



ineo Pharma GmbH

Fachinformation GluteoStop

Aktueller Stand der Wissenschaft zum AN-PEP Enzym

Dr. Marc Schneider

14. August 2018

CHRISANA www.chrisana.ch - info@chrisana.ch

Inhaltsverzeichnis

Zweckbestimmung	3
Aktivstoff	3
Hintergrund	3
Enzyme, die Gluten spalten können.....	5
Aspergillus Niger Prolylendopeptidase (AN-PEP).....	5
Aspergillus Niger Prolylendopeptidase widersteht den sauren Bedingungen im Magen und bleibt selbst im Gastrointestinal Trakt aktiv.....	6
Aspergillus Niger Prolylendopeptidase spaltet Gluten	7
AN-PEP spaltet Gluten spezifisch nach der Aminosäure Prolin	7
AN-PEP spaltet schnell Gluten.....	8
AN-PEP Enzym verhindert T-Zellen Stimulation durch Gluten-Peptide	9
AN-PEP Enzym in klinischen Studien	10
Andere Enzyme, die vermeintlich Gluten abbauen können z.B. DPP-IV	11
Zusammenfassung.....	13
Literaturstellen	14

Zweckbestimmung

GluteoStop® ist ein Nahrungsergänzungsmittel und ausschließlich dazu bestimmt, den Abbau von Gluten in einer glutenarmen Ernährung funktionell zu unterstützen. GluteoStop® kann keine glutenfreie Ernährung ersetzen und ist nicht zur Behandlung oder Vorbeugung einer Zöliakie, Weizenallergie oder Glutenhypersensitivität vorgesehen.

GluteoStop® enthält ein spezielles Verdauungsenzym, die Prolyl oligopeptidase (AN-PEP), welche die Aminosäureketten (Peptide) im Gluten spaltet. Auf diese Weise kann Gluten in kleine Bruchstücke abgebaut werden. GluteoStop® ist also für alle ideal, die sich glutenfrei ernähren und verhindern wollen, dass durch Glutenspuren oder „verstecktes Gluten“ in Nahrungsmitteln Beschwerden verursacht werden. Studien zeigen, dass selbst bei einer vermeintlich glutenfreien Diät die unbeabsichtigte Glutenzufuhr von 200 mg bis 3000 mg pro Tag betragen kann.

Aktivstoff

Der in GluteoStop® verwendete Aktivstoff ist ein natürliches Enzym, eine sogenannte Aspergillus Niger Prolylendopeptidase (AN-PEP) und ist ein für die Aminosäure Prolin spezifisches Verdauungsenzym. Dieses spezielle Enzym wurde so entwickelt, dass es unter den sauren Bedingungen unseres Magens seine optimale Wirkung erzielt.

Hintergrund

Gluten ist ein Nahrungsprotein, das in Lebensmitteln insbesondere aus Weizen, Gerste und Roggen vorkommt. Diese Nahrungsmittel sind für viele Menschen die Ernährungsgrundlage. Andere Getreideprodukte wie z.B. aus Hafer, können auch kleine Mengen von Gluten enthalten, wenn sie während der Verarbeitung durch Kreuzkontamination verunreinigt werden.¹ Es gibt auch viele andere potentielle Glutenquellen (Tabelle 1).

Weizen-Gluten ist ein Protein-Gemisch und besteht etwa zu gleichen Teilen aus den „Gliadinen“ (Prolaminfraktion) und „Gluteninen“ (Glutelinfraktion).² Gliadine und Glutenine bestehen wiederum aus mehreren Subtypen (α , β , γ , Ω -Gliadine und „low molecular weight“/„high molecular weight“-Glutenine). Leider sind die Gluten-Proteine für die Verdauungsenzyme im menschlichen Gastrointestinaltrakt aufgrund der ungewöhnlich hohen Menge der Aminosäure Prolin nur schwer zu verdauen, selbst für gesunde Individuen.²⁻⁴ Viele Verbraucher meiden Weizen und Gluten aufgrund eines breiten Spektrums von Gesundheitsproblemen, einschließlich der Weizenallergie, Intoleranz gegenüber Gluten wie Zöliakie (Coeliac Disease - CD) und Gluten- oder Weizensensitivität (sogenannte Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität / Non Celiac Gluten Sensitivity (NCGS)).⁵

Tabelle 1: Glutenquellen sind allgegenwärtig (in Anlehnung an die Homepage der Deutschen Zöliakie Gesellschaft)¹⁸

Gluten Quellen	Typische glutenhaltige Lebensmittel	Lebensmittel die Gluten enthalten können	Andere Konsumgüter, die Gluten enthalten können
- Weizen, Roggen, Gerste, Triticum (Hartweizen und Gerste), handelsüblicher Hafer, Durum, Grünkern, Dinkel, Einkorn, Urkorn, Rotkorn, Emmer, Kamut® (Khorasan-Weizen) Triticale (Weizen / Roggen-Hybrid), sowie Ur-Sorten und Weizenderivate: -Tempurmehl -Sago aus Gerste und Weizen -Udonnudeln sowie Somennudeln aus Weizen -Taboilé (aus Bulgur oder Couscous) -Kritharaki (griechische Reismudeln aus Weizen) -Panko (japanisches Paniermehl) - Graupen (aus Gerste) - Weizenstärke	Pasta / Nudeln Brot und Gebäck Cracker / Kekse Backwaren Cerealien und Granola- Müsli Pancakes, Waffeln, Pfannkuchen Croutons Paniertes Fleisch / Fisch Paniertes Gemüse Paniertes Käse (Back-Camentbert) Frikadellen Soßen und Bratensoßen -> oft werde Mehle als Verdickungsmittel verwendet Sojasauce, mit einer Mehlschwitze hergestellte Sahnesaucen Weizen-Tortillas Malz-haltige Produkte Bier Getreidekaffee (Muckefuck)	Cornflakes, Polenta, Couscous Pommes frites (behandelt) Kartoffel-Erzeugnisse (Püree, Kroketten, Gnocchi, Klossteig, Reibekuchen, Schupfnudeln Rösti) Kartoffelchips (gewürzt) Energieriegel / Müsliriegel Verarbeitete Fleischgerichte Süßigkeiten, Schokoriegel und Pfefferminzbonbons Fertig-Suppen mit Mehl als Verdickungsmittel Light-Produkte Mehrkorn Tortilla-Chips oder Tortillas Salatdressings / Marinaden Stärke oder Dextrin Fleischersatzstoffe (Seitan, vegetarische Burger, etc.) Sojasauce	Lippenstift und andere Kosmetika Lipgloss und Lippenbalsam Körperpflegeprodukte Kommunionswaffeln Vitaminpräparate Nahrungsergänzungsmittel Medizinprodukte Arzneimittel Kunst und Bastelbedarf - Modelliermasse - Klebstoff

Zöliakie ist eine Autoimmunerkrankung, die durch eine unangemessene T-Zellen-vermittelte Immunantwort auf mit der Nahrung zugeführtes Gluten ausgelöst wird, insbesondere gegenüber α -Gliadinen.^{4,6} Die Pathogenese von Zöliakie führt zur Malabsorption von Nährstoffen und zur chronischen Entzündung der Dünndarmschleimhaut sowohl auf makroskopischer, als auch auf mikroskopischer Ebene.^{6,7} Zöliakie Symptome sind typischerweise gastro-intestinale Beschwerden, aber auch zahlreiche extraintestinale Symptome können sich in vielen anderen Organsystemen manifestieren. Atypische Erscheinungsformen von Zöliakie können neurologische, muskuloskelettale, psychiatrische, dermatologische, hämatologische Beschwerdemuster zeigen und / oder das endokrine System beeinflussen (einschließlich Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit).^{7,8} Epidemiologische Daten weisen darauf hin, dass sich die Zöliakie-Prävalenz etwa alle 20 Jahre verdoppelt und aktuell etwa 1% der allgemeinen Bevölkerung betroffen ist. Allerdings ist bei der überwiegenden Mehrheit der Betroffenen die Zöliakie nicht diagnostiziert worden und sie werden daher auch nicht behandelt.⁹⁻¹¹

Ein Eckpfeiler der Behandlung von Zöliakie ist die Vermeidung der Aufnahme von Gluten durch die Nahrung.¹² Allerdings zeigt eine systematische Überprüfung von 38 Studien an Erwachsenen mit Zöliakie, dass die strikte Einhaltung einer glutenfreien Diät nur in einem Bereich von 42% bis 91% realisiert wird.¹³ Darüber hinaus beschreiben 50% der Patienten mit Zöliakie, die sich strikt an eine glutenfreie Diät halten, keine Verbesserung der Symptome.¹⁴ Bei diesen Patienten handelt es sich um eine sogenannte „non-responsive coeliac disease (NRCD). Die häufigste Ursache dafür ist eine Gluten-Exposition oder Glutenaufnahme aufgrund von Kontamination trotz des Versuchs sich glutenfrei zu ernähren.¹⁵⁻¹⁷

Gluten kann auch Symptome bei Personen ohne Zöliakie auslösen. Man spricht dann von Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie Glutensensitivität (NCGS). Die Symptome sind ähnlich wie Zöliakie, aber mit einem verstärkten Vorkommen von extraintestinalen Symptomen, wie Verhaltensänderungen, Knochen- oder Gelenkschmerzen, Muskelkrämpfe, Beintaubheit, Gewichtsverlust und chronische Müdigkeit.⁵

Die Prävalenzrate einer Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie Glutensensitivität (NCGS) ist schwierig festzustellen, da erst vor kurzem überhaupt die Existenz der Glutensensitivität in der medizinischen Fachliteratur beschrieben wurde.⁵ Die Prävalenzrate wurde konservativ anfänglich auf 0,55% geschätzt.^{19,20} Allerdings haben bevölkerungsbezogene Studien in Nordeuropa gezeigt, dass die Prävalenzrate bei Reizdarmsyndrom (Irritable Bowel Syndrom, IBS) bei 16% bis 25% liegt, wobei der Koinzidenz zur Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie Glutensensitivität bei 28% gelegen hat.²¹ Daher kann davon ausgegangen werden, dass die tatsächliche Prävalenz der Glutensensitivität viel höher sein wird. Folglich ist davon auszugehen, dass auch gerade die Personen mit einer Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie Glutensensitivität Mühe haben werden, eine absolut glutenfreie Ernährung umzusetzen.

Das Einhalten einer strikten glutenfreien Ernährung ist für alle Altersklassen eine Herausforderung, aber insbesondere für Teenager und Studenten.^{7,22} Das Vermeiden von Gluten ist oft schwierig aufgrund des Überflusses an Gluten in Grundnahrungsmitteln wie Getreideprodukten, Brot und anderen Backwaren. Die Personen, die bereits versuchen, Weizen und Gluten zu vermeiden, werden wahrscheinlich unabsichtlich auch weniger offensichtliche Glutenquellen zu sich nehmen, wie z.B. Suppen, die mit Weizenmehl verdickt sind.

Enzyme, die Gluten spalten können

Die orale Einnahme von spezifischen, proteolytischen Enzymen stellt eine vielversprechende, ergänzende Strategie bzw. adjuvante Therapie für Personen dar, die eine unbeabsichtigte Aufnahme von Gluten aus der Nahrung im Rahmen einer glutenfreien Diät vermeiden möchten.^{23,24}

Aspergillus Niger Prolylendopeptidase (AN-PEP)

Aspergillus Niger Prolylendopeptidase bzw. Aspergillus Niger Prolylendoproteasen (AN-PEP) ist ein einzigartiges Enzym (eine Prolyl oligopeptidase) das in der Lage ist, Gluten in kleine Bruchstücke zu spalten. Das Enzym ist ein natürlich vorkommendes Enzym und wurde in einem Fermentationsprozess mit Hilfe von Aspergillus Niger gewonnen, einem Mikroorganismus, der in der Biotechnologie vielfältig verwendet wird. Mit Hilfe von Aspergillus Niger werden viele bekannte Stoffe, wie z.B. Zitronensäure, oder zahlreiche Enzyme für die Lebensmittelindustrie biotechnologisch hergestellt.

Das AN-PEP Enzym ist eine sogenannte „Endopeptidase“. Endopeptidasen spalten enzymatisch Peptidbindungen innerhalb des Proteins. Sie sind meist sehr spezifisch für bestimmte Aminosäuren. Während Exopeptidasen vom Ende her (N-Terminus oder C-Terminus) die Peptide bzw. Proteine abbauen, spalten Endopeptidasen über die gesamte Aminosäurekette an spezifischen Aminosäuren die Peptide.²⁵ Das AN-PEP ist spezifisch für die Aminosäure Prolin, die in Gluten überproportional oft vorkommt. Zahlreiche natürlich vorkommende Enzyme im menschlichen Verdauungstrakt, wie Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin, sind ebenfalls Endopeptidasen. Aspergillus Niger Prolylendopeptidase (AN-PEP) wurde in zahlreichen in vitro und klinischen Studien getestet.

Aspergillus Niger Prolylendopeptidase widersteht den sauren Bedingungen im Magen und bleibt selbst im Gastrointestinal Trakt aktiv

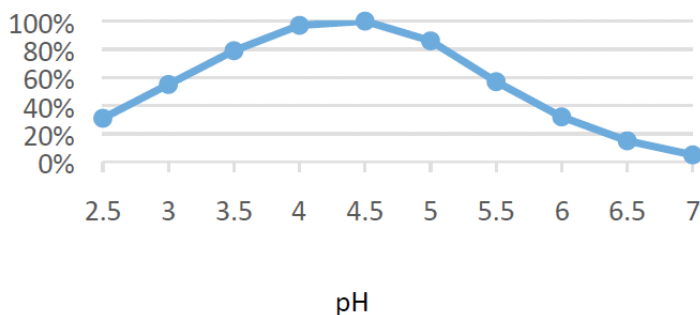
Enzyme die in der Lage sind, Proteine abzubauen, müssen den stark sauren Bedingungen des Magens widerstehen können. In vitro-Versuche haben gezeigt, dass AN-PEP ihren optimalen Wirkungsgrad bei sauren pH-Werten hat. Um dies zu zeigen, wurde die Enzymaktivität von AN-PEP über einen weiten pH-Bereich gemessen. Dabei stellte sich pH 4.5 als Wert mit der höchsten Enzymaktivität heraus^{26,26} (Abbildung 2).

Gemäß veröffentlichter Daten nimmt die Acidität der aufgenommenen Nahrung dreißig Minuten nach der Nahrungsaufnahme von einem anfänglichen Wert von pH 5 auf pH 3.5 ab, gefolgt von einer weiteren Abnahme auf pH 2 etwa nach 60 Minuten nach der Aufnahme. Studien zur Magenentleerung zeigen, dass 45 Minuten nach der Einnahme noch fast 90% der festen Nahrung im Magen vorhanden sind. Jenseits des Magens steigt der pH-Wert der Nahrung langsam an und erreicht einen pH-Wert von 5 im distalen Teil des Zwölffingerdarms, d.h. etwa 50 cm hinter dem Pylorus.

Daher ist eine Optimierung der Enzymaktivität auf pH 4.5 ideal auf die physiologischen Vorgänge der menschlichen Verdauung abgestimmt.

Abbildung 2: AN-PEP Enzym zeigt eine hohe Enzymaktivität über einen breiten pH-Bereich mit einem Optimum bei pH 4.5

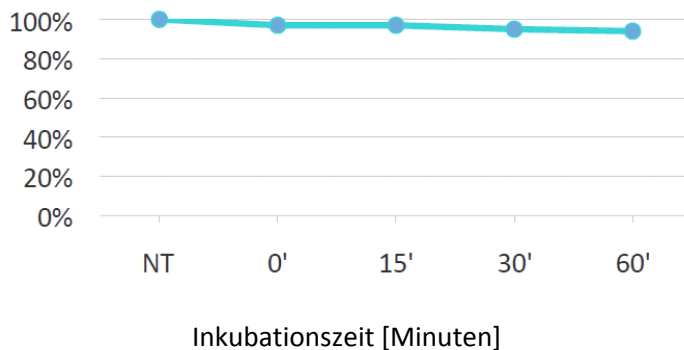
Enzymaktivität [%]



Neben den tiefen pH-Werten im Magen müssen oral verabreichte Enzyme auch widerstandsfähig gegenüber anderen im Gastrointestinal Trakt natürlich vorkommenden Enzymen (Endoproteasen) sein. Um dies zu testen, wurde AN-PEP bei pH=2 zusammen mit Pepsin inkubiert und anschließend die Enzymaktivität gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität von AN-PEP nahezu unverändert hoch bleibt über einen Zeitraum von 60 Minuten (Abbildung 3).²⁶

Abbildung 3: AN-PEP Enzymaktivität wird kaum eingeschränkt bei stark sauren Verhältnissen (pH=2) und der Anwesenheit von Pepsin. An jedem Testpunkt wurde zuerst die Enzymreaktion von Pepsin gestoppt und die Enzymaktivität von AN-PEP bei ihrem pH-Optimum gemessen. (NT = Enzymaktivität AN-PEP ohne Inkubation mit Pepsin bei pH=2)

Enzymaktivität [%]



Aspergillus Niger Prolylendopeptidase spaltet Gluten

In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass das in GluteoStop® eingesetzte AN-PEP Enzym effizient Gluten spalten kann.²⁶

Dazu wurde AN-PEP Enzym zwei Stunden mit Gluten inkubiert und die Mischung anschließend mittels HPLC-MS untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass AN-PEP intaktes Gluten in 152 verschiedene Peptide abgebaut hat. Im Test wurden 5mg AN-PEP pro Gramm Gluten eingesetzt.

AN-PEP spaltet Gluten spezifisch nach der Aminosäure Prolin

Um eine Stimulation von T-Zellen effizient vorzubeugen, ist es notwendig, dass die eingesetzte Peptidase insbesondere diejenigen Glutenepitope (Fragmente) abbaut, die dafür bekannt sind, die T-Zellen-vermittelte Immunantwort auszulösen. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass das von uns eingesetzte AN-PEP Enzym jedes T-Zellen stimulierende Epitop gespalten hat, das getestet wurde. Die Untersuchungen umfassten auch das alpha-Gliadin-Peptid AA 31-49 (Glia 31-49), das für Zöliakie Patienten als toxische Epitop angesehen wird.²⁷⁻²⁹ Bei der Studie wurden 13 unterschiedliche Gluten-Peptide untersucht, die nachweislich eine T-Zellen induzierte Immunreaktion hervorrufen. Mit Hilfe der Massenspektroskopie konnte bestätigt werden, dass AN-PEP jedes der 13 Peptide abbauen konnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass AN-PEP die Peptide spezifisch nach der Aminosäure Prolin gespalten hat (Tabelle 2).²⁶

Tabelle 2: Gluten-Peptide wurden mit Prolyl-Endoprotease aus *Aspergillus niger* (AN-PEP) behandelt und die erzeugten Peptidfragmente wurden durch MALDI-TOF-Massenspektroskopie identifiziert. Minimale T-Zellen-stimulierende Sequenzen sind in Fettdruck angegeben. Pfeile (↔) zeigen Spaltungsstellen an, (‡) zeigen weniger effizient gespaltene Peptidbindungen (übernommen von Stepniak et al. ²⁶).

Epitop	Hauptstellen der Peptidspaltung
Glia 31–43	L G Q Q Q P ↔ F P P Q Q P ↔ Y P ↔ Q P Q P F
Glia-α2	P ↔ Q P Q L P ↔ Y P Q P Q L P Y
Glia-α9	Q L Q P ↔ F P ↔ Q P Q L P ↔ Y
Glia-α20	P F R P ↔ Q Q P ↔ Y P ‡ Q P Q P Q
Glia-γ1	Q P Q Q P ↔ Q Q S F P ↔ Q Q Q R P ↔ F
Glia-γ2	Q Q P ↔ Y P Q Q P ↔ Q Q P F P Q
Glia- γ30	V Q G Q G I I Q P ↔ Q Q P A Q L
Glt-17	Q Q P P ↔ F S Q Q Q Q P ↔ L P Q
Glt-156	Q Q P P ↔ F S Q Q Q Q S P ‡ F S Q
Glu-5	Q Q U S Q P ↔ Q U P ↔ Q Q Q Q U P ↔ Q Q P Q Q F
Glu-21	Q P Q P ↔ F P ↔ Q Q S E Q S Q Q P ↔ F Q P Q P F
DQ8-Glt	Q Q G Y Y P ↔ T S P ↔ Q Q S
DQ8-Glia	S G Q G S F Q P ↔ S Q Q N

AN-PEP spaltet schnell Gluten

Im Idealfall sollte Gluten im Magen effizient aufgespalten werden, um zu verhindern, dass Gluten-Peptide im Dünndarm T-Zellen induzierte Immunreaktionen auslösen. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass AN-PEP Enzym in der Lage ist, Gluten-Peptide innerhalb kürzester Zeit zu spalten.

Um die Geschwindigkeit und Effizienz der Enzymaktivität zu messen, wurde AN-PEP Enzym mit vier verschiedenen Gluten-Peptiden mit hohem und niedrigem Molekulargewicht (Gliadin (Glia -9), Gliadin (Glia -1), LMW-Glt (Glt-156) und HMW-Glt) bei pH=4.5 inkubiert. Anschließend wurde die Enzym-Reaktion zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 30, 60 und 120 Minuten gestoppt und die Konzentration der unverdauten Peptide mittels Q-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Die Halbwertszeiten wurden aus den erhaltenen Kurven berechnet. Die Halbwertszeit lag zwischen 2.4 und 6.2 min. Damit war der Abbau der ausgewählten Gluten-Peptide durch AN-PEP Enzym im Durchschnitt 60-mal kürzer als der Abbau mit einer vergleichbaren Prolyl oligopeptidase aus *Flavobacterium meningosepticum* (FM-POP).²⁶

Tabelle 3: AN-PEP spaltet schnell Gluten-Peptide mit hohem und niedrigem Molekulargewicht bei pH=4.5 (übernommen von Stepniak et al. ²⁶).

Gluten Peptide	Halbwertszeit [Minuten]
α -Gliadin (Glia- α -9)	3.87
γ -Gliadin (Glia- γ -1)	2.36
LMW-Glutenin (Glt-156)	5.80
HMW-Glutenin	6.19

In einer anderen Studie konnte der Abbau von Gliadin-Peptiden innerhalb von 30 Minuten durch AN-PEP unter sauren Bedingungen mittels Western Blot sichtbar gemacht werden. Umgerechnet 33.000 PPI (Protease Picomol International) AN-PEP pro Gramm Gluten waren ausreichend.³⁰

AN-PEP Enzym verhindert T-Zellen Stimulation durch Gluten-Peptide

Ein Teil der Pathophysiologie von glutenbedingten Autoimmunerkrankungen beinhaltet die Stimulation von T-Zellen durch Gluten-Peptide. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass AN-PEP Enzym diese Stimulation verhindern kann:

Stepniak et al. inkubierte AN-PEP Enzym zusammen mit Gluten und den Verdauungsenzymen Pepsin und Trypsin. Nach 5, 10, 15, 30, 60, 120 Minuten, so wie am nächsten Tag wurde die Enzym-Reaktion gestoppt und der Abbau von T-Zellen stimulierenden Gluten-Epitopen (Fragmenten) mit Hilfe eines kompetitiven ELISA Verfahrens gemessen. Dazu wurden Antikörper ausgewählt, die spezifisch für vier verschiedene Gluten-Epitope sind (α -Gliadin, γ -Gliadin, und Glutenin mit hohem und niedrigem Molekulargewicht) untersucht. Diese Epitope sind bekannt, dass sie eine T-Zellen induzierte Immunreaktion auslösen können. Wie erwartet spaltet AN-PEP sehr effizient Gliadin-Epitope, während Glutenine sich als resistenter gegenüber der Proteolyse erwiesen hat und entsprechend langsamer abgebaut wurden. Bereits nach 30 Minuten konnten die zwei Gluten-Epitope α -Gliadin und γ -Gliadin nicht mehr nachgewiesen werden. Obwohl die Glutenine langsamer gespalten wurden, war nach 120 Minuten alles Glutenin mit niedrigem Molekulargewicht abgebaut und 90% des Glutenin mit hohem Molekulargewicht. In der Probe, die über Nacht inkubiert wurde konnte keines der Gluten-Epitope mehr nachgewiesen werden.²⁶

In einem in-vitro TIM Modell (TNO gastro-intestinal model), einem dynamischen Modellsystem, das den Verdauungstrakt nachstellt, wurde die Fähigkeit von AN-PEP Enzym untersucht, T-Zellen stimulierende Gluten-Epitope abzubauen. Zwei Experimente wurden durchgeführt. In dem ersten wurde eine Scheibe Weissbrot (70g Brot mit 5g Gluten) in diesem TIM-System mit und ohne gleichzeitige Gabe von AN-PEP (200mg pro g Protein) getestet. Im zweiten wurde ein Standard-Fast-Food-Menü untersucht. Proben der verdauten Mahlzeit wurden gesammelt zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 und 240 Minuten nach dem Beginn des Experiments aus dem Magen, Zwölffingerdarm, Jejunum- und Ileumkompartiment. In diesen Proben wurden die Spiegel von immunogenen Peptiden (Glia- α 9, Glia- γ 1, Glutenin mit hohem (HMW Glutenin) und niedrigem Molekulargewicht (LMW Glutenin) mit Hilfe eines kompetitiven ELISA Verfahrens basierend auf monoklonalen Antikörpern, Western-Blot-Analyse und

Proliferations-T-Zell-Assays bestimmt und bewertet. Während in der Kontrolle noch nach 120 Minuten im hochspezifischen ELISA Verfahren Gluten-Epitope nachgewiesen werden, konnte bereits nach 90 Minuten unter Zugabe des AN-PEP Enzyms im Magenkompartiment kein Gluten-Epitop mehr detektiert werden. Auch konnte in keinem der weiteren Kompartimente (Zwölffingerdarm, Jejunum und Ileum) die untersuchten Gluten-Epitope nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass innerhalb der Zeitspanne, in der Nahrung normalerweise den Magen passiert, die gleichzeitige Gabe von AN-PEP Enzym zu einem vollständigen Verschwinden der untersuchten T-Zellen-stimulierenden Peptiden (Gliadine und Glutenine) führte.³¹

AN-PEP Enzym in klinischen Studien

Die Fähigkeit von AN-PEP Enzym Gluten abzubauen wurde auch in Humanstudien untersucht und bestätigt.

In einer Studie von Salden et al. wurden gesunden Probanden in einer randomisierten, doppelblind, Placebo-kontrollierten, cross-over Studie über 4 Testtage verteilt über einen nasoduodenal Katheter entweder eine niederkalorische (143 kcal) oder hochkalorische (405 kcal) glutenhaltige Kost verabreicht. Der Glutengehalt war 4 Gramm. Untersucht wurde die Menge an α -Gliadin-Epitop DQ2.5-glia- α 3 mittels ELISA Verfahren (Gluten-Tec[®] ELISA) nach Gabe eines Placebos oder AN-PEP Enzyms (1.6 Mio PPI). Die Ergebnisse wurden mittels Western Blot (DQ2.5-glia- α 1 Epitop) verifiziert. Proben wurden regelmässig über 4 Stunden im Magen und im Zwölffingerdarm gezogen. Das AN-PEP Enzym hat den Abbau von Gluten im Magen der Probanden signifikant erhöht. Eine Erhöhung der kalorischen Dichte verlängert die Verweilzeit der Mahlzeit im Magen von 1.5 h auf 3 h. Da das AN-PEP Enzym bereits das zugesetzte Gluten in der kalorienarmen Mahlzeit abbaute, war kein inkrementeller Effekt zu beobachten, als die Kaloriendichte der Mahlzeit erhöht wurde. Bereits nach 60 Minuten war die Gesamtmenge an Gluten im Magen durch AN-PEP Enzym bis zur Nachweisgrenze abgebaut. Bei der Placebo-Gruppe konnte Gluten noch 3 Stunden nach Aufnahme im Magen nachgewiesen werden. Salden et al. konnten zweifelsfrei die Fähigkeit des AN-PEP Enzyms zum effizienten Abbau von Gluten demonstrieren und den Magen als den primären Wirkort für die Verdauung von Gluten identifizieren.³⁵

In einer weiteren randomisierten, doppelblind, Placebo-kontrollierten Pilotstudie zur Evaluierung der Sicherheit und Wirksamkeit von AN-PEP Enzym bei Zöliakie konnte Tack et al. zeigen, dass die Einnahme von AN-PEP Enzym sicher ist und von den Probanden sehr gut vertragen wird. Dabei wurde den Studienteilnehmern in Phase 1 täglich ein Brot mit 7g Gluten zusammen mit AN-PEP Enzym verabreicht. In Phase 2 bekamen die Probanden täglich ein Brot mit 7g Gluten zusammen mit AN-PEP Enzym oder einem Placebo verabreicht. Die Lebensqualität blieb während der zwei Wochen Glutenzufuhr mit zusätzlicher Einnahme von AN-PEP Enzym relativ hoch. Aufgrund der kurzen Glutenexposition von nur zwei Wochen war keine signifikante histologische Veränderung zu beobachten, wenn auch bei der Placebogruppe diese häufiger vorgekommen ist.³³

Eine weitere Studie untersucht die Wirksamkeit von AN-PEP Enzym in einer komplexen, reichhaltigen Mahlzeit in einer randomisierten Placebo-kontrollierten Crossover Studie. Dabei haben 18 Glutenempfindliche Probanden eine Mahlzeit mit 0,5 g Gluten zusammen mit AN-PEP Enzym in zwei Dosisstärken oder Placebo erhalten. Es wurde nach 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150 und 180 Minuten über einen multi-lumen-nasoduodenal Katheter Proben aus Magen und Zwölffingerdarm

entnommen und der Gehalt an Gluten als „Fläche unter der Kurve (AUC)“ gemessen. Mittels Gluten-Tec ELISA assay (EuroProxima B.V., Arnhem, The Netherlands) wurde das Gluten-Epitope DQ2.5-glia- α 3 (früher bekannt als glia- α 20) quantifiziert und entsprechend der Herstellerangabe in Menge Gluten umgerechnet. Sowohl in hoher als auch in niedriger Dosierung erniedrigte das AN-PEP Enzym signifikant die Glutenkonzentration (AUC 0-180min) im Magen und im Zwölffingerdarm jeweils verglichen zum Placebo. Im Magen wurden die Glutenwerte von einem Median von 176,9 $\mu\text{g} \times \text{min/ml}$ im Placebo (Interquartilbereich 73,5-357,8) um 88% bis auf 22,0 $\mu\text{g} \times \text{min/ml}$ (10,6-50,8, $p = 0,001$) mit der höheren Dosierung AN-PEP reduziert und um 86% auf 25,4 $\mu\text{g} \times \text{min/ml}$ (16,4-43,7, $p = 0,001$) mit der niedrigen Dosierung des AN-PEP Enzyms. Die Ergebnisse im Zwölffingerdarm waren vergleichbar. Dabei wurden die Glutenkonzentrationen von 14,1 $\mu\text{g} \times \text{min/ml}$ (8,3-124,7) im Placebo um 56% auf 6,3 $\mu\text{g} \times \text{min/ml}$ (3,5-19,8, $p = 0,019$) bei höherer Dosis bzw. 48% bis 7,4 $\mu\text{g} \times \text{min/ml}$ (3,8-12,0, $p = 0,015$) in der niedrigen Dosis AN-PEP reduziert. Post-hoc-Tests zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wirksamkeit der niedrigen zur hohen Dosis von AN-PEP Enzym.

Die Ergebnisse dieser doppelblind, placebokontrollierten Studie zeigten, dass sowohl eine niedrige als auch eine hohe Dosis von AN-PEP Enzym in Form von Tabletten signifikant die Glutenkonzentrationen im Magen und Zwölffingerdarm von glutenempfindlichen Personen reduzierte. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse von Salden et al.³⁵, die die Wirksamkeit von AN-PEP Enzym beim Abbau von Gluten im Magen von gesunden Freiwilligen untersuchte. In dieser Studie von König et al. war Gluten in einer Menge von ca. 0,5 g einer komplexen, festen Mahlzeit hinzu dosiert. Es wurde diese eher geringe Menge an Gluten gewählt, da diese der Menge entspricht, die in der Literatur beschrieben wird als die Menge an Gluten, die Gluten-intolerante Personen bei einer glutenfreien Ernährung möglicherweise unbeabsichtigt konsumieren.^{37,38} Während Salden et al. AN-PEP Enzym in flüssiger Form verabreichten, untersuchte diese Studie die Wirksamkeit des Enzyms in Tablettenform und in einer festen Mahlzeit, da dies die tägliche Praxis widerspiegelt. Somit konnte gezeigt werden, dass die Gabe von AN-PEP Enzym in Tablettenform signifikant das meiste Gluten in einer gängigen, festen Mahlzeit im Magen abbaut, bevor es in den Zwölffingerdarm gelangt.

Andere Enzyme, die vermeintlich Gluten abbauen können z.B. DPP-IV

Dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV) ist eines in Nahrungsergänzungsmitteln mit am häufigsten verwendetes Enzym, um die Glutenverdauung zu unterstützen. Wie das AN-PEP Enzym ist auch DPP-IV natürlich vorkommend und oft auch mit Hilfe von Aspergillus Arten produziert. Im Gegensatz zum AN-PEP Enzym handelt es sich bei DPP-IV um eine "Exoprotease", die zudem so spezifisch ist, dass sie ausschließlich Peptide spaltet, die in der vorletzten Position vom N-Terminus eines Proteins oder Peptids gezählt, die Aminosäure Prolin aufweisen.³⁴ Es wurde gezeigt, dass aufgrund dieser hohen Spezifität DPP-IV nicht in der Lage ist, Gliadinpeptide abzubauen ohne dass zusätzliche Proteasen vorhanden sind.⁴ Im Gegensatz dazu ist das AN-PEP Enzym in der Lage, Gliadinpeptide und Gluten ohne zusätzliche Enzyme zu verdauen.^{26,30,31,32} Darüber hinaus verliert DPP-IV seine Aktivität und Funktionalität Gluten abzubauen bei pH-Werten unter pH=4 wohingegen das AN-PEP Enzym sehr gut auch bei deutlich niedrigeren pH-Werten um pH=2 in der Lage ist, Gluten effizient zu spalten.^{25,26,34} In einer aktuellen Untersuchung von Janssen et al. wurde die sehr eingeschränkte Wirksamkeit von diversen Enzympräparaten im Vergleich zu AN-PEP Enzym gezeigt. Dazu wurden fünf verschiedene Enzympräparate, vornehmlich mit DPP-IV Enzym, sowie AN-PEP mit Gliadin maximal 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mittels R5

monoklonalen Antikörper basiertem ELISA zur Bestimmung des verbliebenen Glutens vermessen. Während das untersuchte AN-PEP Enzym die immunreaktiven Peptide bei einem pH=4.5 bereits nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten vollständig abbaute, konnten die anderen untersuchten Enzympräparate die R5-reaktiven Peptide weder bei pH=4.5 noch bei pH=6.2 vollständig aufspalten. Da der R5-ELISA Test nicht alle immunogenen Epitope spezifisch detektieren kann, wurde zusätzlich eine Untersuchung der Abbauprodukte auf das Vorhandensein von bekannten immunogenen Peptidsequenzen mittels Massenspektroskopie unternommen. Insbesondere wurden die Abbauprodukte der Gluten-Epitope des α -Gliadins, das 33-mer Peptid und des γ -Gliadin, das 26-mer Peptid untersucht. Während bei DPP-IV Präparaten noch lange, immunogene Peptidsequenzen gemessen werden konnten, waren die messbaren Bruchstücke bei der Behandlung mit AN-PEP grösstenteils nur acht Aminosäuren lang oder kleiner und damit zu klein um immunogene Epitope zu enthalten. Schließlich wurde noch die T-Zellen Proliferation mittels eines gluten-spezifischen T-Zell-Klons (T-Zell Klon N10 spezifisch für das DQ2-glia- α 1 Epitop) anhand der verdauten Bruchstücke des 33-mer Peptids gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass das AN-PEP Enzym, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Enzympräparaten die T-Zell-stimulierenden Eigenschaften des 33-mer neutralisieren konnte.³⁹

Zusammenfassung

Die orale Einnahme von glutenabbauenden Enzymen stellt eine vielversprechende Ergänzung für all diejenigen dar, die sich glutenfrei ernähren und die unbeabsichtigte Aufnahme von Gluten z.B. durch Kontamination, vermeiden wollen. Das in GluteoStop® verwendete Enzym ist eine sogenannte Aspergillus Niger Prolylendopeptidase (AN-PEP) und ist ein für die Aminosäure Prolin spezifisches Verdauungsenzym. Das natürlich vorkommende AN-PEP Enzym wurde in zahlreichen in-vitro und in-vivo Studien intensiv untersucht. Es ist resistent gegen die harten Bedingungen des Magen-Darm-Trakts, einschließlich seiner extremen pH-Werte und endogenen Verdauungsenzyme (Pepsin/Trypsin).

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass das AN-PEP Enzym schnell und effizient Glutenpeptide und intaktes Glutenprotein abbaut und dadurch helfen kann zu verhindern, dass Glutenpeptide T-Zellen stimulieren. Die wachsende Zahl an wissenschaftlichen Studien und umfangreichen Untersuchungen zum AN-PEP Enzym legt nahe, dass es den gängigen, kommerziell erhältlichen Enzympräparaten deutlich überlegen ist. Jüngste klinische Studien konnten zeigen, dass die Anwendung in Tablettenform bei einer Dosis von 83'300 PPI (Protease Picomol International) eine Glutenmenge von 500mg in einer komplexen, festen Mahlzeit nahezu vollständig abbauen kann. In jüngsten wissenschaftlichen Studien wurde herausgefunden, dass selbst Zöliakie Patienten, die eine strikte glutenfreie Ernährung verfolgen, dennoch unbeabsichtigt täglich durchschnittlich 150 - 400mg Gluten am Tag aufnehmen.⁴⁰

GluteoStop® mit AN-PEP Enzym kann nicht als Ersatz für eine glutenfreie Ernährung verwendet werden oder zur Behandlung und Vorbeugung von Zöliakie, Weizenallergie oder Glutenhypersensitivität. Aber viele Menschen, die sich glutenfrei ernähren wollen oder müssen können von Produkten mit AN-PEP Enzym als ergänzende Maßnahme zu einer glutenfreien Ernährung profitieren. Daher kann GluteoStop® als zusätzliches Hilfsmittel zur Vermeidung von versehentlicher Exposition gegenüber Nahrungsgluten neben einer strikten glutenfreien Ernährung empfohlen werden.

Literaturstellen

1. Hernando A, Mujico JR, Mena MC, Lombardía M, Méndez E. Measurement of wheat gluten and barley hordeins in contaminated oats from Europe, the United States and Canada by Sandwich R5 ELISA. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:545-554.
2. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol*. 2007;24:115-119.
3. Wieser H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr Suppl*. 1996;412:3-9.
4. Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;283:G996-G1003.
5. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*. 2012;10(1):13.
6. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:493-525.
7. Guandalini S, Assiri A. Celiac disease: a review. *JAMA Pediatr*. 2014;168:272-278.
8. Tersigni C, Castellani R, de Waure C, et al. Celiac disease and reproductive disorders: Meta-analysis of epidemiologic associations and potential pathogenic mechanisms. *Hum Reprod Update*. 2014;20:582-593.
9. Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, et al. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26:1217-1225.
10. Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, et al. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology*. 2009;137(1):88-93.
11. Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, Murray JA, Everhart JE. The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2012;107:1538-1544.
12. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet*. 2009;373:1480-1493.
13. Hall NJ, Rubin G, Charnock A. Systematic review: adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30:315-330.
14. Lanzini A, Lanzarotto F, Villanacci V, et al. Complete recovery of intestinal mucosa occurs very rarely in adult coeliac patients despite adherence to gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;29:1299-1308.
15. Abdulkarim AS, Burgart LJ, See J, Murray JA. Etiology of nonresponsive celiac disease: results of a systematic approach. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:2016-2021.
16. Leffler DA, Dennis M, Hyett B, Kelly E, Schuppan D, Kelly CP. Etiologies and predictors of diagnosis in nonresponsive celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:445-450.

17. Dewar DH. Celiac disease: Management of persistent symptoms in patients on a glutenfree diet. *World J Gastroenterol.* 2012;18(12):1348.
18. Deutsche Zöliakie Gesellschaft. Übersicht zur Auswahl glutenfreier Lebensmittel. <https://www.dzg-online.de/uebersicht-zur-auswahl-glutenfreier-lebensmittel.963.0.html>
19. Krogsgaard LR, Engsbro AL, Bytzer P. The epidemiology of irritable bowel syndrome in Denmark. A population-based survey in adults ≤ 50 years of age. *Scand J Gastroenterol.* 2013;48(5):523-529.
20. Breckan RK, Asfeldt AM, Straume B, Florholmen J, Paulssen EJ. Prevalence, comorbidity, and risk factors for functional bowel symptoms: a population-based survey in Northern Norway. *Scand J Gastroenterol.* 2012;47(11):1274-1282.
21. Biesiekierski JR, Newnham ED, Irving PM, et al. Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebocontrolled trial. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(3):508-514.
22. Panzer RM, Dennis M, Kelly CP, Weir D, Leichtner A, Leffler DA. Navigating the glutenfree diet in college. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;55:740-744.
23. Caputo I, Lepretti M, Martucciello S, Esposito C. Enzymatic strategies to detoxify gluten: implications for celiac disease. *Enzyme Res.* 2010;2010:174354.
24. *Aspergillus niger* prolyl endoprotease as a treatment for celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol & Hepatol.* 2006;3(12):654-654.
25. Edens L, Dekker P, Van Der Hoeven R, Deen F, De Roos A, Floris R. Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. *J Agric Food Chem.* 2005;53:7950-7957.
26. Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, et al. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291:G621-G629.
27. Maiuri L, Troncone R, Mayer M, et al. In vitro activities of A-gliadin-related synthetic peptides: damaging effect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune response in the treated coeliac mucosa. *Scand J Gastroenterol.* 1996;31:247- 253.
28. Shidrawi RG, Day P, Przemioslo R, Ellis HJ, Nelufer JM, Ciclitira PJ. In vitro toxicity of gluten peptides in coeliac disease assessed by organ culture. *Scand J Gastroenterol.* 1995;30:758-763.
29. Sturgess R, Day P, Ellis HJ, et al. Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet.* 1994;343:758-761.
30. Montserrat V, Bruins MJ, Edens L, Koning F. Influence of dietary components on *Aspergillus niger* prolyl endoprotease mediated gluten degradation. *Food Chem.* 2015;174:440-445.

31. Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW, Edens L, Dekking L, Koning F. Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut*. 2008;57:25-32.
32. Salden B, Monserrat V, Troost F, et al. Su2096 gluten degrading enzyme effectively digests gluten in the stomach and small intestine of healthy volunteers. *Gastroenterology*. 2014;146(5):S-545.
33. Tack GJ, van de Water JMW, Bruins MJ, et al. Consumption of gluten with glutendegrading enzyme by celiac patients: a pilot-study. *World J Gastroenterol*. 2013;19(35):5837-5847.
34. Ehren J, Mórón B, Martin E, Bethune MT, Gray GM, Khosla C. A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLoS One*. 2009;4(7):1-10.
35. B. N. Salden, V. Monserrat, F. J. Troost, M. J. Bruins, L. Edens, R. Bartholom, G. R. Haenen, B. Winkens, F. Koning, A. A. Masclee. Randomised clinical study: *Aspergillus niger*-derived enzyme digests gluten in the stomach of healthy volunteers. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015 Aug;42(3):273-85
36. J. König, S. Holster, M. J. Bruins, R. J. Brummer. Randomized clinical trial: Effective gluten degradation by *Aspergillus niger*-derived enzyme in a complex meal setting. *Sci Rep*. 2017 Oct 12;7(1):13100.
37. Hopman, E. G., le Cessie, S., von Blomberg, B. M. & Mearin, M. L. Nutritional management of the gluten-free diet in young people with celiac disease in The Netherlands. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43, 102–108 (2006).
38. Lovik, A., Skodje, G., Bratlie, J., Brottveit, M. & Lundin, K. E. Diet adherence and gluten exposure in coeliac disease and selfreported non-coeliac gluten sensitivity. *Clin Nutr* 36, 275–280 (2017).
39. G. Janssen, C. Christis, Y. Kooy-Winkelaar, L. Edens, D. Smith, P. van Veelen, F. Koning. Ineffective Degradation of Immunogenic Gluten Epitopes by Currently Available Digestive Enzyme Supplements. *PLoS One*. 2015 Jun 1;10(6)
40. Syage J.A., Kelly C.P., Dickason M.A., Ramirez A.C., Leon F., Dominguez R., Sealey-Voyksner J.A. Determination of gluten consumption in celiac disease patients on a gluten-free diet. *Am J Clin Nutr*. 2018 Feb 1;107(2):201-207.