(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102365112 A
(43)申请公布日 2012.02.29

(21)申请号 201080009607.6

(22)申请日 2010.01.06

(30)优先权数据
2009900164 2009.01.15 AU

(85)PCT申请进入国家阶段日
2011.08.22

(86)PCT申请的申请数据
PCT/AU2010/000006 2010.01.06

(87)PCT申请的公布数据
WO2010/081185 EN 2010.07.22

(71)申请人 澳大利亚格伦塔根有限公司
地址 澳大利亚维多利亚州

(72)发明人 特奥多尔·斯坦尔马西克
休·詹姆斯·贝蒂·科内尔

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所 31219
代理人 许亦琳 余明伟

(51)Int.Cl.
A61P 1/14(2006.01)
A23L 1/05(2006.01)
A61K 35/38(2006.01)
A61K 38/48(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 3 页

(54)发明名称

治疗谷蛋白不耐受的组合物及其应用

(57)摘要

本发明提供一种用于预防或治疗由谷蛋白不耐受引起的相关病症的组合物，如说明书所述，这些组合物单独包含至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶（或其生物活性片段、类似物或变异体），或还混有其它合适的酶（包括菠萝蛋白酶）和/或肠道提取物。本发明还提供用这样的组合物预防或治疗由谷蛋白不耐受引起的相关病症的方法。

CN 102365112 A

1. 一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的组合物，该组合物包含至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体。

2. 如权利要求 1 所述的组合物，包含占组合物总重量约 5％ w/w 至约 95％ w/w 的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物，其中所述番木瓜半胱氨酸蛋白酶得自番木瓜 (Carica papaya)。

4. 如权利要求 1-3 之一所述的组合物，其中所述番木瓜半胱氨酸蛋白酶包含图 1 或 2 所示氨基酸序列或其生物活性片段、类似物或变异体。

5. 如权利要求 1-4 之一所述的组合物，所述组合物包含肠道提取物。

6. 如权利要求 1-5 之一所述的组合物，所述组合物包含菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体。

7. 如权利要求 1-6 之一所述的组合物，所述组合物制剂成肠溶包衣片或胶囊。

8. 一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的组合物，该组合物包含编码重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的核酸分子。

9. 如权利要求 8 所述的组合物，其中所述核酸分子包括图 3 或 4 所示核酸序列或其功能等同物。

10. 如权利要求 8 所述的组合物，其中所述核酸分子编码图 1 或 2 所示氨基酸序列或其生物活性片段、类似物或变异体。

11. 如权利要求 8-10 之一所述的组合物，所述组合物包含编码重组菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的核酸分子。

12. 一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的组合物，所述组合物包含一种宿主细胞，其中所述宿主细胞可表达重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体。

13. 如权利要求 12 所述的组合物，所述组合物包含一种可表达重组菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的宿主细胞。

14. 一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的方法，该方法包括对需要施用该方法的患者施用一种包含至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体的组合物。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其中所述番木瓜半胱氨酸蛋白酶得自番木瓜 (Carica papaya)。

16. 如权利要求 14 或 15 所述的方法，其中所述番木瓜半胱氨酸蛋白酶包含图 1 或 2 所示氨基酸序列或其生物活性片段、类似物或变异体。

17. 如权利要求 14-16 之一所述的方法，包括对需要施用该方法的患者施用一种包含肠道提取物的组合物。

18. 如权利要求 14-17 之一所述的方法，包括对需要施用该方法的患者施用一种包含菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的组合物。

19. 如权利要求 14-18 之一所述的方法，其中所述组合物包括肠溶包衣片或胶囊。

20. 如权利要求 14-19 之一所述的方法，其中所述组合物包含至少 15mg 番木瓜半胱氨酸蛋白酶。

21. 一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的方法，该方法包括对需要施用该方法的患者施用一种如权利要求 5 或 6 所述的组合物。

22. 一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的方法，该方法包括对需要施用该方法的患者施用一种核酸分子，其中所述核酸分子可在患者体内表达重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述核酸分子编码如图 1 或 2 所示氨基酸序列或其生物活性片段、类似物或变异体。

24. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述核酸分子包括图 3 或 4 所示核酸序列或其功能等同物。

25. 如权利要求 22-24 之一所述的方法，所述方法包括对需要施用该方法的患者施用一种编码菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的核酸分子。

26. 一种从来自含谷蛋白的材料制备食品的方法，该方法包括用番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体处理食品或含谷蛋白的材料，从而减少存在于食品中的源自谷蛋白的毒性寡肽的量。

27. 如权利要求 26 所述的方法，该方法进一步包括用菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体处理食品或含谷蛋白的材料。

治疗谷蛋白不耐受的组合物及其应用

[0001] 本申请总体上涉及用于预防或治疗谷蛋白过敏反应（不耐受）相关病症的组合物及其应用。

[0002] 发明背景

[0003] 谷蛋白过敏反应（不耐受）主要见于以小麦为主食的区域（如欧洲、北美和澳大利亚）。在这些区域，此病的发生率约为人口的 1％ (DA Van Heel 等，Gut 2006 ;55 : 1037-1046)。此病的症状包括腹痛、胃气胀和腹泻。在严重病例或患病时间长的病例中（例如腹部疾病），肠粘膜有炎性变化，导致营养素吸收不良、疲劳、慢性腹泻、体重减轻、腹胀、贫血、出血倾向增加，及胃肠道恶性肿瘤的危险增加，如淋巴瘤和癌。

[0004] 谷蛋白过敏反应（或腹部疾病，口炎性腹泻）的发病机理似乎既有遗传因素又有环境因素。虽然遗传倾向性是一个主要的因素（约 10％的一级亲属受到影响），然而单卵双生子的同病率仅约 75％，这一事实提示环境因素在此病的发生发展中也是起作用的。

[0005] 罹患谷蛋白过敏反应的患者特征性地在其肠粘膜中有 T 细胞存在，该 T 细胞可识别谷蛋白毒性肽中存在的某些序列。证据表明，这些 T 细胞通过识别含某些与毒性相关的特殊氨基酸序列的肽而在此病的免疫发病机制中起着关键性的作用。例如，在体外实验中通过将部分消化形式的水溶性谷蛋白添加到携带 HLA-DQ2 的抗原递呈细胞中，可引起从腹部疾病患者肠道得到的受麦醇溶蛋白特异性 HLA-DQ2 限制的 T 细胞克隆发生增殖。

[0006] 与严重的谷蛋白过敏反应相关的一种疾病是疱疹样皮炎，它以慢性出疹的形式出现，特征为特别瘙痒的水泡、丘疹和荨麻疹样病变集群。研究证明，在几乎所有外观正常的和病灶周围的皮肤上都出现 IgA 沉积物。无症状的谷蛋白敏感性肠病见于 75％至 95％患者及其一些亲属中。疱疹样皮炎的发病通常是渐进型的，发展为受累表面严重瘙痒和烧灼。此外，挠抓常常使有周围皮肤湿疹的原发损害不清楚，从而导致湿疹的错误诊断。

[0007] 谷蛋白是一种蛋白成分，见于例如谷类生面团中，它可再区分为麦谷蛋白和醇溶谷蛋白。醇溶谷蛋白还可以再分类为分别从小麦、黑麦、大麦和燕麦得到的麦醇溶蛋白、黑麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白和燕麦谷蛋白。对谷蛋白过敏反应患者有潜在有害影响的谷蛋白是小麦的储存蛋白，这些小麦的种类包括 Triticum aestivum ;Triticum aethiopicum ; Triticum baeoticum ;Triticum militinae ;Triticum monococcum ;Triticum sinskajae ; Triticum timopheevii ;Triticum turgidum ;Triticum urartu, Triticum vavilovii ; Triticum zhukovskyi ;等等（例如见 Colot, Genet Eng(NY)12 ;225-41, 1990)。

[0008] 麦醇溶蛋白是小麦谷蛋白中 70％醇溶蛋白部分。按照其电泳迁移率，可将得自小麦面粉的麦醇溶蛋白分成几类，包括 α－型、β－型、γ－型和 ω－型。麦醇溶蛋白有特色地富含谷氨酰胺和脯氨酸，特别在其 N- 末端部分。例如，α－和 γ－麦醇溶蛋白的前 100 个氨基酸分别含有约 35％谷氨酰胺残基和 20％脯氨酸残基。不同的麦醇溶蛋白存在于小麦的每一次移种中，而在每一种类型中存在着氨基酸序列上的差异。麦醇溶蛋白的典型特征是其分子量约为 30-50 千道尔顿，以及它们在中性水溶液中不溶解。麦醇溶蛋白序列的例子包括但不限于小麦 α－麦醇溶蛋白序列，例如，基因库中提供的如下登录号的序列 :AJ133612 ;AJ133611 ;AJ133610 ;AJ133609 ;AJ133608 ;AJ133607 ;AJ133606 ;AJ133605 ;

AJ133604 ;AJ133603 ;AJ133602 ;D84341.1 ;U51307 ;U51306 ;U51304 ;U51303 ;U50984 ; 和 U08287。小麦 ω- 麦醇溶蛋白的序列为基因库登录号为 AF280605 的序列。

[0009] 现已发现，谷蛋白不耐受患者中缺乏通常存在于小肠中的消化谷蛋白所必需的酶。谷类蛋白不完全消化所产生的肽片段对这样的个体是有毒的 ;毒性最大的肽是来源于 α- 醇溶蛋白的肽，或称作 A- 醇溶蛋白的类似的蛋白质。

[0010] 含丝氨酸的肽（含 PSQQ 基序，可能还含 QQQP 基序，如见于 A- 醇溶蛋白的 11-19 残基上）似乎具有细胞毒效应。含酪氨酸的肽（含 QQPY 和 / 或 QPYP 基序，如见于 A- 醇溶蛋白的 75-86 残基上）与通过 T 细胞介导的免疫活性有关，因此而与毒性有关。

[0011] 实验证明，在罹患腹部疾病的患者，含丝氨酸的活性肽如 11-19 肽和含酪氨酸的活性肽如 75-86 肽，被粘膜上的酶不完全消化。残留的肽序列，如 11-18 和 77-84，仍然是有毒性的，这提示腹部疾病的病原学是与粘膜消化的缺陷相关连的，此病的发病机理起因于未消化的肽对粘膜的作用。这可能最终由于腹部疾病患者一种酶的缺乏所致，但至少有两种不同类型的肽残留物累积而引起粘膜组织的损伤。

[0012] 目前，除了对患者强制实行无谷蛋白膳食之外，对谷蛋白不耐受效应尚无有效的治疗方法。然而，由于含谷蛋白的谷类食品或谷蛋白本身的数量众多，这一处理方式对可供患者选择的食物构成了严格的限制。此外，虽然取消谷蛋白摄入改善了谷蛋白不耐受患者的预后，但是一些人们仍然可能因淋巴网状内皮细胞疾病（尤其是肠淋巴瘤）而死于此种疾病，特别是本说明书开头提到的那些存在严重谷蛋白过敏反应的人们。无谷蛋白膳食看来是减少了淋巴网状内皮细胞疾病进展的危险，然而表面上的临床缓解通常伴有组织学复发，这仅仅可由活组织检查或 IgA 类抗肌内膜抗体 (EMA) 滴度的提高而检出。

[0013] 鉴于谷蛋白过敏反应的严重性和广泛分布性，需要寻求更好的治疗、预防或改善此病效应的方法。因此，本发明的一个方面是通过提供预防或治疗谷蛋白不耐受所致病症的改善的组合物及其使用方法，来克服或至少部分缓解本领域存在的上述一些问题。

[0014] 本说明书中包括的对文献、正式记录、材料、方法、物品等的讨论仅仅用于提供对本发明背景的理解之用。这些材料中的任何一种或其全部都不提示或代表在本申请的每一个权利要求的优先权日之前所存在的与本发明相关的领域中的普通常识。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明的一个方面，提供一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的组合物，该组合物包括至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0017] 在一个实施方案中，番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 从番木瓜 (Carica papaya) 中得到。

[0018] 在另一个实施方式中，番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 包含如图 1 所示的氨基酸序列，或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0019] 按照本发明的组合物，可一步包含如本说明书描述的一种动物肠道酶提取物。

[0020] 在另一个实施方式中，按照本发明的组合物包含菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0021] 按照本发明的组合物可制剂成肠溶包衣片剂或胶囊。

[0022] 在本发明的一些实施方案中，组合物包含至少 15mg 番木瓜半胱氨酸蛋白酶

(caricain) 或其生物活性片段、变异体或类似物。

[0023] 本发明的另一个方面，提供一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的组合物，该组合物包含编码重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体的核酸分子。在一个实施方案中，该核酸分子包含如图 2 所示的核酸序列或其功能等同物。在另一个实施方案中，该核酸分子编码如图 1 所示的氨基酸序列或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0024] 按照本发明的组合物可进一步包含可表达重组菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的核酸分子。

[0025] 在本发明的另一个实施方案中，提供一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的组合物，其中该组合物包含一种可表达重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体的宿主细胞。

[0026] 在本发明的另一个实施方案中，组合物包含一种可表达重组菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的宿主细胞。

[0027] 本发明的另一个方面，提供一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的方法，该方法包括对需要施用该方法的患者施用一种组合物，该组合物包含本说明书描述的至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体。在本发明的一些实施方案中，该组合物包含至少 15mg 番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、变异体或类似物。在本发明的一些实施方案中，该组合物于饭前施用于需要服用该组合物的患者。

[0028] 在一个实施方式中，按照本发明的方法包括对需要施用该方法的患者施用一种包含肠道提取物的组合物。

[0029] 在另一个实施方式中，按照本发明的方法包括对需要施用该方法的患者施用菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0030] 本发明的另一个方面，提供一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受所致病症的方法，该方法包括对需要施用该方法的患者施用一种核酸分子，其中所述核酸分子可在患者体内表达如本说明书所描述的重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0031] 在一个实施方式中，按照本发明的方法包括对需要施用该方法的患者施用一种核酸分子，该核酸分子可在患者体内表达重组菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0032] 本发明的还有一个方面，提供一种从来自含谷蛋白材料制备食品的方法，该方法包括用番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体处理食品或含谷蛋白的材料，从而减少存在于食品中的源自谷蛋白的毒性寡肽的量。在一个实施方案中，按照本发明的方法可进一步包括用菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体对食品或含谷蛋白材料进行处理。

附图说明

[0033] 图 1 显示 Carica papaya caricain 的一级氨基酸序列 (GenBank 登录号 No.X66060)。

[0034] 图 2 显示 Carica papaya caricain 的一级氨基酸序列 (GenBank 登录号 No.X69877)。

[0035] 图 3 显示 Carica papaya caricain 的 mRNA 序列 (GenBank 登录号 No.X66060)。

[0036] 图 4 显示 Carica papaya caricain 的 mRNA 序列 (GenBank 登录号 No.X69877)。

[0037] 发明详述

[0038] 组合物

[0039] 在本发明的一个方面，提供一种用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的组合物，该组合物包括至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0040] 现已发现，番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 可修饰谷蛋白消化产生无毒肽后产生的毒性寡肽，从而提供一种预防或至少部分减轻其对谷蛋白不耐受个体毒性作用的改进的方法。不受理论的束缚，可预期该效应是酶量和经消化的谷蛋白量的剂量依赖性效应。

[0041] 如本说明书中所使用的，术语“番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain)”(EC3.4.22.30) 指代表性地在植物 (如 Carica papaya) 乳胶中发现的一种半胱氨酸蛋白酶。本领域已知的关于 caricain 的其它名称包括 :包括 ω- 番木瓜蛋白酶、番木瓜内肽酶 III、番木瓜肽酶 A、番木瓜肽酶 II 和番木瓜蛋白酶 III。番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 是番木瓜蛋白酶超家族的一个成员，它与其它植物和动物半胱氨酸蛋白酶是同型的。自然表达的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 是一种无活性酶原的形式，称作番木瓜半胱氨酸蛋白酶酶原 (pro-caricain)。蛋白酶的无活性形式包含一种由附加的 106 个 N- 末端氨基酸组成的抑制性前区。研究证明，番木瓜半胱氨酸蛋白酶酶原在体外激活中的限速步骤是前结构域 (prodomain) 的解离，该步骤之后是前区延伸的多肽链的溶蛋白性裂解。前驱区域提供可促进番木瓜半胱氨酸蛋白酶酶原 C- 末端裂片折叠的稳定支架 (见 Groves et al.,1996,Structure,4(10) :1193-1203)。是本发明者，首次将番木瓜半胱氨酸蛋白酶鉴定为将例如小麦谷蛋白的毒性寡肽转化为无毒片段的关键酶。

[0042] 在一个实施方案中，番木瓜半胱氨酸蛋白酶得自番木瓜 (Carica papaya)，由 Schack 于 1967 年发现 (Dubey K.at al.2007，番木瓜半胱氨酸蛋白酶 :其抑制剂的应用 ; African Journal of Biotechnology 6(9)1077-1086)。

[0043] 在另一个实施方案中，番木瓜半胱氨酸蛋白酶包括如图 1 所示的氨基酸序列，或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0044] 按照本发明的组合物可进一步包括一种肠酶提取物，例如在国际专利申请 PCT/AU03/00633(公开号 WO 2003/100051 ;其内容全文纳入本说明书作为参考) 中所描述的。本发明者首次确定了番木瓜半胱氨酸蛋白酶和 WO 2003/100051 中描述的肠酶提取物合用时的协同效应。

[0045] 至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain)

[0046] 在本发明的一个实施方案中，番木瓜半胱氨酸蛋白酶是按照熟练技术人员已知的常规方法从天然来源 (如番木瓜乳胶) 至少部分纯化的。在本发明的某个实施方式中，番木瓜半胱氨酸蛋白酶是用本领域已知的任何方法从番木瓜 (Carica papaya) 的乳胶中至少部分纯化的，这些方法包括但不限于 Azarkan M. 等 (“储存于番木瓜乳胶中的酶的分离和纯化”，JChromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.2003 790(1-2) :229-38)

和 Buttle D.J.(番木瓜半胱氨酸蛋白酶，Handbook of Proteolytic Enzymes,2edition, p.1130-1132,Elsevier,London) 中描述的方法。

[0047] 番木瓜属番木瓜树 (the tree Carica papaya) 的果实番木瓜 (Papaya)，也称作 **mamão**, tree melon，fruta bomba，lechosa 或 pawpaw。用于从天然来源如番木瓜乳胶分离番木瓜半胱氨酸蛋白酶的方法包括（但不限于）固－液萃取、液－液萃取、固相萃取、膜过滤、超滤、渗析、电泳、溶剂浓缩、离心、超速离心、液相或气相色谱法（包括分子大小排阻色谱法、亲和色谱法等），这些方法使用或不使用高压、冷冻干燥、蒸发、与各种“载体”（如抗体）共沉淀、结晶，以及它们的任何组合。熟练的技术人员应当明白如何以顺序的方式使用这些选项，以便在整个纯化过程中按照番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 的各部分的活性富集其各相继的部分。如本说明书所描述的，至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶的活性可用熟练技术人员已知的各种方法进行测定。

[0048] 固－液萃取包括（但不限于）使用各种溶剂、涡旋混合器、超声波及其它方法以促进萃取，以及使用过滤、离心及本领域中所描述的相关方法进行回收（例如见 Cannell RJP,Natural Products Isolation,Humana Press,1998)。可使用的溶剂的例子包括（但不限于）碳氢化合物溶剂、含氯溶剂、有机酯类、有机醚类、醇类、水，以及它们的组合。

[0049] 液－液萃取包括（但不限于）使用本领域已知的各种溶剂，例如碳氢化合物溶剂、含氯溶剂、有机酯类、有机醚类、醇类、水、各种水溶液，以及它们的组合。液－液萃取可用人工促进，或可自动化操作（完全或部分），溶剂可用本领域的标准技术加以去除和/或浓缩。

[0050] 膜过滤、反向渗透和超滤包括（但不限于）使用本领域已知的各种类型的膜，以及使用压力、真空、离心力，和/或可在膜过滤和超滤过程中使用的其它方法。

[0051] 渗析典型地包括使用选择性除去天然来源材料中各种组分的分子量截留膜，以便提高样品中番木瓜半胱氨酸蛋白酶的相对纯度。本发明还包括用本领域已知的各种方法（包括但不限于冷冻干燥和结晶）从渗析液或渗余物中回收纯化的和/或分离的提取物。

[0052] 色谱法包括（但不限于）使用常规柱色谱法、快速色谱法、高效液相色谱法 (HPLC)、中压液相色谱法 (MPLC)、超临界温度液相色谱法 (SFC)、逆流色谱法 (CCC)、移动床色谱法、模拟移动床色谱法、膨胀床色谱法，及平面色谱法。色谱法中可使用的吸附剂包括（但不限于）硅胶、氧化铝、硅酸镁吸附剂 (fiuorisil)、纤维素和改性纤维素、各种改性硅胶、离子交换树脂、分子大小排阻凝胶、化学改性凝胶，及本领域技术人员已知的其它吸附剂。本发明还包括使用两种或两种以上盐梯度以影响用色谱法分离和/或部分纯化番木瓜半胱氨酸蛋白酶。当使用水或水相时，可包含各种量的无机盐或有机盐，并/或用酸或碱将 pH 调节到不同的值，以加强分离和/或纯化。

[0053] 从天然来源至少部分纯化番木瓜半胱氨酸蛋白酶的方法还包括通过从有机提取物和/或分离的提取物和/或纯化的提取物除去溶剂来浓缩纯化的或部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶。除去溶剂的技术是本领域技术人员已知的，它们包括（但不限于）旋转蒸发、蒸馏（常压和减压）、离心真空蒸发 (speed-vac)、冷冻干燥以及它们的组合。

[0054] 当涉及本发明的肽、蛋白质和肽的类似物（如番木瓜半胱氨酸蛋白酶或菠萝蛋白酶）时，术语“至少部分纯化”代表性地指部分或完全没有其它组分（如其它蛋白、核酸、脂类、碳水化合物）的组合物，而这些组分是伴随非纯化状态（如天然状态或环境中的）肽、蛋白质或其类似物存在的。至少部分纯化的肽和蛋白质一般可以均匀的或接近均匀的状态

存在，它们既可以干燥状态存在也可在水溶液中存在。纯度和均匀性典型地坚决采用诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法等分析化学技术加以测定。在一个实施方案中，肽（如 caricain）可采用例如本说明书所描述的常规和已知的方法进一步纯化。

[0055] 在本发明的某个实施方案中，至少部分纯化的蛋白质（如 caricain）可构成组合物总重量的至少约百分之一或百分之几（重量%），例如组合物总重量的至少约 5 重量%。另一个实施方案中，至少部分纯化的 caricain 可构成组合物总重量的至少约 10 重量%。另一个实施方案中，至少部分纯化的 caricain 可构成组合物总重量的至少约 20 重量%。另一个实施方案中，至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 可构成组合物总重量的至少约 50 重量%。在还有另一个实施方案中，至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 可构成组合物总重量的至少约 80 重量%。在其它实施方案中，至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 可构成组合物总重量的至少约 90 重量%或 95 重量%或更多。

[0056] 番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 的活性检测

[0057] 采用一种或几种本说明书描述的方法可检测部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶降低谷蛋白毒性肽毒性的能力。本领域熟练技术人员会理解，从番木瓜乳胶或从其它任何合适的来源分离和纯化番木瓜半胱氨酸蛋白酶的方法将是使分离的肽酶的至少一些酶活性保留，以提供对谷蛋白不耐受所致病症的预防或治疗。本领域技术人员会懂得，有许多体外或体内试验的方法和技术可用于定性和 / 或定量测定至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶降低谷蛋白毒性肽毒性的能力，如本说明书所描述的那样。

[0058] 本说明书所描述的番木瓜半胱氨酸蛋白酶，可用其改变底物以灭活谷蛋白毒性寡肽的能力来加以鉴定，其中底物可包括（但不限于）麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白、黑麦醇溶蛋白或燕麦蛋白。如本说明书所述，谷蛋白毒性寡肽包括正常的人消化食用谷物（如小麦、黑麦、大麦等）中的醇溶蛋白和相应的储存蛋白时得到的肽类。据信，这样的寡肽在罹患谷蛋白不耐受所致病症（如口炎性腹泻）的患者身上起着作为 T 细胞抗原的作用。为了结合于 II 类 MHC 蛋白，免疫原性肽的长度通常为约 8-20 个氨基酸，更通常为 10-18 个氨基酸。这样的肽可包括 QQPY 或相应的含酪氨酸基序。测定寡肽对特定患者是否具有免疫原性，可用标准的 T 细胞激活试验和其它本领域技术人员已知的试验进行测定。番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 或其生物活性片段、类似物或变异体灭活谷蛋白毒性肽的能力，如本说明书所述，可用本领域已知的任何方法进行测定，例如，采用大鼠肝脏溶酶体 (RLL) 试验，如 WO 2003/100051 和 Cornell and Townley(1974 ;Gut,15(11) :862-869) 中所描述的，这两篇文献均列入本说明书作为参考。

[0059] 在某个实施方案中，按照本发明的 caricain 能使毒性肽改性，如含 PSQQ、QQQP 和 QQPY 基序的肽、小麦 A- 麦醇溶蛋白肽 QNPSQQQPQ（残基 11-19）、RPQQPYPQPQPQ（残基 75-86）、LGQQQPFPPQQPY（残基 31-43）、PQPQPFPSQQPY（残基 44-55）和 LGQGSFRPSQQN（残基 206-217）等。

[0060] 番木瓜半胱氨酸蛋白酶使底物改性的能力可用如下方法加以测定，例如通过将含 1mg/ml 底物和 10mg/ml caricain 的反应混合物于 37℃培育 1 小时后测定酶增加游离 NH_2- 浓度的能力。按照本发明的番木瓜半胱氨酸蛋白酶，在这样的条件下可增加游离氨基末端的浓度，通常至少约 10%，更通常为至少约 25%，更好为至少约 50%。按照本发明

的番木瓜半胱氨酸蛋白酶，还可降低大于约 1000Da 的寡肽（在 0.1ml 的 50mg/ml 底物中，与 0.2ml 的 10mg/ml 肽酶一起培养 2 小时）的毒性至少约 25％，通常至少约 50％，较好的至少约 10 倍。这些寡肽的毒性可用本领域已知的方法进行测定，例如，采用大鼠肝脏溶酶体 (RLL) 试验，如 WO 2003/100051 和 Cornell and Townley(1973) ;Clin.Chim.Acta 49 : 181-188 中所描述的，这两篇文献均列入本说明书作为参考。

[0061] 在本发明的一个实施方案中，番木瓜半胱氨酸蛋白酶显示去毒活性（如采用 RLL 试验测定的）为对溶酶体的保护达到至少约 20％，较佳为至少约 50％，或较佳为至少约 90％。

[0062] 在本发明的一些实施方案中，组合物包括至少 15mg 番木瓜半胱氨酸蛋白酶，或其生物活性片段，变异体和类似物。

[0063] 其它组合物

[0064] 在本发明的另一个实施方案中，受关注的组合物可包括番木瓜半胱氨酸蛋白酶与其它能灭活谷蛋白寡毒性肽的酶的组合，这些酶包括但不限于菠萝蛋白酶和肠道提取物，如国际专利申请 PCT/AU03/00633（公开号 WO 2003/100051，其内容纳入本说明书作为参考）中所描述的。

[0065] 本发明者发现，番木瓜半胱氨酸蛋白酶与肠道酶提取物合用（如 WO 2003/100051 所描述的），对麦醇溶蛋白毒性寡肽的裂解产生惊人的协同效应，例如，用大鼠肝脏溶酶体保护试验 (Rat Liver Lysosome Protection Assay) 所证实的那样。

[0066] 菠萝蛋白酶是一种植物蛋白酶，它典型地从菠萝 (Ananas comosus) 中分离而得。它的最适 pH 范围是 5-8（由底物而定），对肽键具有宽的特异性。菠萝蛋白酶可用本领域已知的标准技术从诸如菠萝来源纯化得到，这些技术包括但不限于 Yamada F. 等（“从菠萝果实纯化和鉴定，果实菠萝蛋白酶 FA2”;J Biochem(Tokyo).1976 ;79(6) :1223-34) 描述的方法。分离和纯化的菠萝蛋白酶也是商业上可购得的。

[0067] 番木瓜半胱氨酸蛋白酶是本发明者发现的从番木瓜乳胶洗脱的高分子量馏分（在 30-35KDa 范围内的馏分 4，见实施例部分），与其活性形式的序列一致 (Groves et al., 1996, Structure, vol4 :1193-1203)。用高效液相色谱仪在 Biosep SEC S 2000 上进一步纯化馏分 4，证实馏分 4 的前期高分子量部分包含 caricain、谷氨酰胺环化转移酶和木瓜凝乳蛋白酶，而后两种酶并不显示它们对麦醇溶蛋白的去毒化有明显的贡献。本申请人证明苯甲基磺酰氟 (PMSF) 在 6mM 浓度时不明显抑制馏分 4 对大鼠肝脏溶酶体的作用，证实了此馏分中存在的主要的酶不是丝氨酸蛋白酶。

[0068] 如本说明书所述的，肠道提取物可以从胃肠道的任何部分得到，包括但不限于十二指肠。肠道提取物可从任何种属得到，只要它显示对麦醇溶蛋白毒性肽的去毒能力，单独使用或与番木瓜半胱氨酸蛋白酶产生协同作用的能力。在本发明的某个实施方案中，肠道提取物来自猪肠子。

[0069] 这些蛋白质的其它动物形式也可使用，或它们的改性形式可分离自其它商业允许的渠道。

[0070] 本发明的组合物也可包含其它酶，例如（但不限于）真菌蛋白酶，得自曲霉 (Aspergillus spp.)，如米曲菌 (Aspergillus oryzae)（例如，Byun et al.(2001) J.Agric.Food Chem.49,2061-2063) 和乳酸杆菌 (Lactobacilli spp.)，如瑞士乳酸杆菌

(如 Vesanto et al.,(1995)Microbiol.141,3067-3075) 和乳酸乳球菌 (Mayo et al.,(1991)Appl.Environ.Microbiol.57,38-44)。

[0071] 生物活性片段、变异体和类似物

[0072] 如本说明书关于番木瓜半胱氨酸蛋白酶所使用的,术语“生物活性片段”代表性地指在体外或体内试验中保留其谷蛋白肽去毒化能力的片段。

[0073] 受关注的肽片段包括(但不限于)至少约 20 个连续氨基酸的片段,更通常为至少约 50 个连续氨基酸的片段,并可包含 100 个或更多个氨基酸,直至完全蛋白,还可进一步延伸至包括额外的序列。对于每一种情况,关键的标准是该片段是否保留使与谷蛋白不耐受所致病症有关的毒性寡肽改性的能力。

[0074] 如本说明书中所使用的,术语“天然的”较好地是指具有存在于自然界的氨基酸序列(如天然蛋白质)的番木瓜半胱氨酸蛋白酶。这样的片段一般可采用本领域技术人员熟知的鉴定肽酶活性的技术加以鉴定,例如,采用如上文所描述的技术。

[0075] 如本说明书中关于菠萝蛋白酶所使用的,术语“生物活性片段”典型地指能保留其与番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体合用时使谷蛋白肽去毒化能力的菠萝蛋白酶片段。

[0076] 如本说明书中关于番木瓜半胱氨酸蛋白酶所使用的,术语“类似物”典型地指其具有的氨基酸序列与天然存在的番木瓜半胱氨酸蛋白酶的氨基酸序列基本上相同的肽酶。如本说明书中关于菠萝蛋白酶所使用的,术语“类似物”典型地指其具有的氨基酸序列与各自天然存在的酶的氨基酸序列基本上相同的肽酶。

[0077] 如关于类似物所使用的,术语“基本上相同的”典型地指取代或添加一个或更多的氨基酸,使所得类似物具有天然存在酶的至少一些生物活性。类似物可以是天然存在的,例如等位基因变异或 mRNA 拼接变异体,或可以用本领域技术人员可使用的合成或重组技术进行构建。

[0078] 如本说明书中关于番木瓜半胱氨酸蛋白酶和菠萝蛋白酶所使用的,术语“变异体”典型地指显示其氨基酸序列与天然酶至少有 80%相同的酶。还有的预期的是在实施方案中,变异体包含与天然分子至少 90%相同的氨基酸序列,较佳为至少 95%相同,较佳为至少 98%相同,较佳为至少 99%相同,或较佳为至少 99.9%相同。百分率的鉴定可采用本领域技术人员已知的方法进行目视检测和 / 或数学计算。变异体可以是天然存在的、合成的或重组的。

[0079] 在本发明的一个实施方案中,番木瓜半胱氨酸蛋白酶或菠萝蛋白酶的变异体包括一种与天然形式的酶基本相同的酶,但其氨基酸序列因一个或几个缺失、插入或替代而不同于天然形式。某些实施方案包括含与天然形式相比有一个至十个氨基酸残基缺失、插入或替代的氨基酸序列。一个特定的序列可被例如具有相似理化性质的残基替代。这种一种脂肪族残基对另一种脂肪族残基的保守取代的例子为例如 Ile、Val、Leu 或 Ala 对另一种的取代;一种极性残基对另一种的取代,例如 Lys 和 Arg 之间或 Glu 的 Asp 之间或 Gln 和 Asn 之间;一种芳香族残基对另一种的取代,例如 Phe、Trp 或 Tyr 对另一种的取代。其它的保守取代,例如,包括具有类似疏水性的整个区域的取代,是本领域熟知的。变异体也可由天然肽酶的氨基酸平截引起。本发明涵盖的其它变异体包括(但不限于)去糖基化氨基酸或其片段,或当其与天然酶比较时显示糖基化增加的那些氨基酸。

[0080] “保守的氨基酸取代”是其氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基取代的一种取代。具有类似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已被限定。这些家族包括具有碱性侧链（如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（如天冬氨酸、谷氨酸）、不带电的极性侧链（如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸）、非极性侧链（如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸）、β-分支侧链（如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香族侧链（如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸）的氨基酸。因此，番木瓜半胱氨酸蛋白酶的一个氨基酸残基较佳为被相同侧链家族的另一个氨基酸残基取代。在一个优选实施方案中，可随机地沿着全部或部分酶编码序列引入突变，例如通过饱和诱变引入突变。可将所产生的突变体进行筛选，以鉴定可证实天然酶的至少某些生物活性的变异体。进行诱变后，可用本说明书描述的方法重组表达该编码的蛋白质并测定酶的活性。

[0081] 还可展望的是，不改变天然形式番木瓜半胱氨酸蛋白酶（caricain）或菠萝蛋白酶基本序列的修饰，包括（但不限于）蛋白质的化学衍生作用（如乙酰化或羧化）、糖基化作用（如在其合成和加工过程中或在进一步加工步骤中改变蛋白质的糖基化模式），及具有磷酸化氨基酸残基（如磷酸酪氨酸、磷酸丝氨酸或磷酸苏氨酸）的序列。

[0082] 本发明实践中，还可使用的是用分子生物学技术和/或化学方法加以修饰的番木瓜半胱氨酸蛋白酶或菠萝蛋白酶，这样的修饰可改善它们对蛋白降解和/或酸性条件（如见于胃的酸性环境）的耐受性，并使其溶解性能最适化，或使其更适合于作为治疗剂使用。这些蛋白质的类似物包括含有天然存在的L-氨基酸之外的残基（如D-氨基酸或非天然存在的合成氨基酸）的蛋白质。

[0083] 按照本发明的番木瓜半胱氨酸蛋白酶可用本领域已知的常规方法在体外合成。可购得各种市售合成装置，例如自动合成仪（如CS936X肽合成仪，CSBio Company，Inc.）。使用这样的合成仪，一个技术熟练的人员就可容易地将一个或多个非天然氨基酸取代天然存在的氨基酸。特定的序列和制备方法可按方便、经济、所需纯度等加以确定。如果需要，合成时可在蛋白中引入各种基团，它们可使蛋白连接到其它分子或表面上。例如，可用半胱氨酸制得硫醚，可用组氨酸连接到金属离子复合物上，可用羧基形成酰胺或酯，可用氨基形成酰胺，等等。

[0084] 核酸分子

[0085] 本发明的还有一个方面，提供一种预防或治疗谷蛋白不耐受所致病症的组合物，该组合物包括编码番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的核酸序列的核酸分子。该核酸分子应能驱使番木瓜半胱氨酸蛋白酶的重组类似物（包括其生物活性片段、类似物或变异体）的表达。例如，不受理论的限制，该核酸分子可将受试者胃肠道内层细胞转染到被给予此核酸分子的人身上，在此掺入受试者的基因组。核酸分子的掺入随后即引起重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的表达。

[0086] 如本说明书所用，术语“核酸分子”包括DNA分子（如cDNA或基因组DNA）和RNA分子（如mRNA）及例如通过使用核苷酸类似物所产生的DNA或RNA的类似物。该核酸分子可以是单链的，或双链的，但优选双链DNA。本发明所涵盖的是天然存在和合成的核酸分子或其结合，它们的核酸序列编码如上文所述的番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0087] 如本说明书所用的，术语“天然存在的”核酸分子典型地指具有存在于自然界的核

苷酸序列的 RNA 或 DNA 分子（如在番木瓜植物中可获得的）。

[0088] 如本说明书所用的，术语“基因”和“重组基因”较佳为指包括一个开放阅读框架的编码本说明书所述肽酶的核酸分子，并可进一步包括非编码的调节序列和内含子。

[0089] 例如，编码番木瓜半胱氨酸蛋白酶的核酸分子包含与编码天然存在番木瓜半胱氨酸蛋白酶的核苷酸序列约 65％至约 99％或更多同源的核苷酸序列。编码番木瓜半胱氨酸蛋白酶的核酸分子可从各种来源获得，包括但不限于番木瓜，而如本发明的精神所设想的类似物可得自非植物种属，包括但不限于人、猪、羊和牛。

[0090] 在本发明的某个实施方案中，核酸分子包括如图 2 所示核酸序列或其功能等同物。

[0091] 如本说明书中所用的，术语“其功能等同物”是指与作为其功能等同物的序列具有类似的功能的序列。“类似的功能”是指若干序列在例如编码番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体上享有共同的功能。在一些实施方案中，功能等同物序列可与作为其功能等同的序列显示出序列的同一性。功能等同物序列与作为其功能等同的序列之间的序列同一性可以是沿功能等同物长度的至少 50％，沿功能等同物长度的至少 60％，或大于沿功能等同物长度的 70％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或 99％。

[0092] 在本发明的另一个实施方案中，核酸分子编码如图 1 所示的氨基酸序列或如本说明书中所述的其生物活性片段、类似物或变异体。本发明的核酸分子（如此处所述）可被插入载体，用作基因治疗载体。

[0093] 在本发明的另一个实施方案中，提供一种组合物，如本说明书所述，进一步包含编码如本说明书所述的重组菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0094] 宿主细胞

[0095] 在本发明的还有一个方面，提供用于预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的组合物，该组合物包括一种宿主细胞，其中宿主细胞可表达重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶，或其生物活性片段、类似物或变异体，如本说明书所述。在本发明的某些实施方案中，宿主细胞是真核细胞或选自如下种属中任何一种的细胞株：胚胎干细胞、胚胎癌细胞、造血干细胞、肝细胞、成纤维细胞、肌原细胞、角质化细胞、内皮细胞、支气管上皮细胞和免疫细胞。宿主细胞还可以是低等生物，如细菌。在一个实施方案中，宿主细胞可以是可定居于受者胃肠道的微生物，例如但不限于乳酸杆菌 (Lactobacillus spp.)。

[0096] 在本发明的另一个实施方案中，宿主细胞是工程化表达如本说明书所述重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶和 / 或菠萝蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的植物。例如，宿主细胞可以是可食用植物，其中需要该植物的患者（如出现谷蛋白不耐受症状或有出现谷蛋白不耐受症状危险的患者）可消化该可食用植物，因而给以一剂重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶和 / 或菠萝蛋白酶（或如本说明书所述其生物活性片段、类似物或变异体）。本说明书所用术语“植物”包括整株植物、植物的部分或器官（如叶、茎、根等），植物细胞、种子及其子代。本说明书所用术语“植物细胞”，进一步包括而不限于，从种子、悬浮培养物、胚胎、分生组织的局部、愈伤组织、叶子、根、嫩枝、配子体、孢子体、花粉和小孢子中得到或发现的细胞。植物细胞还可理解为包括工程化细胞，如得自前述组织的原生质体。按照本发明可使用的植物种类一般与可顺应转化技术的高等植物的种类一样广泛，包括单子叶和双子叶植物。特别优选的植物包括玉米、大豆、向日葵、高粱、芸苔、苜蓿、棉花、稻谷、大麦和小米。

[0097] 任何可用于将植物细胞工程化表达重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶和/或菠萝蛋白酶（或如本说明书所述其生物活性片段、类似物或变异体）的合适的方法包括（但不限于）美国专利6,977,325（其内容纳入本说明书作为参考）中描述的方法。

[0098] 组合物还可进一步包括能表达重组菠萝蛋白酶或如本说明书所述其生物活性片段、类似物或变异体的宿主细胞。例如，在本发明的某个实施方案中，组合物包括表达重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶（或如本说明书所述其生物活性片段、类似物或变异体）和重组菠萝蛋白酶（或如本说明书所述其生物活性片段、类似物或变异体）的宿主细胞。在另一个实施方案中，本发明的组合物包括表达重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶（或如本说明书所述其生物活性片段、类似物或变异体）的第一宿主细胞和表达重组菠萝蛋白酶（或如本说明书所述其生物活性片段、类似物或变异体）的第二宿主细胞。

[0099] 药物组合物

[0100] 按照本发明的组合物，如上述说明书所述，可以是药物组合物的形式，其中组合物进一步包括药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂和/或佐剂。本发明的药物组合物可单独使用或与其它化合物（如治疗用化合物）联合使用。

[0101] 如本说明书所用的，短语“药学上可接受的载体”包括（但不限于）与药物施用相容的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延缓剂，等等。还可在组合物中掺入补充的活性化合物。

[0102] 药物组合物被配制成与其预期的给药途径相适应。代表性的给药途径为胃肠道给药，包括口服（如摄入、吸入）或直肠给药。用于胃肠道给药的溶液或混悬液可包括一种或几种如下组分：无菌稀释剂，如注射用水、溶于纯水的氯化钠溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成的溶剂；抗菌剂，如对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，如乙二胺四乙酸；缓冲剂，如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；及调节张力的试剂，如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱（如盐酸或氢氧化钠）调节pH。

[0103] 一般来说，药物组合物在制造和储存条件下是稳定的，并且对微生物如细菌和真菌的污染作用具有防腐性。载体可以是一种包含例如水、乙醇、多元醇（如甘油、丙二醇或液态聚乙烯乙二醇等）及其合适的混合物的溶剂或分散介质。通过例如使用卵磷脂包衣，对于分散液来说通过维持所需的颗粒大小，或通过使用表面活性剂，可保持适当的流动性。通过掺入各种抗细菌剂和抗真菌剂可达到阻止微生物的作用，例如，掺入对羟基苯甲酸酯类、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在很多情况下，组合物中以包括等渗剂为佳，例如包括糖、氯化钠或多元醇如甘露醇或山梨醇。

[0104] 口服组合物一般包括一种惰性稀释剂或一种可食用载体。为了口服治疗给药的目的，活性化合物可与赋形剂掺和，以片剂、含锭或胶囊（如明胶胶囊）的形式使用。口服组合物也可用液态载体制备成漱口剂。药学上相容的粘合剂和/或辅助材料也可作为组合物的一部分包含在组合物中。片剂、丸剂、胶囊、含锭等可包含任何一种下面的成分或类似性质的化合物：粘合剂，如微晶纤维素、西黄耆胶或明胶；赋形剂，如淀粉或乳糖；崩解剂，如海藻酸、羟甲淀粉钠（Primogel）或改性玉米淀粉；润滑剂，如硬脂酸镁或其它硬脂酸盐；助流剂，如胶态二氧化硅；甜味剂，如蔗糖或糖精；或调味剂，如薄荷、水杨酸甲酯或橙味剂。

[0105] 在一个实施方案中，本发明的组合物可制备可采用载体，保护本发明组合物不会快速地从机体消失，比如控释制剂包括例如埋植剂和微囊包埋的给药系统。可使用生物可

降解的、生物相容的聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这些制剂的方法对于本领域技术人员来说是不言自明的。脂质体混悬液（包括靶向于带有抗病毒抗原的单克隆抗体感染细胞的脂质体）也可用作药学上可接受的载体。

[0106] 为了方便给药而且使剂量均匀，有益的是将口服或胃肠外组合物配制计量单位形式。本说明书所用的“计量单位形式”，指与给予受治疗者的单一剂量相匹配的完全分离的单位；每一单位包含经计算可产生所需治疗效应的预定量的与所需的药物载体相关的活性化合物。这些化合物的毒性和治疗效应可采用标准药学规程包括体外实验、细胞培养或实验动物进行测定，例如，根据所研究的化合物，测定 LD_{50}（使 50％个体死亡的剂量）和 ED_{50}（在 50％个体上治疗有效的剂量）。毒性和治疗效应之间的剂量比是治疗指数，可表示为 LD_{50}/ED_{50} 比值。显示高治疗指数的化合物是较适宜的。显示毒性副作用的化合物可以使用，但应设计一种给药系统，这种给药系统将这样的化合物靶向受累部位，以使其对非累细胞的损害最小化，从而降低副作用。

[0107] 从体外实验、细胞培养试验或动物实验得到的数据可用于制定在人体上使用的剂量范围。剂量较佳地为处于包含 ED_{50} 而极少或没有毒性的血浓度范围内。根据所用剂型和给药途径可在此范围内改变剂量。酶的治疗有效剂量最初可从体外试验结果估计。这样的信息可用于更精确地确定对人有用的剂量。在本发明的一个实施方案中，番木瓜半胱氨酸蛋白酶的有效剂量为成人至少 0.1mg/kg 体重，每餐服用，儿童则典型地将该剂量减半。

[0108] 根据患者的情况、受治疗的病情及给药途径，番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、变异体和类似物通常可以每天约 0.1mg/kg 体重至约 500mg/kg 体重的剂量给药，例如对于一个普通人大约每天 15mg。例如，番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物和变异体的典型剂量可以是每个成人至少约 1mg，较通常为至少约 15mg，较佳为至少约 50mg，较佳为不大于约 500mg。对于儿科制剂来说，剂量可作适当调整。儿童有效剂量可较低，例如至少约 0.1mg 或 0.5mg 的番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、变异体和类似物。在涉及例如番木瓜半胱氨酸蛋白酶和肠内氨酰基脯氨酸二肽酶的联合治疗中，可给予相应剂量的组合物；但是，剂量比会受到组合物对胃灭活作用的相对稳定性的影响。番木瓜半胱氨酸蛋白酶在本发明组合物中可以至少部分纯化的提取物的形式存在，或以合成的药学上可接受蛋白的形式存在。

[0109] 本领域技术人员会容易地理解，剂量水平可根据特定酶、症状严重程度和患者对副作用易感性而变化。在一些实施方案中，特定酶的剂量可被本领域技术人员用各种方法容易地加以确定。一种可作例示的方法是测定克服症状所需的指定化合物的生物活性。

[0110] 在本发明的一些实施方案中，本发明的组合物包括至少 15mg 番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、变异体和类似物。

[0111] 熟练的技术人员会理解，某些因素可影响有效治疗一个患者所需的剂量和有效治疗患者所需的时间，例如包括所用特定化合物的活性、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、给药时间、给药途径、排泄率、任何联合用药、拟调整的表达或活性的程度、对谷蛋白的易感性、先前的治疗和其它存在的疾病。

[0112] 药物组合物可与使用说明书一起包含在一个容器、包装或分配器中。

[0113] 对于口服制剂，本发明的组合物可单独使用，或与适当的添加剂一起制成片剂、粉剂、颗粒剂或胶囊剂。这些添加剂为例如，常规的添加剂如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯

淀粉；粘合剂如微晶纤维素、纤维素变体、阿拉伯胶、玉米淀粉和明胶；崩解剂如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠；润滑剂如滑石或硬脂酸镁；如果需要，还可有稀释剂、缓冲剂、湿润剂、防腐剂和调味剂。

[0114] 在本发明的一个实施方案中，口服制剂包括肠溶包衣制剂，从而使活性剂到达肠道中。肠溶制剂通常用于保护活性成分不受胃中强酸内容物的破坏。用不溶于酸性环境而溶于碱性环境的聚合物薄膜将固体剂型包衣，可制成这样的制剂。例示性的薄膜有醋酸邻苯二甲酸纤维素、聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素醋酸琥珀酸酯、甲基丙烯酸脂类共聚物类、醋酸邻苯二甲酸纤维素，和丙烯酸包衣系统，如 Acryl-Ease(Colorcon. 卡乐康公司）。

[0115] 其它肠溶制剂包括用生物学上易蚀化的聚合物制成的工程化聚合物微球，它与胃肠道粘膜和细胞内层形成强粘着相互作用，可穿越粘膜吸收性上皮和覆盖派尔集合淋巴结(Peyer′ s patches)淋巴组织的连滤泡上皮。聚合物与肠上皮保持长时间接触，实际上穿过细胞和从细胞之间穿透肠上皮。例如，见 Mathiowitz et al.(1997)Nature 386(6623)：410-414。给药系统还可使用一个多孔水凝胶 (SPH) 和 SPH 复合材料 (SPHC) 的核心，如 Dorkoosh et al.(2001)J Control Release 71(3)：307-18) 所描述的。

[0116] 预防或治疗的方法

[0117] 本发明的另一个方面，提供一种预防或治疗谷蛋白不耐受相关病症的方法，该方法包括给予有需要的患者如本说明书所描述的本发明的组合物。

[0118] 本发明的一些实施方案中，该方法包括给予有需要的患者至少 15mg 番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、变异体和类似物。本发明的一些实施方案中，该方法包括饭前、饭后或饭中给予有需要的患者至少 15mg 番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、变异体和类似物。

[0119] 本发明的方法除了可用作治疗目的外，还可用于预防或防护。因此，如本说明书所用的，术语“治疗”等指现有的谷蛋白不耐受疾病、病症或症状严重程度的任何减轻，特别是按如下症状严重程度进行测量，这些症状包括（但不限于）疲劳、慢性腹泻、营养素吸收不良、体重减轻、腹胀和贫血。如本说明书所用的，术语“预防”等指防止谷蛋白不耐受性疾病、病症或症状的发生。谷蛋白不耐受的其它指数包括（但不限于）谷蛋白特异性抗体的存在、组织转谷氨酰胺酶特异性抗体的存在、促炎症反应 T 细胞和细胞因子的存在、组织学或其它检查证明的小肠绒毛结构的损伤、小肠渗透性的增加，等等。

[0120] 可受益于本发明方法的患者可以是任何年龄的患者，包括成人和儿童。儿童特别受益于预防疗法，如预防早期暴露于谷蛋白毒性肽，可防止此病的初期发展。适合于预防处理的儿童，可用遗传缺陷基因测试加以鉴定，例如，用组织相容性抗原分型、家族史、T 细胞测定，或本领域技术人员已知的其它方法。

[0121] 在本发明的一个实施方案中，预防或治疗的方法还包括对需要该处理的患者施用有效剂量的如本说明书所述的至少部分纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体。

[0122] 在另一个本发明实施方案中，预防或治疗的方法还包括对需要该处理的患者施用有效剂量的菠萝蛋白酶（或如本说明书所述的其生物活性片段、类似物或变异体）、肠道提取物（如前文所述）或他们的组合。根据需要，可将番木瓜半胱氨酸蛋白酶与菠萝蛋白酶

和 / 或肠道提取物一起给药，或以分开的剂量给药。

[0123] 本发明的另一个方面，预防或治疗的方法包括对需要该处理的患者施用包含编码如本说明书所述重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的核酸序列的核酸分子。本发明的方法还可进一步包括对患者施用包含编码重组菠萝蛋白酶（或如本说明书所述的其生物活性片段、类似物或变异体）的核酸序列的核酸分子。

[0124] 在本发明的还有一个方面，预防或治疗的方法包括对需要该处理的患者施用可在患者身上表达如本说明书所述重组番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体的宿主细胞。本发明的方法也可进一步包括对患者施用可表达重组菠萝蛋白酶（或如本说明书所述的其生物活性片段、类似物或变异体）的宿主细胞。

[0125] 按照本发明的方法也可与其它治疗形式合用，包括（但不限于）对需要该处理的患者施用组织转谷氨酰胺酶抑制剂、抗炎剂、抗溃疡剂、肥大细胞稳定剂，和 / 或抗变态反应剂。这些药剂的例子包括具有抗炎性的 HMG-CoA 还原酶抑制剂，如康帕丁、洛伐他丁、辛伐他丁、普伐他丁和阿托伐他丁；抗变应性的组胺 H1 受体拮抗剂，如阿伐斯丁、西替利嗪、地氯雷他定、依巴斯汀、非索非那定、左西替利嗪、氯雷他定和咪唑斯汀；白三烯受体拮抗剂，如孟鲁司特和扎鲁司特；环氧化酶 2 抑制剂，如塞来考昔和罗非考昔；p38MAP 激酶抑制剂，如 BIRB-796；及肥大细胞稳定剂，如色甘酸钠 (chromolyn)、吡嘧司特、普昔罗米、瑞吡司特、四唑硫蒽酮、氨氯地平、奈多罗米和普克罗米。

[0126] 各种给药方法都可以采用，较佳为采用口服给药，例如与膳食合用。根据疾病的性质、给药频率、给药方式、药剂从宿主体内清除等各种因素，治疗制剂的剂量可在很宽的范围内变动。初始剂量可以较大，随后用较小的维持剂量。剂量可按每周一次或两周一次的低频率给药，或更经常地，分成较小的剂量每天随膳食给药，半周一次给药，或按维持有效剂量水平所需的其它方式给药。

[0127] 治疗效应可按临床结果或可用免疫学或生物化学试验进行测定。通过测定损伤部位细胞因子的释放的测量，或采用本领域已知的检测自身免疫 T 细胞存在的其它试验，对活性 Th1 细胞进行计数，可测定有害 T 细胞活性的抑制。另外，可根据疾病症状的严重程度的降低。

[0128] 食品的制备

[0129] 本发明的另一个方面，提供从含谷蛋白材料得到食品的制备方法，该方法包括用番木瓜半胱氨酸蛋白酶或其生物活性片段、类似物或变异体处理食品或含谷蛋白材料，从而减少存在于食品中的来自谷蛋白的毒性寡肽的量。

[0130] 本发明的另一个方面，该方法进一步包括用菠萝蛋白酶（或如本说明书所述的其生物活性片段、类似物或变异体）处理食品或含谷蛋白材料。

[0131] 对文献、记录、材料、装置、物品等的讨论包括在本说明书中，仅仅为了提供本发明背景材料的目的。它并不提示或代表这些内容的任何部分或全部形成现有技术基础的一部分，或成为本申请每一权利要求优先权日前与本发明相关的领域中的普通常识。

[0132] 最后，应理解的是，可进行各种其它的变更和 / 或改变而不背离如此处概述的本发明的精神。

[0133] 按照本发明的某些实施方案，组合物及其在谷蛋白不耐受所致病症的预防或治疗上的应用在下面的实施例中加以描述。但是，应当理解，下面的描述只是用以说明本发明，

而不应以任何方式作为对上面描述的本发明通用性的限制。

实施例

[0134] 材料

[0135] 番木瓜半胱氨酸蛋白酶粗品是从干燥的番木瓜乳胶（酶溶液）中提取（见实施例2）。番木瓜乳胶是从番木瓜果实中分离得到的蛋白水解酶的食品级混合物。在两个大鼠肝脏溶酶体(RLL)试验中，采用通常量的麦醇溶蛋白消化物（本试验中为5mg），番木瓜半胱氨酸蛋白酶粗品提供了良好的保护作用，在浓度约10mg/ml时提供约92%-94%的保护作用。

[0136] 按例如Cornell&Townley(1973;Clinica Chimica Acta 49:181-188)和Cornell&Townley(1974;Gut,15(11):862-869)中所描述的，大鼠肝脏溶酶体(RLL)试验基于这样的事实：小麦醇溶蛋白的胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰酶消化液破坏大鼠肝脏溶酶体，引起这些细胞器混悬液的光密度（于400nm）降低。这是存在于消化液中的肽的细胞毒反应的迹象。但是，如果将酶提取物与醇溶蛋白的毒性消化液预培育2个小时，则与溶酶体一起培育后光密度的变化就非常小。通过比较对照组（无毒性消化液）、毒性样品（与醇溶蛋白毒性消化液一起培育的溶酶体）和提取物处理的样品（在加入溶酶体前醇溶蛋白毒性消化液与酶提取物预培育），可以测得保护的程度。保护指数(P.I.)可按如下公式计算：

[0137]

$$P.I.(\%) = \frac{\text{毒性样品降低\%} - \text{提取物处理样品降低\%}}{\text{毒性样品降低\%}} \times 100$$

[0138] 实施例1：分离实验

[0139] 为了进一步表征番木瓜半胱氨酸蛋白酶的特征，在离子交换羧甲基(CM)Sephadex C-50柱上和体积排阻Sephacryl S-300柱上，对番木瓜乳胶进行了分离。

[0140] 将离子交换柱(3.2×20cm)用0.02M磷酸盐缓冲液(pH4.6)和加在初始缓冲液溶液(30ml)中的2g木瓜蛋白酶粗品进行平衡。得到未吸附的部分后，其它部分用提高pH的缓冲液洗脱，先采用0.05M磷酸盐缓冲液(pH6.8)，然后采用同样pH但含0.1M、0.3M和0.7M氯化钠的含盐缓冲液。将各馏分对蒸馏水进行透析，并冷冻干燥。然后用RLL试验对10mg/ml浓度的这些馏分进行测试。结果见如下表1：

[0141] 表1：离子交换色谱法

[0142]

馏分	得率%	洗脱条件	保护指数（%）
1	9.4	未吸附	40
2	2.0	pH改变	53
3	20.0	0.1-0.3MNaCl	70
4	15.0	0.7M NaCl	84

[0143] 然后，将从离子交换色谱法和体积排阻色谱法分离收集的馏分进行RLL试验（如本说明书所描述的，如参照WO 2003/100051和Cornell&Townley(1973;Clinica Chimica

Acta 49 :181-188),它们的内容纳入本说明书作为参考) 和 PEP 试验 (如本说明书所描述的,例如 Marti 等 :脯氨酰肽链内切酶介导的谷蛋白中 T 细胞表位的破坏,化学和免疫学特征 . J Pharmacol Exp Ther. 2005,312(1) :19-26 ;其内容纳入本说明书作为参考),以表征番木瓜乳胶活性馏分。PEP 试验用 Z- 甘氨酰脯氨酸 -4- 硝基 - 苯胺为底物,测定对脯氨酸残基 C- 末端侧的攻击率。

[0144] 体积排阻 Sephacryl S-300 柱 (88×2.2cm) 先用磷酸盐缓冲的盐水 (pH5.2) 平衡,并小心地施加 1.2g 番木瓜乳胶以缓冲液 (10ml) 配制的样品,然后以 30ml/ 小时速率连续洗脱。收集每份 15ml 的馏分,用 1M 氢氧化钠调节 pH 至 7.5,每个馏分用 0.2ml 样品直接进行测定。所得结果见表 2。

[0145] 表 2 :用 RLL 试验测试 Sephacryl S300 馏分

[0146]

样品	保护指数 (%)
馏分 1	8
馏分 2	1
馏分 3	8
馏分 4	58
馏分 5	64
馏分 6	99
馏分 7	100
馏分 8	75
馏分 9	29
馏分 10	19

[0147] 如上面的表 2 所显示的,馏分 6 和 7 提供了最高的保护值,对应于分子量约 30,000 道尔顿的蛋白质。馏分 5 包含最大量的脯氨酰肽链内切酶 (PEP),而馏分 8 含有最大量的蛋白酶,如苯甲酰精氨酸乙酯 (BAEE) 试验所测得的那样 (见例如 Arnon R. (1970)Methods in Enzymology,XIX,226-228 ;其内容纳入本说明书作为参考)。后面这些酶通常报道具有约 23,000 道尔顿的分子量。

[0148] 实施例 2 :植物 / 动物来源酶的协同效应

[0149] 将猪肠道酶提取物 (如按 WO 2003/100051 中描述的方法) 与番木瓜半胱氨酸蛋白酶粗品制备合并,用来评估它们在谷蛋白毒性肽去毒化能力上是否有协同效应,如采用前文描述的 RRL 试验进行测定。番木瓜半胱氨酸蛋白酶粗品的制备如下 :将番木瓜乳胶提取物溶解在水中,调节硫酸铵的浓度为 60%,过滤收集所得的沉淀,将其进行透析和冷冻干

燥。此材料经色谱法（CM Sephadex 柱）用磷酸盐缓冲液进一步富集，用含 0.7M 氯化钠的粗 QC 洗脱，然后透析和冷冻干燥。将酶制备以 6mg/ml 浓度用 RLL 试验进行测试。

[0150]

	猪肠道提取物 (6mg/ml)	Caricain 粗品 (6mg/ml)	联合使用 (1:1) (6mg/ml)
保护指数 (%)	61	71	92*

[0151] * 与 10mg/ml 木瓜蛋白酶粗品单独使用所提供的保护大致相同。

[0152] 实施例 3：耐热耐酸性

[0153] 已证明番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 暴露于热或酸性环境后，其活性保留约 70％。例如，本申请人通过其对 CM Sephadex 色谱法分离所得馏分 4 在加热于 85℃后活性保留约 80％的观察，证明了番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 高度耐热。此外，当馏分 4 用 0.05M 盐酸处理 15 小时后，仍保留其活性的 70％，这证明番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 也是耐酸的。

[0154] 实施例 4：蛋白质组学研究

[0155] 本申请人通过质谱分析证明，番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 是上面实施例 1（表 1）中所指的馏分 4 中的主要蛋白。

[0156]

所鉴定的蛋白	所鉴定的肽的数目
Caricain 前体 (EC 3.4.22.30)	17 (38%覆盖)
木瓜凝乳蛋白酶前体 (EC 3.4.22.6)	6 (18%覆盖)
谷氨酰胺环化转移酶前体 (EC 2.3.2.5)	2 (7%覆盖)

[0157] 蛋白质组学分析由 Joint Proteomics Services Facility at the Ludwig Institute for Cancer Research 和 The Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research (Melbourne, Australia) 用如下参数进行分析：

[0158]

为公开这些结果，下面的信息是期刊所需要的：	
在 MS/MS 数据库检索的信息	
产生峰值表的软件	提取 msn（Thermo Fisher Scientific 2.0 版）
使用的参数	最小质量 m/z 700，最大质量 m/z 5000 分组公差，1.5 中间扫描，1 每组最小扫描，1 前驱负荷，AUTO DTA 中的最小峰值，10
检索引擎	Mascot 算法（Matrix Science，2.1.04 版）
检索参数	
所考虑的酶的特异性	半-胰蛋白酶 考虑胰蛋白酶的全部肽及在一个末端显示胰蛋白酶特异性（KR）而其它末端可能是非胰蛋白酶剪切的肽
允许的忽略的剪切#	3. 考虑消化不完全的部分片段
固定的修饰	如果烷基化用碘乙酸，对于羧甲基（半胱氨酸）为+58Da。如果烷基化用碘代乙酰胺，对于脲基甲基（半胱氨酸）为+57Da。
可变的修饰	对于乙酰化（N-末端），为+42Da；对于氧化（甲硫氨酸），为+16Da
对前体离子的质量耐受	LC-ESI Ion Trap MS 数据，+/- 2.0Da
对片段离子的质量耐受	LC-ESI Ion Trap MS/MS 数据，+/- 0.5Da
检索的数据库	LudwigNR (Q1 版，2007)。由 The Office of Information Technology of the Ludwig Institute for Cancer Research 生产并从 The Swiss Institute of Bioinformatics 获得的最新非丰余蛋白质数据库
种属限制	无
实际检索的蛋白登录号#	所有 LudwigNR 蛋白（即目前超过 4 百万蛋白质）

[0159] 实施例 5：纯化的 Caricain 的蛋白分解活性

[0160] 纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 样品由 The Free University of Brussels(Belgium) 供应 (Yvan Looze 教授惠赠；见 Azarkan M 等，“Carica papaya 乳胶中储存的酶的分离和纯化”. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci(2003)790：229-238))。本申请人证实了此纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 样品与番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 粗品相比，在大鼠肝脏溶酶体 (RLL) 试验中具有高度活性，如本说明书中所描述的。

[0161] 计算：

[0162] 在 RLL 试验中对醇溶蛋白提供的保护作用＝ 32.3%

[0163] 比活性＝ 32.3/0.0043 ＝ 7512（其中 0.0043 是在试验中的毫克数；即 4.3 微克）。

[0164] 番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 粗品的比活性为 40。因此，达到的折叠纯化＝ 7512/40 ＝ 188（为比活性之比）。

[0165] 因此，纯化的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 的活性约为番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 粗品活性的 190 倍，在 RLL 试验中甚至在低至 4 微克的水平都是有活性的。结果显示，番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 在这些研究中对醇溶蛋白的去毒化贡献最大。

[0166] 实施例 6 :Caricain 提取物在治疗谷蛋白不耐受和腹部疾病相关症状上的应用

[0167] 一个活组织检查诊断患有腹部疾病的 45 岁男性患者口服番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 提取物片剂 6 周治疗其症状，在此期间他在每餐开始时服用一片（每片 15mg 番木瓜半胱氨酸蛋白酶）。该患者保持每天记录所有症状，并按严重程度打分 (0 ＝无症状 ;3 ＝轻度症状 ;6 ＝中度症状）。这些结果与其在开始试验前 6 周中按同样方法记录症状的结果相比较。

[0168] 结果显示，症状严重程度的评分从开始治疗前的 307 个症状分减少到结束治疗时的 86 个症状分（减少 72％）。除了症状严重程度的很大降低外，患者还体验到无症状的日子，并且患者还反映这些片剂去除了外出用餐的忧虑。服用片剂使接触谷蛋白从以前发生的腹泻改变为发生轻度恶心。

[0169] 实施例 7 :番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (Caricain) 提取物在治疗谷蛋白不耐受和疱疹样皮炎 (DH) 相关症状上的应用

[0170] 一个活组织检查诊断患有疱疹样皮炎的 48 岁男性患者食用含早餐谷类和烤面包及午餐三明治的饮食 7 天，直至发生中度疼痛性瘙痒。过了 3 周使瘙痒消退后，患者食用同样的饮食 7 天，在此期间他也用片剂形式的番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 提取物（每片 15mg caricain) 进行治疗，与每顿早餐和午餐一起服用。该患者注意到他服用番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 提取物片剂后只有极少轻度瘙痒发生，他评论这些片剂在减轻此病症状上是最有用的。从亲身经历，他注意到没有服用片剂时的任何谷蛋白攻击都会立刻产生疼痛性皮疹，而服用了番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 提取物片剂后出现轻度和频率极低的瘙痒，这几乎不可能被认为会发展到疼痛性皮疹的阶段。结果证明，疱疹样皮炎患者可能发现了用番木瓜半胱氨酸蛋白酶 (caricain) 治疗可对意外摄入谷蛋白提供防护，或帮助其耐受小量谷蛋白而不发生严重症状。

[0171] 将来可能在本申请的基础上或要求本申请的优先权，提交若干专利申请。应当理解，下面的权利要求并不意味着限制在将来任何申请中可能要求保护的范围。在稍后的日子里，可能会从这些权利要求增加或省略特征，以便进一步限定或再限定这个或这些发明。

MAMIPSISKLLFVAICLFVHMSVSFGDFSIVGYSQDDLTSTERLIQLFNSWMLNHNKFY
ENVDEKLYRFEIFKDNLNYIDETNKKNNSYWLGLNEFADLSNDEFNEKYVGSLIDATI
EQSYDEEFINEDTVNLPENVDWRKKGAVTPVRHQGSCGSCWAFSAVATVEGINKIRT
GKLVELSEQELVDCERRSHGCKGGYPPYALEYVAKNGIHLRSKYPYKAKQGTCRAK
QVGGPIVKTSGVGRVQPNNEGNLLNAIAKQPVSVVVESKGRPFQLYKGGIFEGPCGTK
VDHAVTAVGYGKSGGKGYILIKNSWGTAWGEKGYIRIKRAPGNSPGVCGLYKSSYYP
TKN

图 1

MAMIPSISKLLFVAICLFVHMSVSFGDFSIVGYSQDDLTSTERLIQLFNSWMLNHNKFY
ENVDEKLYRFEIFKDNLNYIDETNKKNNSYRLGLNEFADLSNDEFNEKYVGSLIDATIE
QSYDEEFINEDIVNLPENVDWRKKGAVTPVRHQGSCGSCWAFSAVATVEGINKIRTGKL
VELSEQELVDCERRSHGCKGGYPPYALEYVAKNGIHLRSKYPYKAKQGTCRAKQVGG
PIVKTSGVGRVQPNNEGNLLNAIAKQPVSVVVESKGRPFQLYKGGIFEGPCGTKVDHA
VTAVGYGKSGGKGYILIKNSWGTAWGEKGYIRIKRAPGNSPGVCGLYKSSYYPIKNRD
NGRIQIRPSSQHLTSHE

图 2

1 atggctatga taccttcaat ttcaaagttg ctttttgttg caatatgtct ctttgttcat

61 atgagtgtgt cctttggtga ttttttctatc gtggggtatt cgcaagatga cttgacatct

121 actgagaggc ttattcagct ctttaactcg tggatgttga atcacaataa attttacgag

181 aatgttgatg agaaacttta cagatttgaa atttttaagg acaatctaaa ctacattgac

241 gagacaaaca aaaagaataa cagttattgg cttggattaa acgagtttgc tgatttaagc

301 aatgatgaat tcaatgagaa gtatgttggt tcccttattg atgcaacgat tgaacaatcc

361 tatgatgaag agtttattaa tgaagatact gtaaatttgc ccgagaatgt cgattggaga

421 aaaaaaggag ctgtcactcc cgtaagacat cagggttcat gcggtagttg ttgggcattc

481 tcggccgttg caactgtaga gggaataaat aagattagaa ctggaaaatt agtagaatta

541 tcagagcaag aacttgttga ctgtgaaaga cgtagccatg ggtgcaaagg aggttatccg

601 ccgtatgcac ttgaatatgt ggctaagaat ggtattcact tgagatcaaa gtacccatat

661 aaagcaaagc aagggacttg tcgagccaaa caagtgggag gtcccattgt gaaaacttct

721 ggggttggac gtgtgcaacc aaataatgaa gggaatctct taaatgcaat tgcaaagcaa

781 cctgtgagcg ttgtggttga atccaaggga agacctttcc aattgtataa agggggaata

841 tttgaggggc catgcggaac caaagtagat catgcagtaa cagcagttgg ttatggaaaa

901 agtggaggca aaggttacat actcatcaag aattcatggg gtactgcatg gggtgagaaa

961 ggatatataa gaatcaaaag agcccctgga aactccccag gagtgtgtgg actttataaa

1021 agctcatact atcctactaa aaattga

图 3

1 atggctatga taccttcaat ttcaaagttg ctctttgttg caatatgtct ctttgttcat

61 atgagtgtgt cctttggcga ttttttctatt gtggggtatt cgcaagatga cttgacatct

121 accgagaggc ttattcagct ctttaactcg tggatgttga atcacaataa attttacgag

181 aatgttgatg agaaacttta cagatttgaa atttttaagg acaatctaaa ctacattgac

241 gagacaaaca aaaagaataa cagttatagg cttggattaa acgagtttgc tgatttaagc

301 aatgatgaat tcaatgagaa gtatgttggt tcccttattg atgcaacaat tgaacaatcc

361 tatgatgaag agtttattaa tgaagatatt gtaaatttgc ccgagaatgt cgattggaga

421 aaaaaaggag ctgtcactcc cgtaagacat cagggttcat gcggtagttg ttgggcattc

481 tcggccgttg caactgtaga gggaataaat aagattagaa ctggaaaatt agtagaatta

541 tcagagcaag aacttgttga ctgtgaaaga cgtagccatg ggtgcaaagg aggttatccg

601 ccgtatgcac ttgaatatgt ggctaagaat ggtattcact tgagatcaaa gtacccatat

661 aaagcaaagc aagggacttg tcgagccaaa caagtgggag gtccgattgt gaaaacttct

721 ggggttggac gtgtgcaacc aaataatgaa gggaatctct taaatgcaat tgcaaagcaa

781 cctgtgagcg ttgtggttga atccaaggga agacctttcc aattgtataa agggggaata

841 tttgaggggc catgcggaac caaagtagat catgcagtaa cagcagttgg ttatggaaaa

901 agtggaggca aaggttacat actcatcaag aattcatggg gtactgcatg gggtgagaaa

961 ggatatataa gaatcaaaag agcccctgga aactccccag gagtgtgtgg actttataaa

1021 agctcatact atcctattaa aaatagagat aatggacgga tccagatccg cccatcatct

1081 caacacctca caagccatga atgaagctga

图 4