



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106794228 B

(45) 授权公告日 2021.09.03

(21) 申请号 201580043762.2

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限

(22) 申请日 2015.06.16

公司 44202

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 温旭 郝传鑫

申请公布号 CN 106794228 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2017.05.31

A61K 38/48 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61J 1/03 (2006.01)

62/012,865 2014.06.16 US

A61K 36/36 (2006.01)

62/118,396 2015.02.19 US

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2017.02.15

US 2014/0140980 A1, 2014.05.22

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2012/006384 A2, 2012.01.12

PCT/CA2015/000389 2015.06.16

Freeman et al.. Pearls and pitfalls in
the diagnosis of adult celiac disease.
《Can J Gastroenterol》.2008, 第22卷(第3期),
全文.

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 苏存生

W02015/192211 EN 2015.12.23

权利要求书3页 说明书33页
序列表4页 附图15页

(73) 专利权人 科德克希思公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 戴维·施里默 马尔什·雷伊

(54) 发明名称

用于治疗麸质不耐受和由其引起的病症的
组合物和方法

(57) 摘要

本文所描述的发明涉及通过施用包含一种
或多种猪笼草酶的药物组合物来治疗麸质不耐
受和相关病况(例如乳糜泻和麸质敏感)或抑制
肠内由于抗原性食物肽所致的炎症和/或免疫反
应的方法和组合物。

1. 一种包含奈普洛森的药物组合物在制备用于减弱或预防患者体内的由存在含脯氨酸的肽类食物抗原所引起的肠道炎症的药物中的用途,其中,所述奈普洛森是具有脯氨酰基内切蛋白酶活性的蛋白质,并且其氨基酸序列为SEQ ID NO.: 1或SEQ ID NO.: 1的第25-380位氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述含脯氨酸的肽类食物抗原包括脯氨酸富集的肽类食物抗原。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述肠道炎症的特征在于所述患者的肠中上皮内淋巴细胞(IEL)的浸润和/或增殖,并且,其中,所述药物用于减弱或预防肠中IEL的浸润和/或增殖。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述药物组合物还包含猪笼草蛋白酶I或猪笼草蛋白酶II。

5. 根据权利要求3所述的用途,其中,所述药物组合物还包含猪笼草蛋白酶I或猪笼草蛋白酶II。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述药物用于减弱或预防绒毛萎缩。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的用途,其中,所述肽类食物抗原包括部分水解的麸质蛋白质。

8. 根据权利要求1-6中任一项所述的用途,其中,在食用含麸质食物之前、期间或之后立即口服施用所述药物组合物。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中,所述含麸质食物是固体。

10. 根据权利要求8所述的用途,其中,所述含麸质食物是液体。

11. 根据权利要求1-6中任一项所述的用途,其中,所述炎症归因于由麸质的存在所加重的乳糜泻。

12. 一种包含奈普洛森的酶组合物在制备用于减弱或预防肠中由存在部分水解的含脯氨酸的抗原性小麦蛋白质所引起的乳糜泻的表现的药物中的用途,其中,所述奈普洛森是具有脯氨酰基内切蛋白酶活性的蛋白质,并且其氨基酸序列为SEQ ID NO.: 1或SEQ ID NO.: 1的第25-380位氨基酸序列。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中,所述部分水解的含脯氨酸的小麦蛋白质是部分水解的麸质蛋白质。

14. 根据权利要求1-6中任一项所述的用途,其中,所述药物组合物是持续释放型制剂。

15. 根据权利要求12或13所述的用途,其中,所述酶组合物是持续释放型制剂。

16. 根据权利要求1-6中任一项所述的用途,其中,所述药物组合物包含猪笼草瓶状体流体的提取物。

17. 根据权利要求12或13所述的用途,其中,所述酶组合物包含猪笼草瓶状体流体的提取物。

18. 根据权利要求1-6、12或13中任一项所述的用途,其中,所述奈普洛森是重组蛋白质。

19. 根据权利要求4或5所述的用途,其中,所述猪笼草蛋白酶I或猪笼草蛋白酶II是重组蛋白质。

20. 根据权利要求1-6中任一项所述的用途,其中,所述药物组合物的pH为5至8。

21. 根据权利要求12或13所述的用途,其中,所述酶组合物的pH为5至8。
22. 一种包含奈普洛森的酶药物组合物在制备用于减弱或预防肠中由于存在含脯氨酸的肽类食物抗原所致的上皮内淋巴细胞增多的药物中的用途,其中,所述奈普洛森是具有脯氨酰基内切蛋白酶活性的蛋白质,并且其氨基酸序列为SEQ ID NO.: 1或SEQ ID NO.: 1的第25-380位氨基酸序列。
23. 根据权利要求22所述的用途,其中,在食用含麸质食物之前、期间或之后立即口服施用所述酶药物组合物。
24. 根据权利要求23所述的用途,其中,所述含麸质食物是固体。
25. 根据权利要求23所述的用途,其中,所述含麸质食物是液体。
26. 根据权利要求22-25中任一项所述的用途,其中,所述药物组合物包含猪笼草瓶状体流体的提取物。
27. 根据权利要求22-25中任一项所述的用途,其中,所述奈普洛森是重组蛋白质。
28. 一种包含奈普洛森的药物组合物的用途,其用于减弱或预防患者的肠中由于存在含脯氨酸的肽类食物抗原所致的肠道炎症,其中,所述奈普洛森是具有脯氨酰基内切蛋白酶活性的蛋白质,并且其氨基酸序列为SEQ ID NO.: 1或SEQ ID NO.: 1的第25-380位氨基酸序列。
29. 根据权利要求28所述的用途,其中,所述患者罹患选自由麸质敏感性、乳糜泻、注意缺陷多动障碍、孤独症、类风湿性关节炎、纤维肌痛和疱疹样皮炎组成的组的疾病。
30. 根据权利要求28所述的用途,其中,所述药物组合物包含猪笼草瓶状体流体的提取物。
31. 根据权利要求28所述的用途,其中,所述奈普洛森是重组蛋白质。
32. 根据权利要求28-31中任一项所述的用途,其中,所述药物组合物的单位剂量包含1 mg至25 g的所述奈普洛森。
33. 根据权利要求28-31中任一项所述的用途,其中,所述药物组合物的pH为5至8。
34. 根据权利要求28-31中任一项所述的用途,其中,所述药物组合物还包含猪笼草蛋白酶I或猪笼草蛋白酶II。
35. 根据权利要求34所述的用途,其中,所述猪笼草蛋白酶I的氨基酸序列为 SEQ ID NO.: 5、SEQ ID NO.: 6、SEQ ID NO.: 7或SEQ ID NO.: 21。
36. 根据权利要求34所述的用途,其中,所述猪笼草蛋白酶II的氨基酸序列为SEQ ID NO.: 7、SEQ ID NO.: 8、SEQ ID NO.: 9或SEQ ID NO.: 20。
37. 一种药物组合物,其包含奈普洛森和药学上可接受的赋形剂,其中,所述奈普洛森是具有脯氨酰基内切蛋白酶活性的蛋白质并且其氨基酸序列为SEQ ID NO.: 1或SEQ ID NO.: 1的第25-380位氨基酸序列。
38. 根据权利要求37所述的药物组合物,其还包含至少一种另外的猪笼草蛋白酶或其变体。
39. 根据权利要求38所述的药物组合物,其中,所述至少一种另外的猪笼草蛋白酶或其变体是猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和/或其变体。
40. 根据权利要求37-39中任一项所述的药物组合物,其为持续释放型制剂。
41. 根据权利要求37-39中任一项所述的药物组合物,其中,将所述奈普洛森维持在约

pH 2的水性体系中,使得所述奈普洛森的游离氨基带电荷。

42. 根据权利要求37-39中任一项所述的药物组合物,其还包含至少一种另外的蛋白酶。

43. 根据权利要求42所述的药物组合物,其中,所述至少一种另外的蛋白酶是天冬氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。

44. 根据权利要求38或39所述的药物组合物,其中,所述奈普洛森和/或猪笼草蛋白酶包含前肽。

45. 根据权利要求37-39中任一项所述的药物组合物,其中,将所述组合物维持在中性pH。

46. 一种包含根据权利要求37-45中任一项所述的组合物的药物制剂,其中,所述奈普洛森存在于多个层中,使得当所述制剂存在于胃中时所述奈普洛森连续释放。

47. 一种包含根据权利要求37-45中任一项所述的组合物的药物制剂,其还包含药学上可接受的缓冲剂,使得在与胃中的酸接触之后,所述奈普洛森的pH保持在pH 5或6。

用于治疗麸质不耐受和由其引起的病症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2014年6月16日提交的美国临时申请号62/012865和于2015年2月19日提交的美国临时申请号62/118396的优先权。每个在先申请的内容均通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本文提供了用于治疗麸质不耐受和相关病况如乳糜泻或麸质敏感的组合物和方法。本文进一步提供了用于减弱或预防由肠中存在食物蛋白质抗原所诱导的上皮内淋巴细胞(IEL)浸润的组合物和方法。此类食物蛋白质抗原包括难以消化的富含脯氨酸的食物,如在含有麸质的小麦、大麦、裸麦等中发现的蛋白质。具体而言,麸质在胃肠道中部分水解,并且可导致IEL浸润和产生包括肌内膜IgA和抗组织转谷氨酰胺酶在内的抗体。本发明的组合物和方法在肠中提供了降低量的此类食物蛋白质抗原,这进而降低了肠的IEL浸润量。

[0004] 发明背景

[0005] 几种疾病由易感个体中对抗原性食物蛋白质的反应介导。例如,摄入含有抗原性食物蛋白质(例如,麸质)的小麦、大麦和裸麦可在麸质不耐受个体中引起异常的自身免疫反应,如乳糜泻、小麦变态反应和疱疹样皮炎。麸质是富含谷氨酰胺和脯氨酸的麦谷蛋白和谷醇溶蛋白蛋白质分子的混合物。

[0006] 乳糜泻是影响小肠的自身免疫病症。大多数具有特征为乳糜泻的异常自身免疫反应的个体表达人白细胞抗原(HLA)DQ2或DQ8分子。所述疾病的症状由与麸质蛋白质的反应引起,并且还可包括所食用的谷物产品中的其它储存蛋白质(例如丝氨酸蛋白酶抑制蛋白、purinin)。临幊上,所述疾病可部分通过对麸质和组织转谷氨酰胺酶(tTG)特异的抗体的定量来检测。自身免疫反应导致具有隐窝增生的小肠粘膜绒毛萎缩和粘膜炎症的发生。乳糜泻的症状可因个体差异而不同,并且可包括以下中的一种或多种:疲劳、慢性腹泻、便秘、营养素吸收不良、重量减轻、腹胀、贫血,以及大大提高的发生骨质疏松症和肠恶性肿瘤(淋巴瘤和癌瘤)的风险。

[0007] I型糖尿病是乳糜泻的风险因素。孤独症也与乳糜泻相关,并且不含麸质的膳食可帮助减轻孤独症的一些症状。类似地,当从有注意缺陷多动障碍的人的膳食中去除麸质时,认为他们中的一些展现更少的症状。可从消除膳食性麸质中受益的其它病况包括类风湿性关节炎和纤维肌痛。

[0008] 对于麸质不耐受、尤其是乳糜泻的治疗通常涉及终生严格的不含麸质的膳食。然而,不含麸质的膳食是不便的,受限制的,并且麸质难以避免。因此,需要对麸质不耐受和乳糜泻的有效的替代治疗。

发明概要

[0009] 本发明涉及以下发现:本文所述的包含一种或多种猪笼草(Nepenthes)酶的药物组合物与潜在抗原性食物蛋白质的联合施用导致对摄入后的抗原食物蛋白质的免疫反应

降低,包括肠中上皮内淋巴细胞的浸润和/或产生的减少。上皮内淋巴细胞是散布在大肠和小肠的上皮细胞之间的T细胞。增加的T细胞计数是炎症的早期指标,并且与麸质不耐受(包括乳糜泻)潜在相关。

[0010] 认为麸质蛋白质(例如,麦醇溶蛋白和麦谷蛋白)的毒性性质主要归因于在所述蛋白质被人消化酶(包括胃蛋白酶)不完全降解期间产生的富含脯氨酸和谷氨酰胺的肽。胃内切蛋白酶和胰内切蛋白酶不能裂解这些不完全降解的毒性或免疫原性肽副产物,这至少部分归因于此类酶缺乏对脯氨酸和/或谷氨酰胺的特异性的事实。认为所述肽在敏感个体中引起众多肠症状,包括上皮内淋巴细胞增多、绒毛萎缩和/或炎症。存在于小麦中的其它蛋白质也可能与免疫反应有关,包括丝氨酸蛋白酶抑制蛋白、purinin、 α -淀粉酶/蛋白酶抑制剂、球蛋白和farinin。

[0011] T细胞是敏感个体中对抗原攻击(即,毒性食物肽的存在)的第一反应物。T细胞与抗原攻击快速反应并引起炎症,并且在一些情况下,引起肠的降解。因此,肠中T细胞的减少指示降低的免疫反应,并且是敏感个体中与免疫原性食物(例如,麸质)食用相关的症状降低或消除的潜在指标。

[0012] 不受理论的约束,认为使麸质(或其它抗原性蛋白质)与如本文所述的药物组合物接触将所述蛋白质分解成降低或消除免疫反应的小的多肽片段(即,无毒或毒性较小)。

[0013] 预期如本文所述的药物组合物可用于降解未被消化道酶有效降解的膳食蛋白质,特别是富含脯氨酸和/或谷氨酰胺的蛋白质。进一步预期这样的降解将增加蛋白质的吸收和/或降低免疫原性。这样的结果可能对肠疾病和病症(例如,乳糜泻、麸质不耐受、肠易激综合征、结肠炎、克罗恩氏病(Crohn's disease)、食物变态反应等)的症状具有有益作用。在一个实施方案中,施用所述药物组合物改进了营养素吸收。

[0014] 猪笼草(Nepenthes)是一种肉食性瓶状体植物,在热带地区通常被称为瓶子草,其瓶状体分泌物包含多种蛋白酶。浓缩的猪笼草瓶状体流体对富含脯氨酸和谷氨酰胺的麸质肽具有高特异性。美国专利申请公开号2014/0186330和2014/0140980(它们通过引用整体并入本文)描述了浓缩的猪笼草瓶状体流体和重组猪笼草酶的活性和特异性。瓶状体流体是酸性的,并且其中的酶通常在酸性pH下活性最高。

[0015] 猪笼草蛋白酶(EC 3.4.23.12)是从猪笼草瓶状体分泌物以及各种其它植物来源分离或浓缩的天冬氨酸蛋白酶。Tökés等,Digestive Enzymes Secreted by the Carnivorous Plant Nepenthes macferlanei L.,Planta(Berl.) 119, 39-46 (1974)。已发现猪笼草蛋白酶的活性高于胃蛋白酶(EC 3.4.23.1)的活性,胃蛋白酶是存在于人胃中的酶,其部分地负责将食物蛋白质降解成肽。猪笼草蛋白酶具有两种已知的同种型:猪笼草蛋白酶I(已知具有两种变体:猪笼草蛋白酶Ia和猪笼草蛋白酶Ib)和猪笼草蛋白酶II。

[0016] 在一个方面,本发明涉及新颖的脯氨酰基内肽酶奈普洛森(neprosin)的发现,该酶具有裂解富含脯氨酸的蛋白质和寡肽(如麸质蛋白质)的高蛋白水解活性。奈普洛森可从猪笼草的瓶状体分泌物中分离或浓缩,在宽的pH范围内具有活性,并且在低pH(例如,约3至5)下尤其具有活性。奈普洛森蛋白质序列与基因组数据库中任何其它已知的蛋白质均不同源。奈普洛森可在脯氨酸的羧基(C)-末端侧上有效地裂解肽。此种裂解似乎是高特异性的。

[0017] 单独或组合的奈普洛森、猪笼草蛋白酶I和猪笼草蛋白酶II能够将毒性食物肽裂解成更小的非毒性肽。由于所述酶在宽的酸性pH范围内具有活性,因此可在胃的酸性环境

中引发通过所述酶进行的消化。

[0018] 本发明进一步基于以下发现；当与食物联合使用时，此类酶组合物能够将食物蛋白质抗原降解至减弱或消除如通过IEL浸润测量的肠中的免疫反应的水平。由于存在肽类食物抗原所致的IEL浸润是对食物抗原（例如，麸质）的敏感性的早期生物指标。因此，在一个方面，本发明涉及用于减弱或预防哺乳动物的肠中对食物蛋白质抗原的免疫反应的方法，所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的包含至少一种猪笼草酶的药物组合物。在一个实施方案中，至少一种猪笼草酶是猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体或其混合物。在一个实施方案中，所述药物组合物的量为可有效减弱或预防由于存在肽类食物抗原所致的肠的IEL浸润的量。在一个实施方案中，IEL浸润归因于内源性胃酶和/或肠酶对潜在抗原性食物蛋白质的不完全消化。在一个实施方案中，在摄入潜在抗原性食物或蛋白质之前，向哺乳动物施用所述组合物。在一个实施方案中，与摄入潜在抗原性食物或蛋白质同时，向哺乳动物施用所述组合物。在一个实施方案中，在摄入潜在抗原性食物或蛋白质之后，向哺乳动物施用所述组合物。在一个实施方案中，向哺乳动物施用所述组合物，不论是否食用潜在抗原性食物或蛋白质。在一个实施方案中，潜在抗原性蛋白质是麸质。在一个实施方案中，潜在抗原性蛋白质是一种或多种小麦蛋白质。

[0019] 在一个实施方案中，肠道炎症的特征在于肠中IEL的浸润和/或增殖。因此，在一个方面，本发明涉及用于减弱或预防哺乳动物的肠中由于存在肽类食物抗原所致的肠道炎症方法，所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的包含至少一种猪笼草酶的药物组合物。在一个实施方案中，所述至少一种猪笼草酶是猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体或其混合物。在一个实施方案中，所述药物组合物的量为可有效减弱或预防由于存在肽类食物抗原所致的肠道炎症的量。在一个实施方案中，肠道炎症归因于内源性胃酶和/或肠酶对潜在抗原性食物蛋白质的不完全消化。在一个实施方案中，在摄入潜在抗原性食物或蛋白质之前，向哺乳动物施用所述组合物。在一个实施方案中，与摄入潜在抗原性食物或蛋白质同时，向哺乳动物施用所述组合物。在一个实施方案中，在摄入潜在抗原性食物或蛋白质之后，向哺乳动物施用所述组合物。在一个实施方案中，向哺乳动物施用所述组合物，不论是否食用潜在抗原性食物或蛋白质。在一个实施方案中，潜在抗原性蛋白质是麸质。在一个实施方案中，潜在抗原性蛋白质是一种或多种小麦蛋白质。

[0020] 在一个方面，本发明涉及用于减弱或预防哺乳动物的肠中由于存在肽类食物抗原所致的上皮内淋巴细胞增多的方法，所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的包含至少一种猪笼草酶的药物组合物。在一个实施方案中，所述至少一种猪笼草酶是猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体或其混合物。在一个实施方案中，所述药物组合物的量为可有效抑制肠中的上皮内淋巴细胞增多的量。在一个实施方案中，在摄入潜在抗原性食物或蛋白质之前，向哺乳动物施用所述组合物。在一个实施方案中，与摄入潜在抗原性食物或蛋白质同时，向哺乳动物施用所述组合物。在一个实施方案中，在摄入潜在抗原性食物之后，向哺乳动物施用所述组合物。在一个实施方案中，向哺乳动物施用所述组合物，不论是否食用潜在抗原性食物或蛋白质。在一个实施方案中，潜在抗原性蛋白质是麸质。在一个实施方案中，潜在抗原性蛋白质是一种或多种小麦蛋白质。

[0021] 在一个实施方案中，所述药物组合物的有效量为约1mg至约1g。在一个实施方案中，所述药物组合物的有效量取决于所食用的潜在抗原性蛋白质的量。

[0022] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗和/或改善至少一种与患者的肠中对存在麸质或其它抗原蛋白质的免疫反应相关的症状。症状包括但不限于“思维混沌”、抑郁症、焦虑症、ADHD样行为、腹痛、腹胀、腹泻、便秘、头痛、偏头痛、骨或关节疼痛、慢性疲劳、小肠损伤、产生组织转谷氨酰胺酶(tTG)抗体、严重痤疮、呕吐、重量减轻、应激性、缺铁性贫血、关节炎、四肢刺麻、不育症和口腔溃疡。

[0023] 在一个方面,本发明涉及用于减弱或预防哺乳动物的肠中由于存在肽类食物抗原所致的绒毛萎缩的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的包含至少一种猪笼草酶的药物组合物。在一个实施方案中,所述至少一种猪笼草酶是猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体或其混合物。在一个实施方案中,通过所述药物组合物降解潜在抗原性蛋白质以抑制肠中的绒毛萎缩。在一个实施方案中,潜在抗原性蛋白质是麸质。在一个实施方案中,潜在抗原性蛋白质是一种或多种小麦蛋白质。

[0024] 在一个方面,本发明涉及用于降低对肽类食物抗原的T细胞反应的方法,所述方法包括使肽类食物抗原与有效量的包含至少一种猪笼草酶的药物组合物接触。在一个实施方案中,在将所述抗原降解以降低对所述抗原的T细胞反应的条件下,所述至少一种猪笼草酶是猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体或其混合物。在一个实施方案中,哺乳动物的肠中的T细胞反应降低。在一个实施方案中,所述抗原与所述药物组合物在哺乳动物的胃中接触。在一个实施方案中,所述抗原与所述药物组合物离体接触。在一个实施方案中,所述抗原是麸质。在一个实施方案中,所述抗原是免疫毒性麸质蛋白质。

[0025] 在一个方面,本发明涉及用于减弱或预防患有乳糜泻患者的肠中由存在部分水解小麦蛋白质所引起的乳糜泻的表现的方法,其包括向所述患者施用有效量的包含至少一种猪笼草酶的药物组合物。在一个实施方案中,所述至少一种猪笼草酶是猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体或其混合物,以减弱或预防乳糜泻的表现。

[0026] 在一个方面,本发明涉及用于改善患有肠病症的哺乳动物对来自食物的蛋白质的消化性的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的包含至少一种猪笼草酶的药物组合物。在一个实施方案中,在通过所述药物组合物降解食物中的蛋白质的条件下,所述至少一种猪笼草酶是猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体或其混合物。在一个实施方案中,蛋白质的降解改善了蛋白质在肠中的吸收。在一个实施方案中,所述病症的至少一种症状被减弱或预防。在一个实施方案中,所述肠病症是克罗恩氏病、肠易激综合征或结肠炎。在一个实施方案中,来自食物的蛋白质吸收增加。

[0027] 在一个方面,本发明涉及用于治疗有需要的患者的胰酶不足的方法,其包括向所述患者施用有效量的包含至少一种猪笼草酶的药物组合物。在一个实施方案中,所述至少一种猪笼草酶是猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体和其混合物。在一个实施方案中,施用一种或多种胰酶。一种或多种胰酶可与药物组合物同时施用,或在不同的时间施用。在一个实施方案中,胰酶是脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶或其混合物。在一个实施方案中,胰酶不足归因于胰腺炎、囊性纤维化、Shwachman-Bodian-Diamond综合征、胆结石、狼疮、乳糜泻、胰腺癌或胰腺手术。在一个实施方案中,胰腺炎是慢性胰腺炎。

[0028] 在一个实施方案中,从猪笼草植物的瓶状体流体中浓缩、分离或提取猪笼草酶。在一个实施方案中,猪笼草酶包括重组猪笼草蛋白酶I、重组猪笼草蛋白酶II、重组奈普洛森、其变体或其混合物。

[0029] 在一个实施方案中,其变体包括氨基酸序列与选自由SEQ ID NO.:1、SEQ ID NO.:5、SEQ ID NO.:6、SEQ ID NO.:7、SEQ ID NO.:8、SEQ ID NO.:9、SEQ ID NO.:20和SEQ ID NO.:21组成的组的氨基酸序列具有至少85%序列同源性的蛋白质。在一个实施方案中,其变体包括氨基酸序列与由选自由SEQ ID NO.:2、SEQ ID NO.:4和SEQ ID NO.:14组成的组的cDNA编码的氨基酸具有至少85%序列同源性的蛋白质。

[0030] 在一个实施方案中,食物是液体。在一个方面,食物是固体。在优选的实施方案中,口服施用药物组合物。

[0031] 即使在患者坚持严格的不含麸质的膳食时,也难以避免麸质。众多食物、特别是加工食物被少量麸质污染。甚至食用微量麸质也可导致乳糜泻患者的症状复发。其它潜在免疫原性食物也是如此。

[0032] 在一个实施方案中,施用所述药物组合物,不论患者是否已摄入(例如,明知地摄入)含有潜在免疫原性蛋白质的食物。在一个实施方案中,根据需要,例如在可能被潜在免疫原性蛋白质污染或其中潜在免疫原性蛋白质含量未知的用餐之前、期间和/或之后施用所述药物组合物。在一个实施方案中,定期施用所述药物组合物。在一个实施方案中,每天施用所述药物组合物至少一次。在一个实施方案中,每天施用所述药物组合物两次、三次、四次或更多次。在一个实施方案中,将所述药物组合物与每次用餐和/或零食联合(例如,在其之前、期间或之后)施用。在一个实施方案中,所述药物组合物作为持续释放制剂的一部分被包括在所述制剂中,所述持续释放制剂中存在酶的连续释放以允许间歇性吃零食等,而不考虑食物的抗原蛋白质含量。

[0033] 在一个实施方案中,将所述药物组合物维持在约pH 2的水性体系中,其中所述酶的游离氨基带电荷。在一个实施方案中,在与胃中的酸接触之前,将所述组合物维持在中性pH。在一个实施方案中,所述药物组合物包含药学上可接受的缓冲剂,使得在与胃中的酸接触之后,所述组合物的pH保持在pH 5或6。

[0034] 在一个实施方案中,药物组合物的有效量为约1mg至约1g。在一个实施方案中,药物组合物的有效量为每1g底物(例如,麸质或其它潜在免疫原性蛋白质)约1mg至约1g。在一个实施方案中,所述药物组合物包含猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森或其变体中的多于一种。

[0035] 在一个实施方案中,哺乳动物是人。在一个方面,人罹患麸质敏感或乳糜泻。在一个方面,预期肠抗原蛋白质敏感与注意缺陷多动障碍、孤独症、类风湿性关节炎、纤维肌痛和/或疱疹样皮炎直接或间接相关。进一步预期使用本发明的组合物从肠中去除此类抗原性肠蛋白质对注意缺陷多动障碍、孤独症、类风湿性关节炎、纤维肌痛、和/或疱疹样皮炎具有积极作用。在优选的实施方案中,人罹患乳糜泻。

[0036] 在一个方面,本发明涉及包含猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体或其混合物的药物组合物。在优选的实施方案中,所述药物组合物包含奈普洛森或其变体和/或盐。在又一优选的实施方案中,所述药物组合物还包含至少一种另外的猪笼草酶。在一个实施方案中,所述另外的猪笼草酶包括猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、其变体和/或其盐。

[0037] 不受理论的约束,认为猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和奈普洛森在中性至碱性pH下活性较低或基本上无活性。在存在由所述酶进行不期望的消化的可能性的情况下,这

可能是重要的。例如,在口服施用所述药物组合物的情况下,将所述组合物缓冲至pH 6.5或更大可产生所述酶的活性较低的形式,使得口腔粘膜、食管粘膜和可与所述组合物接触的其它细胞将不被其中的酶消化。同样,当将所述组合物添加至食物中时,在所述食物被食用之前,缓冲酶将不能(或较不能)消化所述食物。在此类情况下,将所述组合物引入胃的酸性环境中将导致酶的pH和活化的降低。

[0038] 在一个实施方案中,将所述药物组合物缓冲至约pH 6.5或更高。在优选的实施方案中,将所述组合物缓冲至约pH 6.5至约pH 8.5。在一个实施方案中,所述组合物呈液体形式。在一个实施方案中,所述组合物呈固体形式。在一个实施方案中,将所述组合物的pH以液体形式调整,并将组合物干燥以形成固体。

[0039] 在一个实施方案中,所述药物组合物包含一种或多种另外的蛋白酶。在一个实施方案中,一种或多种另外的蛋白酶是天冬氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。在一个实施方案中,所述药物组合物包含一种或多种另外的外蛋白酶,如亮氨酸氨肽酶和羧肽酶。在一个实施方案中,一种或多种另外的蛋白酶是胰蛋白酶。在优选的实施方案中,一种或多种另外的蛋白酶在酸性pH(例如,pH 2-6)下具有活性。

[0040] 在一个方面,本发明涉及包含本发明的药物组合物的制剂,其中所述酶存在于延迟释放型媒剂中,使得当所述制剂存在于胃中时所述酶连续释放。在一个实施方案中,在与胃中的酸接触之前,所述制剂具有大于约5的pH。在一个实施方案中,所述制剂包含生物学上可接受的缓冲剂,使得在与胃中的酸接触之后,所述组合物的pH在约pH 5或6下保持至少一段时间。

[0041] 在一个实施方案中,本发明涉及所述药物组合物的单位剂量制剂。例如且不限于,单位剂量可以片剂、胶囊等存在。单位剂量可呈固体、液体、粉末或任何其它形式。不受理论的约束,预想所述药物组合物的单位剂量制剂将允许适当的给药(例如,基于免疫原性蛋白质的摄入量),同时避免施用过量的所述组合物的潜在负面副作用。

[0042] 在一个实施方案中,本发明涉及酶原形式的猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森和/或其变体。在一个实施方案中,前肽存在于所述酶上。在优选的实施方案中,通过酸性pH去除所述前肽,由此活化所述酶。在一个实施方案中,所述前肽包含所述酶的天然存在的前肽氨基酸序列。在一个实施方案中,所述前肽是人工前肽或异源(meterologous)前肽(即,来自不同的蛋白质和/或物种的酸不稳定性前肽)。

[0043] 附图简述

[0044] 图1显示来自奇异猪笼草(*Nepenthes mirabilis*) (SEQ ID NO.:5)、翼状猪笼草(*Nepenthes alata*) (SEQ ID NO.:6)、小猪笼草(*Nepenthes gracilis*) (SEQ ID NO.:7)、玉米(*Zea mays*) (SEQ ID NO.:10) 和水稻(*Oryza sativa*) (SEQ ID NO.:11) 的猪笼草蛋白酶I以及来自奇异猪笼草(SEQ ID NO.:8)、小猪笼草(SEQ ID NO.:9)、水稻(SEQ ID NO.:12) 和玉米(SEQ ID NO.:13) 的猪笼草蛋白酶II的蛋白质序列的比对。

[0045] 图2显示重组猪笼草蛋白酶蛋白质的大小。A:猪笼草蛋白酶I的考马斯蓝染色凝胶。B:酸活化的猪笼草蛋白酶I的MALDI-TOF MS分析。C:猪笼草蛋白酶II的考马斯蓝染色凝胶。D:酸活化的猪笼草蛋白酶II的MALDI-TOF MS分析。

[0046] 图3显示通过MALDI-TOF MS获得的天然猪笼草蛋白酶I和猪笼草蛋白酶II(从2-3

个物种汇集)的大小。

[0047] 图4是显示在用重组猪笼草蛋白酶II、猪笼草提取物或胃蛋白酶消化后麸质片段的分子量的考马斯蓝染色凝胶SDS-PAGE凝胶的照片。

[0048] 图5A是装有用胃蛋白酶(40 μ g)或所示量的重组猪笼草蛋白酶I或重组猪笼草蛋白酶II消化的麸质蛋白质浆液的小瓶的照片。图5B是装有用胃蛋白酶(40 μ g)或所示量的猪笼草提取物消化的麸质蛋白质浆液的小瓶的照片。用猪笼草蛋白酶或猪笼草提取物孵育的小瓶不如胃蛋白酶小瓶浑浊,这表明对麸质的消化更强烈。

[0049] 图6显示在37°C 1分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、60分钟、130分钟、360分钟或810分钟后,使用LC-MS/MS从用富集的猪笼草流体对来自小麦的麦醇溶蛋白的消化鉴别的所有肽的平均长度。使用对评分的95%置信度截留值($p<0.05$)来减少假阳性鉴别。肽长度的相对标准偏差示于插图中。

[0050] 图7展示在37°C消化1分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、60分钟、130分钟、360分钟或810分钟后通过LC-MS/MS鉴别的按长度分组的肽的数目。数据如图6中所示。

[0051] 图8展示与图6中相同的数据,作为在37°C消化10分钟、60分钟、120分钟、360分钟或810分钟后获得一定长度的累积概率。

[0052] 图9显示所示酶在(A)裂解位点的P1或N-末端侧和(B)裂解位点的P1'或C-末端侧的裂解偏好。每个残基的左侧条形指示用猪笼草提取物消化,中间条形指示用纯化的猪笼草提取物消化,并且右侧条形指示用重组猪笼草蛋白酶I消化。裂解%表示相对于存在的肽的总数在给定残基处观察到的裂解的数目。从麦醇溶蛋白的消化物获得数据。

[0053] 图10显示猪笼草流体的离子交换纯化分布图。对应于奈普洛森和猪笼草蛋白酶的峰以箭头指示。带框区域指示收集的级分。

[0054] 图11显示小鼠在处理过程期间的体重。阴性对照(●)动物未用麦醇溶蛋白激发。阳性对照(■)动物用通过胃蛋白酶消化的麦醇溶蛋白激发。处理1(▲)动物用经猪笼草提取物消化的麦醇溶蛋白激发。处理2(▼)动物用经重组猪笼草蛋白酶II消化的麦醇溶蛋白激发。

[0055] 图12是被处理小鼠的肠中的CD3-阳性IEL的免疫组织化学的照片。

[0056] 图13显示每个处理组的肠中每100个肠细胞的CD3-阳性上皮内淋巴细胞IEL的平均数目。 $*p<0.05$; $***p<0.001$

[0057] 图14显示每个处理组的绒毛与隐窝的平均比率。

[0058] 图15A显示被奈普洛森消化的麦醇溶蛋白的各部分的取样,如通过数据依赖性LC-MS/MS所检测。

[0059] 图15B显示在用奈普洛森消化后的麦醇溶蛋白的消化分布图。句点指示裂解位点。

[0060] 图16显示来自猪笼草属的不同物种的奈普洛森的氨基酸序列中的多态性的定位。

具体实施方式

[0061] 应当理解,本发明不限于所描述的特定实施方案,因为这些当然可以变化。还应当理解,本文所用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而无意进行限定,因为本发明的范围将仅受所附权利要求限制。

[0062] 本发明的具体实施方式仅为了读者的方便而被分成各个部分,并且见于任何部分

中的公开均可与另一部分中的公开组合。

[0063] I. 定义

[0064] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域技术人员通常所理解的含义相同。虽然类似或等同于本文所述的方法和材料的任何方法和材料均可用于实践或测试本发明,但本文中现在描述了优选的方法、装置和材料。本文所引用的所有技术和专利公开均通过引用整体并入本文。不得将本文中任何内容解释为承认本发明无权早于在先发明的公开内容。

[0065] 除非上下文另有明确规定,说明书和权利要求书中所用的单数形式冠词“a、an和the”包括复数个指示物。

[0066] 如本文所用的术语“包含”意在指所述组合物和方法包括所记载的要素,但不排除其它。当用于定义组合物和方法时,“基本上由……组成”应当意指排除对该组合具有任何重要意义的其它元素。例如,基本上由如本文所定义的要素组成的组合物将不排除不实质影响要求保护的本发明的基本和新颖特征的其它元素。“由……组成”应当意指排除超过痕量的其它成分和所述的实质性方法步骤。由这些过渡术语中的每一个所限定的实施方案均在本发明的范围内。

[0067] 如本文所用的“潜在抗原性食物或蛋白质”是可在敏感个体的肠中引起免疫反应和/或炎性反应的任何食物或蛋白质。在优选的实施方案中,个体是人,并且食物是意在用于人食用的食物。潜在抗原性食物包括但不限于小麦、裸麦、大麦、花生、坚果和种子。在一个实施方案中,来自这些食物的潜在抗原性蛋白质包括谷醇溶蛋白蛋白质、2S白蛋白、非特异性脂质转移蛋白质、双功能 α -淀粉酶/蛋白酶抑制剂、大豆疏水蛋白质、二氢卟啉、麸质、丝氨酸蛋白酶抑制蛋白、purinin、 α -淀粉酶/蛋白酶抑制剂、球蛋白和farinin。在优选的实施方案中,潜在抗原性蛋白质(或肽)富含脯氨酸和/或谷氨酰胺残基。在尤其优选的实施方案中,潜在抗原性蛋白质是麸质。在另一优选的实施方案中,潜在抗原性蛋白质是小麦蛋白质。

[0068] 如本文所用的术语“麸质”通常是指存在于小麦或相关谷物种(包括大麦和裸麦)中的蛋白质,其对某些个体具有潜在有害的影响。麸质蛋白质包括麦醇溶蛋白,如 α -麦醇溶蛋白、 β -麦醇溶蛋白、 γ -麦醇溶蛋白、 ω -麦醇溶蛋白(其为单体蛋白质);和麦谷蛋白,其为通过二硫键保持在一起的高分子量和低分子量亚单位的聚集体的高度非均质混合物。许多小麦麸质蛋白质已被表征。参见例如Woychik等,Amino Acid Composition of Proteins in Wheat Gluten,J.Agric.Food Chem 9 (4),307-310 (1961)。如本文所用的术语麸质还包括可衍生自含有麸质的食物的麸质蛋白质的正常人消化并引起异常的免疫反应的寡肽。这些寡肽中的一些对正常消化酶有抗性。认为包括上述蛋白质和寡肽的麸质在患有麸质不耐受(例如,乳糜泻)的患者中充当T细胞(例如,IEL)的抗原。术语麸质还指变性麸质,如将在烘焙产品中发现的。

[0069] 如本文所用的术语“麸质敏感和相关病况”是指源于对麸质蛋白质或肽的不耐受或敏感的任何病况。这些包括但不限于乳糜泻(乳糜泻)、小麦变态反应、麸质敏感、麸质敏感性肠病、特发性麸质敏感和疱疹样皮炎。相关病况还包括但不限于孤独症、注意缺陷多动障碍(ADHD)、类风湿性关节炎、纤维肌痛、克罗恩氏病、营养素吸收不良和肠易激综合征(IBS)。

[0070] 术语“奈普洛森”是指具有大约29千道尔顿(kDa)的分子量的脯氨酰基内切蛋白酶。可从猪笼草属种的瓶状体分泌物中分离奈普洛森。奈普洛森以高特异性在脯氨酸的羧基末端裂解蛋白质。所述酶在约pH 2至约pH 6下具有活性。在一个实施方案中，奈普洛森具有SEQ ID NO.:1的氨基酸序列。奈普洛森氨基酸序列与任何其它已知的蛋白质均不同源。在一个实施方案中，奈普洛森由SEQ ID NO.:2的cDNA序列编码。在一个实施方案中，奈普洛森包含信号序列。在一个实施方案中，信号序列包含SEQ ID NO.:3的氨基酸序列。在一个实施方案中，奈普洛森不包含信号序列。

[0071] 奈普洛森包括奈普洛森的所有亚型、同种型和变体、重组奈普洛森和其盐。盐是指通过奈普洛森与一种或多种碱、或一种或多种酸形成的那些盐，其保持了游离奈普洛森的生物学有效性和性质，并且不是生物学或其它方面不期望的。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐、铝盐等。衍生自有机碱的盐包括但不限于伯胺盐、仲胺盐和叔胺盐；取代胺，包括天然存在的取代胺；环状胺和碱性离子交换树脂，如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、2-二甲氨基乙醇、2-二乙氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因(procaine)、哈胺(hydramine)、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡糖胺、甲基葡糖胺、可可碱、嘌呤、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺树脂等。可形成盐的酸包括但不限于无机酸，如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等；和有机酸，如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、苦杏仁酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等。

[0072] 蛋白酶的实例包括但不限于天冬氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶和金属蛋白酶。可用于本发明中的蛋白酶包括但不限于BACE、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、凝乳酶(或“凝乳酵素”)、napsin、胃蛋白酶、疟原虫天冬氨酸蛋白酶、早老素、肾素、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、弹性蛋白酶和半胱氨酸内切蛋白酶(EP) B2(也被称为EPB2)。蛋白酶包括描述于例如美国专利号7,320,788、7,303,871、7,320,788、7,628,985、7,910,541和7,943,312；PCT专利公开号2005/107786、2008/115428、2008/115411、2010/021752、2010/042203、2011/097266中的那些，这些专利中的每一个通过引用明确并入本文。在优选的实施方案中，至少一种另外的蛋白酶在酸性pH如在胃中发现的pH(例如，pH 1.5至3.5)下具有活性。

[0073] 术语“猪笼草蛋白酶”是指具有酶学委员会编号EC 3.4.23.12的天冬氨酸蛋白酶，并且包括猪笼草蛋白酶的所有亚型、同种型和变体，如猪笼草蛋白酶I和猪笼草蛋白酶II、猪笼草蛋白酶亚型，以及重组猪笼草蛋白酶和其盐。猪笼草蛋白酶(EC 3.4.23.12)是起源于植物的天冬氨酸蛋白酶，该天冬氨酸蛋白酶可从各种植物来源分离或浓缩，所述植物来源如猪笼草的瓶状体分泌物，猪笼草是一种食肉瓶状体植物，在热带地区通常被称为瓶子草。猪笼草蛋白酶详细描述于2013年3月15日提交的美国专利申请序列号13/843,369中，该美国专利申请通过引用整体并入本文。已知猪笼草蛋白酶蛋白质序列(和推定的猪笼草蛋白酶蛋白质序列)的序列比对示于图1中。

[0074] 在一个实施方案中，“有效量”是指使受试者的症状得到抑制或改善或产生期望的生物学结局(例如，改进的临床体征、疾病的延迟发作等)的组合物的量。有效量可由本领域普通技术人员确定。所选剂量水平可取决于所治疗病况的严重性以及所治疗哺乳动物的病况和先前医疗史。然而，在本领域技术范围内，以低于实现期望的治疗作用所需的水平开始

组合物的剂量，并逐渐增加剂量直至达到期望的作用。

[0075] 术语“乳糜泻的表现”是指乳糜泻的任何症状或临床呈现，此类表现包括但不限于肠道炎症、“思维混沌”、抑郁症、焦虑症、ADHD样行为、腹痛、腹胀、腹泻、便秘、头痛、偏头痛、骨或关节疼痛、慢性疲劳、小肠损伤、组织转谷氨酰胺酶(tTG)抗体的产生、严重痤疮、呕吐、重量减轻、应激性、缺铁性贫血、关节炎、四肢刺麻、不育症和口腔溃疡。表现进一步包括具有隐窝增生的小肠粘膜绒毛萎缩、肠粘膜炎症、营养素吸收不良、腹胀，以及大大提高的发生骨质疏松症和肠恶性肿瘤(淋巴瘤和癌瘤)的风险。

[0076] 如本文所用的“同时施用”或“共治疗”包括将试剂一起或在彼此之前或之后施用。

[0077] 术语“调节”、“减弱”或“改善”意指对受试者如哺乳动物的疾病或病症的任何治疗，其包括：

[0078] • 预防或防御疾病或病症，即，使异常的生物反应或症状不发展；

[0079] • 抑制疾病或病症，即，阻止或阻抑异常的生物反应和/或临床症状的发展；和/或

[0080] • 缓解疾病或病症，即，使异常的生物反应和/或症状消退。

[0081] 如本文所用的术语“预防”或“抑制”是指对有需要的受试者的预防性治疗。所述预防性治疗可通过向处于罹患疾病的风险中的受试者提供适当剂量的治疗剂来实现，由此基本上防止所述疾病的发作。

[0082] 如本文所用的术语“病况”是指对其使用本文所提供的化合物、组合物和方法的疾病状态。

[0083] 如本文所用的术语“患者”或“受试者”是指哺乳动物，并且包括人和非人哺乳动物。在本文的特定实施方案中，患者或受试者是人。

[0084] 在数值之前使用的术语“约”指示该值可在合理的范围内变化：±5%、±1%或±0.2%。

[0085] 与另一序列具有一定百分比(例如，80%、85%、90%或95%)的“序列同一性”的多核苷酸或多核苷酸区域(或多肽或多肽区域)意指在比对时，该百分比的碱基(或氨基酸)在这两个序列的比较中是相同的。比对和百分比同源性或序列同一性可使用本领域内已知的软件程序来确定，所述程序例如Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等编辑，1987) 增刊30，第7.7.18部分，表7.7.1中所述的那些。优选地，将默认参数用于比对。一个比对程序是BLAST，其使用默认参数。所述程序的实例包括BLASTN和BLASTP，其使用以下默认参数：遗传密码=标准；过滤器=无；链=两者；截留值=60；期望值=10；矩阵=BLOSUM62；描述=50个序列；排序方式=高评分；数据库=非冗余，GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+Swiss蛋白质+SPupdate+PIR。这些程序的细节可见于以下网络地址：ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0086] “同源性”或“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可通过比较每个序列中可出于比较目的进行比对的位置来确定。当被比较序列中的位置被相同碱基或氨基酸占据时，所述分子在该位置是同源的。序列之间的同源性程度随所述序列所共有的匹配或同源位置的数目而变化。“无关”或“非同源”序列与本公开的序列之一共有小于40%的同一性，或者小于25%的同一性。

[0087] II. 方法

[0088] 在一个方面，本发明涉及用于调节患者的由麸质不耐受介导的病况的方法，其包

括向所述患者施用有效量的包含猪笼草酶的药物组合物。在优选的实施方案中，所述病况是乳糜泻或小麦变态反应。

[0089] 在另一方面，本发明涉及用于减弱或预防由于哺乳动物的肠中存在肽类食物抗原而在肠中产生和/或募集IEL的方法。在一个实施方案中，所述方法包括向哺乳动物施用有效量的包含猪笼草酶的药物组合物。在一个实施方案中，通过所述药物组合物降解麸质蛋白以减弱或预防肠中产生和/或募集IEL。

[0090] 在一个方面，本发明涉及用于减弱或预防由于哺乳动物的肠中存在肽类食物抗原所致的肠道炎症的方法。在一个实施方案中，所述方法包括向哺乳动物施用有效量的包含猪笼草酶的药物组合物。在一个实施方案中，通过所述酶降解肽类食物抗原以减弱或预防肠道炎症。

[0091] 在一个方面，本发明涉及用于减弱或预防由于哺乳动物的肠中存在肽类食物抗原所致的上皮内淋巴细胞增多的方法。在一个实施方案中，所述方法包括向哺乳动物施用有效量的包含猪笼草酶的药物组合物。在一个实施方案中，通过所述药物组合物降解肽类食物抗原以减弱或预防肠中的上皮内淋巴细胞增多。

[0092] 在一方面，本发明涉及用于减弱或预防由于哺乳动物的肠中存在肽类食物抗原所致的绒毛萎缩的方法。在一个实施方案中，所述方法包括向哺乳动物施用有效量的包含猪笼草酶的药物组合物。在一个实施方案中，通过所述药物组合物降解肽类食物抗原以减弱或预防肠中的绒毛萎缩。在一个实施方案中，绒毛萎缩是由于肠的炎症所致。

[0093] 在一个实施方案中，猪笼草酶是猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体或其混合物。在优选的实施方案中，药物制剂是持续释放型制剂。

[0094] 在一个实施方案中，所述变体是具有与SEQ ID NO.:1、SEQ ID NO.:5、SEQ ID NO.:6、SEQ ID NO.:7、SEQ ID NO.:8、SEQ ID NO.:9、SEQ ID NO.:20或SEQ ID NO.:21的氨基酸序列具有至少85%序列同源性的氨基酸序列的蛋白质。在一个实施方案中，所述变体是具有与SEQ ID NO.:1的氨基酸序列具有至少85%序列同源性的氨基酸序列的蛋白质。在一个实施方案中，所述变体是具有与SEQ ID NO.:5的氨基酸序列具有至少85%序列同源性的氨基酸序列的蛋白质。在一个实施方案中，所述变体是具有与SEQ ID NO.:6的氨基酸序列具有至少85%序列同源性的氨基酸序列的蛋白质。在一个实施方案中，所述变体是具有与SEQ ID NO.:7的氨基酸序列具有至少85%序列同源性的氨基酸序列的蛋白质。在一个实施方案中，所述变体是具有与SEQ ID NO.:8的氨基酸序列具有至少85%序列同源性的氨基酸序列的蛋白质。在一个实施方案中，所述变体是具有与SEQ ID NO.:9的氨基酸序列具有至少85%序列同源性的氨基酸序列的蛋白质。在一个实施方案中，所述变体是具有与SEQ ID NO.:20的氨基酸序列具有至少85%序列同源性的氨基酸序列的蛋白质。在一个实施方案中，所述变体是具有与SEQ ID NO.:21的氨基酸序列具有至少85%序列同源性的氨基酸序列的蛋白质。

[0095] 在一个实施方案中，所述药物组合物包含猪笼草瓶状体流体的提取物。在一个实施方案中，所述药物组合物包含从猪笼草瓶状体流体的提取物纯化的猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和/或奈普洛森。在一个实施方案中，猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森或其变体中的至少一种是重组蛋白质。在一个实施方案中，在施用之前，所述药物组合物为约pH 5至约pH 8。用于本文所述的方法的药物组合物更详细地论述于下文。

[0096] 在优选的实施方案中,哺乳动物是人。在一个实施方案中,人罹患选自由麸质不耐受、乳糜泻、注意缺陷多动障碍、孤独症、类风湿性关节炎、纤维肌痛和疱疹样皮炎组成的组的疾病。在一个实施方案中,人罹患食物变态反应。

[0097] 在一个实施方案中,在食用含麸质食物之前、期间或之后立即口服施用所述药物组合物。

[0098] 在一些实施方案中,在受试者摄入包含麸质或疑似包含麸质的食物之前,向所述受试者施用所述药物组合物。在一些实施方案中,在所述酶在降解受试者将摄入的食物中的麸质方面至少部分有效(例如,至少约10%、20%、50%、70%、90%的原始活性)的时段内施用所述药物组合物。在一些实施方案中,在受试者摄入食物之前不超过约4小时、3小时、2小时、1小时或30分钟,施用所述药物组合物。

[0099] 在一些实施方案中,与受试者摄入潜在免疫原性食物同时,向所述受试者施用所述药物组合物。在一些实施方案中,将酶组合物与食物一起施用。在一些实施方案中,将所述药物组合物与食物分开施用。

[0100] 在一些实施方案中,在受试者摄入潜在免疫原性食物之后不久,向所述受试者施用所述药物组合物。在一些实施方案中,在食物中至少一部分(例如,至少约10%、20%、50%、70%、90%)抗原仍在受试者的胃中的时段内施用所述药物组合物。在一些实施方案中,在受试者摄入食物之后不超过4小时、3小时、2小时、1小时或30分钟,施用所述药物组合物。

[0101] 通常,以安全且足以产生将肽类食物抗原解毒的期望作用的量施用所述药物组合物。所述药物组合物的剂量可取决于许多因素而变化,如所施用的特定酶、受试者对食物的敏感性、所摄入的含抗原食物的量和类型、酶的药物效应动力学性质、施用方式、接受者的年龄、健康和体重、症状的性质和程度、治疗的频率和同时治疗的类型(如果有的话)以及酶的清除率。本领域技术人员可基于上述因素确定适当的剂量。所述组合物可以最初以可根据需要调整的适合剂量施用,这取决于临床反应。体外测定可任选地用于帮助鉴别最佳的剂量范围。待用于制剂中的精确剂量还将取决于施用途径和/或疾病或病症的严重性,并且应当根据医师的判断和每个受试者的情况来决定。

[0102] 成年受试者的剂量或给药方案可针对儿童和婴儿按比例调整,并且还针对其它施用或其它形式,与例如分子量或免疫反应按比例调整。可在医生的决定下以适当的间隔重复施用或治疗。

[0103] 通常,当需要时,如当受试者将要或正在食用或已经食用包含抗原性蛋白质或疑似包含抗原性蛋白质的食物时,施用所述药物组合物。在任何情况下,对于普通人,其可以每天每千克体重约0.001mg至约1000mg酶、或每剂量约1mg至约100g的剂量施用。在一些实施方案中,所述酶可以每天0.001、0.01、0.1、1、5、10、50、100、500或1000mg/kg体重、以及这些值中的任何两个之间的范围(包括端点)施用。在一些实施方案中,所述酶可以每剂量1mg、10mg、100mg、200mg、500mg、700mg、1g、10g、20g、50g、70g、100g、以及这些值中的任何两个之间的范围(包括端点)施用。在一些实施方案中,取决于受试者摄入包含抗原性蛋白质的食物的次数和/或食用此类食物的量,其可以一天施用一次、两次、三次等。本文所述的酶的量可涉及所述组合物中的全部酶或每种酶。

[0104] 在一些实施方案中,所施用的药物组合物的量(或近似量)取决于食用/待食用的

底物(例如,麸质和/或其它蛋白质或潜在抗原性蛋白质)的量。在一个实施方案中,每1g底物施用约1mg至约1g的酶。在一个实施方案中,每1g底物施用约5mg至约1g的酶。在一个实施方案中,每1g底物施用约10mg至约1g的酶。在一个实施方案中,每1g底物施用约100mg至约1g的酶。在一个实施方案中,每1g底物施用约1mg至约500mg的酶。在一个实施方案中,每1g底物施用约1mg至约250mg的酶。在一个实施方案中,每1g底物施用约1mg至约100mg的酶。在一个实施方案中,每1g底物施用约1mg至约10mg的酶。这包括这些范围内的任何值(包括端点),以及这些值中的任两个之间的子范围。

[0105] 在一个实施方案中,底物与施用的酶的比率为约1:1至约10000:1。在优选的实施方案中,底物与酶的比率为约10:1至约1000:1。在一个实施方案中,底物与酶的比率为约10:1至约100:1。

[0106] 本发明的药物组合物可作为唯一的活性剂施用,或它们可与其它试剂联合(同时、依序或分开,或通过共配制)施用,所述试剂包括表现出相同或类似的治疗活性并且被确定为对于此类联合施用安全且有效的其它化合物。

[0107] 在一些实施方案中,将所述药物组合物与另外的酶如胃部蛋白酶(gastric protease)、天冬氨酸蛋白酶(如胃蛋白酶、胃蛋白酶原或由Chen等,Aspartic proteases gene family in rice:Gene structure and expression,predicted protein features and phylogenetic relation, Gene 442:108-118 (2009) 描述的那些)以及酶如另一脯氨酰基内肽酶(PEP)、二肽基肽酶IV(DPP IV)和二肽基羧肽酶(DCP)或半胱氨酸蛋白酶B(描述于美国专利号7,910,541中)一起施用。在一个实施方案中,另一酶以产生和/或分泌另外的酶的细菌的形式被施用。在一个实施方案中,所述细菌被工程化以产生和/或分泌猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森和/或其变体。

[0108] 在一些实施方案中,向受试者施用所述药物组合物与另一试剂。可与所述药物组合物一同施用的试剂的非限制性实例包括组织转谷氨酰胺酶抑制剂、抗炎剂如淀粉酶、葡糖淀粉酶、内肽酶、HMG-CoA还原酶抑制剂(例如,康帕丁(compactin)、洛伐他汀(lovastatin)、辛伐他汀(simvastatin)、普伐他汀(pravastatin)和阿托伐他汀(atorvastatin))、白三烯受体拮抗剂(例如,孟鲁司特(montelukast)和扎鲁司特(zafirlukast))、COX-2抑制剂(例如,塞来昔布(celecoxib)和罗非昔布(rofecoxib))、p38MAP激酶抑制剂(例如,BIRB-796);肥大细胞-稳定剂如色甘酸钠(chromolyn)、吡嘧司特(pemirolast)、普昔罗米(proxicromil)、瑞吡司特(repirinast)、硫葱唑(doxantrazole)、氨来咕诺(amlexanox)、奈多罗米(nedocromil)和普克罗米(probucromil)、抗溃疡剂、抗变态反应剂如抗组胺剂(例如,阿伐斯汀(acrivastine)、西替利嗪(cetirizine)、地氯雷他定(desloratadine)、依巴斯汀(ebastine)、非索非那定(fexofenadine)、左西替利嗪(levocetirizine)、氯雷他定(loratadine)和咪唑斯汀(mizolastine))、转谷氨酰胺酶2(TG2)抑制剂、抗-TNF α 剂和抗生素。在一个实施方案中,另外的试剂是益生菌。益生菌包括但不限于乳杆菌属(lactobacillus)、酵母菌、芽孢杆菌属(bacillus)或双歧杆菌属(bifidobacterium)的种和菌株。在一个实施方案中,另一试剂是弹性蛋白酶抑制剂。在一个实施方案中,另一试剂以产生和/或分泌另外的试剂的细菌的形式被施用。

[0109] 在一些实施方案中,另一试剂包括在肠中具有活性的酶(例如,蛋白酶)。不受限于理论,认为此类酶可与所述药物组合物的酶协同作用以进一步降解免疫原性蛋白质。

[0110] 本文还提供了包含猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体和/或其盐的酶组合物在制造用于治疗或预防上述病况和疾病中的一种的药物中的应用。

[0111] III. 药物组合物

[0112] 所述药物组合物可单独或与适当的药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂以各种组合物的形式施用。

[0113] 因此,在另一方面,本文提供了包含猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体和/或其盐的组合物。在一些实施方案中,所述组合物是药物组合物。所述组合物可被配制成固体、半固体或液体形式,如片剂、胶囊、粉末、颗粒、软膏、溶液、注射剂、凝胶和微球。所述组合物的施用可以各种方式实现,例如通过口服施用。

[0114] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含治疗有效量的猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体或其混合物和药学上可接受的载剂。在特定的实施方案中,术语“药学上可接受的”意指获得联邦、州政府的管理机构批准或列示于美国药典或另一公认药典中用于动物且更特别地用于人。术语“载剂”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒剂。此类药物载剂可以是无菌的液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的以那些,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。还可采用盐水溶液以及水性右旋糖和甘油溶液作为液体载剂。

[0115] 适合的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、二氧化硅凝胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。如果期望的话,所述组合物还可含有少量润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可呈溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、持续释放型制剂等的形式。适合的药物载剂的实例描述于E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中,该文献通过引用整体并入本文。此类组合物将含有治疗有效量的优选呈纯化形式的酶,以及适合量的载剂,以向受试者提供适当施用的形式。制剂应适合施用方式。

[0116] 对于口服施用来说,所述药物组合物可单独或与适当的添加剂组合用于制备片剂、粉末、颗粒、胶囊、糖浆、液体、悬浮液等。例如,可利用常规的添加剂、崩解剂、润滑剂、稀释剂、缓冲剂、湿润剂、防腐剂和调味剂来制备所述组合物的固体口服形式。赋形剂的非限制性实例包括乳糖、甘露醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米淀粉、羧甲基纤维素钠、滑石、硬脂酸镁、调味剂和着色剂。在一些实施方案中,所述制剂在受试者的胃中释放酶,使得肽类食物抗原可被所述酶降解。

[0117] 可任选地在适当的缓冲剂(例如磷酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、咪唑缓冲液)和赋形剂(例如冷冻保护剂如蔗糖、乳糖、海藻糖)存在下,从水溶液中冻干所述组合物。冻干饼可任选地与赋形剂共混并制成不同的形式。

[0118] 在另一方面,本文提供用于治疗有需要的患者的麸质不耐受或相关病况(如乳糜泻、小麦变态反应、麸质敏感和疱疹样皮炎)的方法,其包括在被患者食用之前,用有效量的所述组合物处理包含麸质或疑似包含麸质的食物。在一些实施方案中,在食物制备期间,将其与有效量的所述组合物组合。在一个实施方案中,在食物制备中的任何加热步骤之后添加所述组合物。在一个实施方案中,在食物制备中的一个或多个加热步骤之前添加所述组合物。

[0119] 猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和奈普洛森在活化前作为酶原存在于猪笼草中。

即,所述蛋白质包括被裂解以活化瓶状体流体中的酶的前肽。在一个实施方案中,所述组合物包含猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森、其变体和/或其盐,包含前肽。在一个实施方案中,所述前肽与所述酶的N末端相邻。在一个实施方案中,所述前肽是所述酶的天然存在的前肽。在一个实施方案中,所述前肽是异源前肽(例如,来自不同的蛋白质或物种,或合成的)。在一个实施方案中,所述前肽被酸性条件裂解。在一个实施方案中,所述前肽被酶裂解。在一个实施方案中,所述前肽的存在导致所述酶在胃中的活性延迟(例如,归因于去除所述前肽和产生成熟酶所需的时间)。在一个实施方案中,所述前肽被工程化以更缓慢地被去除以延迟所述酶在胃中的活性。在一个实施方案中,所述前肽被工程化以更快速地被去除以加速所述酶在胃中的活性。

[0120] 在优选的实施方案中,所述制剂是受控释放型制剂。术语“受控释放型制剂”包括持续释放型制剂和延时释放型制剂。受控释放型制剂是本领域所熟知的。这些包括允许药物的持续释放、周期性释放、脉冲释放或延迟释放的赋形剂。受控释放型制剂包括但不限于将药物包埋至基质中;肠溶包衣;微囊包封;凝胶和水凝胶;和允许药物的受控释放的任何其它制剂。

[0121] 在一些实施方案中,所述组合物作为食物添加剂与包含或疑似包含潜在抗原性食物蛋白质的食物一起施用。在一个实施方案中,所述食物包含或疑似包含麸质,例如由小麦、裸麦和大麦等制成的面包、意大利面、谷物等。在一些实施方案中,所述组合物作为此类食物中的成分被添加。在一些实施方案中,在食用食物之前,任选地在所述组合物无活性的pH(如约5或高于5的pH)下,将所述组合物分散至食物中。在一些实施方案中,所述组合物可被制成或并入粉末、涂抹料、喷雾剂、调味酱、蘸酱、搅打奶油等中,当食物正在被患者食用时,其可被施加至食物。在一些实施方案中,所述组合物可被制成引起人食欲的形式,如糖果、口香糖、膳食补充剂咀嚼物、糖浆等,以易于施用。在一些实施方案中,所述组合物可与常见的食品混合,如糖、盐、色拉调味汁、香料、奶酪、黄油、人造黄油、涂抹料、黄油、油煎起酥油、蛋黄酱、乳制品、坚果黄油、种子酱、果仁酱、花生酱等。优选地,包含所述组合物的食品或添加剂无需在被患者摄入之前加热,使得可将由于升高温度所致酶的活性的可能损失最小化。

[0122] 在一个实施方案中,所述组合物中的酶在与酸(即,在胃中)接触后被活化。

[0123] 在另一方面,本文提供包含奈普洛森、猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、其变体或其组合的食物产品。在一些实施方案中,食物产品包含麸质或疑似包含麸质,如由小麦、裸麦和大麦制成的焙烤产品(例如,蛋糕、松饼、炸面圈、酥皮糕点、卷状物和面包)、意大利面食、薄脆饼干、脆玉米片、谷物等。在一些实施方案中,所述食物产品可与包含麸质或疑似包含麸质的另一食物产品一起食用。此类食物的非限制性实例包括粉末、涂抹料、喷雾剂、调味酱、蘸酱、搅打奶油、糖果、口香糖、糖浆、糖、盐、色拉调味汁、香料、奶酪、黄油、人造黄油、涂抹料、黄油、油煎起酥油、蛋黄酱、乳制品、坚果黄油、种子酱、果仁酱、花生酱等。

[0124] 在一些实施方案中,将包含奈普洛森、猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、其变体或其组合的组合物与食物混合,或用于预处理含有麸质的食品。存在于食物中的组合物可具有酶活性以降低在摄入之前或期间食物中麸质的水平。

[0125] 在本发明的一个方面,在食用食物之前,将包含奈普洛森、猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、其变体或其组合的组合物添加至食物中。在一个实施方案中,本发明涉及包含内

部赋形剂和有效量的药物组合物的分配器,其用以消化麸质。在一个实施方案中,在食用食物之前,将所述药物组合物和/或内部赋形剂添加至食物中。在一个实施方案中,所述食物包含麸质或疑似包含麸质。在一个实施方案中,所述内部赋形剂包含氯化钠或碘化钠或其混合物。在一个实施方案中,所述药物组合物和/或内部赋形剂呈大小适于从所述分配器中有效地分配的颗粒形式。

[0126] 在一些实施方案中,所述组合物(如药物组合物或可食用组合物)或食物产品包含约0.1%至约99%、约0.5%至约95%、约1%至约95%、约5%至约95%、约10%至约90%、约20%至约80%、约25%至约75%的所述酶。在一些实施方案中,所述组合物(如药物组合物或可食用组合物)或食物产品中的酶的量是总组合物或食物产品的约0.01%、约0.1%、约0.5%、约1%、约5%、约10%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%、或所述值中的任何两个之间的范围(包括端点)。

[0127] 在一些实施方案中,所述组合物包含奈普洛森和猪笼草蛋白酶或其变体。在一些实施方案中,猪笼草蛋白酶是猪笼草蛋白酶I和/或猪笼草蛋白酶II或其变体。在一些实施方案中,猪笼草蛋白酶是重组猪笼草蛋白酶I和/或重组猪笼草蛋白酶II或其变体。在一些实施方案中,猪笼草蛋白酶是重组猪笼草蛋白酶I和重组猪笼草蛋白酶II或其各自的变体。在一些实施方案中,奈普洛森是重组奈普洛森或其变体。在优选的实施方案中,所述组合物包含猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和/或奈普洛森,其包含来自猪笼草属种的猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和/或奈普洛森或其变体的氨基酸序列。

[0128] 已从若干猪笼草属种(例如,奇异猪笼草(GenBank登记号JX494401)、小猪笼草(GenBank登记号AB114914)和翼状猪笼草(GenBank登记号AB266803))中描述猪笼草蛋白酶I mRNA/cDNA序列。已从若干猪笼草属种(例如,奇异猪笼草(GenBank登记号JX494402)和小猪笼草(GenBank登记号AB114915))中描述猪笼草蛋白酶II mRNA/cDNA序列。

[0129] 已从若干猪笼草属种(例如,奇异猪笼草(GenBank登记号AFV26024;SEQ ID NO.:5)、小猪笼草(GenBank登记号BAD07474;SEQ ID NO.:7)和翼状猪笼草(GenBank登记号BAF98915;SEQ ID NO.:6))中描述猪笼草蛋白酶I蛋白质序列。已从若干猪笼草属种(例如,奇异猪笼草(GenBank登记号AFV26025;SEQ ID NO.:8)和小猪笼草(GenBank登记号BAD07475;SEQ ID NO.:9))中描述猪笼草蛋白酶II蛋白质序列。所述序列还见于美国专利申请公开号2014/0186330,该美国专利申请通过引入整体并入本文。

[0130] 由本文所提供的GenBank登记号表示的每个序列均通过引用整体并入本文。

[0131] 在一些实施方案中,猪笼草蛋白酶是与猪笼草蛋白酶I的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO.:5、SEQ ID NO.:6、SEQ ID NO.:7或SEQ ID NO.:21)具有至少约85%序列同源性的猪笼草蛋白酶变体。在一些实施方案中,所述变体与猪笼草蛋白酶I的氨基酸序列具有至少约90%序列同源性。在一些实施方案中,所述变体与猪笼草蛋白酶I的氨基酸序列具有至少约95%序列同源性。在一些实施方案中,所述变体与猪笼草蛋白酶I的氨基酸序列具有至少约96%序列同源性。在一些实施方案中,所述变体与猪笼草蛋白酶I的氨基酸序列具有至少约97%序列同源性。在一些实施方案中,所述变体与猪笼草蛋白酶I的氨基酸序列具有至少约98%序列同源性。在一些实施方案中,所述变体与猪笼草蛋白酶I的氨基酸序列具有至少约99%序列同源性。在一个实施方案中,猪笼草蛋白酶包含SEQ ID NO.:5、SEQ ID NO.:6、

SEQ ID NO.:7或SEQ ID NO.:21的氨基酸序列。

[0132] 在一些实施方案中，猪笼草蛋白酶是与猪笼草蛋白酶II的氨基酸序列(例如，SEQ ID NO.:8、SEQ ID NO.:9或SEQ ID NO.:22)具有至少约85%序列同源性的猪笼草蛋白酶变体。在一些实施方案中，所述变体与猪笼草蛋白酶II的氨基酸序列具有至少约90%序列同源性。在一些实施方案中，所述变体与猪笼草蛋白酶II的氨基酸序列具有至少约95%序列同源性。在一些实施方案中，所述变体与猪笼草蛋白酶II的氨基酸序列具有至少约96%序列同源性。在一些实施方案中，所述变体与猪笼草蛋白酶II的氨基酸序列具有至少约97%序列同源性。在一些实施方案中，所述变体与猪笼草蛋白酶II的氨基酸序列具有至少约98%序列同源性。在一些实施方案中，所述变体与猪笼草蛋白酶II的氨基酸序列具有至少约99%序列同源性。在一个实施方案中，猪笼草蛋白酶包含SEQ ID NO.:8、SEQ ID NO.:9或SEQ ID NO.:22的氨基酸序列。

[0133] 在本发明的一个方面，所述组合物中的奈普洛森与猪笼草蛋白酶I和/或II的比率使得肽类食物抗原被裂解成足够小和/或无害的片段，以预防受试者的肠中的麸质不耐受、乳糜泻、小麦变态反应、或疱疹样皮炎、炎症、IEL增殖或募集、上皮内淋巴细胞增多、和/或绒毛萎缩、或其任何症状。在一些实施方案中，奈普洛森：猪笼草蛋白酶的比率为约1:100至约100:1。

[0134] 在一些实施方案中，所述组合物包含至少约100:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶(猪笼草蛋白酶I和/或II)。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约90:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约70:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约60:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约50:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约40:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约30:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约20:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约10:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约5:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约4:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约3:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约2:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:1的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:2的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:3的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:4的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:5的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:10的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:20的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:30的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:40的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:50的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:60的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些

实施方案中，所述组合物包含至少约1:70的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:80的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:90的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:100的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。

[0135] 在本发明的一个方面，所述组合物中的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II的比率使得肽类食物抗原被裂解成足够小和/或无害的片段，以预防受试者的肠中的炎症、IEL增殖或募集、上皮内淋巴细胞增多和/或绒毛萎缩。在一些实施方案中，猪笼草蛋白酶I：猪笼草蛋白酶II的比率为约1:100至约100:1。

[0136] 在一些实施方案中，所述组合物包含至少约100:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约90:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约70:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约60:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约50:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约40:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约30:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约20:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约10:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约5:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约4:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约3:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约2:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:2的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:3的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:4的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:5的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:10的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:20的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:30的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:40的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:50的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:60的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:70的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:80的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:90的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中，所述组合物包含至少约1:100的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。

[0137] IV. 制备方法

[0138] 预期猪笼草蛋白酶和/或奈普洛森可通过本领域已知的方法浓缩(或提取)或纯

化,所述方法例如(但不限于)过滤或基于来自天然来源的固定化胃蛋白酶抑制剂的亲和纯化,所述天然来源包括诸如猪笼草的植物的瓶状体分泌物。经典的蛋白质色谱,如尺寸排阻色谱(也被称为凝胶渗透色谱)和/或色谱聚焦色谱也可用于浓缩(或提取)或纯化猪笼草蛋白酶和/或奈普洛森。可在尺寸排阻之前或之后使用色谱聚焦。猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和奈普洛森以相对少量存在于天然植物分泌物中。例如可使用产生表达和/或分泌增加量的期望的酶或其变体的转基因植物的生物工程技术来增加猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和/或奈普洛森的产量。

[0139] 除了从植物来源分离之外,猪笼草酶或其变体还可通过化学合成制备。化学合成可根据期望的酶或变体的序列通过氨基酸的偶合来实现。各种肽偶合方法和商业肽合成设备可用于合成肽或蛋白质,例如,Applied Biosystems公司(Foster City, Calif.)、Beckman和其它制造商的自动化合成器。

[0140] 在另一方面,本文提供了使用重组产生系统通过以下方式来制备猪笼草酶或其变体的方法:用所述酶的DNA(例如,cDNA)和/或信使RNA转化或转染细胞而使得所述细胞能够产生所述酶。例如,可通过在生物体如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、乳杆菌、芽孢杆菌、曲霉(*Aspergillus*)和植物细胞培养物如烟草细胞等中建立宿主-载体系统来产生猪笼草蛋白酶。

[0141] 本文还提供了包含多核苷酸的载体和宿主细胞如大肠杆菌以及含有如本文所述的任何多核苷酸或多肽的组合物。

[0142] 在另一方面,本文提供了用于产生重组猪笼草酶(猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和/或奈普洛森或其变体)的方法,其包括在所选宿主生物体中表达编码所述酶的核酸序列,和将所述核酸序列插入适当设计的载体中。在一个方面,所述重组酶是猪笼草蛋白酶I或其变体。在一个方面,所述重组酶是猪笼草蛋白酶II或其变体。在一个方面,所述重组酶是奈普洛森或其变体。在一个方面,所述重组酶是猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和/或奈普洛森或其变体的混合物。

[0143] 在另一方面,本文提供了包含重组猪笼草蛋白酶如猪笼草蛋白酶I和/或猪笼草蛋白酶II或其变体的组合物。在一个方面,所述重组猪笼草蛋白酶是猪笼草蛋白酶I或其变体。在一个方面,所述重组猪笼草蛋白酶是猪笼草蛋白酶II或其变体。在一个方面,所述重组猪笼草蛋白酶是猪笼草蛋白酶I和猪笼草蛋白酶II或其变体的混合物。

[0144] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的cDNA。在一个实施方案中,本发明涉及包含如本文所述的cDNA的载体。在优选的实施方案中,所述载体是表达载体。在一个实施方案中,本发明涉及表达重组猪笼草蛋白酶I、重组猪笼草蛋白酶II、重组奈普洛、其变体或混合物的细胞。

[0145] 在一些实施方案中,猪笼草酶的生物合成可通过用包含编码猪笼草蛋白酶I的cDNA(例如SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.:6、GenBank登记号JX494401、GenBank登记号AB114914或GenBank登记号AB266803的核苷酸序列)的载体转化细胞来实现。在一些实施方案中,猪笼草蛋白酶的生物合成可通过用包含与编码猪笼草蛋白酶I的cDNA同源的序列的载体转化细胞来实现,该序列编码具有蛋白酶活性的蛋白质。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶I的cDNA具有至少约60%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶I的cDNA具有至

少约70%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶I的cDNA具有至少约80%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶I的cDNA具有至少约85%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶I的cDNA具有至少约90%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶I的cDNA具有至少约95%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶I的cDNA具有至少约96%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶I的cDNA具有至少约97%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶I的cDNA具有至少约98%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶I的cDNA具有至少约99%同源性。在优选的实施方案中，所述序列编码保持麸质酶活性的猪笼草蛋白酶I变体。在特别优选的实施方案中，所述序列编码降解至少一种毒性麸质肽的猪笼草蛋白酶I变体。

[0146] 在一些实施方案中，猪笼草酶的生物合成可通过用包含编码猪笼草蛋白酶II的cDNA(例如SEQ ID NO.:8、SEQ ID NO.:9、GenBank登记号JX494402或GenBank登记号AB114915的核苷酸序列)的载体转化细胞来实现。在一些实施方案中，猪笼草蛋白酶的生物合成可通过用包含与编码猪笼草蛋白酶II的cDNA同源的序列的载体转化细胞来实现，该序列编码具有蛋白酶活性的蛋白质。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶II的cDNA具有至少约60%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶II的cDNA具有至少约70%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶II的cDNA具有至少约80%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶II的cDNA具有至少约85%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶II的cDNA具有至少约90%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶II的cDNA具有至少约95%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶II的cDNA具有至少约96%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶II的cDNA具有至少约97%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶II的cDNA具有至少约98%同源性。所述序列可与编码猪笼草蛋白酶II的cDNA具有至少约99%同源性。在优选的实施方案中，所述序列编码保持麸质酶活性的猪笼草蛋白酶II变体。在特别优选的实施方案中，所述序列编码降解至少一种毒性麸质肽的猪笼草蛋白酶II变体。

[0147] 在一些实施方案中，猪笼草酶的生物合成可通过用包含编码奈普洛森的cDNA(例如SEQ ID NO.:2的核苷酸序列)的载体转化细胞来实现。在一些实施方案中，奈普洛森的生物合成可通过用包含与编码奈普洛森的cDNA同源的序列的载体转化细胞来实现，该序列编码具有蛋白酶活性的蛋白质。所述序列可与编码奈普洛森的cDNA具有至少约60%同源性。所述序列可与编码奈普洛森的cDNA具有至少约70%同源性。所述序列可与编码奈普洛森的cDNA具有至少约80%同源性。所述序列可与编码奈普洛森的cDNA具有至少约85%同源性。所述序列可与编码奈普洛森的cDNA具有至少约90%同源性。所述序列可与编码奈普洛森的cDNA具有至少约95%同源性。所述序列可与编码奈普洛森的cDNA具有至少约96%同源性。所述序列可与编码奈普洛森的cDNA具有至少约97%同源性。所述序列可与编码奈普洛森的cDNA具有至少约98%同源性。所述序列可与编码奈普洛森的cDNA具有至少约99%同源性。在优选的实施方案中，所述序列编码保持脯氨酰基内切蛋白酶活性的奈普洛森变体。在尤其优选的实施方案中，所述序列编码保持麸质酶活性的奈普洛森变体。在特别优选的实施方案中，所述序列编码降解至少一种毒性麸质肽的奈普洛森变体。

[0148] 不受理论的约束，认为受影响的个体的肠中对麸质的炎性反应归因于麸质蛋白质的不完全水解，导致形成毒性(免疫毒性)麸质肽。已知若干免疫毒性和/或潜在免疫毒性麸质肽。这些包括但不限于33聚体(SEQ ID NO.:15, LQLQPF(PQPQLPY)₃PQPQPF)和p31-49(SEQ ID NO.:16, LGQQQPFPPQQPYPQPQPF)，其来自 α -麦醇溶蛋白；Gly-156(SEQ ID NO.:17,

QQQQPPFSQQQQSPFSQQQQ),其来自低分子量麦谷蛋白;以及九肽重复(SEQ ID NO.:18, GYYPTSPQQ)和六肽重复(SEQ ID NO.:19,PGQGQQ),其来自高分子量麦谷蛋白。

[0149] 在一些实施方案中,通过用一种或多种包含每种期望酶的cDNA序列的载体转染、感染或转化细胞来合成猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II、奈普洛森和/或其变体。即,单个细胞、细胞系或生物体可被工程化以产生两种或更多种酶。在一些实施方案中,通过单独的细胞合成期望酶并将其组合于所述药物组合物中。在优选的实施方案中,重组猪笼草蛋白酶I、重组猪笼草蛋白酶II、重组奈普洛森和/或其变体未被糖基化。在一个实施方案中,重组猪笼草蛋白酶I、重组猪笼草蛋白酶II、重组奈普洛森和/或其变体具有不同于天然酶(即,从猪笼草属植物中分离的猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II或奈普洛森)的糖基化模式。

[0150] 合成(例如,重组)猪笼草酶可根据已知方法浓缩或纯化,所述方法如用于从植物瓶状体液体中分离猪笼草酶的那些。

[0151] 在一些实施方案中,从天然来源或合成(例如,重组)来源分离的蛋白质产物包含至少20重量%的至少一种猪笼草酶或其变体。在一些实施方案中,所分离的蛋白质产物包含至少约50重量%、约75重量%、约90重量%、约95重量%的猪笼草酶或其变体。在一些实施方案中,所分离的蛋白质产物包含至少约99重量%的猪笼草酶或其变体。

[0152] 在一些实施方案中,所述重组猪笼草酶或其变体基本上仅包含重组猪笼草蛋白酶或其变体。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶或其变体基本上仅包含重组猪笼草蛋白酶I或其变体。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶或其变体基本上仅包含猪笼草蛋白酶II或其变体。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶或其变体包含猪笼草蛋白酶I和猪笼草蛋白酶II或其变体。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶或其变体包含至少约100:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II(或其各自的变体)。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约90:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约70:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约60:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约50:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约40:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约30:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约20:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约10:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约5:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约4:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约3:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约2:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约1:1的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约1:2的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。在一些实施方案中,所述重组猪笼草蛋白酶包含至少约1:3的比率的猪笼草蛋白酶I与猪笼草蛋白酶II。

施方案中,所述重组猪笼草酶包含至少约1:10的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中,所述重组猪笼草酶包含至少约1:20的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中,所述重组猪笼草酶包含至少约1:30的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中,所述重组猪笼草酶包含至少约1:40的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中,所述重组猪笼草酶包含至少约1:50的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中,所述重组猪笼草酶包含至少约1:60的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中,所述重组猪笼草酶包含至少约1:70的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中,所述重组猪笼草酶包含至少约1:80的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中,重组猪笼草酶包含至少约1:90的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。在一些实施方案中,所述重组猪笼草酶包含至少约1:100的比率的奈普洛森与猪笼草蛋白酶。

[0154] 在一些实施方案中,从天然来源或合成来源分离的蛋白质产物包含与猪笼草属猪笼草蛋白酶I的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO.:5; SEQ ID NO.:6; SEQ ID NO.:7; SEQ ID NO.:21)至少约70%同源的氨基酸。在一个实施方案中,蛋白质产物保持蛋白酶活性。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶I至少约80%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶I至少约85%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶I至少约90%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶I至少约95%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶I至少约96%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶I至少约97%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶I至少约98%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶I至少约99%同源。

[0155] 在一些实施方案中,从天然来源或合成来源分离的蛋白质产物包含与猪笼草属猪笼草蛋白酶II(例如,SEQ ID NO.:8; SEQ ID NO.:9; SEQ ID NO.:20)至少约70%同源的蛋白质。在一个实施方案中,蛋白质产物保持蛋白酶活性。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶II至少约80%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶II至少约85%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶II至少约90%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶II至少约95%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶II至少约96%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶II至少约97%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶II至少约98%同源。所述蛋白质可与猪笼草属猪笼草蛋白酶II至少约99%同源。

[0156] 在一些实施方案中,从天然来源或合成来源分离的蛋白质产物包含与猪笼草属奈普洛森(例如,SEQ ID NO.:1)至少约70%同源的蛋白质。在一个实施方案中,蛋白质产物保持蛋白酶活性。所述蛋白质可与猪笼草属奈普洛森至少约80%同源。所述蛋白质可与猪笼草属奈普洛森至少约85%同源。所述蛋白质可与猪笼草属奈普洛森至少约90%同源。所述蛋白质可与猪笼草属奈普洛森至少约95%同源。所述蛋白质可与猪笼草属奈普洛森至少约96%同源。所述蛋白质可与猪笼草属奈普洛森至少约97%同源。所述蛋白质可与猪笼草属奈普洛森至少约98%同源。所述蛋白质可与猪笼草属奈普洛森至少约99%同源。

[0157] 在一些实施方案中,从天然来源或合成来源分离的蛋白质产物包含具有猪笼草属猪笼草蛋白酶I的至少约10%的原始蛋白酶活性的猪笼草蛋白酶或其变体。在一些实施方案中,所述蛋白质产物包含具有猪笼草蛋白酶I的至少约20%的原始蛋白酶活性的猪笼草蛋白酶或其变体。在一些实施方案中,所述蛋白质产物包含具有猪笼草蛋白酶I的至少约

- [0160] 除非另有说明,说明书通篇中所用的缩写具有以下含义:
- [0161] g=克
- [0162] kDa=千道尔顿
- [0163] kg=千克
- [0164] L=升
- [0165] LC=液相色谱
- [0166] mg=毫克
- [0167] min=分钟
- [0168] mL=毫升
- [0169] mM=毫摩尔
- [0170] MS=质谱
- [0171] nM=纳摩尔
- [0172] pM=皮摩尔
- [0173] s.d.=标准偏差
- [0174] μCi =微居里
- [0175] μg =微克
- [0176] μL =微升
- [0177] μM =微摩尔
- [0178] μm =微米
- [0179] $^{\circ}\text{C}$ =摄氏度
- [0180] 当表示氨基酸时,这些单字母符号具有以下含义:
- [0181] A=丙氨酸
- [0182] R=精氨酸
- [0183] N=天冬酰胺
- [0184] D=天冬氨酸
- [0185] C=半胱氨酸
- [0186] E=谷氨酸
- [0187] Q=谷氨酰胺
- [0188] G=甘氨酸
- [0189] H=组氨酸
- [0190] I=异亮氨酸
- [0191] L=亮氨酸
- [0192] K=赖氨酸
- [0193] M=甲硫氨酸
- [0194] F=苯丙氨酸
- [0195] P=脯氨酸
- [0196] S=丝氨酸
- [0197] T=苏氨酸
- [0198] W=色氨酸

- [0199] Y=酪氨酸
- [0200] V=缬氨酸
- [0201] 实施例
- [0202] 实施例1.猪笼草蛋白酶提取物制备
- [0203] 化学品
- [0204] 水和乙腈(HPLC级,来自Burdick and Jackson)购自VWR。甲酸、Tris和甘氨酸购自Sigma Aldrich。
- [0205] 植物培养
- [0206] 莱佛士猪笼草(*Nepenthes rafflesiana*)、苹果猪笼草(*Nepenthes ampularia*)、奇异猪笼草和海盗猪笼草(*Nepenthes globosa*)的移植株购自Keehns Carnivores (www.keehnscarnivores.ca)。将这些用木皮、珍珠岩、泥炭藓和腐殖土(分别为40%、35%、10%、5%)盆栽。生长条件涉及每天14小时光照,80%湿度和23°C至28°C范围的温度,以及每周浇水2至3次。在瓶状体成熟后,向植物每个瓶状体供给一个或两个果蝇并且在一周后收获瓶状体流体。留下瓶状体和它们的分泌物进行一周的恢复,随后进行第二轮供给和提取。
- [0207] 提取物制备
- [0208] 从所有4种植物收集瓶状体流体并将其合并。首先通过0.22μm过滤器将粗制瓶状体流体澄清,然后使用Amicon Ultra离心10kDa分子量截留过滤器(均来自Millipore)将该流体浓缩80倍至100倍。在用于消化之前,用100mM甘氨酸-HCl(pH 2.5)将浓缩物酸活化3小时,然后在过滤装置中用100mM甘氨酸-HCl(pH 2.5)洗涤3次,每次洗涤使用10X流体体积。然后基于瓶状体流体的原始取样将最终分离物再稀释至11X浓度。
- [0209] 瓶状体流体提取物的表征
- [0210] 将瓶状体植物的流体分泌物浓缩并且通过减小pH(pH 2.5)将消化酶活化。使用蛋白质组学方法确定富集过程和活化对流体蛋白质组的影响。首先,为了确认猪笼草蛋白酶的存在,通过SDS-PAGE分离无活性浓缩物。用胰蛋白酶消化7个具有非常弱的考马斯蓝染色的邻接凝胶区域并通过nanoLC-MS/MS使用标准方法对其进行分析。这预计不是活化的流体蛋白质组的完整目录,但该分析确认了存在天冬氨酸蛋白酶猪笼草蛋白酶I/II以及植物来源的葡聚糖酶、几丁质酶、羧肽酶和过氧化物酶加上中等水平的果蝇和细菌污染。流体蛋白质组的低复杂性与最近的分析是一致的(Hatano N,Hamada T (2012) Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*.Journal of Proteomics 3;75 (15) :4844-52 (2012年6月15日电子出版)),但在该分析中发现猪笼草蛋白酶-I分布于宽得多的质量范围(40-70kDa)内。
- [0211] 然后以类似方式处理并分析酸活化的流体。活化过程降低了总体蛋白质产率,并且也似乎简化了组合物。除了猪笼草蛋白酶-I以外,仅来自角蛋白和肌动蛋白的微小污染是显而易见的。这些分析指向富集流体的低复杂性,其中猪笼草蛋白酶是主要组分。通过BCA测定将活化和80X富集的流体的总蛋白质浓度测量为22ng/μL。该值与描述流体的富集的早期研究一致。Tokes ZA等,Digestive Enzymes Secreted by Carnivorous Plant *Nepenthes-Macferlanei-L*.*Planta*119 (1) :39-46 (1974)。

[0212] 实施例2:猪笼草蛋白酶提取物纯化

[0213] 提取物的纯化

[0214] 将在 $50 \times 2\text{cm}$ ID柱中的Sephadex固定的胃蛋白酶抑制剂在20mM甘氨酸-HCl (pH 2.5-3) 中平衡。将过滤的瓶状体流体(如实施例1中所述制备)通过柱循环两次，并用100mL平衡缓冲液(20mM甘氨酸HCl, pH 2.5)洗涤柱。用100mM碳酸氢铵(pH 8.7)洗脱所述柱并收集级分。为了保持最大的酶活性，在收集级分之后立即用2M甘氨酸HCl (pH 2.5) 将pH降低至4。使用消化测定验证活性，并且将最大活性级分合并且基于原始流体体积浓缩至大约80x。

[0215] 猪笼草流体和/或提取物中在可检测水平下发现的唯一内切蛋白酶是天冬氨酸蛋白酶和脯氨酰基内切蛋白酶。

[0216] 实施例3:重组猪笼草蛋白酶I

[0217] 从猪笼草蛋白酶I cDNA制备猪笼草蛋白酶I的基因(SEQ ID NO:4; 编码氨基酸残基20-413, 来自小猪笼草, 无植物信号序列), 并将其置于NdeI与HindIII限制位点之间。使用T4DNA连接酶(1U) (New England Bio, NEB)、T4DNA连接酶缓冲液(NEB)、ATP(0.5mM) (NEB)、0.5μg pET21a载体和2μg猪笼草蛋白酶I cDNA将该序列克隆至pET21a中。将其在18°C孵育4小时。将连接混合物(5μL)添加至200μL的NovaBlue感受态细胞中并在冰上孵育15分钟。通过热激(在42°C 45秒, 然后立即置于冰上, 使用1ml LB培养基)转化细胞, 并在37°C孵育1小时, 并且用抗生素(四环素和氨苄西林)涂铺。在确认基因存在于若干白色菌落中后, 选择代表性菌落用于maxiprep。通过如上文所述的热激将所得重组质粒pET21a/R.NepI转化至大肠杆菌C41中, 用于在通过IPTG的诱导下表达。这里, 在37°C使细胞生长至0.6的OD₆₆₀并用0.1mM IPTG诱导4小时。被表达的蛋白质前往包涵体。

[0218] 将包涵体如下分离。将细胞离心, 添加蔗糖溶解缓冲液(25%蔗糖、50mM TrisCl pH 7.4、1mM EDTA、1mM NaN₃和蛋白酶抑制剂), 并且使细胞经受4轮冷冻/解冻和超声波处理。之后添加DNA酶和RNA酶, 用于在室温下孵育30min。将制剂离心(在5000x g下约15min.)以使包涵体和膜片段形成小粒。将该小粒再悬浮于Triton缓冲液(50mM TrisCl pH 7.4、10mM NaCl、1mMβ-巯基乙醇、1mM NaN₃、0.5% Triton X100+蛋白酶抑制剂)中并在冰上进行超声波处理。将其再次离心, 以使包涵体形成小粒, 并且将小粒在不含Triton的缓冲液(50mM TrisCl pH 7.4、10mM NaCl、1mMβ-巯基乙醇、1mM NaN₃、蛋白酶抑制剂)中在冰上洗涤两次(利用混合和超声波处理)。

[0219] 然后使蛋白质小粒经受再折叠。将1g包涵体悬浮至1L 50mM CAPS pH 10.5、8M脲、1mM EDTA、1mM甘氨酸、500mM NaCl、300mMβ-巯基乙醇中并且振荡1小时。将悬浮液针对50mM Tris (pH 11)透析两次, 每次1小时, 之后针对50mM Tris (pH 7.5)透析一天, 并且最后针对具有300mM NaCl的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)透析。

[0220] 将溶液高速离心(10000x g持续15min.)以去除任何未再折叠的蛋白质, 并且将上清液通过.22μm膜过滤。在4°C将猪笼草蛋白酶I在pH 2.5(甘氨酸-HCl)下活化过夜。从1L细胞培养物开始, 产率为10至100mg的折叠的活化蛋白质。

[0221] 实施例4:重组猪笼草蛋白酶II

[0222] 来自小猪笼草的猪笼草蛋白酶II的cDNA(参见SEQ ID NO.:14)(无植物信号序列)用于制备猪笼草蛋白酶II cDNA。使用T4DNA连接酶(1U) (New England Bio, NEB)、T4DNA连

接酶缓冲液(NEB)、ATP(0.5mM)(NEB)、0.5μg pET21a载体和2μg猪笼草蛋白酶II cDNA将该序列克隆至pET21a中的NdeI与HindIII限制位点之间。将其在18℃孵育4小时。将连接混合物(5μL)添加至200μL的NovaBlue感受态细胞中并在冰上孵育15分钟。通过热激(在42℃45秒,然后立即置于冰上,使用1ml LB培养基)转化细胞,并在37℃孵育1小时,并且用抗生素(四环素和氨苄西林)涂铺。在确认基因存在于若干白色菌落中后,选择代表性菌落用于maxiprep。通过如上文所述的热激将所得重组质粒pET21a/R.NepI转化至大肠杆菌C41中,用于在通过IPTG的诱导下表达。这里,在37℃使细胞生长至0.6的OD₆₆₀并用0.1mM IPTG诱导4小时。被表达的蛋白质前往包涵体。

[0223] 将包涵体如下分离。将细胞离心,添加蔗糖溶解缓冲液(25%蔗糖、50mM TrisCl pH 7.4、1mM EDTA、1mM NaN₃和蛋白酶抑制剂),并且使细胞经受4轮冷冻/解冻和超声波处理。之后添加DNA酶和RNA酶,用于在室温下孵育30min。将制剂离心(在5000x g下约15min.)以使包涵体和膜片段形成小粒。将该小粒再悬浮于Triton缓冲液(50mM TrisCl pH 7.4、10mM NaCl、1mMβ-巯基乙醇、1mM NaN₃、0.5% Triton X100+蛋白酶抑制剂)中并在冰上进行超声波处理。将其再次离心,以使包涵体形成小粒,并且将小粒在不含Triton的缓冲液(50mM TrisCl pH 7.4、10mM NaCl、1mMβ-巯基乙醇、1mM NaN₃、蛋白酶抑制剂)中在冰上洗涤两次(利用混合和超声波处理)。

[0224] 然后使蛋白质小粒经受再折叠。将1g包涵体悬浮至1L 50mM CAPS pH 10.5、8M脲、1mM EDTA、1mM甘氨酸、500mM NaCl、300mMβ-巯基乙醇中并且振荡1小时。将悬浮液针对50mM Tris(pH 11)透析两次,每次1小时,之后针对50mM Tris(pH 7.5)透析一天,并且最后针对具有300mM NaCl的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)透析。

[0225] 将溶液高速离心(10000x g持续15min.)以去除任何未再折叠的蛋白质,并且将上清液通过.22μm膜过滤。在4℃将猪笼草蛋白酶II在pH 2.5(甘氨酸-HCl)下活化过夜。从1L细胞培养物开始,产率为10至100mg的折叠的活化蛋白质。

[0226] 实施例5.猪笼草酶的糖基化

[0227] 通过纯化的大肠杆菌包涵体的再折叠生成猪笼草蛋白酶I(A)和II(C)示于图2中。监测再折叠程序的每一步骤并将其显示为:来自纯化的大肠杆菌包涵体的总溶解蛋白质(泳道1)、最后透析后的再折叠的猪笼草蛋白酶(泳道2)、24小时酸活化(100mM甘氨酸-HCl,pH 2.5)的再折叠产物(泳道3)。对24小时酸活化的猪笼草蛋白酶I(B)和II(D)酶进行MALDI-TOF MS分析。酸活化的条带(A和C,泳道3)的胶内消化物的LC-MS/MS分析确认分别存在纯猪笼草蛋白酶I和II。

[0228] 对天然猪笼草蛋白酶(汇集自2-3个种)进行MALDI-TOF分析。结果示于图3中。认为37,200的质量是猪笼草蛋白酶II并且38,951的质量是猪笼草蛋白酶I。不管怎样,它们都不同于重组酶的质量,如表1中所示。

[0229] 表1:重组猪笼草蛋白酶与天然猪笼草蛋白酶的质量

[0230]	猪笼草蛋白酶 I	质量(道尔顿)*	猪笼草蛋白酶 II	质量(道尔顿)*
	重组的	37,460	重组的	37,506
	天然的	38,949	天然的	37,199
	差值:	1,489		-307

[0231] *由于MALDI所增加的质子而减去1道尔顿。

[0232] 不受理论的约束,我们认为这确认了猪笼草蛋白酶I在天然状态下是糖基化的。重组猪笼草蛋白酶II的活性成熟酶大于天然存在的。仍然可能的是,天然猪笼草蛋白酶II在蛋白质序列上甚至更小,但有些微小的糖基化。本文所报告的天然酶的质量不同于Athauda等,可能是因为质谱对于确定分子的质量是比SDS PAGE更精确的技术。

[0233] 实施例6.猪笼草酶与胃蛋白酶的比较

[0234] 对通过所示酶消化的麦醇溶蛋白进行SDS-PAGE。SDS-PAGE根据分子量大致剖析蛋白质。以大约100:1的底物与酶的比率用胃蛋白酶、纯化的猪笼草提取物或重组猪笼草蛋白酶II进行麦醇溶蛋白消化。将麦醇溶蛋白(5mg)与所示制剂在37°C孵育2小时。图4显示通过重组猪笼草蛋白酶II、猪笼草提取物或胃蛋白酶进行的麦醇溶蛋白消化的SDS-PAGE凝胶。该凝胶显示相比于胃蛋白酶,通过重组猪笼草蛋白酶II对麦醇溶蛋白的消化导致不同的消化模式并消化成更小的肽。这在带框的凝胶区域特别显著。猪笼草提取物在降解麦醇溶蛋白方面如此有效,以致于在该区域中没有观察到残余的麦醇溶蛋白蛋白质。

[0235] 表2显示用于通过胃蛋白酶、重组猪笼草蛋白酶I和II以及猪笼草提取物进行C-末端裂解的优选的、低概率的和禁用的残基。基于一大群蛋白质底物概述了C-末端裂解特异性,该裂解特异性是将酶分类的经典方式。猪笼草蛋白酶在裂解特异性方面相当不同于胃蛋白酶,这表明猪笼草蛋白酶和胃蛋白酶是非常不同的酶。从文献(例如“Determining the Specificity of Pepsin for Proteolytic Digestion”,Melissa Palashoff的一篇论文,其可于以下网址获得:books.google.ca/books?id=701nU4-6T-wC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false)概述了提供于表2中胃蛋白酶数据。从消化物研究如描述于美国专利申请公开号2014/0186330中的研究概述了猪笼草酶数据,该美国专利申请通过引入整体并入本文。

[0236] 表2:C-末端裂解

[0237]		胃蛋白酶	猪笼草蛋白酶 I 和 II	猪笼草提取物
	优选的	F、L、M	F、L、M、K、R、D、E、C、Y、A	F、L、M、K、R、D、E、C、Y
	低概率	W、C、Y、D、E、G、Q、N、S、T	W、G、N、Q、V、T	H、I、A、P、N、Q
[0238]	“禁用的”	I、V、K、R、P、H、G	G、I、S、P	G、S、T、W、V

[0239] 进行LC-MS测定以确定每种酶裂解33聚体毒性麸质肽的能力。将33聚体与所示酶以100:1比率(底物:酶)孵育0.5h,并且依照惯例相对于标准物确定未消化的33聚体的量。将数据提供为对照(未添加酶的33聚体)的百分比。

[0240] 表3提供了来自麸质蛋白质的抗胃蛋白酶的片段的消化,该片段被称为“33聚体”(LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) SEQ ID.15。该序列与乳糜泻密切相关并且经常被称为毒性麸质肽。与全麸质蛋白质自身一样,33聚体富含Q、P和L氨基酸。仅使用胃蛋白酶的延长消化时间对该肽没有太多的影响-该肽对胃蛋白酶消化具有极大抵抗性。相比之下,猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和高分子量级分(>大约10kDa)的猪笼草提取物(流体)展现消化该肽的能力。将数据提供为对照(没有酶的33聚体)的%。

[0241] 表3:33聚体消化

消化用酶	相对峰面积 (%)
对照	100.0
[0242] 猪笼草流体	0.0
猪笼草蛋白酶 I	78.7
猪笼草蛋白酶 II	34.0
胃蛋白酶	93.2

[0243] 将麦醇溶蛋白蛋白质浆液(5mg麸质)与40μg或200μg重组猪笼草蛋白酶I或重组猪笼草蛋白酶II、或40μg胃蛋白酶孵育,并检查消化度(如通过相对溶液的浑浊度所确定)。增加胃蛋白酶的量对浆液的浑浊度(数据未显示)没有影响。图5A是容纳麦醇溶蛋白浆液和所示量的重组猪笼草蛋白酶I、重组猪笼草蛋白酶II或胃蛋白酶的小瓶的图像。图5B是类似的,但使用了5μg、20μg或100μg的猪笼草提取物。用猪笼草蛋白酶或猪笼草提取物孵育的小瓶不如胃蛋白酶小瓶浑浊,显示对麦醇溶蛋白的更强烈消化。

[0244] 这些数据显示在凝胶水平(其显示“较大的”消化产物)、肽水平(33聚体的加工)和浆液水平(澄清溶液)下,麦醇溶蛋白蛋白质消化物在猪笼草酶与胃蛋白酶之间是不同的。胃蛋白酶、奈普洛森和猪笼草蛋白酶是具有独特的裂解特异性的非常不同的蛋白质,特别是对于麸质蛋白质来说。简单地说,胃蛋白酶不以避免麸质毒性的方法充分消化麸质,而猪笼草酶则会。

[0245] 实施例7.通过猪笼草提取物对麦醇溶蛋白的消化

[0246] 使用LEAP HTX-PAL自动取样器和设计用于氢/氘交换(HDX)应用的分配系统在溶液中进行通过猪笼草蛋白酶对麦醇溶蛋白的消化。使用AB Sciex Triple-TOF 5600QqTOF质谱仪收集数据。使用Mascot (v2.3)从MS/MS数据鉴别肽。简单地说,将12pmol粗制麦醇溶蛋白(购自Sigma Aldrich)与2μL如实施例1所述产生的100x浓缩提取物混合。在消化之后,将整个体积注入连接至质谱仪的反相LC系统中。将肽捕集于7cm,150μm i.d. Magic C18柱上并在10或30分钟内用10%至40%的乙腈梯度洗脱。这些分析中所检测到的肽被选择用于MS/MS波谱的多个信息依赖性获取中的CID断裂。针对含有所有鉴别的小麦麦醇溶蛋白(α、β、γ、ω)蛋白质加上低分子量和高分子量麦谷蛋白的序列的微型数据库搜索波谱。

[0247] 图6显示在37°C 1分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、60分钟、130分钟、360分钟或810分钟后,使用LC-MS/MS从来自小麦的麦醇溶蛋白的猪笼草提取物消化所鉴别的所有

肽的平均长度。使用对评分的95%置信度截留值($p<0.05$)来减少假阳性鉴别。肽长度的相对标准偏差示于插图中。

[0248] 图7展示在37°C消化1分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、60分钟、130分钟、360分钟或810分钟后通过LC-MS/MS鉴别的按长度分组的肽的数目。数据如在图6中。

[0249] 图8展示与图6中相同的数据,作为在37°C消化10分钟、60分钟、120分钟、360分钟或810分钟后获得一定长度的概率。

[0250] 对于消化作图,如上文所述进行麦醇溶蛋白消化,不同之处在于底物与酶的比率大约为1000:1。在37°C,用猪笼草蛋白酶提取物、纯化的猪笼草蛋白酶提取物或重组猪笼草蛋白酶I将麦醇溶蛋白消化2小时。

[0251] 重组猪笼草蛋白酶I的P1裂解偏好非常类似于浓缩的流体提取物以及所述提取物的纯化级分(图9A)。令人惊讶地,所述提取物显示比纯化的提取物或重组猪笼草蛋白酶I对谷氨酰胺更高的偏好。

[0252] 重组猪笼草蛋白酶I的P1'裂解偏好非常类似于浓缩的流体提取物以及所述提取物的纯化级分(图9B)。令人惊讶地,所述提取物显示比纯化的提取物或重组猪笼草蛋白酶I对脯氨酸更高的偏好。

[0253] 所述提取物含有猪笼草蛋白酶I、猪笼草蛋白酶II和奈普洛森,但所述纯化策略相比于另外两种酶回收了更多的猪笼草蛋白酶I。不希望受限于理论,认为所述提取物在P1谷氨酰胺位置和P1'脯氨酸位置处的增强裂解归因于奈普洛森、猪笼草蛋白酶II、和/或所述酶中的两种或更多种间的协同作用。

[0254] 实施例8. 奈普洛森提取物的制备

[0255] 从猪笼草属种消化流体中提取奈普洛森。在用冷冻果蝇供给之后5天,从植物瓶状体中收集流体。将收集的液体过滤以去除死昆虫,并通过多个浓缩/过滤循环经过10kDa分子量截留膜用20mM乙酸铵盐(pH 5.0)反复洗涤。

[0256] 在单P 5/50GL柱上从猪笼草蛋白酶中部分地纯化出奈普洛森。将5mL 1.5X浓缩流体注入在低离子强度(20mM乙酸铵盐pH 6)下平衡的单P柱上。用40min NaCl梯度(0至1M)以0.5ml/min洗脱所述蛋白质。每0.5ml收集级分。在各个级分中通过消化固有无序的富含脯氨酸的蛋白质APLF来测试奈普洛森活性。将所产生的肽在C8柱上分离,并通过LC-MS/MS在tripleToF 5600(AB Sciex)上分析。级分19-22富集奈普洛森(图10)并被称为粗制奈普洛森提取物;奈普洛森不同于猪笼草蛋白酶,所述猪笼草蛋白酶富集于随后的级分中。

[0257] 实施例9. 猪笼草酶在抑制麸质不耐受小鼠的肠中的炎症方面的功效

[0258] 目的:测试使用猪笼草提取物或重组猪笼草蛋白酶II对麦醇溶蛋白的体外消化在预防使用麦醇溶蛋白致敏的NOD-DQ8小鼠的体内麦醇溶蛋白诱导的损伤方面的功效。

[0259] 实验设计:用霍乱毒素(CT)和麦醇溶蛋白使NOD DQ8小鼠致敏以破坏对麦醇溶蛋白的口服耐受性。用CT和麦醇溶蛋白处理阴性对照,但没有随后的口服麦醇溶蛋白激发。用含有各种毒性和免疫原性衍生肽的麦醇溶蛋白的猪蛋白酶(胃蛋白酶)消化物进行麦醇溶蛋白激发。用经猪笼草提取物或重组猪笼草蛋白酶II预消化的麦醇溶蛋白激发处理组(在37摄氏度持续90分钟)。假设猪笼草提取物-麦醇溶蛋白消化物或重组猪笼草蛋白酶II-麦醇溶蛋白消化物在体内将比胃蛋白酶-麦醇溶蛋白消化物具有更低的免疫原性。

[0260] 分组:

[0261] 阳性对照 (n=8) : 致敏的和麦醇溶蛋白激发的。用霍乱毒素 (CT) 和胃蛋白酶麦醇溶蛋白 (P-G) 使小鼠致敏 (每周一次, 持续3周)。在实验期间, 用P-麦醇溶蛋白管饲小鼠 (每周三次, 持续3周)。

[0262] 阴性对照 (n=8) : 致敏的 (然后没有麦醇溶蛋白)。用霍乱毒素 (CT) 和胃蛋白酶麦醇溶蛋白 (P-G) 使小鼠致敏 (每周一次, 持续3周)。在实验期间, 用媒剂管饲小鼠 (每周三次, 持续3周)。

[0263] 处理1 (n=8) : 猪笼草提取物。用霍乱毒素 (CT) 和胃蛋白酶麦醇溶蛋白 (P-G) 使小鼠致敏 (每周一次, 持续3周)。在实验期间, 用猪笼草提取物消化的麦醇溶蛋白管饲小鼠 (每周三次, 持续3周)。

[0264] 处理2 (n=8) 用霍乱毒素 (CT) 和胃蛋白酶麦醇溶蛋白 (P-G) 使小鼠致敏 (每周一次, 持续3周)。在实验期间, 用猪笼草蛋白酶II消化的麦醇溶蛋白管饲小鼠 (每周三次, 持续3周)

[0265] 结果:

[0266] 用胃蛋白酶-麦醇溶蛋白消化物加上霍乱毒素使所有4组小鼠致敏。阴性对照在致敏后没有麦醇溶蛋白激发。阳性对照和处理组在致敏后用麦醇溶蛋白口服激发。处理组的差异在于用猪笼草提取物或猪笼草蛋白酶II预消化麦醇溶蛋白激发。以这种方式, “阴性对照”不是完全未经麦醇溶蛋白处理的 (因为它们在致敏阶段期间暴露于该蛋白), 且因此模拟了进入缓解同时坚持不含麸质的膳食的乳糜泻患者的临床情况。

[0267] 临床/毒性作用: 评价了小鼠的总体表现 (移动、睁眼、理毛)。在任何处理组或对照组中均未观察到不良作用。在整个实验中记录体重, 并且在任何组中均未观察到重量减轻 (图11)。

[0268] 针对麦醇溶蛋白激发的先天免疫变化: 对来自每个处理组的小鼠的肠进行CD3+上皮内淋巴细胞的免疫组织化学 (图12)。这是模型中肠道麦醇溶蛋白暴露的快速且早期的先天免疫标志物。麦醇溶蛋白暴露导致与阴性对照小鼠和暴露于用猪笼草提取物或猪笼草蛋白酶II预消化的麦醇溶蛋白的小鼠相比IEL计数增加 (图13)。在猪笼草提取物处理组与猪笼草蛋白酶II处理组之间没有观察到IEL计数的差异。

[0269] 绒毛/隐窝比率: 在阳性对照组中观察到较低绒毛/隐窝 (V/C) 比率的非显著趋势 (图14)。与阳性对照和阴性对照相比, 猪笼草提取物和猪笼草蛋白酶II处理组具有更高比率的趋势。

[0270] 解释/讨论:

[0271] 用猪笼草提取物或猪笼草蛋白酶II预消化的麦醇溶蛋白的三周激发是安全的, 并且不诱导小鼠的体重的短期降低或任何临床不良事件。

[0272] 口服麦醇溶蛋白激发导致先前致敏的小鼠的小肠IEL计数的显著增加。在用已经用猪笼草提取物或猪笼草蛋白酶II预消化的麦醇溶蛋白激发的小鼠中未观察到IEL增加。这表明用猪笼草提取物或猪笼草蛋白酶II处理的麦醇溶蛋白的较低腔内抗原性。

[0273] 阳性对照组中V/C比率的降低非常微小。然而, 在用利用猪笼草提取物或猪笼草蛋白酶II预消化的麦醇溶蛋白激发的小鼠中, 存在更高的V/C比率的非显著趋势。该动物模型中V/C比率的降低是中度的, 并且随着麦醇溶蛋白激发的持续时间和剂量而变化。当阴性对照完全未经麦醇溶蛋白/麸质处理 (非致敏的) 时, 阳性对照与阴性对照之间的差异更为显

著。认为在更慢性的情况下和/或与完全未经麦醇溶蛋白处理的(非致敏的)小鼠相比,使用预消化的猪笼草提取物或猪笼草蛋白酶II的V/C比率的差异将更为显著。

[0274] 总体结论:结果显示用猪笼草提取物或猪笼草蛋白酶II将麦醇溶蛋白预消化以降低麦醇溶蛋白肽在致敏的NOD/DQ8小鼠的小肠道中的抗原性的作用。

[0275] 实施例10.通过奈普洛森进行的麦醇溶蛋白消化

[0276] 将粗制奈普洛森提取物与麦醇溶蛋白在pH 2.5孵育并且通过MS分析所得肽片段。将结果示于图15A和15B中(点[.]指示裂解位点)。所述提取物的蛋白质序列覆盖率为61%。通过粗制奈普洛森提取物加工了麦醇溶蛋白中的大约57%的潜在脯氨酸(P)裂解位点(C-末端)。不受理论的约束,认为至少一部分谷氨酰胺裂解位点归因于猪笼草蛋白酶蛋白质对提取物的少量污染。

SEQ ID NO.: 1: 奈普洛森氨基酸序列

1	MQAKFFTIVILSSVFYFNYPLAEARSIQARLANKPKGTIKTIKGDDGEVVDCV	53
54	DIYKQPAFDHPPLLKNHTLQMOPSSYASKVGEYNKLEQPWHKNGECPKGSIPIRRQVITGL	113
114	PVVKKQFPNLKFAPPANTSNHQYAVIAYFYGNASLQGANATINIWEPNLKNPNGDFSLTQ	173
174	IWISAGSGSSLNTIEAGWQVPGRTGDSQPRFFIYWTADGYTSTGCYDLTCPGFVQTNNY	233
234	YAIGMALQPSVYGGQQYELNESIQRDPATGNWWLYLWGTVVGYWPASIYNSITNGADTVE	293
194	WGGEIYDSSGTGGFHTTQMGSGHFPTEGYGKASYVRDL	332
333	QCVDTYGNVISPTANSFQGIAPAPNCNYQFQQGSSELYLFYGGPGCQ	380

SEQ ID NO.: 2: 奈普洛森cDNA序列

1>	ACATGGGGACGGCTAATTAGTAATCTCAAGTTGATGTTAAAA-GGCTTCAACTATGC>59	
60>	AAGCTAACGTTTCACATTGTTACTTCCCTCTGTATTTATTCAACTATCCTTG>119	
120>	CTGAAGCAAGATCGATTCAAGCAAGATTAGCCAATAACCAAAGGGTACTATCAAAACCA>179	
180>	TAAAGGGAGATGATGGAGAGGTGGTTGATTGTGTTGATATATAAGCAACCAGCTT>239	
240>	ACCACCCCACTTTAAAAAATCACACTTACAGATGCAACCCAGTTCATACGCATCCAAGG>299	
300>	TCGGTGAATAACAATAAGCTGAACAACCATTGGCATAAAAATGGTGAGTGCCCTAAAGGTT>359	
[0001]	360>CAATCCCAATTAGAAGGCAAGTTACTGGCTCCCCGTGTAACATTCCTA>419	
	420>ACTTGAATTTGCCCCACCAAGTGCAAATAACAAACCACCAAGTATGCTGTATTGCATACT>479	
	480>TTTACGGCAATGCATCATTGCAAGGAGCAAATGCAACCATTACATATGGAGCCAATT>539	
	540>TGAAAAACCTAACGGGACTTCAGTCTACTCAAATTGGATCTCTGCTGGCAGTGGAT>599	
	600>CCAGCTTGAATACCATTGAGGCAGGATGGCAAGTGTATCCAGGAAGAACAGGTGACTCAC>659	
	660>AGCCAAGATTTTCATATATTGGACAGCCGATGGTTACTTCGACGGTTGCTATGATT>719	
	720>TAACATGCCAGGATTGTGCAAACACTAACAACTATTATGCCATTGGTATGGCGTTACAAC>779	
	780>CCTCTGTGTACGGCGGACAACAATATGAGTTAACGAATCCATACAAAGGGACCCAGCGA>839	
	840>CCGGAAACTGGTGGCTCACCTGTGGGGACTGTTGTCGGATACTGGCCGGCGTCAAT>899	
	900>ACAACCTCATAACTAACGGTCCGATACCGTAGAATGGGAGAGAGATTACGACTCGT>959	
	960>CCGGAACCGGTGGATTCCACACGACAACTCAGATGGGAAGCGGTCAATTCCGACCGAAG>1019	
	1020>GTTATGGAAAAGCAAGCTACGTACGTGATCTCAATCGTAGATAACCTACGGGAATGTCA>1079	
	1080>TATCTCCGACGGCGAACAGCTTCCAGGGAAATAGCTCTGCGCCGAATTGTTATAACTATC>1139	
	1140>AGTTTCAGCAAGGCAGCTGAACTGTATCTTTACGGTGGCCCTGGATGCCAGTGAA>1199	
	1200>TGAACATATAATATTGCGAGGCCTCTGATAATAAGAGGGGGAGAGAGAGAGAGAGGGGGCA>1259	
	1260>GCTGGCTAGCCTATAATAAGTCCACACAC--TGTAGCTTGTGTTCTTGACAAATAAT>1317	
	1318>GCAGCGGTCAAGGATGTTGAACGCAGTAGGGCTTTCTCGTCACTCTGATT>1377	
	1378>GAATGGATCGAGAAGACAGCATTGAACGTATGACCTAAATTTCTATTGATTT>1437	

1438>TATCAATGGGNAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA>1480

粗体：起始密码子

带下划线：终止密码子

SEQ ID NO.:3 -奈普洛森预测信号肽序列

QAKFFTVILSSV**FYFNYPLAEA**

SEQ ID NO.:4 -猪笼草蛋白酶I cDNA序列

ACGTCAAGAACAGCTCTCAATCACCGTCACGAAGCCAAAGTAACGGGCTTCAGATAATGCTGAACATGTTGATT
 GGGCAAAAACCTAACCAAATTCCAGCTTCTAGAACGTGCTATCGAAAGGGTAGTCGTAGATTGCAGAGGCTCGAAG
 CCATGTTAATGGCCCTCCGGTGTGAAACTTCCGTCTACGCCGGAGATGCCGAATATCTGATGAACCTATCGATT
 GGAACCTCCGGCACAACCTTCTCCGCAATCATGGATACCGGTAGCGATCTTATCTGGACGCAGTGCCAGCCTTGAC
 TCAGTGTAAATCAATCAACGCCATATTAACTCCTCAAGGATCATCCTCCTCTCCACCCCTCCCTGCTCAAGCC
 AACTCTGTCAAGCCCTTCAGCCCCACATGCTCTAAATAATTCTGCCAATACACCTACGGGTATGGGGACGGGTCC
 GAAACCCAAGGATCCATGGGCACTGAGACTCTCACTTCGGGTCGGTTCCATCCCTAAATACACATTCCGGCTGCGG
 GGAAAACAACCAAGGGTTGGGCAAGGAAACGGGGCAGGCTGGTGGATGGGTGGGGCCCTGTCGCTCCCT
 CTCAACTCGTGTGACCAAATTCTCTACTGCATGACCCCATTGGTAGCTCAACCCCTAGCACTCTTCTATTGGGA
 TCACTGGCTAATTCTGTCAACCCTGGTAGTCCTAAATACAACCCCTAAATCCAAAGCTCTCAAATACCAACTTTCTATT
 TATTACTCTCAACGGGTTGAGTGTGGTTCAACTCGCTTGCCATTGATCCGAGTGCTTGCACCTTAATAGCAATA
 ATGGAACAGGAGGGATAATAATAGACTCTGGAACGACACTTACTTACTTCGTTAACGCTTATCAATCTGTAAGGCAA
 GAGTTCATCTCCCAGATTAATCTACCGTCGTAAATGGTTCCCTCCGGCTTGATCTGTGCTTCCAGACGCCCTC
 TGATCCGTCAAACCTGCAGATAACCCACCTTGTGATGCATTGACGGTGGAGATTGGAGTTGCCAGTGAGAATT
 ATTTCATCTCCCCAAGCAACGGCTGATTGCTTGGCGATGGGAGTTCGTCGCAGGGATGTCCTTTGGGAAT
 ATTCAAGCAGCAAAACATGCTAGTCGTTACGACACCGGAAATTGGTGGTTCAATTGCTTCTGCTCAATGTGGTGC
 GT

SEQ ID NO.: 14 - 猪笼草蛋白酶II cDNA序列

ATGGCCTCACCACTATACTCTGGTACTTGGCTTAGCAATAAGTTCTGCCATTGTTGCACCAACAAGCTCCACCTC
 AAGAGGAACCCCTTCTCATCATGGTCAGAAAAGGCCACAACCCGGCTTCTGTGTTGATCTCGAGCAGGTCGATTGCG
 GCAAGAATTGACCAAATACGAGCTCATCAAACGTGCTATCAAGCGTGGGAGAGGGAGATGCGAACGATTAATGCT
 ATGTTGCAGAGCTCCTCCGGTATTGAAACTCCTGTTATGCGGGAGACGGTGAATATCTAATGAACGTAGCAATTGG
 TACTCCGGATAGTTCTTCGGCCATTATGGATACCGGCAGTGATCTCAATTGGACGCAATGCGAGCCATGTACGC
 AGTGCTTCAGTCAACCTACGCCATTTCACCCACAGGACTCGTCTCCTCTACCCCTCCTGCGAGAGCCAG

TATTGCCAAGATCTCCGAGCGAAACCTGCAATAATAATGAATGCCAATATAACATACGGATACGGAGACGGTTCAC
 AACCCAAGTTATATGGCAACCGAGACCTCACTTCGAGACGAGCTCCGTGCCAATATCGCGTTGGGTTGCGGGGG
 AAGACAACCAGGGATTCCGGCAAGGCAACGGGCTGGCCTGATCGGGATGGGTTGGGCCCCGTTATCGCTTCTCT
 CAACTCGGCGTGGGTCAAGTCTCTTACTGCATGACCTCCTATGGAAGCTCCTCACCCAGCACTCTGCACTTGGATC
 CGCAGCCAGTGGAGTGCCTGAAGGCTCCCCGAGTACGACCCCATCCATAGTTCTTGAATCCAACGTACTATTATA
 TTACGCTCCAAGGTATAACGGTTGGCGATAATTGGGTATTCCATCGAGTACTTTCAACTCAAGACGATGGA
 ACTGGCGGGATGATAATTGACTCCGGACAACGCTCACTTATCTTCCACAAGACGCTTACAATGCCGTAGCACAAAGC
 GTTCACTGACCAGATAAACTCCCCACCGTCGATGAATCCTCGAGCGGCCTCAGTACGTGCTTCCAGCAACCGTCCG
 ACGGATCAACCGTGCAAGTTCCGGAGATTCAATGCAGTTGATGGTGGGTGCTGAACTTAGGGGAACAGAATATA
 TTGATCTCTCCAGCTGAAGGGGTGATATGCTTGGCGATGGGAAGTTCATCGCAGCTGGGAATTCCATTTGGGAA
 TATCCAGCAGCAAGAACGCAGGTGCTTATGACCTTCAGAATTGGCCGTGTCGTTCCACTCAGTGTGGTAG
 CGTCGTAG

SEQ ID NO.: 15 - α -麦醇溶蛋白33聚体

LQLQPF(PQPQLPY)₃PQPQPF

[0003]

SEQ ID NO.: 16 - α -麦醇溶蛋白 p31-49

LGQQQPFPQQPYPQPQPF

SEQ ID NO.: 17 -来自低分子量麦谷蛋白的Gly-156

QQQQPPFSQQQQSPFSQQQQ

SEQ ID NO.: 18 -来自高分子量麦谷蛋白的九肽重复

GYYPTSPQQ

SEQ ID NO.: 19 -来自高分子量麦谷蛋白的六肽重复

PGQGQQ

SEQ ID NO.: 20 -猪笼草蛋白酶II氨基酸序

QSSSGIETPVYAGDGEYLMNVAIGTPDSSFSAIMDTGSDLIWTQCEPCTQCFSQPTPIFNP
QDSSSFSTLPCESQYCQDLPSETCNNNECQTYGYGDGSTTQGYMATETFETSSVPNI
AFGCGEDNQGFGQNGAGLIGMGWGPLSQLGVGQFSYCMTSYGSSSPSTLALGSA
ASGVPEGSPSTTLIHSSLNPTYYYITLQGITVGVDNLGIPSSTFQLQDDGTGGMIIDSGTTL
TYLPQDAYNAVAQAFTDQINLPTVDESSSGLSTCFQQPSDGSTVQVPEISMQFDGGVLN
LGEQNILISPAEGVICLAMGSSSQLGISIFGNIQQQETQVLYDLQNLAVSFVPTQCGAS

[0004] SEQ ID NO.: 21 -猪笼草蛋白酶I氨基酸序列

NGPSGVETSVYAGDGEYLMNLSIGTPAQPFSAIMDTGSDLIWTQCQPCTQCFNQSTPIFN
PQGSSSFSTLPCSSQLCQALSSPTCSNNFCQTYGYGDSETQGSMGTETLTFGSVSIPNI
TFGCGENNQGFGQNGAGLVGMGRGPLSQLDVTKFSYCMTPIGSSTPSNLLLGSIA
NSVTAGSPNTTLIQSSQIPTFYIITLNGLSVGSTRLPIDPSAFALNSNNGTGGIIIDSGTTLT
YFVNNAAYQSVRQEFIGQINLPVVNGSSSGFDLCFQTPSDPSNLQIPTFVMHFDDGDELPS
ENYFISPSNGLICLAMGSSSQGMSIFGNIQQQMLVVYDTGNSVVSFASAQCGAS

奇异状猪的猪笼草蛋白酶 I	MLNGPSGVETPVYAGD-----GEYLNLNISIG-----TQAQPFSAIMDTGSDIINTQCEPC-TQCFNSQPTPIFNP-----QDSSSFESTLPCSSQLCQALQSPT
翼状小猪的猪笼草蛋白酶 I	MLNGPSGVETPVYAGD-----GEYLNLNISIG-----TQAQPFSAIMDTGSDIINTQCEPC-TQCFNSQPTPIFNP-----QDSSSFESTLPCSSQLCQALQSPT
翼状小猪的猪笼草蛋白酶 II	MLNGPSGVETPVYAGD-----GEYLNLNISIG-----TQAQPFSAIMDTGSDIINTQCEPC-TQCFNSQPTPIFNP-----QDSSSFESTLPCSSQLCQALQSPT
小猪的猪笼草蛋白酶 I	MLQSSSGIETPVYAGS-----GEYLMNVNIAIG-----TPASSLSAINTDTGSDIINTQCEPC-TQCFNSQPTPIFNP-----QDSSSFESTLPCESQYCDLIPSES
小猪的猪笼草蛋白酶 II	MLQSSSGIETPVYAGS-----GEYLMNVNIAIG-----TPDSSLSAINTDTGSDIINTQCEPC-TQCFNSQPTPIFNP-----QDSSSFESTLPCESQYCDLIPSET
玉米猪的猪笼草蛋白酶 I	LAESDRTSTIVSARTRKDLPNGEYLMTLAIG-----TPPLPYAAVADTGSDIINTQCAPCGTCFEQPAPLYNP-----ASSTTFSVLPCHSSLSMCAGALA
玉米猪的猪笼草蛋白酶 II	YGSTAQAQRERERPGMAVRSGDLEYIDLAVG-----TPPQQTITALLDTGSDIINTQCDTC-TACLRQDPPLFSP-----RMSSSYEPMRCAQGLCDILHHS
水稻猪的猪笼草蛋白酶 I	GGENGGQQSQDPAATN-----TGMYVL5FSVG-----TPRPQWVTVGWDITSDFEW/MQCSACATCGADAATAPSAPPYAFSLSTREVRCANRGQRLVPQT
水稻猪的猪笼草蛋白酶 II	AAYSDGRHEGRVSTD-----ASYLIITFYLGNQRKPEDNIAWVDTGSDIINTTEKECSRSTSMPCCSP-----KCEQRASCGGRSELKA
玉米猪的猪笼草蛋白酶 I	-----CSNNISQCQTYGYGDGETTQGSIMGTETLTFGS-----VSIPNITFGCGE-MNOQFGQGNGAGLVGMGRGPLSLPSOLDVTKFSYCMTPIGSS-
玉米猪的猪笼草蛋白酶 II	-----CSNNISQCQTYGYGDGETTQGSIMGTETLTFGS-----VSIPNITFGCGE-MNOQFGQGNGAGLVGMGRGPLSLPSOLDVTKFSYCMTPIGSS-
小猪的猪笼草蛋白酶 I	-----CSNNIFCQTYGYGDGETTQGSIMGTETLTFGS-----VSIPNITFGCGE-MNOQFGQGNGAGLVGMGRGPLSLPSOLDVTKFSYCMTPIGSS-
小猪的猪笼草蛋白酶 II	-----CYN-DCYTYGYGDGSTQGYMATETFET-----SSVPIIAFGCGE-DNQGFGQGNGAGLIGMGNGGPLSLPSQLGVQFSYCMTSQGSSS-
玉米猪的猪笼草蛋白酶 I	-----CNNNECQTYGYGDGSTTQGYMATETFET-----SSVPIIAFGCGE-DNQGFGQGNGAGLIGMGNGGPLSLPSQLGVQFSYCMTSQGSSS-
玉米猪的猪笼草蛋白酶 II	-----GAAPPGCACMYYQTGTG-WTAGWQGSESETFTFGSSA-----ADQARVPGVAFGCSN-ASSSDWNG-SAGLVGLGRGSLSLVSQLGAGRFESYCLTPQDNTN
玉米猪的猪笼草蛋白酶 I	---CVRPDTCIYRYSYGDGTITLGYAATERFTFASSS-----GETQSVP-LGFEGCGT-MNWG-SLNNASGIVFGRDPLSLYSQLSTRRESYCLTPYASS-
玉米猪的猪笼草蛋白酶 II	CSADDSPCGYSVYGGGAANTTAGLLAYDAFAAT-----DIGGVIGLGRGELSPVSQLQIGRESYYLAPDDAVD
玉米猪的猪笼草蛋白酶 I	EAEEKTKCTYAIYGGNANDSTAGVWYEDKLTIVAVASKAVPSSQSFKEVATG5TSATTLFKDPSIKGVFLGRSATSLPRQLNFSKFSYCLSSYQEPD
玉米猪的猪笼草蛋白酶 II	

图 1

图1(续)

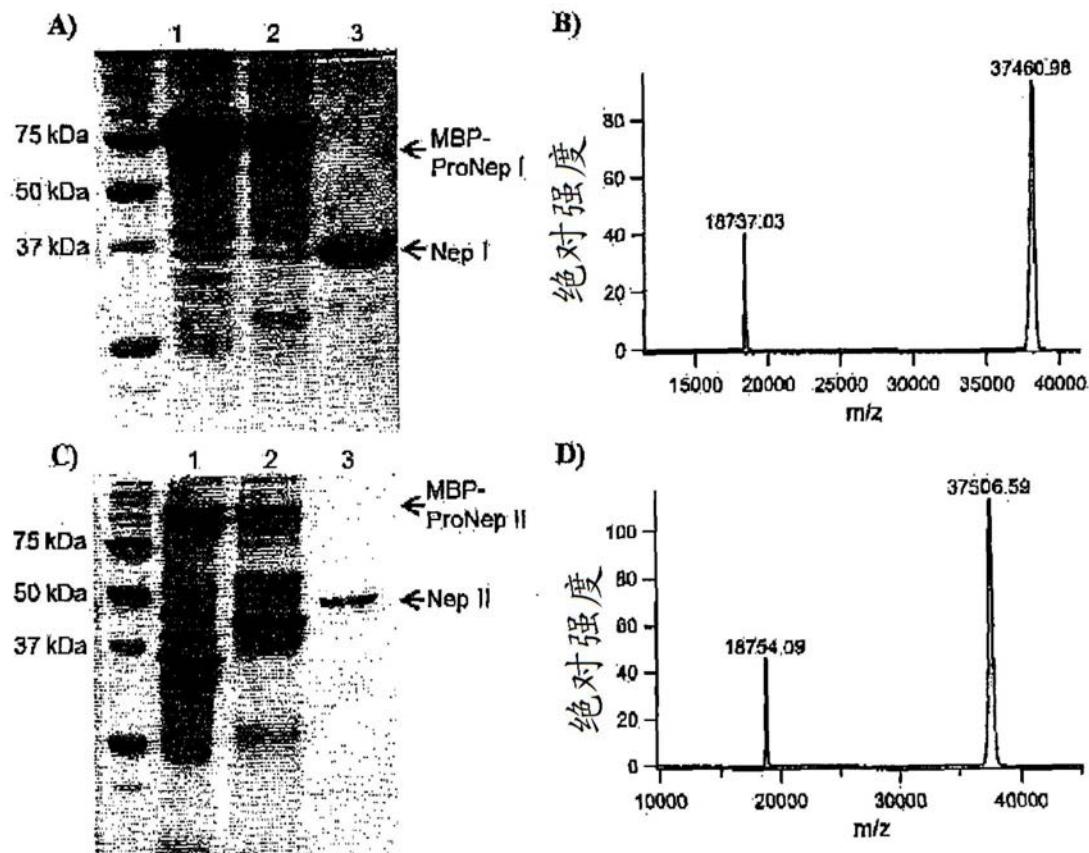


图2

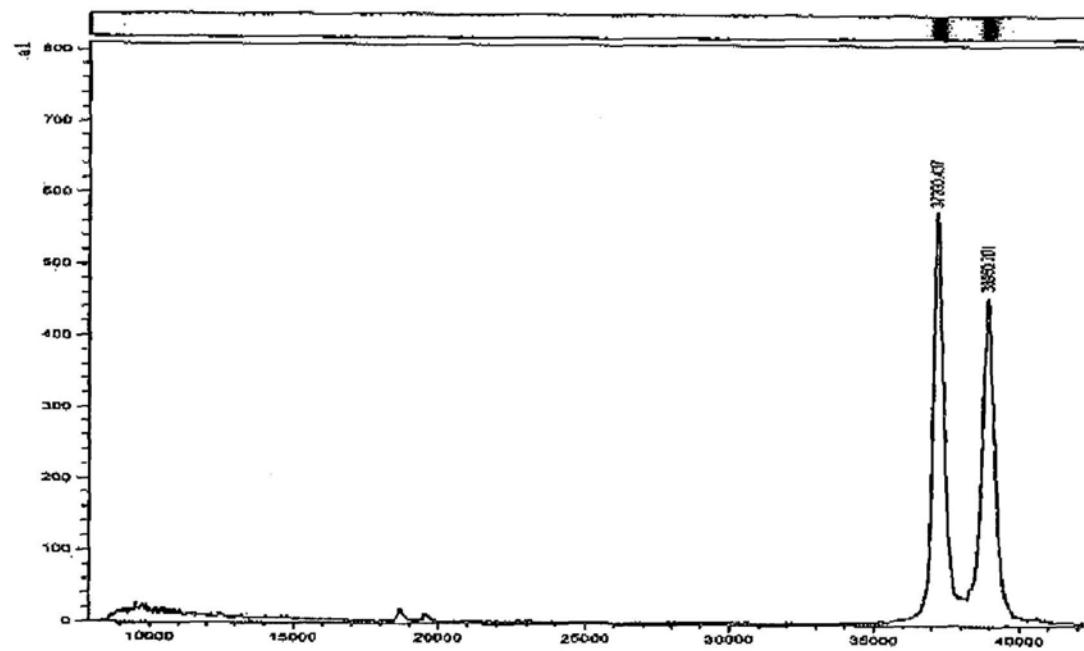


图3

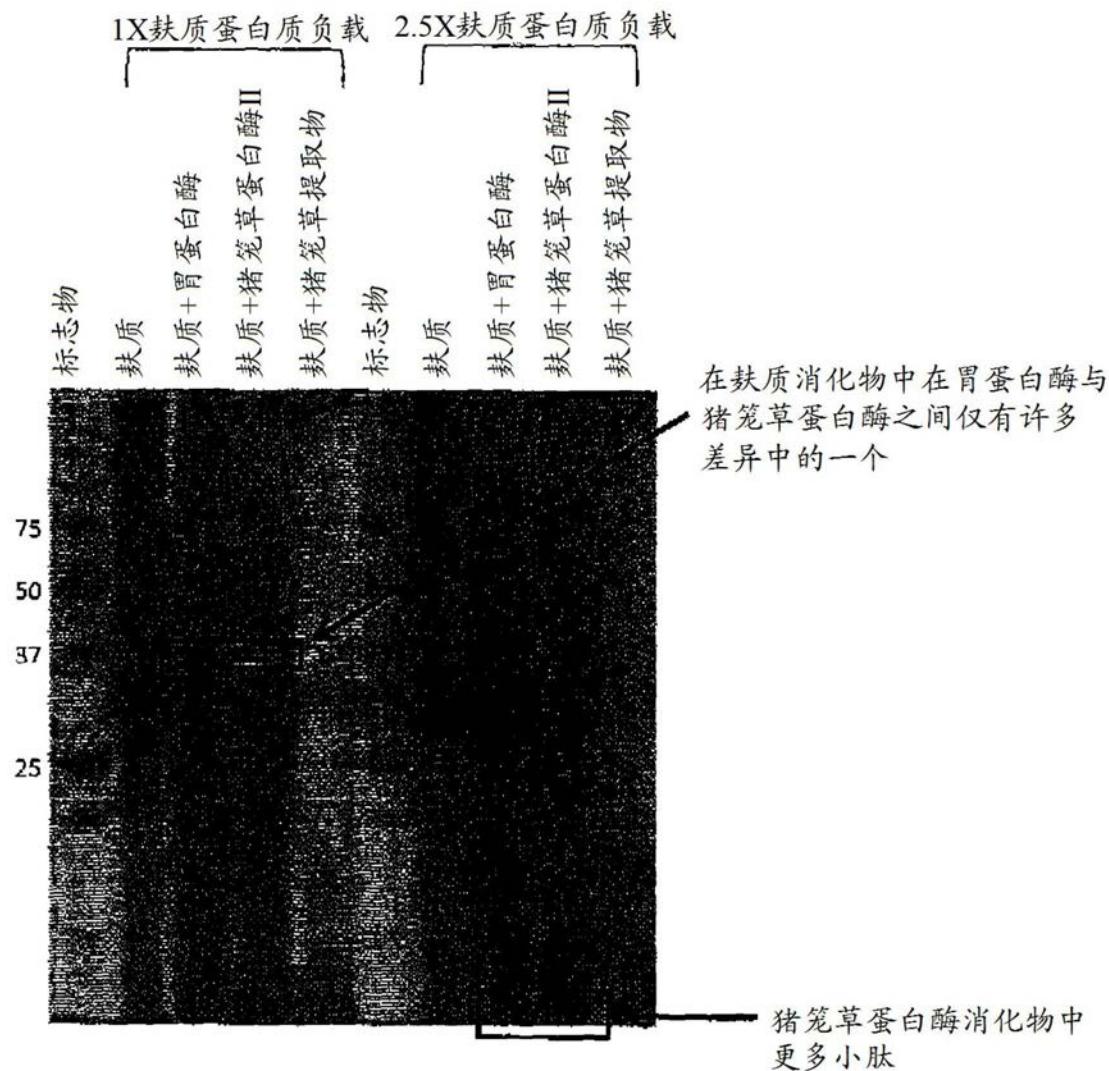


图4

200 μg NepI 40 μg NepI 胃蛋白酶 40 μg NepII 200 μg NepII

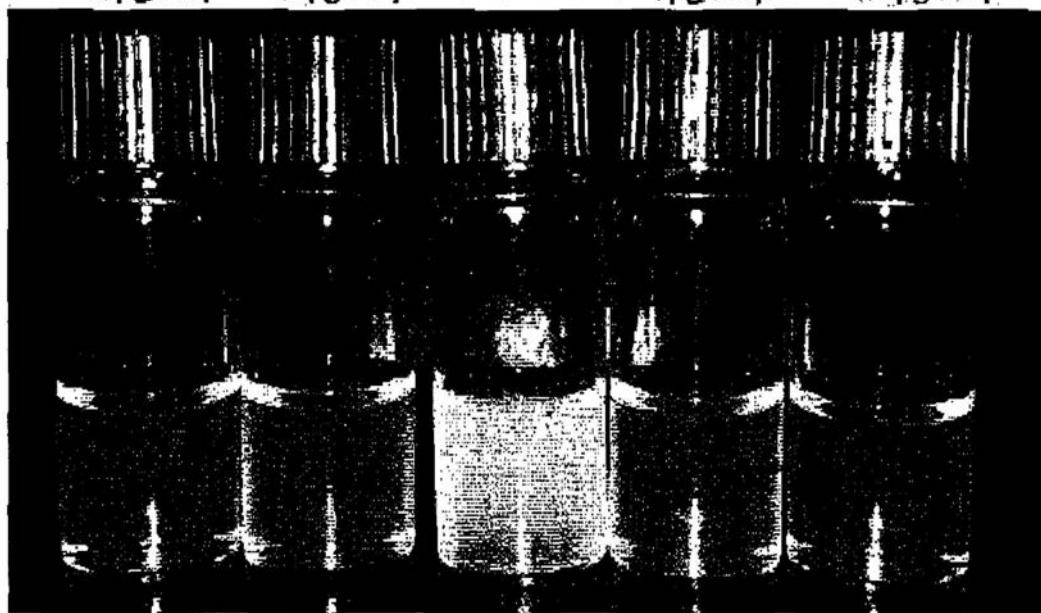


图5A

100 μg Nep流体 20 μg Nep流体 5 μg Nep流体 胃蛋白酶

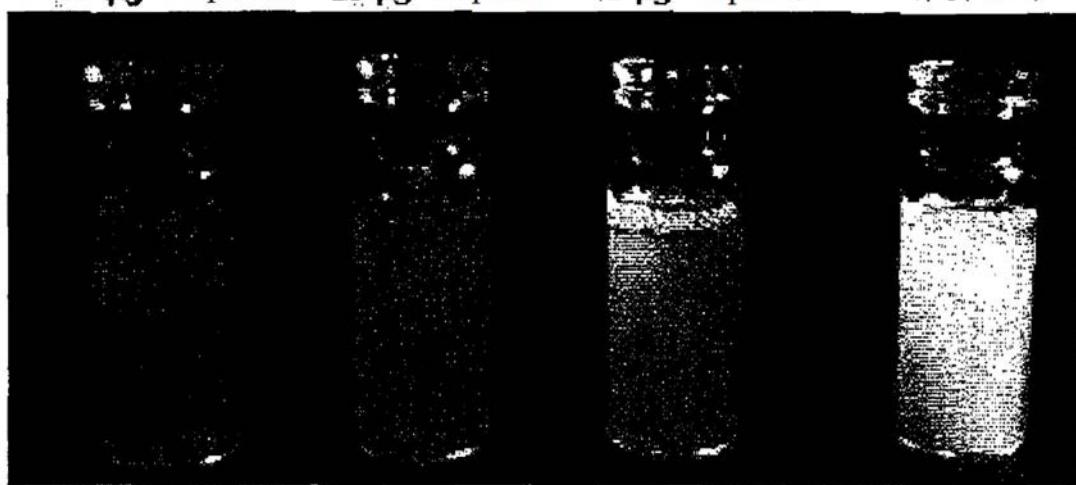


图5B

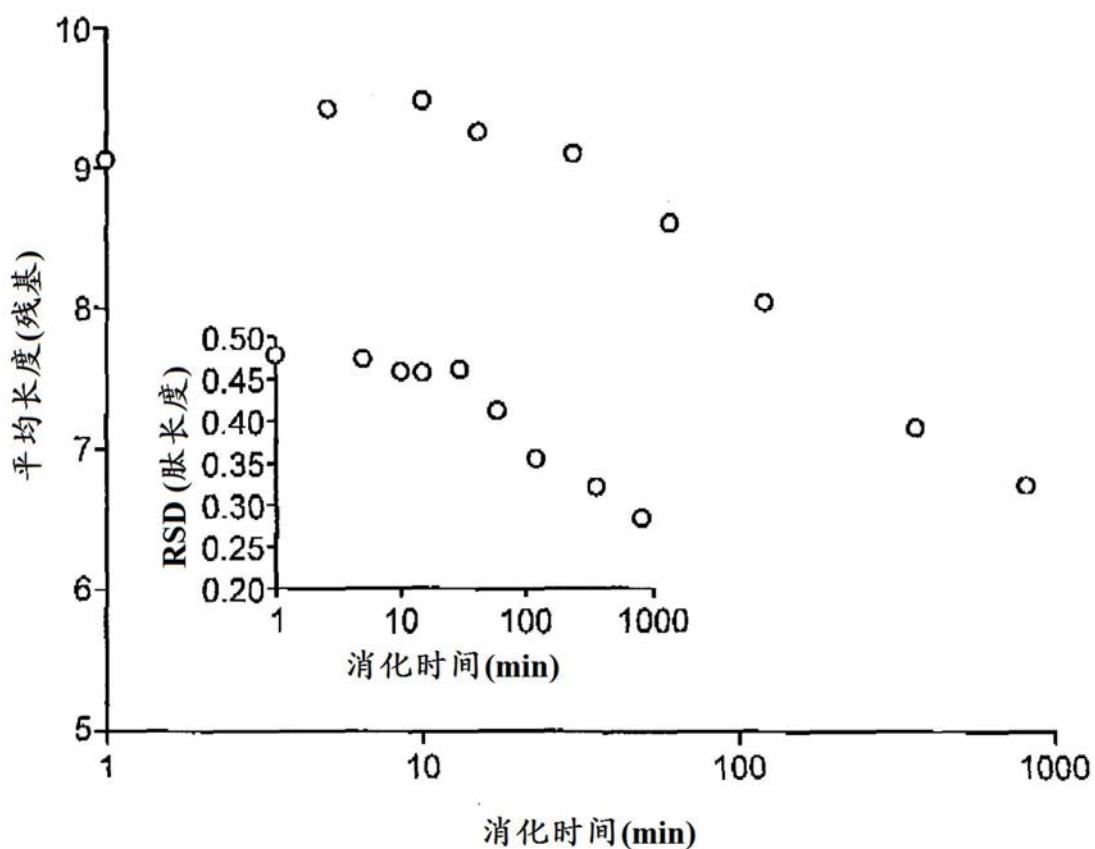


图6

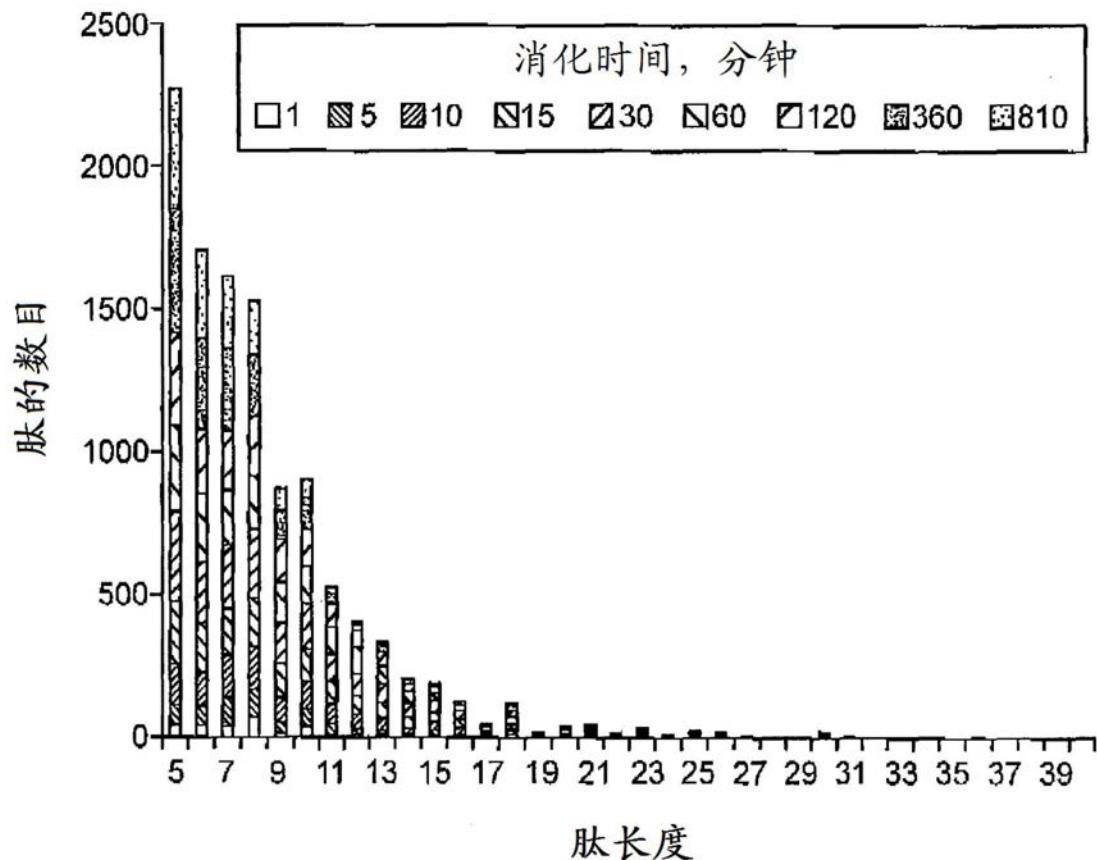


图7

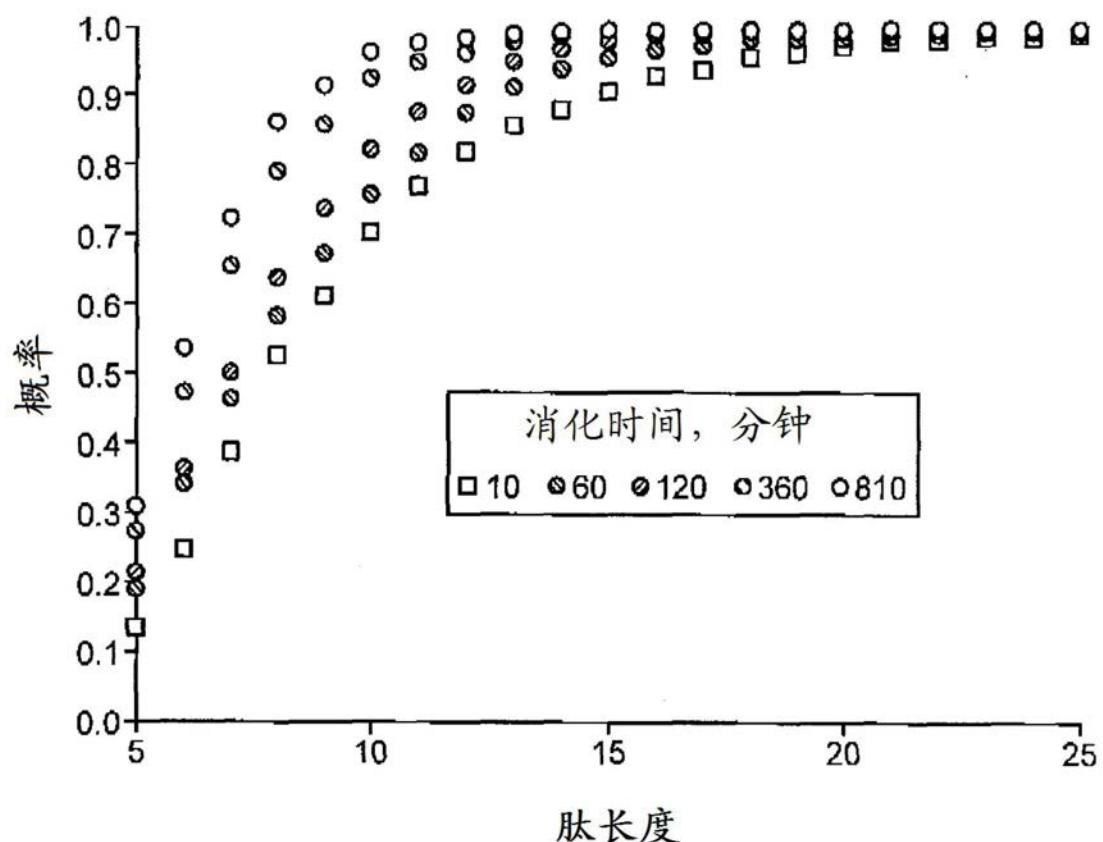


图8

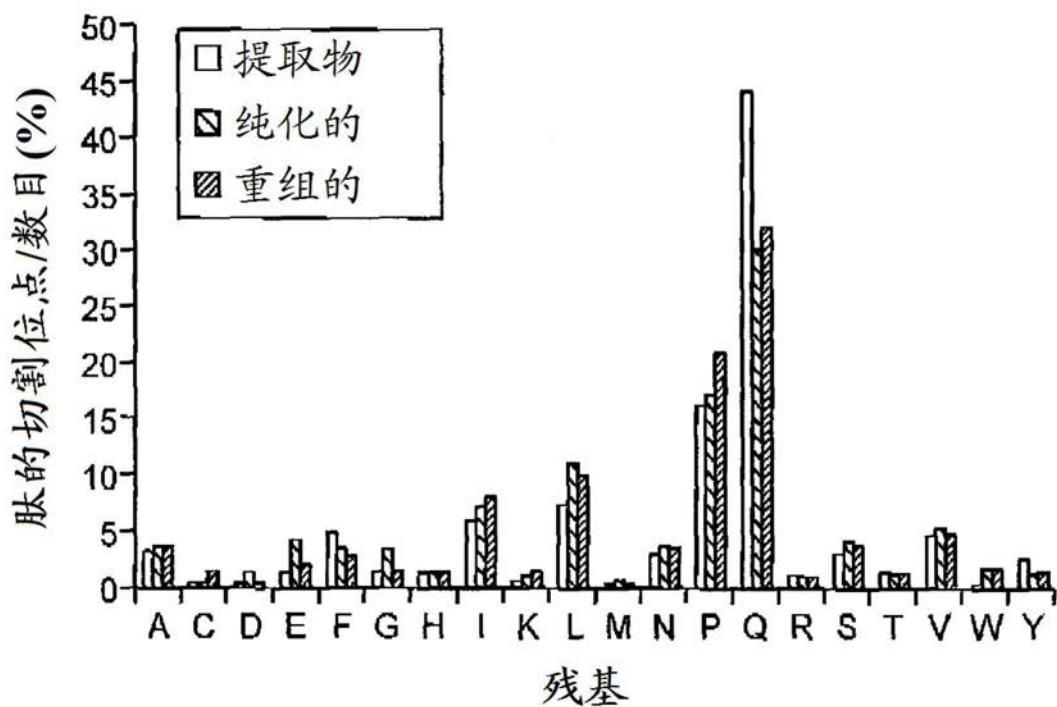
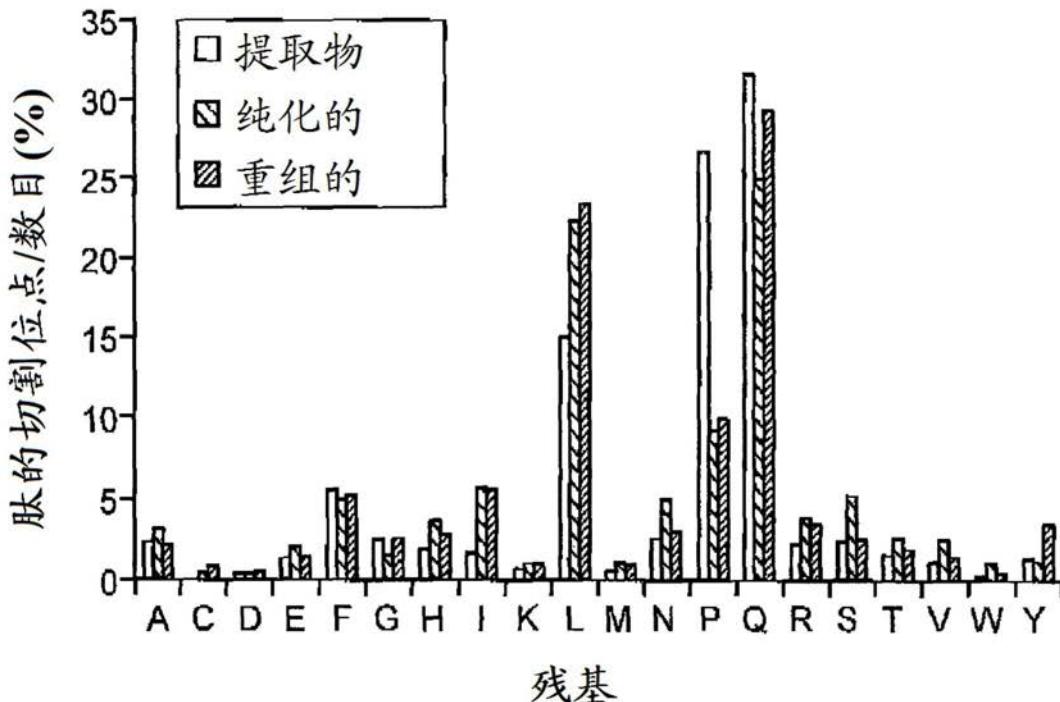
A**B**

图9

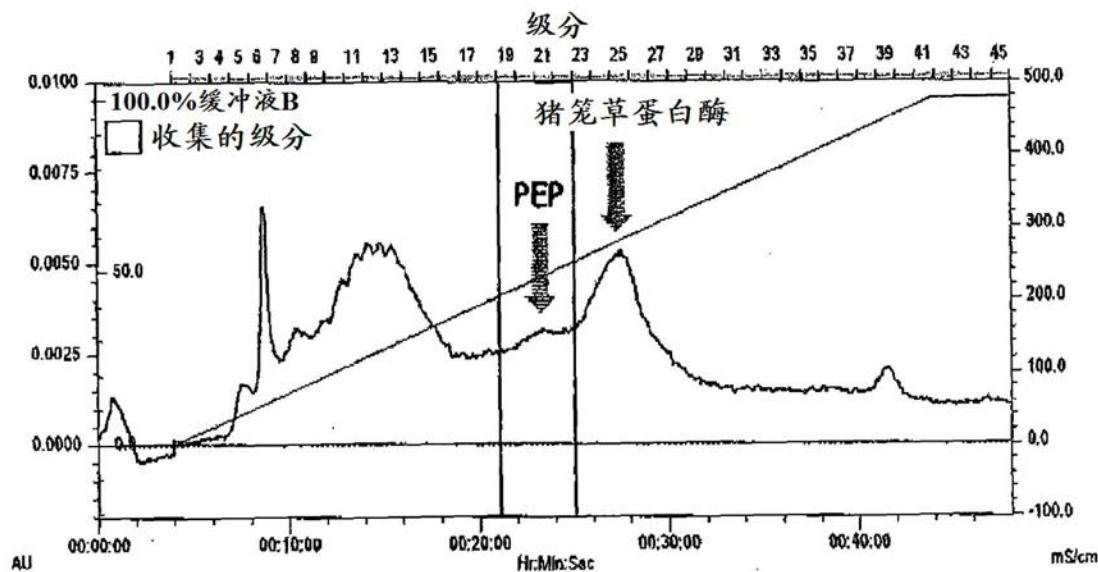


图10

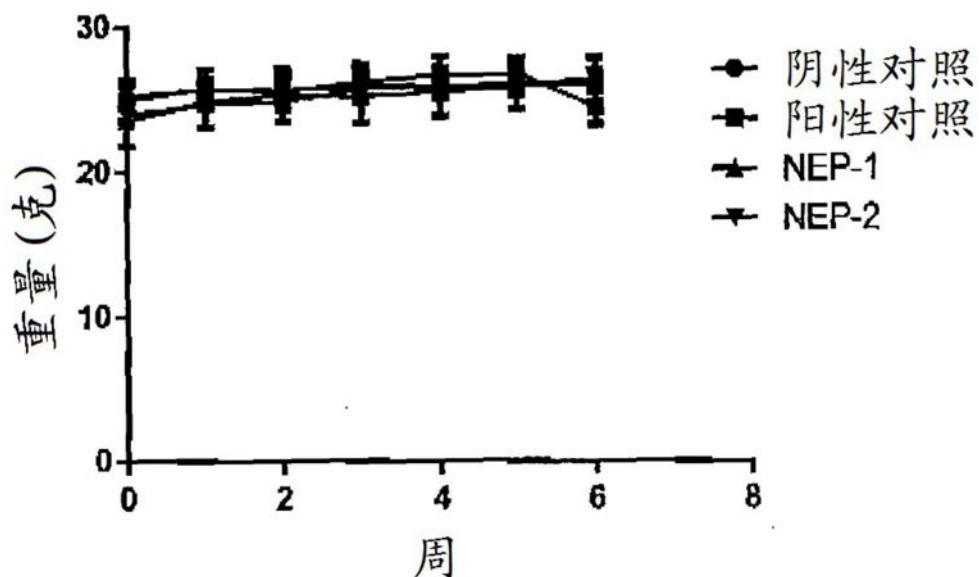


图11

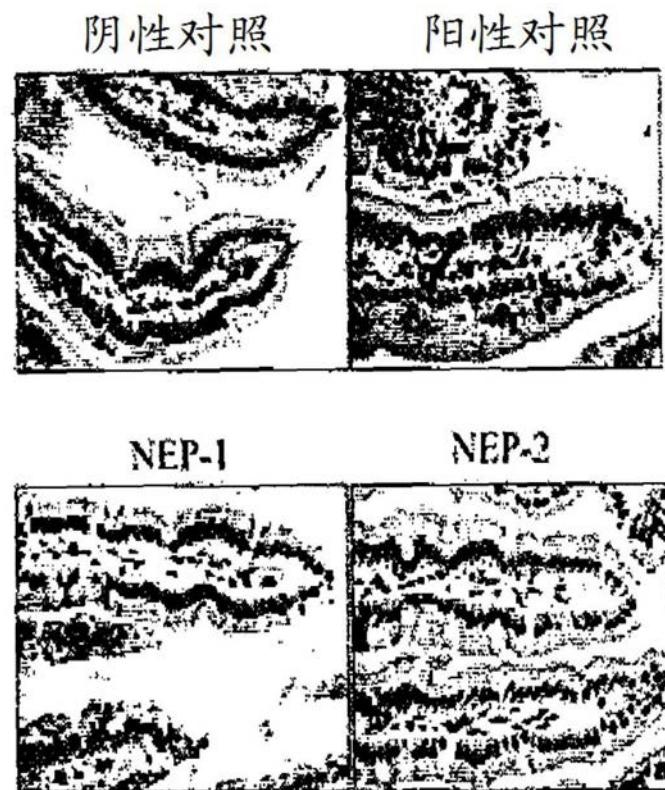


图12

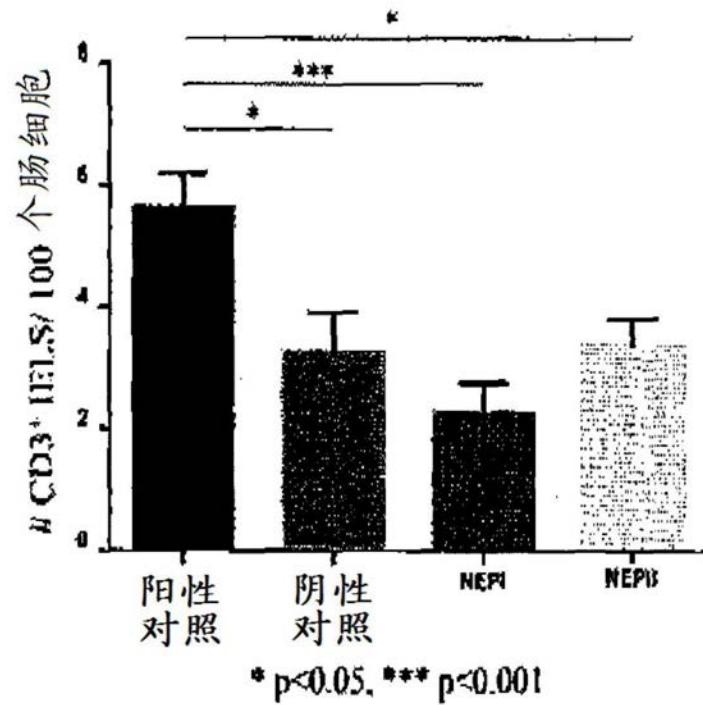


图13

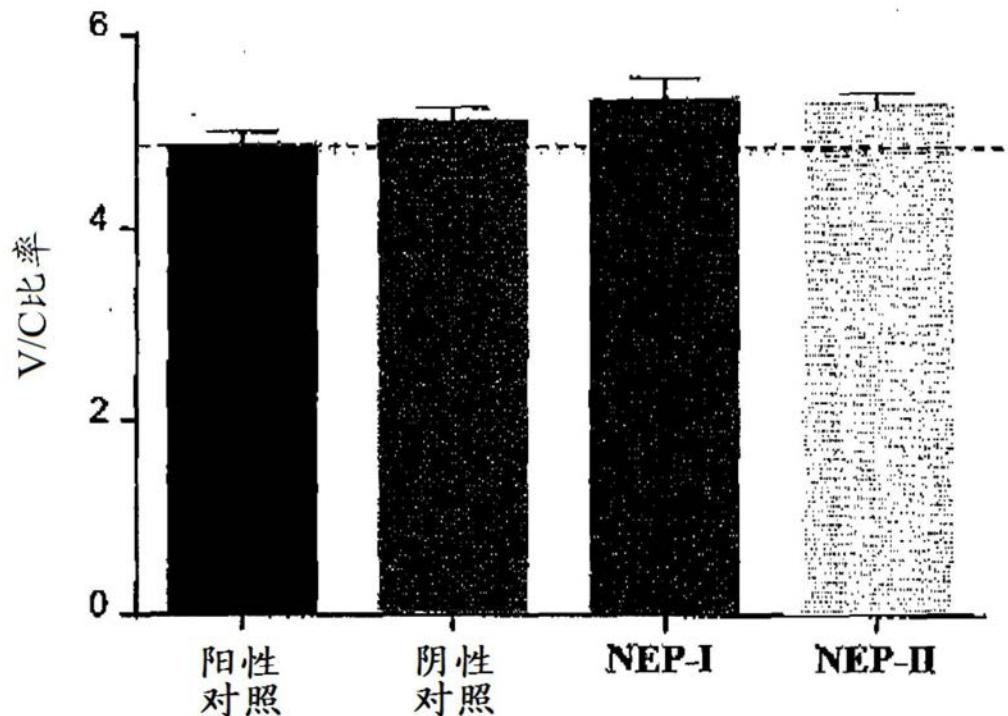


图14

蛋白质序列覆盖率：61%
匹配肽以红色粗体显示。

```

1 MKTFLILALL AIVATTATTA VRVFPVPQLQP QNPSQQQFQE QVPZVQQQQF
51 PQQQQQQFFPQ QPYFPQPQPFPP SQQFYLQLQP FPQFPQPFPPQ LPYPQPOFPP
101 PQQPYPPQQFQ QYLQPQOBIS QQQAQQQQQQ QQQQQQQQQI LGGILGQQLI
151 PCRDVVVLQQH NIAHASQVL QQSTYQLLQQ LCCQQQLLQIP EQSQCQAIHN
201 VAHAIIIMHQQ QQQQQEQKQQ LQQQQQQQQQ LQQQQQQQQQ QPSSQVSEQQ
251 PQQQYQSSQV SFQPSQLNPQ AGGSVQPOQL PQFAEIRNL AQTLPAMCNV
301 YIPPHCSTTI AFFGISGTN

```

图15A

查询	开始 - 结束	观察的 Mr(期望值)	Mr(计算值)	ppm	M	评分	期望值	秩次	U	肽
d60	21 - 26	533.7101	665.4216	663.4225	-1.21 0	30	0.0011	1	A.	VRVTPVP.Q
d61	21 - 26	533.7104	665.4222	663.4225	-0.31 0	30	0.0011	1	A.	VRVTPVP.Q
d179	21 - 27	397.7472	793.4798	793.4810	-1.49 0	28	0.0018	1	A.	VRVTPVPQ.L
d180	21 - 27	397.7476	793.4806	793.4810	-0.49 0	32	0.00064	1	A.	VRVTPVPQ.L
d400	21 - 28	454.2898	906.5650	906.5651	-0.051 0	38	0.00016	1	A.	VRVTPVPQL.Q
d591	21 - 30	566.8454	1131.6762	1131.6764	-0.17 0	35	0.00031	1	A.	VRVTPVPQLQP.Q
d592	21 - 30	566.8456	1131.6766	1131.6764	0.19 0	37	0.00021	1	A.	VRVTPVPQLQP.Q
d593	21 - 30	566.8456	1131.6766	1131.6764	0.19 0	37	0.0002	1	A.	VRVTPVPQLQP.Q
d1126	21 - 31	630.8743	1259.7340	1259.7330	-0.77 0	30	0.0011	1	A.	VRVTPVPQLQPQ.N
d1445	21 - 33	491.2039	1470.8299	1470.8307	-0.57 0	24	0.0037	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP.S
d1446	21 - 33	736.4225	1470.8304	1470.8307	-0.17 0	37	0.00022	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP.S
d1447	21 - 33	491.2041	1470.8303	1470.8307	-0.16 0	24	0.004	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP.S
d1448	21 - 33	736.4227	1470.8308	1470.8307	0.098 0	38	0.00016	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP.S
d1449	21 - 33	736.4230	1470.8314	1470.8307	0.51 0	43	5.4e-005	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP.S
d1450	21 - 33	736.4232	1470.8318	1470.8307	0.78 0	37	0.00021	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP.S
d1946	21 - 38	680.7040	2039.0902	2039.0912	-0.52 0	36	0.0012	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP\$QQQP.Q
d1947	21 - 38	680.7043	2039.0911	2039.0912	-0.078 0	25	0.0039	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP\$QQQP.Q
d1948	21 - 38	680.7045	2039.0917	2039.0912	0.22 0	30	0.001	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP\$QQQP.Q
d1949	21 - 38	680.7047	2039.0923	2039.0912	0.51 0	32	0.00075	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP\$QQQP.Q
d1950	21 - 38	1020.5536	2039.0926	2039.0912	0.69 0	27	0.0022	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP\$QQQP.Q
d1951	21 - 38	1020.5545	2039.0944	2039.0912	1.58 0	25	0.0036	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP\$QQQP.Q
d1952	21 - 38	1020.5551	2039.0956	2039.0912	2.17 0	20	0.01	1	A.	VRVTPVPQLQPQNP\$QQQP.Q
d222	27 - 33	412.7167	823.4188	823.4188	0.049 0	24	0.0049	1	P.	QLQPQMP.S
d1304	27 - 38	686.6469	1391.6792	1391.6793	-0.064 0	22	0.0086	1	P.	QLQPQNP\$QQQP.Q
d926	29 - 38	576.2766	1150.5386	1150.5367	1.76 0	36	0.00039	1	L.	QPQNP\$QQQP.Q
d927	29 - 38	576.2771	1150.5396	1150.5367	2.56 0	35	0.00050	1	L.	QPQNP\$QQQP.Q
d928	29 - 38	576.2772	1150.5390	1150.5367	2.74 0	43	8.9e-005	1	L.	QPQNP\$QQQP.Q
d929	29 - 38	576.2773	1150.5404	1150.5367	3.26 0	24	0.0066	1	L.	QPQNP\$QQQP.Q
d334	31 - 38	463.7203	925.4260	925.4254	0.75 0	42	0.00017	1	P.	QNP\$QQQP.Q
d435	31 - 38	463.7204	925.4262	925.4254	0.97 0	34	0.00095	1	P.	QNP\$QQQP.Q
d74	39 - 43	300.6529	599.2912	599.2915	-0.40 0	17	0.010	1	P.	QEQVP.I
d55	39 - 43	300.6532	599.2918	599.2915	0.60 0	21	0.0082	1	P.	QEQVP.I
d6	39 - 43	300.6533	599.2920	599.2915	0.93 0	16	0.025	1	P.	QEQVP.I
d7	39 - 43	300.6533	599.2920	599.2915	0.93 0	20	0.01	1	P.	QEQVP.I
d369	39 - 44	557.1943	712.3740	712.3755	-2.11 0	26	0.0023	1	P.	QEQVP.L.V
d137	42 - 48	406.2971	810.4596	810.4600	-0.39 0	26	0.003	1	Q.	VPLVGQQ.Q
d363	44 - 50	445.7400	889.4654	889.4650	-0.37 0	16	0.03	1	P.	LVQQQQPF.P
d564	44 - 51	494.2657	986.5160	986.5105	-1.71 0	16	0.023	1	P.	EVQQQQPF.G

图15B

查询	开始 - 结束	观察的 Mr(期望值)	Mr(计算值)	ppm M	评分	期望值	秩次	U	肽
w585	44 - 51	494.2664	986.5182	986.5185	-0.29 0	23	0.0055	1	P.LVQQQQFP.G
w586	44 - 51	494.2665	986.5184	986.5185	-0.092 0	24	0.0042	1	P.LVQQQQFP.G
w1286	44 - 59	633.3234	1896.9484	1896.9483	0.052 0	30	0.0012	1	P.LVQQQQFPGQQQQFP.P.Q
w1887	44 - 59	633.3239	1896.9498	1896.9483	0.84 0	18	0.021	1	P.LVQQQQFP.G
w164	46 - 51	388.1900	774.3654	774.3661	-0.79 0	20	0.022	1	V.QQQQFP.G
w165	46 - 51	388.1901	774.3656	774.3661	-0.53 0	22	0.013	1	V.QQQQFP.G
w167	46 - 51	388.1903	774.3660	774.3661	-0.013 0	22	0.016	1	V.QQQQFP.G
w49	47 - 51	324.1609	646.3072	646.3075	-0.36 0	19	0.047	1	Q.QQQFP.G
w50	47 - 51	324.1609	646.3072	646.3075	-0.36 0	18	0.056	1	Q.QQQFP.G
w51	47 - 51	324.1609	646.3072	646.3075	-0.36 0	21	0.029	1	Q.QQQFP.G
w1139	49 - 59	651.3184	1300.6222	1300.6201	1.69 0	17	0.024	1	Q.QQQFPQQQQFP.Q
w324	54 - 60	436.7163	871.4180	871.4188	-0.89 0	14	0.16	2	Q.QQQFPQ.Q
w542	55 - 62	485.2424	968.4702	968.4716	-1.38 0	20	0.058	5	Q.QQQFPQGP.Y
w543	55 - 62	485.2426	968.4706	968.4716	-0.97 0	14	0.24	7	Q.QQQFPQGP.Y
w545	55 - 62	485.2428	968.4710	968.4716	-0.56 0	20	0.069	6	Q.QQQFPQGP.Y
w32	60 - 64	316.6554	631.2962	631.2966	-0.51 0	21	0.044	1	P.QQYPY.P
w34	60 - 64	316.6555	631.2964	631.2966	-0.19 0	25	0.021	1	P.QQYPY.D
w140	60 - 65	380.6855	759.3564	759.3551	1.71 0	17	0.053	1	P.QQYPY.Q
w302	60 - 66	429.2106	856.4066	856.4079	-1.48 0	15	0.11	1	P.QQYPY.Q
w303	60 - 66	429.2112	856.4078	856.4079	-0.076 0	22	0.019	2	P.QQYPY.Q
w738	60 - 68	543.7669	1081.5192	1081.5193	-0.0083 0	33	0.0016	1	P.QQYPYQP.Q.P
w1077	60 - 69	615.3012	1228.5878	1228.5877	0.14 0	26	0.0056	1	P.QQYPYQPQPF.P
w1350	60 - 71	707.3434	1412.6722	1412.6725	-0.16 0	40	0.00034	1	P.QQYPYQPQPF.F.Q
w1802	60 - 74	863.9276	1765.8408	1765.8424	-0.99 0	28	0.027	1	P.QQYPYQPFPSSQQF.Y
w935	65 - 74	577.2856	1152.5566	1152.5564	0.23 0	17	0.067	2	P.QQQPPFSQQP.Y
w437	67 - 74	464.7300	927.4454	927.4450	0.44 0	28	0.0045	1	P.QQQPSQQP.Y
w438	67 - 74	464.7302	927.4458	927.4456	0.87 0	30	0.0026	1	P.QQQPSQQP.Y
w1594	72 - 84	528.6124	1882.6154	1882.6144	0.63 0	23	0.0046	1	S.QQQYQLQQLPFPQ.P.Q
w1597	72 - 84	792.4166	1582.8186	1582.8184	2.70 0	19	0.012	1	S.QQQYQLQQLPFPQ.P.Q
w1416	73 - 84	728.3838	1454.7530	1454.7538	-1.99 0	15	0.046	1	Q.QTYLQLQFPFP.P.Q
w1079	75 - 84	615.6306	1229.6466	1229.6445	1.78 0	41	0.00011	1	P.YLQLQFPFP.Q
w1080	75 - 84	615.6311	1229.6476	1229.6445	2.60 0	29	0.0018	1	P.YLQLQFPFP.Q
w764	76 - 84	534.2983	1066.5820	1066.5811	0.86 0	33	0.0007	1	Y.LQPFQFP.Q
w227	76 - 84	413.7264	825.4382	825.4385	-0.30 0	33	0.00063	1	Q.LQPFQFP.Q
w228	78 - 84	413.7272	825.4398	825.4385	1.64 0	34	0.00078	1	Q.LQPFQFP.Q
w98	79 - 84	357.1844	712.3542	712.3544	-0.26 0	21	0.051	1	L.QPFQFP.Q
w1155	79 - 89	640.3262	1278.6378	1278.6397	-1.47 0	39	0.0003	1	U L.QPFQQPQFPFP.Q
w1156	79 - 89	640.3282	1218.6418	1218.6397	1.66 0	31	0.0018	1	U L.QPFQQPQFPFP.Q
w1307	81 - 92	696.8708	1391.7270	1391.7236	2.34 0	14	0.077	1	U P.FFPQFPFPQLP.Y
w377	90 - 96	421.7240	841.4334	841.4334	0.063 0	20	0.03	1	P.QLYPQ.P.Q
w272	90 - 96	421.7242	841.4338	841.4334	0.54 0	20	0.025	1	P.QLYPQ.P.Q
w1327	90 - 101	659.8577	1397.7008	1397.6980	2.07 0	16	0.042	1	P.QLYPQQPQFPFP.Q
w356	102 - 108	444.7143	887.4140	887.4137	0.36 0	36	0.00035	1	P.QQYPQQQ.Q
w357	102 - 110	557.2696	1112.5246	1112.5251	-0.38 0	49	2.6e-005	1	P.QQYPQQQP.Q
w858	102 - 110	557.2698	1112.5250	1112.5251	-0.020 0	54	5e-006	1	P.QQYPQQQP.Q
w577	103 - 110	493.2399	984.4632	984.4665	-3.30 0	25	0.0085	2	Q.QYFPQQQ.P.Q
w578	103 - 110	493.2394	984.4642	984.4665	-2.38 0	22	0.014	3	Q.QYFPQQQ.P.Q
w572	111 - 115	324.6718	647.3290	647.3279	1.83 0	15	0.065	1	U P.QLYPQ.P.Q
w506	116 - 123	478.7443	955.4740	955.4723	1.82 0	14	0.076	1	P.QQPI8QQQ.A
w507	116 - 123	478.7444	955.4742	955.4723	2.03 0	28	0.0032	1	P.QQPI8QQQ.A
w681	116 - 124	514.2623	1026.5100	1026.5094	0.62 0	30	0.0013	1	P.QQPI8QQQ.A
w682	116 - 124	514.2626	1026.5106	1026.5094	1.20 0	33	0.00082	1	P.QQPI8QQQ.A
w1347	116 - 127	706.3503	1410.6860	1410.6852	0.64 0	21	0.015	1	P.QQPI8QQQAAQ.Q
w2068	115 - 138	940.7863	2819.9371	2819.3295	2.68 0	22	0.009	1	P.QQPI8QQQAAQQQQQQQQQ.Q
w851	138 - 146	556.3278	1110.6410	1110.6397	1.22 0	14	0.13	1	Q.QQIQLQIL.Q
w301	139 - 145	428.2692	854.5238	854.5225	1.53 0	24	0.004	1	Q.QIIQQIL.Q
w687	227 - 234	514.7601	1027.5054	1027.5047	0.95 0	16	0.077	1	Q.QQQQQLQ.Q
w1314	232 - 242	698.8342	1395.6538	1395.6491	3.40 0	16	0.039	1	L.QQQQQQQQQQ.P.S
w1464	232 - 243	742.3493	1482.6840	1482.6811	1.96 0	17	0.02	1	L.QQQQQQQQQQGSWS.S
w1140	233 - 242	634.8032	1267.5918	1267.5905	1.04 0	13	0.055	1	Q.QQQQQQQQQQF.S
w419	244 - 251	460.7264	919.4382	919.4400	-1.86 0	32	0.00068	1	S.SQVSPQGP.Q
w420	244 - 251	460.7265	919.4384	919.4400	-1.54 0	48	1.6e-005	1	S.SQVSPQGP.Q
w381	248 - 254	452.2192	902.4238	902.4246	-0.87 0	22	0.0058	1	S.SQVSPQGP.Q
w533	252 - 259	483.2206	964.4266	964.4250	1.69 0	18	0.018	1	P.QQYYPSSQVSEFQES.Q
w534	252 - 259	483.2208	964.4270	964.4250	2.10 0	24	0.0042	1	P.QQYYPSSQVSEFQES.Q
w535	252 - 259	483.2208	964.4270	964.4250	2.10 0	17	0.021	1	P.QQYYPSSQVSEFQES.Q
w1520	252 - 264	762.3596	1522.7046	1522.7052	-0.38 0	14	0.11	1	U P.QQYYPSSQVSEFQES.Q
w1646	252 - 265	805.8761	1609.7376	1609.7373	0.24 0	36	0.00099	1	U P.QQYYPSSQVSEFQES.Q
w1962	252 - 269	698.3322	2061.3748	2061.3756	-0.39 0	46	5.1e-005	1	U P.QQYYPSSQVSEFQES.Q
w867	260 - 269	558.7982	1115.5616	1115.5611	0.65 0	27	0.002	1	U Q.VBFPQSQLNP.Q
w1586	263 - 277	769.8979	1577.7912	1577.7798	0.93 0	26	0.0026	1	U F.QPSQLNPQDQGSVQF.Q
w1261	265 - 277	677.3416	1352.6686	1352.6684	0.15 0	36	0.00038	1	U F.SQIWPQAGQSVQF.Q
w1138	266 - 277	633.8250	1265.6354	1265.6364	-0.76 0	80	1.5e-008	1	U S.DLMFQJNQGSVQF.Q
w674	268 - 277	513.2538	1024.4930	1024.4938	-0.71 0	54	8e-006	1	L.NPQAQGSVQF.Q
w410	269 - 277	456.2332	910.4518	910.4509	1.10 0	42	0.00011	1	N.PQAQGSVQF.Q
w202	270 - 277	407.1069	813.3992	813.3981	1.43 0	15	0.094	1	P.QAAGGSVQF.Q
w203	270 - 277	407.7071	813.3996	813.3981	1.92 0	39	0.00038	1	P.QAAGGSVQF.Q

图15B (续)

查询	开始 - 结束	观察的Mr(期望值)	Mr(计算值)	ppm	M	评分	期望值	秩次	U	肽
d204	270 - 277	407.7072	813.3998	813.3981	2.16 0	26	0.006	1		P.QAQGSVQF.Q
d205	270 - 277	407.7072	813.3998	813.3981	2.16 0	37	0.00047	1		P.QAQGSVQF.Q
d206	270 - 277	407.7072	813.3998	813.3981	2.16 0	38	0.00038	1		P.QAQGSVQF.Q
d17	278 - 282	307.1691	612.3236	612.3231	0.86 0	15	0.11	1		P.QQLPQ.P
d11	278 - 283	360.7031	759.3916	759.3915	0.14 0	24	0.0099	1		P.QQLPQ.F.A
d143	282 - 287	382.2074	762.4002	762.4024	-2.85 0	37	0.0002	1		P.QWAEIR.N
d331	282 - 288	439.2299	876.4452	876.4453	-0.11 0	32	0.00068	1		P.QFAEIRN.L
d601	282 - 289	495.7718	989.5290	989.5294	-0.36 0	37	0.00019	1		P.QFAEIRNL.A
d602	282 - 289	495.7720	989.5294	989.5294	0.044 0	28	0.0017	1		P.QFAEIRNL.A
d705	286 - 294	521.3239	1040.5332	1040.6342	-0.92 0	36	0.00024	1		S.IRNLAQTL.P
d319	288 - 295	435.2585	868.5024	868.5018	0.74 0	21	0.0072	1		R.NLAQTL.P.A
d320	288 - 295	435.2585	868.5024	868.5018	0.74 0	33	0.00051	1		R.NLAQTL.P.A
d41	290 - 295	321.6943	641.3740	641.3748	-1.20 0	25	0.0032	1		L.ALQTL.P

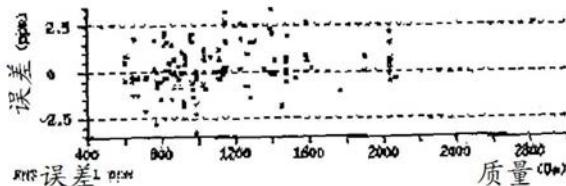


图15B (续)

NVEN	1	MQAKFFTFVILSSVVFNYPLAE[RE]SIQARLANKPKG[RE]	53
**			
NVEN	54	[RE]	113
* * * ^ * * *			
NVEN	114	[RE]IAYFYGNASLQGANATINIWEPNLKNPNGDFSLTQ	173
* * * ^ * * *			
NVEN	174	IWISAGSGSSLNTEAGWQVYPGRTGDSOPRFFLYWTADGYTSTGCYDLTCPGFVOTNNY	233
^ ^			
NVEN	234	YAIGMALQPSVYGGQQYELNESTQRDPATGNWWLYLWGTVVGYWPASIYNSITNGADTV	293
^ ^			
NVEN	194	WGGEIYDSSGTGGFHTTTQMGSGHFPTEGYGKASYVRDL	332
** ^ * * ^ * * *			
NVEN	333	QCVDTYGNVISPTANSFOGIAPAPNCNYQFOQQSSELYLFYGGPGCQ	380

^ 相似； * 非相似差异

[RE] - [RE] - 连接体 - DUF239 (156-387)

多态性证据：

21/380 ≈ 5.5% 总数

14/380 = 3.7% 非相似差异

图16