNF-α, der in der Pathogenese der Zöliakie wichtig ist, induziert. Ausserdem zeigten Maus- und Rattenexperimente, dass die systemische Verfügbarkeit von P(HEMA-*co*-SS) sehr tief ist. Das Polymer bleibt also hauptsächlich im Darm, weshalb mit entsprechend wenigen systemischen Nebenwirkungen zu rechnen ist. Diese Experimente demonstrieren, dass

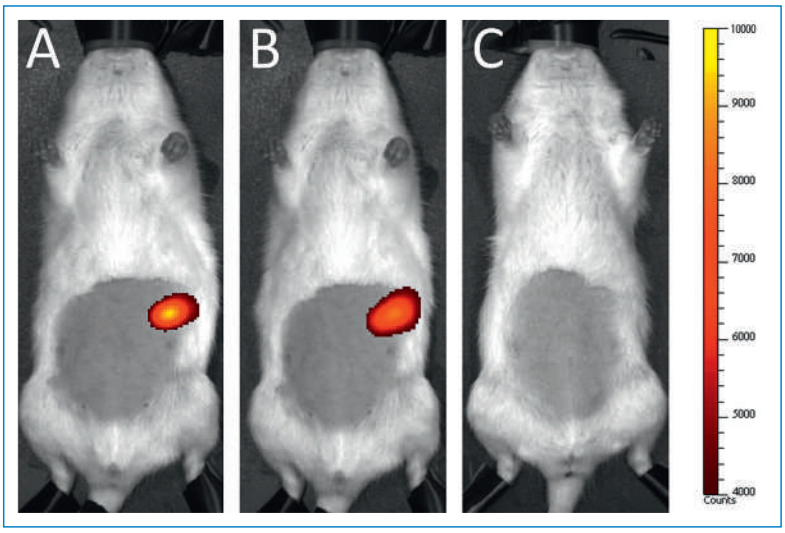

Abbildung 1
In der Ratte wurde die Spaltung markierter Glutenfragmente durch PEPs mittels Fluoreszenz in Echtzeit verfolgt. Das *in vitro* vorgespaltene Peptid zeigt das höchste Signal **(A)**. FM PEP spaltet das Peptid im Magen **(B)**, MX PEP ist hingegen inaktiv **(C)**. Adaptiert nach [10].

P(HEMA-*co*-SS) bei gleichzeitiger nicht-systemischer Wirkung die Schleimhauttoxizität von Gluten stark reduziert [9].

Glutenspaltende Enzyme

Eine weitere Methode zur Detoxifizierung von Gluten ist die orale Administration von exogenen Enzymen, sogenannten Prolylendopeptidasen (PEPs), die Gluten vollständig abbauen können. Bei unseren Untersuchungen konzentrieren wir uns auf drei bakterielle Vertreter dieser Gruppe: FM-PEP *(Flavobacterium meningosepticum)*, MX-PEP *(Myxococcus xanthus)* und SC-PEP *(Sphingomonas capsulata)*. Gluten ist aufgrund seiner hohen Zahl an Prolineinheiten ein bevorzugtes Substrat dieser Enzyme. Die orale Verabreichung von Enzymen birgt jedoch ein grosses Problem: Als Proteine können sie unter den widrigen Bedingungen des Gastrointestinaltrakts (Verdauungsenzyme, niedrige pH-Werte) rasch inaktiviert werden.
Um die PEPs *in vivo* zu evaluieren, entwickelten wir eine Methode, die es erlaubt, die Enzyme aufgrund ihrer katalytischen Funktion im Verdauungstrakt lebender Tiere in Echtzeit zu verfolgen. Ein glutenähnliches Peptid wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem -quencher so markiert, dass kein Signal erzeugt wird, solange das Peptid intakt ist. Wird es jedoch von den PEPs gespalten, entsteht ein mittels Fluoreszenz detektierbares Signal.
Durch eine Schlundsonde wurde Ratten markiertes Glutenpeptid mit FM oder MX-PEP verabreicht; die entstandenen Signale wurden mit demjenigen eines bereits *in vitro* gespaltenen Peptids verglichen. Nach einer Stunde zeigte FM-PEP eine signifikante Aktivität im Magen, MX war hingegen inaktiv. Im Dünndarm erlangte MX-PEP seine katalytische Funktion zurück und erzeugte ein ähnlich hohes Signal wie FM-PEP (Abb. 1 📷). Da die immunogene Wirkung im ersten Abschnitt des Dünndarms einsetzt, wäre es jedoch vorteilhaft, wenn möglichst viele Glutenpeptide bereits im Magen verdaut würden. Das im Magen inaktive MX-PEP wurde deshalb mit dem Antazidum Magaldrat (Riopan®) kombiniert. Der daraufhin beobachtete Anstieg der Enzymaktivität im Magen hing vermutlich mit dem erhöhten Magen-pH und/oder der Hemmung gastrischer Proteasen zusammen. Damit zeigten wir, dass die Aktivität oral verabreichter Enzyme durch Modifikation der gastrointestinalen Umgebung beeinflusst werden kann. Solche Erkenntnisse können nützlich sein, wenn die Aktivität oral verabreichter Enzyme verbessert werden soll. Zudem gelang es uns mit diesen Versuchen, eine fluoreszenzbasierte Methode zur Evaluation der katalytischen Fähigkeit von PEPs *in vivo* und in Echtzeit zu etablieren [10].

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die gleichzeitige Einnahme von glutendetoxifizierenden Agentien mit glutenhaltigen Speisen verspricht, die Lebensqualität von Zöliakiebetroffenen zu erhöhen. Das Polymer P(HEMA-*co*-SS) bindet Gluten und bildet mit den Fäzes ausscheidbare Aggregate, wodurch die Entstehung immunogener Peptide verhindert werden kann [8, 9]. Vor zwei Jahren wurde P(HEMA-*co*-SS) an BioLineRx lizenziert, wo es zurzeit unter dem Namen BL-7010 in präklinischen Studien untersucht wird.
Exogene Enzyme aus bakteriellen Quellen haben die Fähigkeit, toxisches Gluten abzubauen. Mit unserer fluoreszenzbasierten Methode kann deren Funktion in Echtzeit im lebenden Tier bestimmt werden [10]. SC-PEP wird bereits als Komponente einer Enzymmischung namens ALV003 von Alvine Pharmaceuticals in klinischen Studien untersucht; hinsichtlich einer Verbesserung gastrointestinaler Symptome konnte jedoch keine statistisch signifikante Überlegenheit von ALV003 gegenüber Plazebo erreicht werden [11]. Möglicherweise hängt dies mit der leichten Inaktivierbarkeit der Enzyme im Verdauungstrakt zusammen, weshalb wir derzeit verschiedene stabilisierende Modifikationen an den PEPs vornehmen und diese mit unserer *In-vivo*-Methode optimieren.

Dank
Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds und der IG Zöliakie der Deutschen Schweiz für die finanzielle Unterstützung. Für hilfreiche Kommentare danken wir Meltem Kutlar Joss, Barbara Oneta und Anita Dimas. Forschungs-Grant-Nr.: 310030_135732

Korrespondenz:
Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux
Departement Chemie und Angewandte Biowissenschaften
ETH Zürich
Wolfgang-Pauli-Strasse 10
CH-8093 Zürich
jean-christophe.leroux[at]pharma.ethz.ch

Empfohlene Literatur

– Pinier M, Fuhrmann G, Verdu EF, Leroux JC. Prevention Measures and Exploratory Pharmacological Treatments of Celiac Disease. American Journal of Gastroenterology. 2010;105(12):2551–61.
– Pinier M, Fuhrmann G, Galipeau HJ, Rivard N, Murray A, David CS, et al. The Copolymer P(HEMA-co-SS) Binds Gluten and Reduces Immune Response in Gluten-Sensitized Mice and Human Tissues. Gastroenterology. 2012;142(2):316–25.e12.
– Fuhrmann G, Leroux JC. In vivo fluorescence imaging of exogenous enzyme activity in the gastrointestinal tract. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011;108(22):9032–7.

Die vollständige nummerierte Literaturliste finden Sie unter www.medicalforum.ch.